

Title	Studies on the structure, function and biotechnological application of a family I.3 lipase
Author(s)	アンカウイジャヤ, クレメン
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48713
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	アンカウィジャヤ クレメン Angkawidjaja, Clement
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 21564 号
学位授与年月日	平成 19 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Studies on the structure, function and biotechnological application of a family I.3 lipase (ファミリー I.3 リパーゼの構造、機能、応用に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 金谷 茂則 (副査) 教授 卜部 格 教授 塩谷 捨明 教授 小林 昭雄 教授 原島 俊 教授 大竹 久夫 教授 福井 希一 教授 福崎英一郎 教授 仁平 卓也 教授 清水 浩 教授 四方 哲也 教授 野地 博行

論文内容の要旨

Chapter 1. Introduction

Enzymology plays crucial roles in the biotechnology industry. One of the widely-used enzymes is lipase. Based on the classification of bacterial lipolytic enzymes, family I.3 lipase is a member of the Gram-negative bacterial true lipases (Arpigny and Jaeger, 1999). This lipase family is distinguished from other families by the amino acid sequence and the secretion mechanism. Lipases of family I.3 are secreted via the type I secretion system (T1SS). PML is a member of this lipase family (Amada *et al.*, 2000). PML consists of two domains. The N-domain contains all the catalytic triad required for lipase activity, as shown by site-directed mutagenesis study of PML (Kwon *et al.*, 2000). The C-domain contains a secretion signal near the C-terminus, and several repeats of a GGxGxDxux sequence motif, which form a β -roll structure in the presence of Ca^{2+} ions (Fig. 1B). PML has twelve repeats, in which five and seven repeats are separated by a 70-amino acid insertion. The repeats do not function as a secretion signal, but affect the secretion level of the protein to a significant extent (Kwon *et al.*, 2002).



Fig. 1(A). Outline of the primary structure of PML and (B). The β -roll structure.

Chapter 2. Importance of a repetitive nine-residue sequence motif for intracellular stability and functional structure of PML

Previous study (Kwon *et al.*, 2002) showed that the GGxGxDxux repeats are required for PML stability against intracellular proteolytic degradation and overall protein structure integrity. The study used deletion mutants of PML, in which the number of the repeats were varied. It was found that PML mutant containing five repeats (PML5) had similar enzymatic activity and only a slightly lower secretion efficiency compared with the full-length protein (containing 12 repeats). Further deletion of the repeats reduced the enzymatic activity and secretion level of the protein. It was proposed that the repeats function only when it folds into a β -roll motif, and therefore the β -roll motif folds intracellularly. However, the study on the deletion mutants itself was not sufficient to support the proposal and it was necessary to construct a protein with the same repeat number but unable to form a β -roll structure. Two aspartate residues within the second and third repetitive sequences of PML5 were mutated to alanine. The secretion level, intracellular accumulation level, and stability of the resultant mutant protein (A387/A396-PML5) were greatly reduced as compared to those of PML5. In addition, this mutant protein was inactive and did not bind Ca^{2+} ion, supporting the mechanism of intracellular β -roll folding.

Chapter 3. Extracellular overproduction and preliminary crystallographic analysis of PML

So far, no structure of family I.3 lipase is available, and therefore various questions regarding its structure and function are still unanswered. Attempts to crystallize PML that was purified from inclusion bodies have been unsuccessful. Therefore we purified PML from the culture supernatant of *E. coli* cells carrying two plasmids, one for PML and another one for a heterologous T1SS (Kwon *et al.*, 2002 ; Kawai *et al.*, 1998). By using this protein, PML was crystallized and its crystal diffracted X-ray to 1.7 angstrom resolution.

Chapter 4. Extracellular secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase with a C-terminal tag by type I secretion system: purification and biochemical characterization

In order to exploit the C-domain of PML for the extracellular production of heterologous protein, the *E. coli* alkaline phosphatase (AP) was fused to a C-terminal region of PML (PMLC) and examined for secretion using the *E. coli* cells carrying the heterologous T1SS. The fusion protein was efficiently secreted to the extracellular medium, while AP was not secreted at all, indicating that the secretion of AP is promoted by a secretion signal of PML. The repetitive sequences were not so important for secretion of the fusion protein, because the secretion level of the fusion protein containing the entire repeats (~ 10 mg/l culture) was only < 2 -fold higher than that of the fusion protein without repeats. The fusion protein purified from the culture supernatant existed as a homodimer, like AP, and was indistinguishable from AP in enzymatic properties and stability.

