

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580230

研究課題名（和文） 棘皮動物由来ホスホリパーゼ A2 の立体構造と基質特異性の関係

研究課題名（英文） Relationship between 3D-structure and substrate specificity of phospholipase A2 from Echinoderm.

研究代表者

岸村 栄毅（KISHIMURA HIDEKI）

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：50204855

研究成果の概要（和文）：

水産生物由来の酵素の立体構造レベルでの詳細な構造・機能解析は殆ど行われていない。本研究では、カタクチイワシのトリプシンの結晶化に成功し、X線結晶構造解析により立体構造を明らかにした。この結果を基に、食品乳化剤である酵素分解大豆レシチンの製造に適した有用酵素であるイトマキヒトデのホスホリパーゼ A2 の構造解析を試みた。その結果、本酵素の遺伝子構造の解明およびその結晶化条件の把握に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Few researches exist on the relationship between 3D-structure and function of enzyme from marine organisms. In this study, we succeeded the crystallization of anchovy (*Engraulis japonica*) trypsin and demonstrated its 3D-structure by X-ray crystallography. On the base of this result, we tried to reveal the structural properties of phospholipase A2 from the starfish *Patiria pectinifera*. The starfish phospholipase A2 is adequate enzyme for production of soybean lysolecithin which is good emulsifier on food industry. Consequently, we determined the full mRNA sequence of the starfish phospholipase A2 and developed the condition for crystallization of the enzyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：水産化学、

科研費の分科・細目：農学・水産化学

キーワード：棘皮動物、酵素、ホスホリパーゼ A2、基質極性基特異性、X線結晶構造解析、立体構造、魚類、トリプシン

1. 研究開始当初の背景

水圏には 50 万種以上にもおよぶ多種多様な生物が棲息しているが、それらのもつ酵素の構造・機能も水圏環境への適応に伴い多様になったと考えられる。例えば、魚類は変温動物であり、それぞれの棲息温度に応じて酵素機能を適応させている。すなわち、寒帯域に棲息する魚類のトリプシンは、恒温動物のものと比較して至適温度および熱安定性が低い。このような魚類トリプシンの酵素化学的特性は、低温での食品加工のような工業的応用に有利である。水圏生物の酵素研究は、酵素タンパク質の構造・機能解析の研究対象としてのみならず、生物の環境適応および進化、さらには酵素の産業利用の観点からも重要である。水圏生物由来の酵素の研究は、陸上動物や微生物由来の酵素に比べて遅れているが、近年、急速に進歩した分離技術や遺伝子工学の手法により種々の特異な酵素の存在が明らかにされつつある。しかしながら、水圏生物由来の酵素の立体構造レベルでの詳細な構造・機能解析研究は殆ど行われていない。

岸村は水産廃棄物である魚類内臓や未利用の水産生物であるヒトデ類由来の有用酵素に関する研究を行ってきた。その中で、イトマキヒトデ (*Patiria pectinifera*) の内臓中のホスホリパーゼ A2 (PLA2: EC 3. 1. 1. 4) 活性が他生物に比べて 100~3, 000 倍高いことを見いだした。精製したイトマキヒトデ PLA2 は、至適 pH、至適温度、Ca²⁺の影響、基質脂肪酸特異性において、ほ乳動物膵臓由来 PLA2 のものとほぼ同様の性質を有した。一方、

イトマキヒトデ PLA2 の比活性 (119, 000U/mg) は、同様の方法で測定した市販のブタ膵臓 PLA2 (Sigma) のそれ (4, 300U/mg) と比較して 28 倍高く、また、ホスファチジルエタノールアミン (PE) に比べてホスファチジコリン (PC) をよく加水分解し、基質極性基に対してブタ膵臓 PLA2 と異なる性質を示した。さらに、イトマキヒトデ PLA2 のアミノ酸配列を決定した結果、本酵素はブタ膵臓由来 PLA2 の配列と比較して、膵臓ループ部位に 2 残基の欠損およびβ-ウィング部位に 13 残基の挿入を有し、新たなタイプの IC 型 PLA2 に分類された。イトマキヒトデ PLA2 の高い比活性や特異な基質極性基特異性は、このような構造に起因すると推察された。

そこで本研究では、イトマキヒトデ PLA2 を中心にして、水圏生物由来の酵素の立体構造レベルでの構造・機能解析研究を進展させるために行った。

2. 研究の目的

(1) 最も結晶化が容易な酵素である卵白リゾチームを用いて、酵素の結晶化の技術を修得する。

(2) 代表的な水産生物由来の酵素であり、精製も容易な魚類トリプシン (EC 3. 4. 21. 4) を用いて、水産生物由来酵素の結晶化の条件検討、X線結晶構造解析および立体構造特性の解析手法を修得する。本研究では、カタクチイワシ (*Engraulis japonica*) のトリプシンを用いた。

