

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420830

研究課題名(和文)ホスファチジルイノシトールの精密高純度合成のための高機能改変酵素の開発

研究課題名(英文)Development of engineered enzymes for synthesis of highly pure phosphatidylinositol

研究代表者

岩崎 雄吾 (Iwasaki, Yugo)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50273214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：機能性リン脂質ホスファチジルイノシトール(PI)の高純度合成を目的とし、リン脂質変換酵素であるホスホリパーゼD(PLD)の蛋白工学的改変を行った。基質ポケットに変異を導入した変異酵素から、PIを位置選択的に与える変異酵素を同定した。また、PLDの不安定ループを除去することで、安定かつ高選択性を併せ持ったPLDの作出にも成功した。さらにPIの収率を高める為に酵素反応条件を詳細に検討し、反応系に高濃度のNaClの添加という極めて単純な方法でPI収率を飛躍的に高める事に成功した。さらに、反応後の副生物であるホスファチジン酸を分解する酵素を探索し、適した酵素を産生する微生物を同定した。

研究成果の概要(英文)：Protein engineering study on a phospholipase D (PLD) was performed in to synthesize phosphatidylinositol (PI), a functional phospholipid, with high purity. Analysis of many PLD variants with mutations at its substrate-binding pocket successfully identified some variants with excellent positional specificity. In addition, trimming an unstable loop structure from PLD molecule lead to the creation of another variant with both improved stability and high positional specificity. Moreover, during the optimization of the reaction conditions, we found that very high concentration of NaCl enhanced the PI yield. Furthermore, we discovered another enzyme that hydrolyzes phosphatidic acid (a unwanted side product) from a microorganism by screening.

研究分野：protein engineering

キーワード：phospholipase D phosphatidylinositol

1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼD(PLD)のホスファチジル基転移活性を利用すると、天然に豊富に存在するリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)とアルコールから様々なリン脂質を合成することができる。天然リン脂質のうちホスファチジルイノシトール(PI)は脂質代謝向上作用が認められる機能性脂質であるが、これまで実用的な合成法は存在しなかった。

代表者は PLD による PI の酵素合成を可能とすべく、元来 PI 合成活性を持たない放線菌 PLD の分子進化工学的改変により、困難とされていた PI 合成活性を有する改変型 PLD の創出に世界で初めて成功したが、得られる PI は複数の位置異性体の混合物であるという問題があり、実用的な PI 製造には酵素の位置選択性を高める必要があった。さらに酵素の安定性の向上及び、副生物の軽減方法といった問題があった。

2. 研究の目的

本研究では、PI の酵素合成を位置異性体選択的かつ高収率で達成するため、現有する改変型 PLD の蛋白工学的改変により、1)イノシトールに体する位置特異性、2)安定性、および3) PI 合成の高収率化をめざした。さらに、4) PI 合成時に副生するホスファチジン酸 (PA) を分解除去する為の PA ホスファターゼの探索も行った。

3. 研究の方法

従前課題(基盤研究 C 22560770)において NYR 変異体の G186 位と D189 位への変異導入が酵素の位置選択性向上に有効である事が判明していた。そこで、さらなる選択性の向上のため、186 位と 189 位の変異を掛け合わせた次世代の変異型 PLD を作成し、その位置選択性を解析した。また、酵素の安定化に関し不安定ループを欠損した変異体を作成し、耐熱性を指標としてその安定性を評価した。さらに、高位置選択性が向上した変異体と安定性の向上した変異体を掛け合わせ、高選択性かつ高安定な変異型 PLD の作出を行った。また、得られた改変型 PLD について PI 合成反応の諸条件を検討した。さらに、PAP を産生する微生物を探索した。

4. 研究成果

従前課題の結果から G186 位を L, M, V, T, S に D198 位 L, Y, R, W, N に置換した 25 種類 (=5x5)の変異 PLD を作成して PI 合成を行い、生成した PI の位置異性体組成を分析した。その結果、25 種の変異体では単変異体の選択性を上回るものは見られなかった。従って、単変異体である NYR-G186T を最も 1-PI 選択性の高い酵素とした。

