OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Family I.3 リパーゼの結晶構造 : Ca2+イオンとC末端保存配列モチーフの役割
Author(s)	桑原, 克昌
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/739
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	桑原克昌（くわはらかつまさ）
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第　24540　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	Crystal structure of family Ⅰ.3 lipase：role of calcium ion and C-terminal conserved sequence motif （Family Ⅰ.3 リパーゼの結晶構造：Ca^{2+}イオンとC末端保存配列モチーフの役割）
論文審査委員	（主査） 教授　金谷　茂則 （副査） 教授　福住　俊一　　教授　宮田　幹二　　教授　菊地　和也 教授　高井　義造　　教授　伊東　一良　　教授　渡部　平司 教授　伊東　忍　　教授　兼松　泰男

論文内容の要旨

細菌由来リパーゼは、8つのファミリー（Family I～VIII）に分類され、Family Iリパーゼは更に7つのサブファミリー（Family I.1～I.7）に分類される。この中で、Family I.3リパーゼはType 1分泌システム（T1SS）により菌体外に分泌される、大腸菌を用いて容易に大量生産できる、などの特徴を有しており、その産業利用が期待されているが、まだ結晶構造が決定されていないため、その構造機能相関は明らかにされていない。そこで本研究では、*Pseudomonas* sp. MIS38由来Family I.3リパーゼ（PML）をモデルタンパク質として用いることにより、Family I.3リパーゼの構造機能相関を明らかにすることを目的とした。第1章では、PMLの結晶構造をclose構造として1.5Åの分解能で決定した。その結果、Family I.3リパーゼは、N末端触媒ドメインと2つのβロール構造が互いに横に並ぶβロールサンドイッチ構造を形成するC末端ドメインの2つのドメインから成ること、N末端触媒ドメインには通常のリパーゼに見られるlid（lid1）の他に、もう1つのlid（lid2）が存在することを明らかにした。また、open構造で決定された他のFamily I.3リパーゼの結晶構造と比較することにより、Ca2+イオン結合サイト（Ca1）は、lid1がopen構造を形成する時だけ形成されることを明らかにした。さらに、PMLのN末端触媒ドメインには、Family I.3リパーゼに保存されているCa2サイトと、保存されていないCa3サイトの存在することを明らかにした。以上、PMLをclose構造として決定することにより、N末端触媒ドメインには2つのlidが存在すること、N末端触媒ドメインにはCa1サイト以外にCa2サイトとCa3サイトが存在すること、13個の繰り返し配列はβロールサンドイッチ構造を形成すること、この構造には8個のCa2+イオンが結合することを明らかにした。第2章では、これら3個のCa2+イオン結合サイト（Ca1～Ca3）の役割を解析するため、3種類の1アミノ酸置換変異体D157A-PML、D275A-PML、およびD337A-PMLを構築した。これら変異体の酵素活性や熱安定性を解析することにより、活性に必須のCa2+イオンはCa1サイトに結合してlid1のopen構造を固定（安定化）するのに必要であることを明らかにした。また、Ca2サイトは安定性に寄与し、更に活性残基を最適な位置に維持するために必要であることを明らかにした。更にCa3サイトはFamily I.3リパーゼの一部にしか保存されていないが、これらのリパーゼの安定化に寄与していることを提案した。第3章では、Family I.3リパーゼに保存されているC末端モチーフと5残基配列モチーフの役割を解析することを目的として、C末端モチーフを切除したり、5残基配列モチーフやC末端モチーフに変異を入れたりすることにより、４種類のPML変異体、PMLΔ5、PMLΔ10、2A-PML、3A-PMLを構築し、分泌、酵素活性、および安定性を調べた。その結果、2A-PMLの分泌レベルはPMLより劇的に減少したが、3A-PMLの分泌レベルはPMLと同等であった。また、C末端領域に変異を入れても、C末端領域を削除しても、PMLの酵素活性はそれほど変化しなかった。しかし、3A-PML、PMLΔ5、そしてPMLΔ10の安定性に関しては、PMLと比べて安定性が低下していた。特にPMLΔ5とPMLΔ10では大きく安定性が低下していた。以上の結果、5残基配列モチーフはPMLの分泌シグナルとして働くこと、C末端モチーフはPMLの安定性に重要であることを明らかにした。また、C末端モチーフはFamily I.3リパーゼだけでなくT1SSにより分泌される他のタンパク質にも保存されているので、C末端モチーフはこれらのタンパク質の安定化に寄与することを提案した。

