

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Identification of Essential Residues for Catalysis of Rat Intestinal Phospholipase B/Lipase   |
| Author(s)    | 陸, 婷  |
| Citation     | 大阪大学, 2001, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43746">https://hdl.handle.net/11094/43746</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 陸 婷   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第 16488 号   |
| 学位授与年月日    | 平成13年8月8日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科生理系専攻   |
| 学位論文名      | Identification of Essential Residues for Catalysis of Rat Intestinal Phospholipase B/Lipase<br>(小腸ホスホリパーゼ B/リパーゼの触媒作用に必須なアミノ酸残基の同定) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 岡本 光弘<br><br>(副査)<br>教授 高井 義美 教授 三木 直正   |

#### 論文内容の要旨

##### 【目的】

Ca<sup>2+</sup>非依存性ホスホリパーゼ B/リパーゼ (PLB/LIP) は、最近精製・クローニングされた小腸刷子縁膜結合型酵素で、単一酵素でリパーゼ、ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)、リゾホスホリパーゼの3つの脂質分解活性を持つ。リン脂質に対しては、まず PLA<sub>2</sub>活性が作用し続いてリゾホスホリパーゼ活性によりリン脂質の2本のアシル鎖を両者とも切断するいわゆるホスホリパーゼ B 活性を発揮する。本酵素は、脂質の膜消化に関与する初めての酵素で、胆汁酸により不活化される腓リパーゼとは逆に、それにより著しく活性化され単一酵素で中性脂肪とリン脂質を分解できるため、膵外分泌不全における膵臓脂質分解酵素の不足を代償する。本研究では、このように多彩な基質特異性を発揮する PLB/LIP の触媒反応機構を明らかにするため、活性発現に必須なアミノ酸残基を部位特異変異法により決定した。

##### 【方法】

PLB/LIP cDNA は1450アミノ酸残基をコードし、N末端に約30残基のシグナルペプチド、ほぼ等しい長さの4つの繰り返し配列 (リピート)、C末端側疎水性膜結合部位から構成されている。活性ドメインはN末端から2番目のリピートである。シグナル配列とこのリピートを連結した pSVL#2 発現プラスミッドを作成して COS-7 細胞に導入しリピート2酵素を発現させた。全長酵素も COS-7 細胞で発現させたところ、両者とも同様の基質特異性、比活性を示したので、pSVL#2 を鋳型にして単一制限酵素作用部位除去法により変異酵素を作成した。酵素的作用により切断された脂肪酸を抽出し9-アントリルジアゾメタン (ADAM) で誘導体化後 HPLC を用い分離定量することによりリパーゼ活性・PLA<sub>2</sub>活性・リゾホスホリパーゼ活性を測定した。発現酵素の分泌量の変動による影響を除くため、PLB/LIP に特異的な酵素抗体法により測定した濃度を用いて比活性を求めた。遺伝子組み替え酵素の高次構造変化の有無を検索するため、組換え酵素の遠紫外円偏光二色性 (CD) スペクトルを日本分光 J600CD 分光光度計により測定した。この実験には、リピート2cDNA を挿入したバキュロウイルス発現プラスミッド pAcSG2-#2 を Sf-9 細胞に導入し、発現させた酵素を精製して用いた。発現酵素はリピート2のみからなるが、以下に示すアミノ酸配列の番号付けは転写開始の Met を1番にしたものである。

##### 【成績】

(1)触媒基の候補の選択. セリンプロテアーゼと同様に、活性中心のいわゆる Ser-His-Asp(Glu)catalytic triad がリパーゼの触媒効率促進のための構造的基礎であることが知られている。PLB/LIP は、セリンを修飾する不可

逆性阻害剤ジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) で阻害されるのでリパーゼ同様にセリンが触媒に関与することが示唆される。そこで、リパーゼをファミリー I と II に大別して各ファミリーに属する酵素の catalytic triad 近傍のアミノ酸配列と PLB/LIP の配列の相同性を検討して活性必須残基の候補を選択した。ファミリー I には、膵臓リパーゼをはじめ主要な哺乳類リパーゼのほとんどが含まれる。それらの触媒基セリンはアミノ酸配列の中央部分に位置し、ほとんどの場合 Gly-X-Ser-X-Gly 共通配列中にある。PLB/LIP リピート 2 にはこの共通配列が 2 箇所あってその中に Ser-414 と Ser-459 がある。一次構造の相同性からファミリー 1 は四つのサブファミリーに分けられ、triad を形成する Asp (Glu)、His の近傍のアミノ酸配列にもそれぞれの特徴を持っているが、リピート 2 酵素にはこれらに該当する配列は見られなかった。ファミリー II に属する酵素は多彩な反応を触媒して微生物や植物に分布している。このファミリーの特徴は、Ser が N 末端側の Gly-Asp-Ser-Leu 共通配列中、Asp が Gly-X-Gly-Asp 共通配列中、His が Asp-X-X-His 共通配列中にあることである。リピート 2 酵素にはこれらに相当する Ser-404、Asp-518、His-659 が存在する。

