

論文内容の要旨

博士論文題目 Studies on the catalytic reaction of *Streptomyces* phospholipase D
(Phospholipase D の反応性に関する研究)

氏 名 上杉 佳子

(論文内容の要旨)

Phospholipase D (PLD) は、ホスファチジル基の転移と加水分解の 2 種の反応を司り、その転移反応は、脳機能改善作用を有するホスファチジルセリンなどの希少な機能性リン脂質の合成に有用である。しかし、反応メカニズムに関する従来の研究は、触媒部位である 2 ヶ所の HKD モチーフに限定されており、HKD モチーフ以外の反応性に寄与するアミノ酸残基は特定されておらず、反応メカニズムの解明は十分でない。

そこで、本論文では、放線菌由来 PLD の変異体及びキメラを用いて、PLD の転移反応および加水分解反応に関わるアミノ酸残基を特定することによって反応メカニズムを解明し、併せて転移活性と基質選択性の優れた高機能性 PLD を創成するために指針を示すことを目的とした。

まず、PLD の 2 ヶ所の HKD モチーフの役割を明らかにすることに取り組んだ。従来、N 末側と C 末側の HKD モチーフのどちらがホスファチジル基を求核攻撃する求核子であるかは明らかになっていなかった。そこで、それぞれの HKD モチーフの His 残基を Ala に置換した変異体を作製し、ホスファチジル-PLD 中間体の形成の程度を表面プラズモン共鳴法で評価した。その結果、N 末側の His を置換した変異体は、C 末側の His を置換した変異体と比較してホスファチジルコリンとホスファチジルセリンに対する結合能が大きく減少した。この結果から、N 末側の HKD モチーフの His 残基が求核子である可能性が示された。また、C 末側の His を置換した変異体では、ホスファチジルグリセロールの結合能がホスファチジルコリンとホスファチジルセリンと比較して大きく減少しており、C 末側の HKD モチーフの His 残基がホスファチジルグリセロールの認識に寄与している可能性も示唆された。

次に、HKD モチーフ以外の反応に関わる残基の特定を行うために、Repeat-length independent and broad spectrum (RIBS) *in vivo* DNA shuffling を用いて、転移活性の異なる 2 つの放線菌由来 PLD (TH-2PLD および PLDP) からキ

メラ PLD ライブラリーを作製した。キメラ PLD の転移活性と加水分解活性を評価した結果、反応性に関わる 2 つのアミノ酸領域、TH-2PLD の 188-203 および 425-442、を特定した。これらの領域は、PLD の 2 つのドメインのそれぞれ向かい合う 2 つのループ上に存在しており、触媒部位の入り口に相当すると推測された。

さらに、これらの領域の中で反応性に寄与するアミノ酸残基を詳細に特定するため、キメラを作製して反応性に与える影響を検討した。その結果、4 つのアミノ酸残基 Gly188、Asp191、Ala426 および Lys438 が反応性に関わることが示された。アミノ酸残基 188 および 191 は基質の会合状態を認識して反応性に影響を与えること、アミノ酸残基 426 および 438 は反応性の向上と転移反応の選択性に関わることが示唆された。これらのアミノ酸残基は触媒部位である HKD モチーフに含まれず、HKD モチーフと非依存的に反応性に関わることが示唆された。この研究により、転移反応と加水分解反応に関わる HKD モチーフ以外の残基が初めて明らかになった。

本研究で明らかになった触媒部位である HKD モチーフと、HKD モチーフ以外の反応性に関わる部位に関する知見は、今後高機能性 PLD の創製を行うための指針となる。

(論文審査結果の要旨)

Phospholipase D (PLD) は、ホスファチジル基の転移と加水分解の 2 種の反応を司り、その転移反応は脳機能改善作用を有するホスファチジルセリンなどの稀少な機能性リン脂質の合成に有用である。しかし、反応メカニズムに関する従来の研究は、触媒部位である 2 ヶ所の HKD モチーフに限定されており、HKD モチーフ以外の反応性に寄与するアミノ酸残基は特定されておらず、反応メカニズムの解明は十分でなかった。

本論文は、放線菌由来 PLD の変異体及びキメラを用いて、PLD の転移反応および加水分解反応に関わるアミノ酸残基を特定することによって反応メカニズムを解明し、併せて転移活性能と基質選択性の優れた高機能性 PLD を創成するために指針を示すことを目的としている。その結果、以下のような重要な結果を得た。

- 1) これまで PLD 中に存在する 2 つの HKD モチーフのうちどちらが求核子であるかは明らかになっていなかった。まずこの HKD モチーフに着目し、それぞれの His 残基を Ala に置換した変異体を作製し、リン脂質との結合を定量的に検討した。その結果、N 末側の HKD モチーフが求核子である可能性を示した。さらに、C 末側の HKD モチーフがホスファチジルグリセロールの認識に関わることも推定した。
- 2) 次に、HKD モチーフ以外の反応に関わる残基の特定を行うために、Repeat-length independent and broad spectrum (RIBS) *in vivo* DNA shuffling を用いて、転移活性の異なる 2 つの放線菌由来 PLD (TH-2PLD および PLDP) からキメラ PLD ライブラリーを作製した。キメラ PLD の転移活性と加水分解活性を評価した結果、反応性に関わる 2 つのアミノ酸領域、TH-2PLD の 188- 203 および 425- 442、を特定した。これらの領域は、PLD の 2 つのドメインのそれぞれ向かい合う 2 つのループ上に存在しており、触媒部位の入り口に相当すると推測した。
- 3) さらに、これらの領域の中で反応性に寄与するアミノ酸残基を詳細に特定するため、キメラを作製して反応性に与える影響を検討した。その結果、4 つのアミノ酸残基 Gly188、Asp191、Ala426 および Lys438 が反応性に関わることが示された。アミノ酸残基 188 および 191 は基質の会合状態を認識して反応性に影響を与えること、アミノ酸残基 426 および 438 は反応性の向上と転移反応の選択性に関わることが示唆された。これらのアミノ酸残基は触媒部位である HKD モチーフに含まれず、HKD モチーフと非依存的に反応性に関わることが示唆された。この研究により、転移反応と加水分解反応に関わる HKD モチーフ以外の残基が初めて明らかになった。

以上のように、本論文は、従来解明されていなかった PLD の反応に関わるアミノ酸領域を初めて明らかにした。PLD の反応メカニズムを詳細に解明するとともに、有用な脂質の製造に用いえる変異 PLD の設計に対して重要な基礎的知見を与えた。よって、審査員一同は、本論文が博士 (工学) の学位論文として価値あるものと評価し、審査結果を合格と認めた。