

称号及び氏名 博士（工学） 梶原 翔太

学位授与の日付 平成 31 年 3 月 31 日

論 文 名 「Improvement of Organic Solvent Stability  
of Lipases by Modification with Saccharides」  
(糖修飾によるリパーゼの有機溶媒安定性の向上)

論文審査委員 主査 荻野 博康

副査 武藤 明德

副査 安田 昌弘

副査 山田 亮祐

## 論文要旨

酵素は生物の細胞内で合成される触媒機能を有したタンパク質であり、常温・常圧・中性 pH といった温和な環境下で効率よく反応を触媒できる。また、酵素はその立体構造によって、酸化還元反応、転移反応、加水分解反応、あるいは異性化反応といった幅広い反応を触媒することができる。近年、医薬品およびその中間体、生化学物質などの高付加価値であり、複雑な構造を持つファインケミカルの需要がますます高まっている。ファインケミカル製造の触媒として基質特異性や反応選択性の高い酵素を用いると反応工程数を削減するだけでなく、副生成物の生成を抑制できるため、省資源・省エネルギーな環境調和型化学プロセスの構築が可能になる。

酵素の一種であるリパーゼは水中では高級脂肪酸のトリアシルグリセロールの加水分解反応を触媒するが、有機溶媒存在下においてはエステル合成反応やエステル交換反応を触媒することができる。また、反応溶液に有機溶媒を添加することで基質の溶解性が向上し、反応速度の向上も期待できる。しかし、リパーゼを含む酵素は一般的に有機溶媒存在下では容易に失活するため、有機溶媒存在下において安定なリパーゼが求められている。

酵素表面の親水性は酵素の有機溶媒安定性に関係し、酵素表面の親水性が低い場合、酵素分子と有機溶媒分子の直接の接触や酵素表面の水分子が奪われることで、酵素は容易に

失活すると考えられている。一方、酵素表面の親水性が高い場合、有機溶媒存在下においても酵素周囲に配位した水分子が多く、酵素分子と有機溶媒分子の直接の接触を低減することができるため、有機溶媒存在下でも酵素の安定性が向上すると期待できる。糖や糖鎖はヒドロキシ基を多く持つため親水性が高く、自身の周りに水分子を配位するため、酵素を糖で修飾することで酵素表面の親水性が向上し、有機溶媒安定性の向上が期待できる。

本研究は、リパーゼの有機溶媒安定性の向上を目的として (1) リパーゼとスクロースを含む溶液を凍結乾燥する手法、(2) リパーゼに含まれるリシン残基の  $\epsilon$ -アミノ基と酸化したデキストリンに含まれるアルデヒド基を共有結合する手法、(3) 真核生物である酵母による *N* 結合型糖鎖付加機構を用いる手法の三つの手法によってリパーゼに糖を修飾し、リパーゼの有機溶媒安定性に及ぼす糖や糖鎖の影響を検討したものであり、以下に示す 5 章から構成される。

第 I 章では本研究の研究背景を述べるとともに、本研究の目的と構成を述べた。

第 II 章では、*Pseudomonas fluorescens* 由来のリパーゼとスクロースを含む溶液を凍結乾燥することでリパーゼをスクロースで修飾し、有機溶媒中でのリパーゼの活性や安定性に及ぼすスクロース修飾の影響について述べた。まず凍結乾燥後のリパーゼの活性に及ぼす pH およびスクロース濃度の影響を検討したところ、5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 9.0) および 1% (w/v) スクロースを含むリパーゼ溶液を凍結乾燥したときにスクロース修飾リパーゼのエステル交換活性が最も高かった。この条件で調製したスクロース修飾リパーゼは、修飾していないリパーゼと比べ、100% (v/v) *n*-デカン、*n*-ヘキサン、1-オクタノール、1-ペンタノール、あるいは 1-プロパノール中において高い安定性を示した。また、100% (v/v) *n*-ヘキサンや 50% (v/v) の *n*-オクタン、1-オクタノール、1-ペンタノール、1-プロパノール、あるいはアセトンを含む *n*-ヘキサン中では、スクロースで修飾することでリパーゼの活性が向上した。本章において、凍結乾燥を用いる方法によるスクロース修飾は有機溶媒中でのリパーゼの安定性を向上させる方法として有効であった。