Chapter 5. General discussion and conclusion

The roles of the repetitive sequences in the folding and secretion level of PML and the significance of extracellular production of PML for crystallization have been described. Furthermore, the usefulness of the C-domain of PML for extracellular production of *E. coli* alkaline phosphatase has been presented. In general, PMLC has a chaperone-like function, which is required for efficient protein secretion by T1SS. By studying the structure-function relationship and secretion properties of PML, a more general understanding on protein secretion mechanism by T1SS has been achieved. Future remarks include the challenge in structural determination of PML and the protein subunits of the T1SS. By doing this, we may gain a thorough understanding on “how do proteins pass the T1SS channel”. In the end, we may come closer to construct a generalized, simple, highly-specific protein secretion machinery in the well-studied *E. coli* for secretory

production of heterologous proteins, altogether should make a significant contribution to the further development of biotechnology.

References:

1. Arpigny J. L. and Jaeger K. E. (1999) *Biochem. J.* **343**, 177-183.
2. Amada K. *et al.* (2000). *Biochim. Biophys. Acta* **1478**, 201-210.
3. Kwon H. J. *et al.* (2000). *FEBS Lett.* **483**, 139-142.
4. Kwon H. J. *et al.* (2002) *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 157-164.
5. Kawai E. *et al.* (1998). *Mol. Microbiol.* **27**, 941-952.

論文審査の結果の要旨

本論文は、ファミリーI.3 リパーゼの一種である *Pseudomonas* sp. MIS38 株由来リパーゼ (PML) の構造、機能、応用について検討したものであり、以下に示すように、序論、本論3章、および総括から構成されている。第一章(序論)では、PMLは他のファミリーI.3 リパーゼ同様I型分泌システムにより菌体外に分泌されること、Nドメイン(触媒ドメイン)とCドメインから成ること、カルシウムが結合するとβロール構造を形成することが知られているGGXGXDXUXの繰り返し配列をCドメインに持つことなど、これまでPMLを用いて行われてきた研究の背景について触れ、本研究の目的を述べている。第二章では、上記繰り返し配列に変異を導入し、PMLの酵素活性、安定性、分泌効率などに及ぼす影響を解析することにより、βロール構造の形成はPMLの活性だけでなく、菌体内における構造安定性や菌体外への分泌に極めて重要であることを明らかにしている。第三章では、まだ三次構造が明らかにされていないファミリーI.3 リパーゼの構造決定を目的として、PMLの結晶化を検討することにより、インクルージョンボディから再構成した蛋白質を用いても良質な結晶は得られないが、菌体外に分泌されたPMLを精製して用いると、高分解能の構造解析が可能な結晶を取得することが可能であることを明らかにしている。第四章では、大腸菌由来アルカリ性ホスファターゼ(BAP)のC末端にPMLのC末端ドメイン(LipC)を連結した融合タンパク質(BAP-LipC)が、I型分泌システムの一つであるLipシステムを導入した大腸菌の菌体外に効率良く分泌されることを明らかにしている。また、分泌されたBAP-LipCを精製しその生化学的諸特性を解析することにより、BAP-LipCはBAP同様高い活性と安定性を有することを明らかにしている。この結果は、I型分泌システムを異種蛋白質の新たな菌体外分泌システムとして利用できることを示唆している。第五章(総括)では、本研究で得られた結果に基づきPMLのフォールディング機構や活性発現機構について考察するとともに、蛋白質の新たな菌体外分泌システム開発の可能性について展望している。

以上のように、本論文はファミリーI.3 リパーゼの構造と機能に関して新たな知見を見いだした点で意義深い。また、本論文は本酵素の産業的利用を図る上で有益な知見を与えるものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。