

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22560770

研究課題名（和文）

改変型ホスホリパーゼDによるホスファチジルイノシトールの位置異性体選択的合成

研究課題名（英文）

Isomer-specific synthesis of phosphatidylinositol by engineered phospholipase D

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

研究成果の概要（和文）：

ホスファチジルイノシトール合成型ホスホリパーゼDを高機能化を試みた。本酵素の1-PI選択性を高めるため基質結合部位に変異を導入したところ、選択性を向上させることに成功した。次に本酵素の耐熱化のため揺らぎの大きな残基ランダム化したライブラリーからスクリーニングを行い、耐熱性が向上した変異体を獲得した。不安定性ループを除去した変異体を作製したところ、耐熱性はさらに向上した。

研究成果の概要（英文）：

Attempts were made to brush up phosphatidylinositol-synthesizing phospholipase D using protein engineering technique. First, the positional specificity of the enzyme was improved by mutation at the residues that form the "inner wall" of the inositol binding pocket. It was found that the substitutions of G186 and D189 were effective to improve the specificity, resulting in 93% 1-PI. Second attempt was to improve the thermostability. Random mutation was introduced to the residues with high B-factor. The resultant libraries were screened for enhanced thermostability, and we have successfully isolated mutants with the desired property. Finally, another mutant with deletion at an unstable 9-residue loop was constructed. The constructed deletion mutant showed further improved stability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：酵素工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生体触媒工学, ホスホリパーゼD, ホスファチジルイノシトール, 位置特異性

1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼD(PLD)はリン脂質の極性部に作用してホスファチジン酸と水酸化化合物に加水分解する酵素であるが、反応系内にアルコールが存在すると、その水酸基にホスフ

ァチジル基を転移する反応（ホスファチジル基転移反応）を触媒する。この反応を利用すると、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可能であ

る。

PLDによる転移反応により天然型リン脂質のほとんどは、相当するアルコールとホスファチジルコリン(PC)あるいはレシチンから酵素合成可能であり、一部は工業化されている。しかし、天然リン脂質のうちホスファチジルイノシトール(PI)に関しては、これまで実用的な合成例がなかった。

PIには脂質代謝向上作用等が報告されており、機能性脂質として注目を集めている。PIは大豆レシチン等にも含まれているものの、その含量は高くないため、天然物から抽出したPIは極めて高価であるという問題があった。

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、これまで困難とされていた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。

myo-イノシトールの6個の水酸基は非等価であるため、改変PLDを用いてPI合成を行うと、6種のPI位置異性体が生成しうる。代表者はPI異性体組成を調べるためのHPLC分析法を世界に先駆けて確立し、単離した約90種の改変PLDが生成するPIの異性体組成を精密に調べたところ、各々の変異内容によって、生じるPI異性体組成が大きく異なることを見出した。

現有する改変型PLDのうちNYRおよびHYR変異体は1-PIを優先的に(約78%)生成する。しかし、実用的なPI製造のためにはその1-PI選択性をさらに高める必要があった。さらにPI収率を向上させるためには高温で反応させてイノシトール濃度を高める事が有効であるため、PLDの耐熱性を向上させる事が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、PIの酵素合成を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を蛋白工学的に改変して、1)イノシトールに体する位置特異性の向上、および2)耐熱性、安定性の向上をめざした。

3. 研究の方法

現有する改変PLDのうち、1PI選択性の高いNYRのイノシトール結合ポケットの内壁を形成するループ部分(G186~D190)に着目し(図1)、これらの残基を一つづつ他のアミノ酸に置換した変異酵素を作製した。それらの変異酵素を組換え大腸菌で発現させ、得られた酵素を用いてPI合成反応を行った。生成したPIをR-フェニルエチルカルバメート誘導体とした後、逆相HPLCで分析することで