(3) イトマキヒトデ PLA2 の遺伝子構造の解明、結晶化の条件検討、X 線結晶構造解析および立体構造特性の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 材料および試薬

結晶化スクリーニングキット (Crystal Screen™・Crystal Screen2™: HAMPTON RESERCH)、結晶化プレート (VDX Plate™: HAMPTON RESERCH) は、家田貿易株式会社より購入した。

大腸菌 (*E. coli*) JM109 Competent Cell、プラスミド pCold TF DNA、制限酵素 *Nde* I および *Xho* I はタカラバイオ (株) より購入した。発現用の宿主大腸菌 (*E. coli*) Origami B (DE3) Quarters competent cells は Novagen より購入した。

(2) 卵白リゾチームの結晶化

結晶化は、蒸気拡散法のハンギングドロップ法で行った。Biological Macromolecule Crystallization Database (BMCD) (<http://xpdb.nist.gov:8060/BMCD4/index.faces>) から卵白リゾチームの結晶化条件を検索した。VDX Plate™ に 1.0M Tris-HCl (pH8.0) を 50μL (終濃度 100mM)、4M NaCl を終濃度が 1.0~2.5M になる様に分注して全量を 500μL とし、これを結晶化母液とした。卵白リゾチームを滅菌超純水で 10mg/mL に調製し、結晶化サンプルとした。結晶化サンプル 2μL と結晶化母液 2μL をカバーガラス上で混合し、VDX Plate™ とカバーガラスをシリコンオイルで密閉した。その後、20°C でインキュベートし、光学顕微鏡で経時的に観察した。

(3) カタクチイワシ・トリプシンの結晶化および X 線結晶構造解析

カタクチイワシ・トリプシンの精製は、岸村が既に確立した方法により行った。

カタクチイワシ・トリプシンの結晶化は、卵白リゾチームと同様の方法により行った。

X 線結晶解析は X 線回折装置を用いて行った。得られた電子密度図をカタクチイワシトリプシン・アイソザイムの塩基配列およびアミノ酸配列を基に分子置換法で構造精密化を行い、Rasmol で構造を出力し、Raster 3D および MOLSCRIPT および Swiss-Protein Pdv Viewer を用いて立体構造図を作製した。

(4) イトマキヒトデ PLA2 の遺伝子構造の解明および結晶化

イトマキヒトデ PLA2 の cDNA クローニングは常法に従って行った。

イトマキヒトデの内臓からの PLA2 の精製とイトマキヒトデ PLA2 遺伝子を挿入したプラスミド pET16-b を用いて形質転換した大腸菌 Origami B (DE3) によるイトマキヒトデ PLA2

(Wild Type PLA2) の発現およびその精製は、岸村が既に確立した方法により行った。

イトマキヒトデ PLA2 の結晶化は、卵白リゾチームと同様の方法により行った。

4. 研究成果

(1) 卵白リゾチームの結晶化

100mM Tris-HCl (pH8.0) および 1.0M、1.5M、2.0M あるいは 2.5M NaCl の条件で結晶化を試みた。その結果、20°C で 48 時間インキュベート後にいずれの条件においても結晶が得られた。NaCl 濃度が 1.0M から 2.5M へと増加するに従って、結晶は小さくなった。

(2) カタクチイワシ・トリプシンの結晶化および X 線結晶構造解析

カタクチイワシの内臓から 2 種類のトリプ

シン・アイソザイムIおよびII (AT-IおよびAT-II)を精製した。7,483mgの粗酵素からAT-IおよびAT-IIがそれぞれ45mgおよび11mg得られた。

BMCD よりトリプシンの結晶化条件を検索し、Crystal Screen™およびCrystal Screen 2™を用いて結晶化スクリーニングを行った。その結果、AT-Iは100mM HEPES (pH7.5)および1.2~2.2M NaClあるいは0.4~1.4M 硫酸アンモニウムの条件で結晶が得られ、100mM HEPES (pH7.5)、0.6M 硫酸アンモニウムにおいて立体構造解析に適した良質な結晶が得られた。また、AT-IIは100mM Tris-HCl (pH8.0)および1.2~2.2M NaClあるいは0.4~1.4M 硫酸アンモニウムの条件で結晶が得られ、100mM Tris-HCl (pH8.0)および1.8M NaClにおいて良質な結晶が析出した。