一方、PLD の安定化に関しては従前課題で見いだしていた不安定ループ(9 残基)欠損させた変異体を作成し、その耐熱性を解析した

ところ、親酵素に比べて 70 °C での半減期が 11 倍に延長された。一般に酵素の安定性はその産業応用に直結した重要な課題である。本課題で示した「不安定ループ除去による安定化」(ループトリミング)は本酵素のみならず、広く産業酵素の安定化に応用できるものと考えられる(図1)。

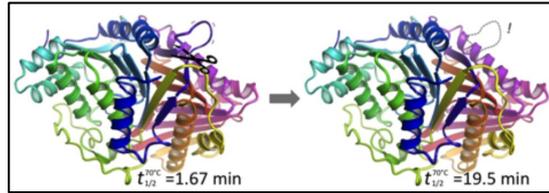


図1 ループトリミングによる安定性向上

さらに、G186T 変異と 38-46 変異を掛け合わせた変異体 NYR-G186T 38-46 を作成し、高選択性と安定性を兼ね備えた酵素を作成した。

次に、開発した変異 PLD を用いて PI 合成反応条件の最適化を行った。反応温度は酵素の位置選択性に大きく影響し、低温ほど 1-PI 選択性が向上した。20 °C での反応では 1-PI/3-PI 比は 97/3 に達した。これは検討開始当初の 74/26 と比較して大幅な改善である。図2は10種の変異 PLD の位置選択性の温度依存性を示した。また、検討過程で GYR-190A 型変異 PLD はその位置選択性が完全に逆転し、非天然型 PI である 3-PI を選択的に与える事をみとめた。

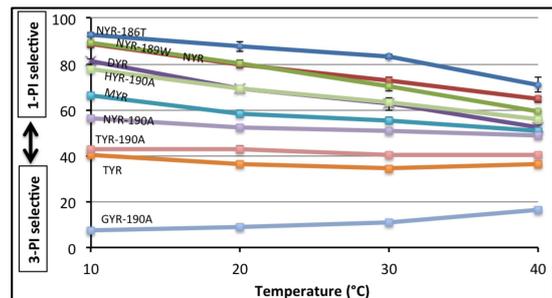


図2 変異 PLD の位置選択性の温度依存

PI の収率改善を検討した。PI 合成反応有機溶媒と水からなる二相反応系で行われるが、様々な検討の結果、水相に高濃度の塩類を添加すると、PI 収率が極めて向上する事を発見した。塩無添加時は PI のリン脂質中の含量は 10 数%に過ぎなかったが、4.3M NaCl 存在下では 40%程度まで向上した。各種の生化学的解析により、高濃度塩により PI 収率

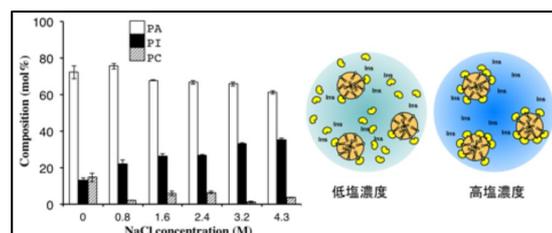


図3 高濃度塩による PI 収率向上

の向上は、疎水性相互作用の増強により酵素が溶媒-水の界面に吸着し、リン脂質との接触頻度が増加した事によると結論された(図3)。

最適化した条件を用いて、各種の PI の合成を行った。di-C18:1 型、C16:0-C18:1 型、C18:0-C20:4 型、および C18:0-C22:6 型 PI の合成を行い、シリカカラムで精製した。いずれの PI も収率約 30%、異性体純度は 95%以上で得る事ができた(表 1)。

表 1 高純度 PI のラージスケール合成

substrate	product	yield (%)	1-PI purity (%)
DOPC (100mg)	DOPI (31mg)	28	94
POPC (100mg)	POPI (28mg)	25	91
SAPC (108mg)	SAPI (44mg)	37	96
SDPC (116mg)	SDPI (36mg)	28	96