PI異性体組成を算出し、各変異酵素のPI異性体選択性を評価した。

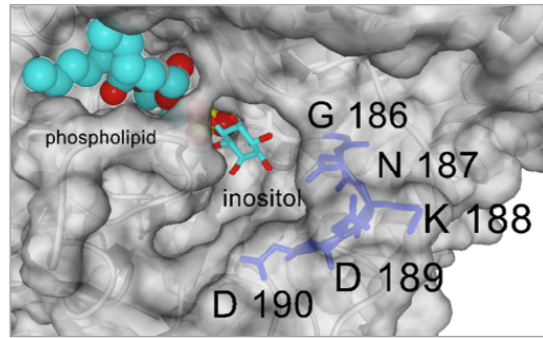


図1 基質結合ポケットの構造

また現有するDYRについて耐熱性の向上を試みた。DYRのB-factorをもとに構造揺らぎの大きな残基を選択し(図2)、その部分をランダム変異を導入したライブラリを作製した。ライブラリより耐熱性を指標にスクリーニングを行った。また方法によって得られた複数の耐熱性変異体を掛け合わせ、さらなる耐熱性向上を試みた。さらにランダム変異により構造不安定性に関わると考えられるループ(D40ループ)を欠損した変異体を作製し、その耐熱性を評価した。

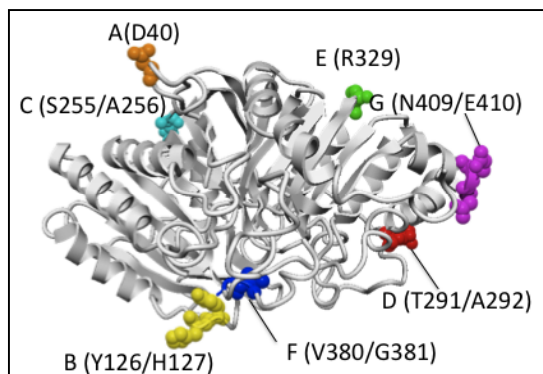


図2 耐熱化のための変異導入箇所

4. 研究成果

PLDの位置選択性の向上ではG186及び、D189位への置換が有効であった。特にG186を置換した変異PLDでは、1-PI組成が約93%

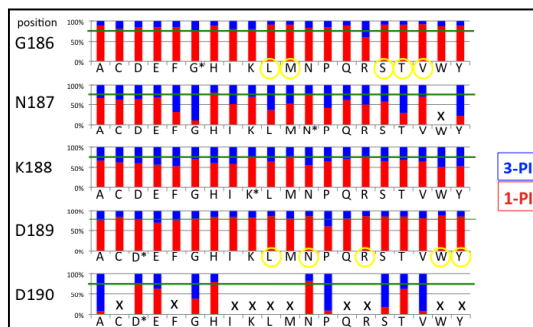


図3 1-PI選択性の向上

となり、親酵素と比較して選択性を大幅に向上させることに成功した(図3)。

一方, B-factor の高い残基にランダム変異を導入したライブラリーから耐熱性を指標にスクリーニングしたところ, 耐熱性が向上した複数の変異酵素を獲得した. 特に D40H/T291A 変異体では Tm が親酵素の 63.5 °C から 67 °C に向上した(表 1). 得られた耐熱型 PLD を用いて 60 °C で PI 合成を行ったところ, 収率の向上が確認された.

表 1 耐熱化 PLD の性質

Enzyme	Hydrolytic activity@30°C (nmol/min/mg protein)	Activity half life @65°C (min)	Tm (by CD) (°C)
Parent (D40H)	22.3	25.9	63.5
D40H	19.9	27.3	64
T291Y	22.3	27.8	65
R329G	21.2	34.0	66
D40H/T291Y	20.4	34.6	67
T291Y/R329G	22.0	30.4	67
D40H/R329G	20.7	26.9	65
D40H/T291Y/R329G	20.7	26.1	64.5

上記の結果を受け, 不安定性の一因である D40 付近のループ(9 アミノ酸)を除去した変異体を作製し(図 4), その安定性や PI 合成能を解析した. その結果, 耐熱性はさらに向上し, 70°C での失活の半減期が親酵素の 15 倍程度まで延長された.

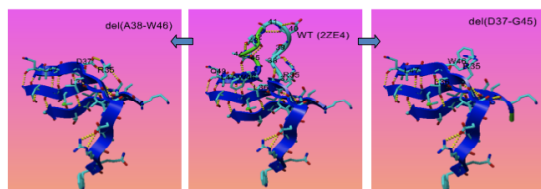


図 4 不安定ループの除去

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) Jasmina Damnjanović, Rie Takahashi, Atsuo Suzuki, Hideo Nakano and Yugo Iwasaki: Improving thermostability of phosphatidylinositol-synthesizing *Streptomyces* phospholipase D. *Protein Eng. Des. Sel.* 25, 415-424 (2012). 査読有
- (2) Jasmina Damnjanović, Hideo Nakano and Yugo Iwasaki: Simple and efficient profiling of phospholipids in phospholipase D-modified soy lecithin by HPLC with charged aerosol detection. *J. Am. Oil Chem. Soc.* in press. (2013). 査読有