次に、得られたAT-IおよびAT-IIの結晶を用いてX線結晶構造解析を行った。その結果AT-Iの解析が終了した。AT-IのX線結晶解析の結果を図1に示す。本研究のAT-Iは、ほ乳動物膵臓由来のトリプシンと基本的に同様の立体構造を有した。すなわち、AT-Iは、N-ドメインとC-ドメインの2つのドメインから成り、N-ドメインには2つの α ヘリックス ($N\alpha 1$ および $N\alpha 2$)、7つの β シート ($N\beta 1$ 、 $N\beta 2$ 、 $N\beta 3$ 、 $N\beta 4$ 、 $N\beta 5$ 、 $N\beta 5'$ および $N\beta 6$)および Ca^{2+} 結合部位が存在し、C-ドメインには2つの α ヘリックス ($C\alpha 1$ および $C\alpha 2$)、6つの β シート ($C\beta 1$ 、 $C\beta 2$ 、 $C\beta 3$ 、 $C\beta 4$ 、 $C\beta 5$ および $C\beta 6$)および自己消化ループが存在する。そして、N-ドメインとC-ドメインの間に触媒三連基が存在する。また、AT-Iの触媒3連基の側鎖原子間の距離は、 $His57N^{\sigma 1}-Asp102^{\sigma 2}$ が2.6Å、 $His57N^{\sigma 1}-Asp102^{\sigma 1}$ が3.3Å、 $His57N^{\sigma 2}-Ser195O^{\gamma}$ が3.0Åであり、ウシ・トリプシンのそれらとほぼ同様であった。

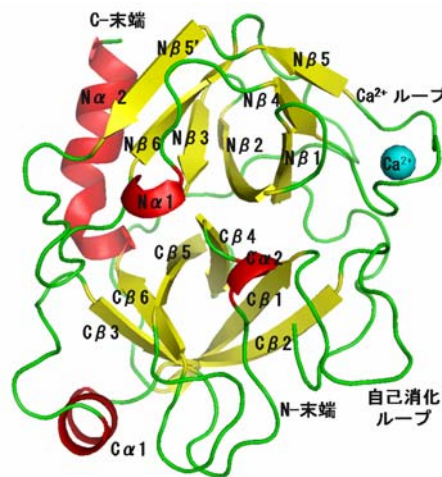


図1 AT-Iの立体構造図

一方、AT-Iの立体構造は以下の点においてウシ・トリプシンのものと相違した。第1に、AT-Iの「自己消化ループ」は分子の外に向かって開いた構造特性であったが、ウシ・トリプシンのそれは分子表面に添って折れ畳んだ構造であった。第2に、AT-Iはウシ・トリプシンと比較して、分子表面に存在する荷電アミノ酸残基数が著しく多かった。特に、AT-Iの「N-末端領域」は分子表面に荷電アミノ酸残基が多く分布し、疎水性アミノ酸残基は少なかった。第3に、AT-Iの「 Ca^{2+} 結合部位」周辺の立体構造表面に正電荷をもつアミノ酸残基が分布したが、ウシ・トリプシンでは存在しなかった。以上のAT-Iの立体構造特性は、AT-Iがウシ・トリプシンと比較してより柔軟な立体構造を有することを示唆する。

(3) イトマキヒトデ PLA2 の遺伝子構造の解明および結晶化

イトマキヒトデ PLA2 の遺伝子構造の解明のために mRNA の未知塩基配列決定を行った。その結果、215 bp の 5'-UTR、60bp のプレプロ領域および611bp の 3'-UTR の塩基配列が決定され、ポリ A 鎖およびポリ A シグナルの存在、

17残基のシグナルペプチド配列および3残基のプロ配列が演繹された。このことから、イトマキヒトデ PLA2 はイトマキヒトデ内臓の細胞内で発現し、シグナルペプチドの切断により細胞外に分泌され、プロ配列の切断により活性型の PLA2 になることが明らかになった。

イトマキヒトデの内臓から 1 種類の PLA2 を精製した。3,812mg の粗酵素から 2 mg の PLA2 (比活性 93,456 U/mg) が得られた。また、イトマキヒトデ PLA₂ 遺伝子を導入した大腸菌を大量培養し、272mg の粗酵素から 4 mg の Wild Type PLA2 (比活性 100,726U/mg) が得られた。

精製したイトマキヒトデ PLA2 を 10mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解して 6mg/mL に調整した。これを結晶化サンプルとし、Crystal Screen™ および Crystal Screen2™ を用いて結晶化スクリーニングを行った。その結果、100mM 酢酸 Na (pH4.0)、0.02M CaCl₂ および 30% 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD)、100mM HEPES (pH7.5)、0.2M CaCl₂ および 28% PEG400、100mM HEPES (pH7.5) および 1.5M LiSO₄ の条件で結晶が析出した (図 2)。