さらに、副生物である PA を簡便に取り除き PI を高純度化するため、PA を選択的に分解する酵素 PAP の探索を行った。種々の放線菌を探索したところ、PAP を培地中に分泌する株を見いだした。この菌株の培養上清濃縮物を用いて PI 合成物(副生物として PA を含有)に作用させたところ、PA は選択的に分解されてジアシルグリセロールとなる一方、PI は分解されずに残存することが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- (1) Michiko Muraki, Jasmina Damnjanović, Hideo Nakano and Yugo Iwasaki: Salt-induced increase in the yield of enzymatically synthesized phosphatidylinositol and the underlying mechanism. *J. Biosci. Bioeng.*, (2016) in press. 査読有り
- (2) Jasmina Damnjanović, Chisato Kuroiwa, Hidetoshi Tanaka, Ken Ishida, Hideo Nakano and Yugo Iwasaki: Directing positional specificity in enzymatic synthesis of bioactive 1-phosphatidylinositol by protein engineering of a phospholipase D. 査読有り *Biotechnol. Bioeng.* 113, 62-71 (2016).
- (3) Jasmina Damnjanović, Hideo Nakano and Yugo Iwasaki: Deletion of a dynamic surface loop improves stability and changes kinetic behavior of phosphatidylinositol-synthesizing *Streptomyces* phospholipase D. *Biotechnol. Bioeng.*, 112, 674-682 (2014). 査読有り

[学会発表](計 26 件)

- (1) 村木美智子, ダムニャノビッチヤスミナ, 中野秀雄, 岩崎雄吾. 高濃度塩の添加によるホスファチジルイノシトール酵素合成の効率化. 第 6 回学際的脂質創生研究部会講演会, 平成 28 年 1 月, 徳島
- (2) 井上ありさ, 安立昌篤, ダムニャノビッチヤスミナ, 中野秀雄, 岩崎雄吾. 酵素によるホスファチジル-1-グルコースの合成. 第 6 回学際的脂質創生研究部会講演会, 平成 28 年 1 月, 徳島
- (3) 村木 美智子, 中野 秀雄, 岩崎 雄吾. ホスファチジルイノシトール酵素合成の効率化. 第 67 回日本生物工学会大会, 平成 27 年 10 月, 鹿児島
- (4) Jasmina Damnjanovic, Chisato Kuroiwa, Ken Ishida, Hidetoshi Tanaka, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki. Protein engineering and temperature control as means of directing positional specificity in phospholipase D-catalyzed synthesis of 1-phosphatidylinositol. 第 67 回日本生物工学会大会, 平成 27 年 10 月, 鹿児島
- (5) 井上ありさ, 安立昌篤, 中野秀雄, Jasmina Damnjanovic, 岩崎雄吾. 1-ホスファチジル-*D*-グルコースの酵素合成. 2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会, 平成 27 年 9 月, 射水
- (6) Jasmina Damnjanovic, Chisato Kuroiwa, Ken Ishida, Hidetoshi Tanaka, Michiko Muraki, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki. Directing positional specificity in phospholipase D-catalyzed synthesis of 1-phosphatidylinositol. 2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会, 平成 27 年 9 月, 射水
- (7) Iwasaki Y., Damnjanovic J., and Nakano H.: Phospholipase D as a catalyst: application in phospholipid synthesis. 6th International Conference on FerVAAP. July 2015, Kohn Kaen, Thailand
- (8) 井上ありさ, 安立昌篤, 中野秀雄, ダムニャノビッチ ヤスミナ, 岩崎雄吾. 1-ホスファチジル-*D*-グルコースの酵素合成. 生物学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー2015, 平成 27 年 7 月, 北名古屋
- (9) 太田貴都, 岩崎雄吾. ホスファチジン酸ホスファターゼの開発. 生物学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー2015, 平成 27 年 7 月, 北名古屋
- (10) 村木美智子, 中野秀雄, 岩崎雄吾. 酵素によるホスファチジルイノシトール合成の効率化. 生物学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー2015, 平成 27 年 7 月, 北名古屋