- (3) Jasmina Damnjanović and Yugo Iwasaki: Phospholipase D as a catalyst: application in phospholipid synthesis, molecular structure and protein engineering. *J. Biosci. Bioeng.* in press (2013). 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- (1) 尾崎朱里, 岩崎雄吾, 中野秀雄: ホスファチジルイノシトール合成型ホスホリパーゼ D の位置選択性の解析. 日本農芸化学会中部支部第 159 回例会, 2010.10. 名古屋
- (2) 永坂和寛, 岩崎雄吾, 中野秀雄: ホスホリパーゼを用いたホスファチジルイノシトール異性体の選択的合成. 日本農芸化学会中部支部第 159 回例会, 2010.10. 名古屋
- (3) Iwasaki, Y.: *Streptomyces* phospholipase D with altered substrate specificity capable of synthesizing phosphatidylinositols. 8th Euro Fed Lipid Congress, 2010.11. Munchen, Germany
- (4) Iwasaki, Y., Masayama, A. and Nakano H.: Altering substrate specificity of phospholipase D by protein engineering. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2010, 2010.12. Honolulu, USA
- (5) Iwasaki, Y.: Enzymatic synthesis of phosphatidylinositols by phospholipase D. 7th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2011.10. Kyoto
- (6) Damnjanovic, J., Takahashi, R., Nakano, H. and Iwasaki, Y.: Phosphatidylinositol (PI) synthesis using thermostable *Streptomyces antibioticus* phospholipase D (PLD) mutants. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9. Sapporo
- (7) Damnjanovic, J., Takahashi, R., Nakano, H. and Iwasaki, Y.: A rapid and efficient HPLC method for profiling of phospholipids from soy lecithin used as substrate for 1(3)-PI synthesis

- catalyzed by mutant phospholipase D. 9th Euro Fed Lipid Congress, 2011. 9. Amsterdam, Netherland
- (8) 岩崎雄吾: 変型ホスホリパーゼ D によるホスファチジルイノシトールの酵素合成. 学際的脂質創製研究部会, 2012. 1. 大阪
- (9) ダムニャノビッチヤスミナ, 中野秀雄, 岩崎雄吾: Influence of surface loop (D40 loop) deletion on expression and stability of *Streptomyces antibioticus* phospholipase D. 日本農芸化学会 2012 大会, 2012. 3. 京都
- (10) Damnjanovic, J., Nakano, H. and Iwasaki, Y.: Characterization of *Streptomyces antibioticus* phospholipase D deletion mutant. The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2012. 5. Kanazawa
- (11) Damnjanovic, J., Nakano, H. and Iwasaki, Y.: Synthesis of phosphatidylinositol catalyzed by thermostable variants of *Streptomyces* phospholipase D. 15 th European Congress of Biotechnology, 2012. 9. Istanbul, Turkey
- (12) Damnjanovic, J., Nakano, H. and Iwasaki, Y.: Surface loop deletion as a strategy for enzyme thermostabilization. 日本生物工学会 2012 年大会, 2012. 10. 神戸
- (13) 石田健, 田中秀俊, Damnjanovic Jasmina, 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 においてイノシトール配向を決定するアミノ酸残基. 日本生物工学会 2012 年大会, 2012. 10. 神戸
- (14) 石田健, 田中秀俊, ダムニャノビッチ・ヤスミナ, 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 におけるイノシトールの配向を決定するアミノ酸残基. 日本農芸化学会中部支部第 165 回例会, 2012. 10. 名古屋
- (15) 岩崎雄吾: 放線菌ホスホリパーゼ D の基質特異性改変, 2012 年度酵素補酵素研究会 2012. 7. 名古屋
- (16) 岩崎雄吾: 変型ホスホリパーゼ D によるホスファチジルイノシトールの合成, 第 11 回ホスファチジルセリン研究会, 2012. 11. 東京
- (17) 岩崎雄吾: 放線菌ホスホリパーゼ D の蛋白工学的機能改変 酵素工学会第 69 回講演会 2013. 4. 名古屋
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
- 取得状況 (計 0 件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:
- [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 (IWASAKI YUGO)
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
()
研究者番号:
- (3) 連携研究者 なし
()
研究者番号: