

## 放線菌ホスホリパーゼDの機能改変

名古屋大学 大学院生命農学研究科 岩崎雄吾

### はじめに

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(PA)と水酸化化合物(XOH)に加水分解する酵素である(図 1A)。本酵素は反応系に水酸化化合物(YOH)が存在すると、リン脂質のホスファチジル基をそれに転移する反応(ホスファチジル基転移反応)を触媒する(図 1B)。この反応を利用すると、大豆レシチンなどの天然に豊富に存在する安価なリン脂質から、様々なリン脂質を簡単に合成することが可能である。

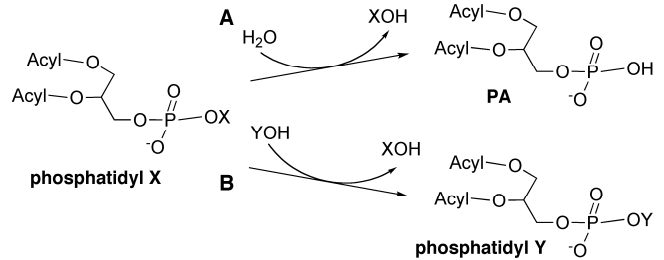


図 1 PLD が触媒する反応 A 加水分解 B ホスファチジル基転移反応

放線菌由来の PLD はその広い基質特異性ゆえに様々なリン脂質の製造に用いられてきた。現在では天然型リン脂質のほとんどはホスファチジルコリン(PC)と適当な水酸化化合物から合成する事ができる。しかし、PC とイノシトールからホスファチジルイノシトール(PI)を合成することは困難とされてきた。PI にはある種の脂質代謝改善作用が認められており、これを酵素的に合成する事は応用的に価値がある。本シンポジウムでは、放線菌 PLD の機能改変による PI 合成型 PLD の開発について紹介する。

### PI 合成活性を付与した変異 PLD のスクリーニング

放線菌 *Streptomyces antibioticus* 由来の PLD は、優れたホスファチジル基転移活性を有するが、レシチンとイノシトールから PI を合成する活性は持たない。この原因は本酵素の触媒ポケットが高高いイノシトール分子を受容できないためであると考えられる。図 2 は野生型(WT)PLD-基質複合体の基質結合部位周辺の立体構造である。W187, Y191 および Y385 の 3 つの残基に囲まれたスペースにリン脂質の極性基が入ると予想された。そこで、このスペースを拡大すればイノシトール分子を受容できるようになり、結果として PI 合成が可能になるのではないかと考えた。この考えに基づいて、PLD 遺伝子上の対応箇所にランダム変異を導入し、3 カ所のアミノ酸が置き換わった変異遺伝子ライブラリーを作製した。

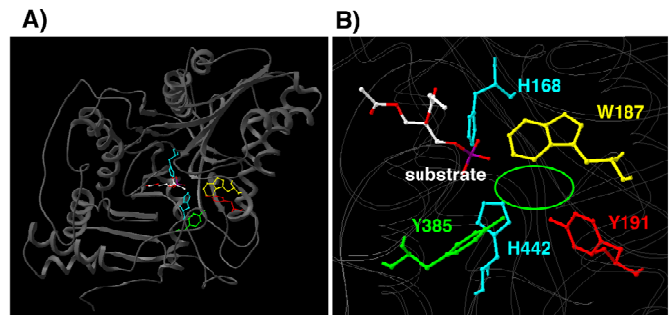


図 2 PLD の立体構造 A 全体図 B 基質結合部位

一方、PI 生成を指標としたハイスループットスクリーニング法を考案し、この方法を用いてライブラリー中の約 30,000 個のコロニーをスクリーニングした結果、約 90 種類の PI 合成型変異 PLD を獲得することに成功した。

### 変異 PLD が生成する PI 異性体

*myo*-イノシトールの 6 個の水酸基は化学的に非等価であるため、*myo*-イノシトールと PC から合成された PI には 6 通りの位置異性体が考えられる(図 3A)。そこで、TLC や HPLC を用いて全ての変異 PLD が生成する PI の異性体組成を調べた。その結果、187F/191R/385Y (FRY) 変異体をはじめとする多くの変異体は 1(3)-PI と 4(6)-PI の混合物を生成したが、興味深い事に、187D/191Y/385R (DYR)、187A/191Y/385R (AYR)、187M/191Y/385R (MYR) なる変異体は 1(3)-PI を選択的に生成する事が判明した(図 3B, C)。この 3 変異体に共通する 187X/191Y/385R