以上の研究成果により、Family I.3リパーゼの構造機能相関を初めて明らかにし、将来産業でPMLが利用されることが期待されるに至った。

論文審査の結果の要旨

細菌由来リパーゼは、8つのファミリー（Family I～VIII）に分類され、Family Iリパーゼは更に7つのサブファミリー（Family I.1～I.7）に分類される。この中で、Family I.3リパーゼはType 1分泌システム（T1SS）により菌体外に分泌される、大腸菌を用いて容易に大量生産できる、などの特徴を有しており、その産業利用が期待されているが、まだ結晶構造が決定されていないため、その構造機能相関は明らかにされていない。そこで本研究では、*Pseudomonas* sp. MIS38 由来 Family I.3 リパーゼ（PML）をモデルタンパク質として用いることにより、Family I.3 リパーゼの構造機能相関を明らかにすることを目的とした。第１章では、PML の結晶構造を close 構造として 1.5Åの分解能で決定した。その結果、Family I.3 リパーゼは、N末端触媒ドメインと２つのβロール構造が互いに横に並ぶβロールサンドイッチ構造を形成するC末端ドメインの２つのドメインから成ること、N末端触媒ドメインには通常のリパーゼに見られる lid（lid1）の他に、もう１つの lid（lid2）が存在することを明らかにした。また、open 構造で決定された他の Family I.3 リパーゼの結晶構造と比較することにより、Ca^{2+}イオン結合サイト（Ca1）は、lid1 が open 構造を形成する時だけ形成されることを明らかにした。さらに、PML のN末端触媒ドメインには、Family I.3 リパーゼに保存されている Ca2 サイトと、保存されていない Ca3 サイトの存在することを明らかにした。以上、PML を close 構造として決定することにより、N 末端触媒ドメインには２つの lid が存在すること、N 末端触媒ドメインには Ca1 サイト以外に Ca2 サイトと Ca3 サイトが存在すること、13 個の繰り返し配列はβロールサンドイッチ構造を形成すること、この構造には８個の Ca^{2+}イオン結合サイト（Ca1～Ca3）の役割を解析するため、３種類の１アミノ酸置換変異体 D157A-PML、D275A-PML、および D337A-PML を構築した。これら変異体の酵素活性や熱安定性を解析することにより、活性に必須の Ca^{2+}イオンは Ca1 サイトに結合して lid1 の open 構造を固定（安定化）するのに必要であることを明らかにした。また、Ca2 サイトは安定性に寄与し、更に活性残基を最適な位置に維持するために必要であることを明らかにした。更に Ca3 サイトは Family I.3 リパーゼの一部にしか保存されていないが、これらのリパーゼの安定化に寄与していることを提案した。第３章では、Family I.3 リパーゼに保存されている C 末端モチーフと５残基配列モチーフの役割を解析することを目的として、C 末端モチーフを切除したり、５残基配列モチーフや C 末端モチーフに変異を入れたりすることにより、４種類の PML 変異体、PMLΔ5、PMLΔ10、2A-PML、3A-PML を構築し、分泌、酵素活性、および安定性を調べた。その結果、2A-PML の分泌レベルは PML より劇的に減少したが、3A-PML の分泌レベルは PML と同等であった。また、C 末端領域に変異を入れても、C 末端領域を削除しても、PML の酵素活性はそれほど変化しなかった。しかし、3A-PML、PMLΔ5、そして PMLΔ10 の安定性に関しては、PML と比べて安定性が低下していた。特に PMLΔ5 と PMLΔ10 では大きく安定性が低下していた。以上の結果、５残基配列モチーフは PML の分泌シグナルとして働くこと、C 末端モチーフは PML の安定性に重要であることを明らかにした。また、C 末端モチーフは Family I.3 リパーゼだけでなく T1SS により分泌される他のタンパク質にも保存されているので、C 末端モチーフはこれらのタンパク質の安定化に寄与することを提案した。

以上のように、本論文は Family I.3 リパーゼの構造機能相関を初めて明らかにしている。具体的には、PML の結晶構造を close 構造で決定し他の Family I.3 リパーゼの open 構造と比較することにより、Family I.3 リパーゼには他のリパーゼには見られない lid2 の存在すること、そのN末端触媒ドメインには３個の Ca^{2+}イオン結合サイト（Ca1～Ca3）の存在することを明らかにしている。また、Ca1 サイトは活性に必須であることを明らかにしている。さらに、C末端の５残基配列モチーフは分泌に必須であること、C末端モチーフは安定性に重要であることを明らかにしている。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。