

氏名	なか がわ ゆう いち 中 川 祐 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1668 号
学位授与の日付	平 成 20 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Amide-Hydrolyzing Activities of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lipase by Directed Evolution (進化分子工学を用いた <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来リパーゼのアミド加水 分解活性に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 宮 川 恒 教 授 江 崎 信 芳 准 教 授 平 竹 潤

### 論 文 内 容 の 要 旨

リパーゼはトリアシルグリセロールを基質とし、これをグリセロールと脂肪酸に加水分解するエステル加水分解酵素である。その活性中心には Ser-His-Asp/Glu からなる catalytic triad と、四面体型中間体を安定化するための oxyanion hole をもつ。これらの構造はキモトリプシンやサチライシンといったセリンプロテアーゼと類似しているが、リパーゼはセリンプロテアーゼと異なり、化学的により安定なアミドを加水分解することができない。しかし、リパーゼの触媒残基の種類やそれらの空間的配置、アシル酵素中間体を経て進む二段階の反応機構などは、セリンプロテアーゼと酷似していることから、変異を導入することでリパーゼをアミド加水分解酵素へと改変できるのではないかと考えられた。そこで、進化分子工学的的手法を用いて *Pseudomonas aeruginosa* 由来リパーゼのアミド加水分解活性を向上させること、また、得られた変異体を速度論的に解析し、リパーゼによるアミド加水分解の分子機構を明らかにすることを目的とした。

#### 1) 進化分子工学的的手法によるリパーゼのアミド加水分解活性向上

野生型酵素と比べて約 2 倍のアミド加水分解活性を示す二重変異体、F207S/A213D を親変異体として用いた。F207S/A213D の遺伝子に、error-prone PCR を用いてランダム変異を導入した。得られた 20,000 個のリパーゼ変異体を、アミド基質 *N*-(2-naphthyl)oleamide に対する加水分解活性を指標にスクリーニングした結果、親変異体と比べ、活性の向上した 5 つの変異体 (10F12, 2C7, 3E2, 10G5, 3B9) を得た。シークエンシングの結果、これらのうち 4 変異体 (10F12, 2C7, 10G5, 3B9) は同じ変異 L252M を獲得した同一の変異体であった。また、残りの変異体 3E2 は、V76A の変異を有していた。得られた変異体の中から、野生型酵素と比べ 3.6 倍の活性を示した変異体 10F12 を選抜し、次の世代の親変異体として進化実験に供した。

変異体 10F12 の基質結合部位を構成する 20 個のアミノ酸残基それぞれに対して saturation mutagenesis を行い、各残基ごとにそれぞれ 20 種類のアミノ酸に置換した変異体を取得して、それらの活性を網羅的に測定した。基質結合部位は、野生型酵素とアミノ酸配列相同性 99% のリパーゼの立体構造情報 (PDB entry: 1EX9) にもとづき、タンパク質の物理的な形状を計算するプログラム CASTp を用いて計算、決定した。四面体型中間体を安定化する oxyanion hole を構成する残基 M16 と H83 に対する saturation mutagenesis の結果、アミド加水分解活性の向上した変異体を得ることはできなかった。しかし、親変異体である 10F12 と比べて活性の低下した変異体 M16L を見いだした。メチオニン、ロイシン以外の残基に置換された変異体はアミド加水分解活性を示さなかったことから、oxyanion hole による四面体型中間体の安定化は、リパーゼによるアミド加水分解に大きな影響を与えており、M16 と H83 は進化の過程ですでに最適化を受けていることが示唆された。次に、ランダム変異によってアミド加水分解活性の向上が見られた M252 に対する saturation mutagenesis を行ったところ、野生型酵素と比べ、アミド加水分解活性が 12 倍向上した変異体 Sat252 を得た。この変異体は M252F という変異を有していた。基質結合部位を構成するアミノ酸残基のうち、残りの 17 残基に対する saturation mutagenesis を行ったが、アミド加水