図 2 イトマキヒトデ PLA2 の結晶
(100mM HEPES (pH7.5) および 1.5M LiSO₄)

また、Wild Type PLA2 は 100mM Tris-HCl (pH8.5)、0.2M LiSO₄ および 30% PEG4000、100mM HEPES (pH7.5) および 0.8M 酒石酸 KNa、

100mM HEPES (pH7.6) および 1.4M クエン酸 Na、100mM 酢酸 Na (pH4.6)、0.2M 硫酸アンモニウム および 30% PEG2000、100mM MES (pH6.5)、0.2M 硫酸アンモニウム および 30% PEG5000、100mM HEPES (pH7.5)、0.5M 硫酸アンモニウム および 30% MPD、100mM HEPES (pH7.5)、0.05M CdSO₄ および 1M 酢酸 Na の条件で結晶が析出した (図 3)。

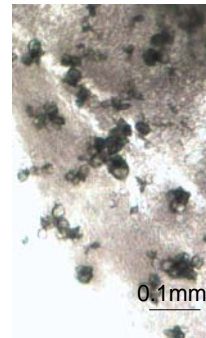


図 3 Wild Type PLA2 の結晶
(100mM HEPES (pH7.5)、0.5M 硫酸アンモニウム および 30% MPD)

最後に、上記の Wild Type PLA2 の回収率を改善するため、プラスミド pCold TF DNA を用いて、活性型の PLA2 (pCold TF PLA2) の発現を試みた。すなわち、5' - および 3' - に制限酵素 (*Nde* I および *Xho* I) 切断部位を付加したイトマキヒトデ PLA2 遺伝子に特異的なプライマーを設計し、RT-PCR を行った。PCR 産物を *Nde* I および *Xho* I で消化後、プラスミド pCold TF DNA にサブクローニングした。このプラスミドを用いて大腸菌 JM109 を形質転換した後、組換えプラスミド pCold TF PLA2 を得た。この組換えプラスミド pCold TF PLA2 を用いて大腸菌 Origami B (DE3) を形質転換した。形質転換した大腸菌 Origami B (DE3) を LB 培地に植菌し、37°C で 8.5 時間振とう培養した後、15 °C で 30 分静置して大腸菌を低温への適応期に置くことで、コールドショックタンパク質の発現を誘導した。次の

で、終濃度 0.5mM の IPTG 溶液を加えてから 15 °C で 24 時間 pCold TF PLA2 を発現させた。pCold TF PLA2 発現後の培養液から調製した粗酵素溶液中に PLA2 活性がわずかに検出された。このことから、活性型のイトマキヒトデ PLA2 が大腸菌により生産できる可能性が得られた。

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 1 件)

(1) B.-S. Chun, H. Kishimura, H. Kanzawa, S. Klomklao, S. Nalinanon, S. Benjakul, S. Ando

“Application of supercritical carbon dioxide for preparation of starfish phospholipase A2”

Process Biochemistry (査読有), Online publish (2010).

[学会発表] (計 3 件)

(1) 菅野岳・小林淳一・岸村栄毅・居弥口大介・豊田栄子・関崎春雄・佐伯弘樹

「カタクチイワシ・トリブシンの結晶化および X 線結晶構造解析」

日本水産学会秋季大会、2009 年 10 月 2 日、盛岡市、いわて県民情報交流センター・アーナ

(2) 菅野岳・小林淳一・岸村栄毅・居弥口大介・豊田栄子・関崎春雄・佐伯弘樹

「カタクチイワシ・トリブシンの結晶化および立体構造解析」

マリンバイオテクノロジー学会、2009 年 5 月 24-25 日、東京都、早稲田大学大久保キャンパス

(3) 岸村栄毅・小林淳一・居弥口大介・豊田栄子・関崎春雄・佐伯弘樹

「カタクチイワシ・トリブシンの精製と性質

およびその結晶化」

マリンバイオテクノロジー学会、2008 年 5 月 24-25 日、京都府、京都大学

[その他]

ホームページ等

(1) 岸村栄毅・阿部剛大

「イトマキヒトデ PLA2 の full mRNA sequence」(AB022278 in DDBJ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸村 栄毅 (KISHIMURA HIDEKI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：50204855

(2) 研究分担者

関崎 春雄 (SEKIZAKI HARUO)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：50094834

(2008 より連携研究者)

豊田 栄子 (TOYOTA EIKO)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：00103200

(2008 より連携研究者)

居弥口 大介 (IYAGUCHI DAISUKE)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：00433425

(2008 より連携研究者)

(3) 連携研究者

2008 より上記 3 名