- (11) Damnjanovic J., Kuroiwa C., Muraki M., Ishida K., Tanaka H., Nakano H., Iwasaki Y., Directing positional specificity in enzymatic synthesis of 1-phosphatidylinositol by protein engineering of a phospholipase D, The 13th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Jeju, Korea, November 2014 (Best Poster Award)
- (12) Jasmina Damnjanovic, Chisato Kuroiwa, Michiko Muraki, Ken Ishida, Hidetoshi Tanaka, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki. Engineering of a phospholipase D for positionally-specific and efficient enzymatic synthesis of 1-phosphatidylinositol. Japan-Italy Joint Symposium. Nov, 2014, Nara
- (13) Yugo Iwasaki, Jasmina Damnjanovic, Hideo Nakano. Protein engineering of phospholipase D for phosphatidylinositol synthesis. Japan-Italy Joint Symposium. Nov, 2014, Nara
- (14) 黒岩千智, 石田健, 田中秀俊, 中野秀雄, 岩崎雄吾. ホスホリパーゼ D のタンパク質工学による位置特異的ホスファチジルイノシトール合成の最適化. 日本農芸化学会中部支部 第 171 回例会 平成 26 年 10 月, 名古屋
- (15) Yugo Iwasaki, Jasmina Damnjanovic, Hideo Nakano. Development of phospholipase D having phosphatidylinositol-synthesizing activity. 1st Asian Conference on Oleo Science. Sep, 2014, Sapporo.
- (16) 岩崎雄吾: 酵素の耐熱安定化のためのループトリミング法の確立とホスホリパーゼ D への応用 旭硝子財団 2014 助成研究発表会 平成 26 年 7 月, 東京
- (17) 岩崎雄吾: 放線菌ホスホリパーゼ D の改変とリン脂質合成への応用. 日本油化学会東海支部油化学セミナー, 平成 26 年 6 月, 名古屋
- (18) 岩崎雄吾: 微生物ホスホリパーゼの蛋白質学的改変. 2014 油脂産業技術部会・オレオライフサイエンス部会共催セミナー 平成 26 年 6 月, 東京
- (19) Yugo Iwasaki, Jasmina Damnjanovic, Hideo Nakano: Enhancing the thermostability of phosphatidylinositol-synthesizing phospholipase D. 105th AOCS Annual meeting and Expo. May, 2014. San Antonio, USA.
- (20) Damnjanovic J., Kuroiwa C., Ishida K., Tanaka H., Nakano H., Iwasaki Y., Engineering phospholipase D for stereoselective conversion of phosphatidylcholine into bioactive 1-phosphatidylinositol, 71st Semi-annual Meeting of the Japanese Society of Enzyme Engineering, April 2014, Fukuoka
- (21) 黒岩千智, 石田健, 田中秀俊, 中野秀雄, 岩崎雄吾: ホスファチジルイノシトール合成活性を有するホスホリパーゼ D の 1-PI 特異性の向上. 日本農芸化学会中部支部第 168 回例会, 平成 25 年 10 月, 名古屋
- (22) Jasmina Damnjanovic, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki: Gate-forming loops keep the substrate bound inside the active site of Streptomyces phospholipase D. 日本生物工学会 2013 年 65 回大会, 平成 25 年 9 月, 広島
- (23) 黒岩千智, 石田健, 田中秀俊, 中野秀雄, 岩崎雄吾: ホスファチジルイノシトール合成型ホスホリパーゼ D の一選択性向上. 日本生物工学会 2013 年 65 回大会, 平成 25 年 9 月, 広島
- (24) 岩崎雄吾: 放線菌ホスホリパーゼ D の蛋白質学的機能改変 第 69 回酵素工学研究会 平成 25 年 4 月, 名古屋
- [図書](計 0 件)
[産業財産権]
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)
[その他]
ホームページ等
6. 研究組織
(1) 研究代表者
岩崎雄吾 (Yugo IWASAKI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号: 50273214
- (2) 研究分担者 なし
(3) 連携研究者 なし