分解活性の向上した変異体を得ることはできなかった。

## 2) アミド加水分解の向上した変異体の速度論的解析

野生型酵素, 10F12 および Sat252 について, アミド基質 *N*-(2-naphthyl) oleamide に対する速度論的パラメータを求めた。野生型酵素と比べ, 10F12 では  $K_m$  値が減少していたことから, 少なくとも基質に対する親和性が向上していることが分かった。一方 10F12 と比べ, Sat252 では  $K_m$  値は増大していたにもかかわらず,  $k_{cat}$  値は 6 倍の向上を示した。また Sat252 は得られた変異体の中で最高のアミド加水分解活性を示し, 野生型酵素と比べ, 触媒効率を示す  $k_{cat}/K_m$  値が 28 倍に向上していた。アミド基質と構造の類似したエステル基質 2-naphthyl oleate に対する  $k_{cat}$  値は 10F12 と Sat252 でほとんど変わらなかったことから, Sat252 のもつ変異 M252F はアミド加水分解活性のみを選択的に向上させ, エステル加水分解活性には影響を与えないことが分かった。

変異 M252F は catalytic triad を構成する触媒残基ヒスチジン (H251) に隣接しており, この変異は H251 の機能に影響を与えていると考えられた。H251 は触媒反応の過程で一般酸塩基として機能すること, アミド加水分解の  $k_{cat}$  値のみを選択的に向上させ, エステル加水分解の  $k_{cat}$  値には影響を与えなかったことから, リパーゼのアミド加水分解活性が向上したのは, H251 の酸触媒としての機能が向上したためであると結論づけた。

## 3) 異なるアミドおよびエステル基質に対する活性測定

野生型酵素, 10F12 および Sat252 について, エステル基質である 4-nitrophenyl oleate とアミド基質である *N*-(4-nitrophenyl) oleanilide および *N*-(2,4-dinitrophenyl) oleanilide に対する活性を測定した。この結果, エステル基質 4-nitrophenyl oleate およびアミド基質 *N*-(4-nitrophenyl) oleanilide に対する活性の向上は, ほとんど認められなかった。一方, *N*-(2,4-dinitrophenyl) oleanilide に対する活性は  $k_{cat}/K_m$  値で約 13 倍向上した。

## 論文審査の結果の要旨

エステル加水分解酵素であるリパーゼは, 広い基質特異性に加えて, 優れた立体選択性や位置選択性を有することから, 光学活性なアルコールやエステル類の合成用触媒として, 実験室から工業レベルにいたる非常に広い範囲で用いられている。したがって, リパーゼを用いてアミドを加水分解することができれば, アミンの光学分割やアミド型保護基の位置選択的脱保護など, さまざまな応用が期待される。本論文では進化分子工学的手法を用い, リパーゼのアミド加水分解活性を向上させること, またアミド加水分解活性の向上した変異体を速度論的に解析することで, 活性向上の分子機構を明らかにすることを目指した。その評価される主な点は以下の通りである。

1) ランダム変異の導入, および基質結合部位に対する saturation mutagenesis によって, *N*-(2-naphthyl) oleamide に対する加水分解活性が大きく向上した変異体を取得した。またアミド基質の構造に類似したエステル 2-naphthyl oleate に対する活性を測定した結果, リパーゼのエステル加水分解活性は, アミド加水分解活性とは関連せず, アミド加水分解活性のみを選択的に向上させることに成功した。

2) 野生型酵素と変異体について, アミドおよびエステル加水分解反応の速度論的パラメータを求めた。その結果, アミド加水分解活性の最も向上した変異体 Sat252 では, 野生型酵素と比べ  $k_{cat}/K_m$  値が 28 倍向上していること, またその活性の向上が  $K_m$  値の減少ではなく  $k_{cat}$  値の向上によることを明らかにした。

3) Sat252 がもつ変異 M252F はアミド加水分解活性の  $k_{cat}$  値のみを特異的に向上させ, エステル加水分解の  $k_{cat}$  値には影響を与えなかった。また M252F は触媒残基ヒスチジンに隣接していることから, リパーゼによるアミド加水分解活性向上の分子機構はヒスチジン残基の一般酸触媒としての機能向上によることを示した。

以上本論文では, 進化分子工学的手法を用いることで, セリン加水分解酵素であるリパーゼのアミド加水分解活性を向上させるとともに, 速度論的な解析によって活性向上の分子機構を明らかにした。このことは, ともにセリン加水分解酵素であるプロテアーゼとエステラーゼの活性の違いに, 触媒機構の観点から新たな知見を与えるものであり, 生化学, 酵素化学, タンパク質工学に寄与するところが多い。

よって, 本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。なお, 平成19年11月8日, 論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。