



Title	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
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	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 リバーゼの結晶構造: 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

細菌由来リバーゼは、8つのファミリー (Family I~VIII) に分類され、Family Iリバーゼは更に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リバーゼは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リバーゼ (PML) をモデルタンパク質として用いることにより、Family I.3リバ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1.5 Åの分解能で決定した。その結果、Family I.3リバーゼは、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バーゼに見られる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リバ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リバ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+} イオンが結合することを明らかにした。第2章では、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サイトは活性に必須であ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+} イオンが結合することを明らかにした。第3章では、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サイトは活性に必須であることを明らかにした。また、Ca3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。

定化に寄与していることを提案した。第3章では、Family I.3リバ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、PML Δ 5、PML Δ 10、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、PML Δ 5、そしてPML Δ 10の安定性に関しては、PMLと比べて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リバーゼだけでなく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リバ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

細菌由来リバーゼは、8つのファミリー (Family I~VIII) に分類され、Family I リバーゼは更に 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 リバーゼは 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 リバーゼ (PML) をモデルタンパク質として用いることにより、Family I.3 リバ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 1.5 Å の分解能で決定した。その結果、Family I.3 リバーゼは、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バーゼに見られる 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 リバ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 リバ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 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サイトは活性に必須であることを明らかにした。また、Ca3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。

以上のように、本論文は Family I.3 リバ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 リバーゼの open 構造と比較することにより、Family I.3 リバーゼには他のリバ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。