



Title	Functional Alteration of a Family 1.3 Lipase from <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38 by "Lid Engineering"
Author(s)	Cheng, Maria
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/50523">https://doi.org/10.18910/50523</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

Name (Cheng, Maria)

Title

Functional Alteration of a Family I.3 Lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38 by "Lid Engineering"  
(緑膿菌MIS38株由来ファミリーI.3リパーゼのリッドエンジニアリングによる機能改変)

## Abstract of Thesis

Lipase (EC 3.1.1.3) is defined as a carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of long-chain triglycerides. True lipase displays interfacial activation, in which lipase activity is significantly enhanced upon contact with micellar substrate. Lipase is a member of the serine hydrolase family that shares the same catalytic triad of Ser-His-Asp. It is widely present in various organisms from prokaryotes to eukaryotes. These lipases usually have a lid structure that controls the access of substrate to the active site. *Pseudomonas* sp MIS38 lipase (PML) is a family I.3 lipase with a unique two-lid structure and undergoes interfacial activation. Another unique property of PML is the presence of a catalytically essential calcium ion (Ca1) that is required to anchor lid1 to the open position. To examine whether the enzymatic properties of PML are altered by lid engineering, PML derivatives lacking lid2 ( $\Delta$ L2-PML) or having mutations at the Ca1 site were constructed and characterized. We show that  $\Delta$ L2-PML does not undergo interfacial activation and exhibits higher esterase and lower lipase activities than PML. Comparison of the tertiary models of  $\Delta$ L2-PML in closed and open conformations, which have been optimized by MD simulation with the crystal structures of PML, suggests that hydrophobic surface area provided by lid1 and lid2 in an open conformation is considerably decreased by the deletion of lid2. We propose that hydrophobic surface area provided by these lids is necessary to hold the micellar substrates firmly to the active site and therefore lid2 is required for interfacial activation of PML. Thus, by deletion of lid2, we have successfully converted PML to an esterase-like enzyme. We also show that D153R-PML exhibits activity in a calcium-independent manner. Lid1 of D153R-PML opens even in the absence of calcium ions due to electrostatic attraction between Arg153 and Asp157. Thus, we succeeded to construct a PML derivative that exhibits activity in a calcium-independent manner by the single mutation at lid1.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (Cheng, Maria)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	教授 金谷 茂則
	副査	教授 原島 俊
	副査	教授 大竹 久夫
	副査	教授 福井 希一
	副査	教授 福崎 英一郎
	副査	教授 村中 俊哉
	副査	教授 紀ノ岡 正博
	副査	教授 渡邊 雄
	副査	教授 仁平 卓也
	副査	教授 藤山 和仁
	副査	教授 永井 健治

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、緑膿菌 (*Pseudomonas*) MIS38 株由来 Family I リバーゼ (PML) のタンパク工学的手法 (lid engineering) による機能改変について研究したものであり、以下に示すように、序論、本論2章、および総括から構成されている。第1章 (序論) では、まずリバーゼの構造、機能、分類、産業利用について述べた後、Family I.3 リバーゼの構造的、機能的特徴や分泌機構について述べ、最後に PML の構造、触媒機構、基質認識機構、安定性などに関するこれまでの研究をまとめるとともに、本研究の目的と意義を述べている。Family I.3 リバーゼは細菌由来リバーゼのサブファミリーの1つであるが、lid1 と lid2 の2つの lid を持つ、活性にカルシウムイオンを必要とする、などの特徴を有している。lid は両親媒性のヘリックス構造を有しており、基質がないと閉じて活性部位を覆っているが、ミセル上の基質と接触すると開いて基質が活性部位に直接接触できるようになる。この lid はエステラーゼではなくリバーゼにあるが、リバーゼは通常 lid を1つしか持たない。また、リバーゼは通常カルシウムイオンを活性には必要としないが、Family I.3 リバーゼが活性にカルシウムイオンを必要とするのは、lid1 が開くためにカルシウムイオンが lid1 に配位する必要があるからである。第2章では、lid2 を欠失させた PML 変異体を構築し、その活性や安定性を解析することにより、lid2 は PML のリバーゼ活性に必要であることを明らかにしている。また、lid2 の欠失により PML のエステラーゼ活性はむしろ向上し、ミセル上基質との接触による活性化 (界面活性化) も受けなくなるので、この変異体はむしろエステラーゼとして働くことを明らかにしている。第3章では、lid1 に存在する Asp153 と Asp157 をそれぞれ Ala、Arg、Lys に置換した PML 変異体を各種構築し、その活性や安定性を解析することにより、これらの変異体のうち Asp153 を Arg に置換した変異体 D153R-PML だけが活性を示すこと、またこの活性はカルシウムイオンに依存しないことを明らかにしている。Asp153 と Asp157 は lid1 が閉じているときは互いに離れて存在しているが、lid1 が開いた時は互いに近づき、カルシウム結合部位を形成する。従って、カルシウムイオンが存在しないと、これらの残基間に負電荷の反発が生じるため lid1 は開いた構造を保持できない。しかし、D153R-PML においては Arg153 と Asp157 の間に静電的引力が働き、結果として、カルシウムイオンが存在しなくとも lid1 は開くことができると考えられる。第4章 (総括) では、本研究で得られた結果に基づき、PML の機能改変における lid engineering の有用性について考察するとともに、今後の展望について述べている。

以上のように、本論文は lid2 の除去によるリバーゼからエステラーゼへの変換、lid1 への変異導入によるカルシウム依存型酵素から非依存型酵素への変換など、lid engineering が Family I.3 リバーゼの機能改変に有効であることを初めて示した点で大変意義深い。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。