

Studies on thermostability and structure-function relationship in phosphatidylinositol-synthesizing *Streptomyces antibioticus* phospholipase D

DAMNJANOVIĆ Jasmina

ホスファチジルイノシトール(PI)はリン脂質の一種であり、動植物に広く存在している。PIには脂質代謝改善機能といった有用な生理機能が知られており、機能性脂素材として食品・薬品分野での応用が期待される物質である。従来、工業的にPIを製造法としては大豆レシチン等の天然物からの抽出に依存していた。ホスホリパーゼD(PLD)はリン脂質の極性基に作用してホスファチジン酸(PA)と水酸化化合物とに加水分解する酵素である。本酵素は加水分解に加えて反応系に水酸化化合物が存在するとその水酸基にリン脂質のホスファチジル基を転移する反応(transphosphatidylation)も触媒する。この反応を利用すると安価なレシチンとアルコールから様々なリン脂質を酵素的に合成する事が可能である。しかしながらPLDを用いてレシチンとイノシトールからPIを合成することが試みられたが、成功していなかった。

後に放線菌由来PLDを蛋白工学的に改変することでPI合成活性を有する改変型PLDが開発され、PIを安価なレシチンとイノシトールから酵素合成することが可能となった。しかし、開発されたPI合成型PLDによる合成では、そのPI収率が低いことが問題となった。イノシトールの水への溶解度は温度に大きく依存するため、高温下で反応を行うことで反応系内のイノシトール濃度を高めれば、PI収率の向上が期待される。そのためには酵素の耐熱性を高める必要があった。そこで本研究では蛋白工学によるPI合成型PLDの耐熱性向上を試みた。

本酵素の蛋白工学的改変に先立ち、リン脂質を正確に分離定量するためのHPLC分析条件を確立した。順相シリカゲルカラムを用い、検出器に荷電化粒子検出器(CAD)を用いる事で、PI、ホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、およびそれらのリゾ体の分離分析条件を最適化し、高感度分析法を確立した。類似の分析法は既報にも見られるが、それらは検出に蒸発光散乱検出器を使っている点や、リン脂質相互の分離において異なっている。今回確立した分析法は、ダイナミックレンジや定量限界、検出限界において優れていた。

次に、蛋白工学による耐熱性向上を試みた。本酵素の結晶構造の座標データからアミノ酸残基ごとのB-ファクター(温度因子)を算出し、その値が高い領域を7カ所選択した。B-ファクターの高い部分は相対的に構造揺らぎが大きいことを意味し、従って不安定である事が予想される。選択した各領域にそれぞれランダム変異を導入した変異PLDライブラリーを作製して組換え大腸菌で発現させ、耐熱性を指標としてス

クリーニングを行った。その結果、耐熱性の向上した3つの変異酵素、すなわち、D40H、T291Y および R329G を獲得した。これらの変異酵素ならびに3つの変異を掛け合わせた二重、三重変異酵素を作製して同様に発現、精製後、その酵素科学的な解析を行った。その結果、二重変異酵素 D40H/T291Y が高温下での失活半減期、CD スペクトルによる変性温度等において最も耐熱性が優れていた。これら耐熱化酵素を用いた高温下での PI 合成では、その収率を親酵素と比較して向上することができた。

D40 は酵素分子表面のループ (D40 ループ) 上にあり、そのループは二本の β ストランドを分断するような構造をしている。さらに、D40 ループによる分断のため、当該 β ストランドは捻れた歪な構造をしている。つまり、通常 β ストランドでは隣り合うアミノ酸残基の側鎖はストランドに対して互いに逆向きに配置されるのに対し、本酵素の W46 と L47 は同方向に配向している。D40 ループを構成する 9 アミノ酸を酵素分子から欠損させ、分断された二本の β ストランドを一本に連結し、捻れを解消することで、本酵素の安定性をさらに向上できるのではないかと考えた。そこで D40 ループ欠損型変異酵素として Δ D37-G45 と Δ A38-W46 の二つを作製した。 Δ D37-G45 変異体においては W46 の側鎖は親酵素の時と逆向きに配向する事が予想され、 Δ A38-W46 変異体では W46 は消失する。両変異酵素とも組換え大腸菌で可溶性蛋白として菌体外に発現し、PI 合成活性を維持していた。このことから D40 ループは少なくとも組換え大腸菌での発現におけるフォールディングや、酵素の触媒活性には無関係であることが示された。また、精製酵素を用いた酵素科学的解析から、二つの欠損型変異酵素は耐熱性が向上しており、特に Δ D38-W46 変異体は 70°C での活性半減期が親酵素のそれと比較して 10 倍以上に延長された。分子ダイナミクス(MD)シミュレーションによっても Δ D38-W46 変異体の耐熱性を裏付ける結果が得られた。さらに、60°C での PI 合成において D40 ループ欠損変異体は親酵素と比較して高い PI 収率を与えた。一方で副産物である PA の生成は抑制されるという、酵素の応用的に非常に望ましい結果が得られた。

T291 を含む長いループ (T291 ループ, G273-T313) についても同様に欠損変異体を作製し、その機能評価を試みることにした。T291 ループ欠損変異酵素を作製するにあたっては、以下の点を考慮した。1) 本酵素はモノマー酵素であるが、その構造は N ターミナルハーフドメインと C ターミナルハーフドメインより構成されており、二つのハーフドメインの立体構造は類似している。2) T291 ループは C ターミナルハーフドメイン上に存在するが、それに対応する N ターミナルハーフドメイン上の領域は P51-R62 であり、T291 ループと比較して短く、構造揺らぎも低い。そこで、T291 ループの 41 アミノ酸を単純に欠損させた Δ G273-T313、および本ループを欠損後に N ターミナルハーフドメイン上の対応するループである P51-R62 を「移植」(grafting) した変異体(grf 51-62)を作製した。これらの変異酵素の発現を大腸菌で試みたが、可溶性での発現はできなかった。

その理由は、元来 C297-C343 間でジスルフィド結合を形成していたものが、T291 ループの除去により C297 を喪失し、孤立した C343 が正しいフォールディングを妨

げているためではないかと予想した。そこで、 Δ G273-T313 および grf 51-62 変異体の C343 をセリンに置換した変異体、 Δ G273-T313/C343S および grf51-62/C343S を作製したところ、両変異体とも可溶性蛋白として発現することを確認した。grf51-62/C343S 変異酵素では粗酵素の状態で一時的に酵素活性を検出できたが、酵素の精製途上で活性を失ったため、その耐熱性評価には至らなかった。T291 ループの一部はリン脂質結合時にアシル基を収納するための疎水性領域を提供しているため、その欠損により酵素活性が失われたと予想された。

次に、本酵素をさらに安定化することを目的で、モレキュラーダイナミクス(MD)シミュレーションによる不安定領域の探索を行った。コンピュータの処理速度を稼ぐために、80-250°C という仮想的な温度において MD 計算を行い、安定性の低いホットスポットを新たに同定した。それらは、A57-L69, K161-S163, R226-W235, S243-D263, および T400-R414 であり、今後の耐熱化のターゲットとして期待出来る。

さらに本酵素のドッキングシミュレーションによって本酵素と基質との相互作用に関わる残基の同定を試みた。その結果、リン脂質の短鎖アシル基との相互作用部位として、L88, A123, Y126, W166, P462, G381 および A463 を、リン脂質グリセロール骨格との相作用部位として L465, Y461 を同定した。一方、長鎖アシル基は I125, V380, R385, N459, Y461, P462, L465, および D467 と相互作用する。さらに、ホスファチジル受容体であるアルコール化合物は N185, S382 と相互作用することが示された。これらのシミュレーション結果はこれまで得られた本酵素の変異体の解析結果とも良く一致した。同定された残基のいくつかは Y126 ループ(A123-V130)と G381 ループ(D373-I388)の構成残基であるが、野生型 PLD の結晶構造から、この二つのループは「ゲート様構造」を形成し、リン脂質の結合に伴って開閉することが判明している。これらのことから、このゲート様構造が水中で凝集しているリン脂質基質から一分子を引き抜き活性部位に留めておく機構を提唱した。