- (2) PLB/LIP の触媒基セリンの同定。リピート 2 の触媒基セリンの候補である Ser-414、Ser-459、Ser-404 を Ala に改変し COS 細胞で発現させると、ファミリー 2 共通配列中にある Ser-404 置換酵素のみ PLA<sub>2</sub>、リパーゼ、リゾホスホリパーゼ活性が検出感度以下にまで減少した。円偏光二色性分光測定により、精製した Ser404 置換酵素の高次構造に大きな変化がないことが確認されたので、Ser-404 が脂質分解活性に必須であることが証明された。
- (3) PLB/LIP の触媒基アスパラギン酸とヒスチジンの同定。ファミリー II 酵素に特徴的な共通配列中にある Asp-518 と His-659 の部位特異的変異体を作成した。Asp-518 を Ala、Glu、Asn に改変し COS 細胞で発現させたところ、それぞれの変異酵素の PLA 2 比活性は、リピート 2 酵素の 0.025%、6.7%、1.6% にまで低下した。同様に His-659 を Ala に改変し発現させたところ PLA 2 活性は検出感度以下まで低下した。またリパーゼファミリーでは、Ser、Asp、His の配列順序はこの順序で保存されているので Asp より C 末端側の His をそれぞれ Ala に置換した変異体も作成した。His-665Ala 変異酵素で PLA<sub>2</sub> 比活性がリピート 2 酵素の 1.2% に低下したが、他の変異体では比活性に大きな変化はなかった。Asp<sup>518</sup>Ala と His<sup>659</sup>Ala 変異体の CD スペクトルも大きな変化はなかった。これらの結果から Asp-518 と His-659 が活性発現に必須であることが分かった。His-665 変異による活性低下の原因として、この His が直接触媒に関与する可能性、His665 の変異が活性中心の構造に影響を与える可能性等が考えられる。
- (4) 一般に重要な機能を担うアミノ酸残基は種を超えて保存される。ウサギ、モルモット、*C.elegans* の PLB/LIP ホモログでも触媒に関与する Ser、Asp、His は保存されており、これらの残基の触媒における重要性と一致していた。ラット PLB/LIP では、活性に必須な Ser、Asp、His がすべて揃っているのはリピート 2 のみであり、リピート 2 にだけ脂質分解活性があることと一致していた。

#### 【総括】

PLB/LIP リピート 2 (活性ドメイン) の Ser-404、Asp-518、His-659 は、活性発現に必須な触媒基であり、活性中心で catalytic triad を形成していることが示唆された。これらの残基は、ファミリー II に属する酵素に特徴的な共通配列中にあり PLB/LIP がファミリー II に属することが示唆された。PLB/LIP は哺乳動物では初めてのファミリー II の仲間である。活性に必須な 3 残基のどの一つを Ala に改変しても、リパーゼ、PLA<sub>2</sub>、リゾホスホリパーゼの 3 つの脂質分解活性が同等に消失したので、これらの活性は一つの活性中心で触媒されていることが分かった。

#### 論文審査の結果の要旨

脂質分解酵素であるホスホリパーゼ A2 (PLA<sub>2</sub>) とリパーゼは、ともに種々の組織に普遍的に存在しエネルギー代謝、細胞内情報伝達系や炎症のメディエータとして非常に重要な役割を演じる。最近まで、両酵素は、反応機構的にも構造的にも異なり、別個のファミリーを形成すると考えられてきた。これまで構造が決定された哺乳動物トリアシルグリセロールリパーゼはすべて、一次構造的に相同性がない場合でも  $\alpha/\beta$  ヒドロラーゼフォールドという折り

たたみ構造と活性中心にセリン (Ser)・アスパラギン酸・ヒスチジンの触媒に必須な三残基——いわゆる catalytic triad——が存在する共通の立体構造をとり、一つの大きなファミリーを形成している。しかし、最近、リパーゼ同様に Ser を触媒基として利用する PLA2 が発見され、両者の区別が曖昧になってきている。このため、PLA2 とリパーゼの反応機構、機能と密接に関連した基質特異性を決める構造的基盤をより詳細に比較検討することが必要になってきた。小腸ホスホリパーゼ B/リパーゼは、哺乳動物では初めて cDNA クローニングされた膜結合型 PLA2 であり、これまで知られている哺乳動物リパーゼではみられない、単一酵素で高い PLA2 活性とリパーゼ活性をともに示すユニークな酵素である。したがって、本酵素の活性中心の詳細な検討により、リパーゼと PLA2 の構造機能連関に関する新しい知見が得られる事が期待される。本研究は、小腸ホスホリパーゼ B/リパーゼの活性発現に必須の三残基を部位特異変異法により決定し、それらの残基が存在するアミノ酸配列の位置と近傍のアミノ酸配列の相同性から本酵素が、細菌、植物に分布する脂質分解酵素のファミリーの一つに属するという新しい知見を提供するものである。本研究の結果は、脂質分解酵素の構造機能連関に関する新しい展開に結びつく研究であり、学位論文に充分値するものと認める。