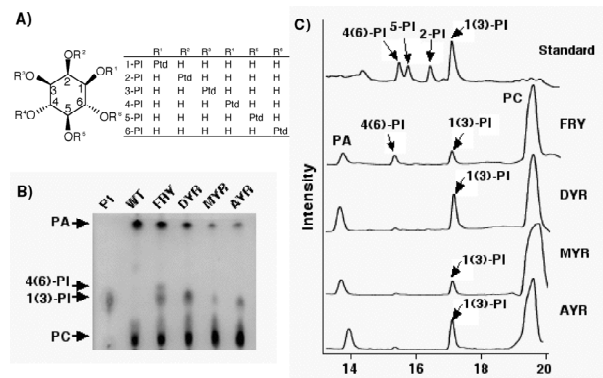


図 3. PI 異性体の分析 A:PI 異性体の構造 B:酵素生成物の TLC 分析 C: 酵素生成物の HPLC 分析

配列に着目し、187位を他の全てのアミノ酸に置換したXYR変異体を作製してPI合成活性を評価したところ、WYRを除く19種に関しては全て1(3)-PI選択的なPI合成活性を確認できた。

XYR変異体は1(3)-PIを選択的に生成するが、1-PIと3-PIはイノシトール環に対する対称性のため、通常のクロマトグラフィーでは区別する事ができない。そこでPI異性体を(R)-フェニルエチルカルバメート(PEC)誘導体とした後、ジアステレオマーとして相互分離する分析法を新たに開発した。

この分析法を用いて、主要な変異体の立体選択性を調べた(図4)。その結果、187H/191Y/385R(HYR)や187N/191Y/385R(NYR)ではイノシトールの1位に強い選択性を示し、6種の異性体のうち1-PIを選択的に生成する事がわかった。興味深い事に、

187T/191Y/385R(TYR)では選択性が逆転し、3-PIを選択的に生成する事がわかった。この事は、187位がたった一つ異なるだけで、イノシトールに対する1位と3位の識別能が反転することを意味している。また、FRYは1-, 3-, 4-, および6-PIを生成し、ブロードな位置/立体特異性を有する事がわかった。

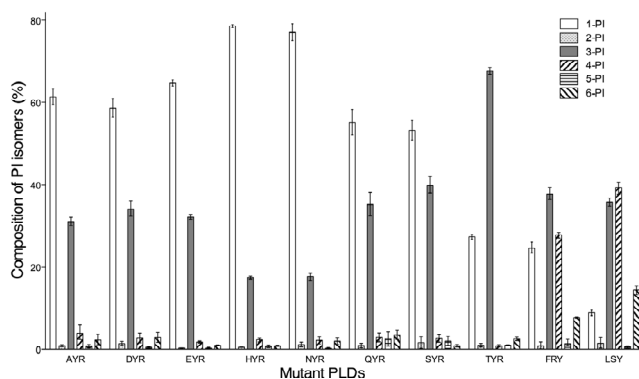


図4 変異PLDが生成するPIの異性体組成

### 変異型PLDの立体構造

DYR及びFRYの立体構造をX線構造解析により決定し、PIとの複合体モデルを構築した。図5は、WT、FRY、及びDYRの基質結合部位の構造を比較したものである。当初の予想通り、WTでは187位のW残基がイノシトール環の結合を妨げているが、

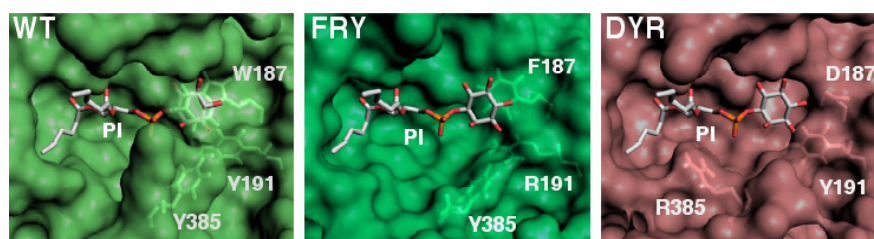


図5 WTおよび変異型PLDのFRYの基質結合部位付近の構造比較

2つの変異酵素ではそれが解消され、イノシトールを受け入れるスペースが形成されている事がわかった。また、FRYとDYRのイノシトール受容スペースを比較すると、DYRの方がFRYよりも狭い事がわかった。この事は、DYRのイノシトール環に対する高い位置選択性、すなわち、ある特定の向きでのみイノシトール分子を受容する事ができるという性質と関連があると思われる。

### おわりに

蛋白質工学的機能改変によるPI合成型PLDの開発について紹介した。今後は得られた変異酵素を元に特異性や比活性の増強といった、さらなる高機能化を進めていきたいと考えている。

### 文献

- Masayama A. *et al*, *ChemBioChem*, **9**, 974-981 (2008).  
 Masayama A. *et al*, *ChemBioChem*, **10**, 559-564 (2009).