第 III 章では、*Candida cylindracea* 由来のリパーゼのリシン残基に酸化したデキストランを修飾し、有機溶媒存在下におけるリパーゼの安定性に及ぼすデキストラン修飾の影響について述べた。凍結乾燥を用いる手法でスクロース修飾した場合、リパーゼとスクロースはファンデルワールス力などの弱い力で結合しているため、酵素反応溶液中でスクロースが容易に脱離する可能性がある。一方、リパーゼのリシン残基に酸化したデキストランを修飾した場合、リシン残基とデキストランは共有結合するため、酵素反応溶液中でも脱離しない。本章ではまず、還元剤を用いずにデキストラン修飾を試みた。pH 7.7 で修飾したときに修飾リパーゼの比活性が最も高く、pH 8.0 で修飾したときに、修飾されたリシン残基の割合 (修飾率)、修飾デキストラン量、および 25% (v/v) エタノールあるいは 2-プロパノール存在下でのリパーゼの安定性が最も高かった。また、pH 8.0 でデキストラン修飾したリパーゼは、修飾していないリパーゼと比べ、25% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO)、エタノール、2-プロパノール、トルエン、あるいはイソオクタン存在下において高い安定性

を示した。次に、修飾時に還元剤としてボランピリジン錯体を加えてデキストラン修飾を試みた。修飾時に還元剤を用いると、リパーゼとデキストランの共有結合の形成を促進させるが、酸化デキストランのアルデヒド基を還元する可能性がある。pH 8.0 で還元剤を用いた修飾を行ったときに修飾リパーゼの比活性、修飾率、修飾デキストラン量、および 25% (v/v) エタノールあるいは 2-プロパノール存在下でのリパーゼの安定性が最も高かった。また、pH 8.0 でデキストラン修飾したリパーゼは、修飾していないリパーゼと比べ、25% (v/v) DMSO、エタノール、2-プロパノール、トルエン、*n*-ヘキサン、あるいはイソオクタン存在下において高い安定性を示した。修飾時にボランピリジン錯体を加えて調製したデキストラン修飾リパーゼは、還元剤を用いずに調製したデキストラン修飾リパーゼと比べ、修飾度は同程度であったが、修飾デキストラン量および修飾リパーゼの比活性が高く、還元剤を用いることで修飾時に高い活性を保持できた。本章において、リパーゼのリシン残基の  $\epsilon$ -アミノ基と酸化したデキストランに含まれるアルデヒド基を共有結合する手法によるデキストラン修飾は有機溶媒存在下でのリパーゼの安定性を向上させる方法として有効であった。

第 IV 章では、真核生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で *Bacillus thermocatenuatus* 由来のリパーゼ (BTL2) を発現することで N 結合型糖鎖付加を行い、リパーゼの有機溶媒安定性に及ぼす糖鎖修飾の影響について述べた。真核生物を宿主とした場合、細胞を培養するだけでリパーゼを生産すると同時に糖鎖修飾も行われるため、凍結乾燥を用いる手法やリパーゼのリシン残基と酸化したデキストランを共有結合させる手法のような修飾操作が不要になる。まず、酵母 *S. cerevisiae* を宿主とした BTL2 分泌発現量の向上を試みた。15 種類のプロモーター配列、15 種類の分泌シグナル配列、および 15 種類のターミネーター配列からなる発現カセットを含むコンビナトリアル DNA ライブラリーを作製し、作製した DNA ライブラリーを *S. cerevisiae* で発現した。その後、一般的に酵母 *S. cerevisiae* を宿主とした分泌発現に用いられる PGK1 プロモーター、 $\alpha$  ファクターシグナル配列、PGK1 ターミネーターによりリパーゼを分泌発現する形質転換体をコントロール株とし、トリブチリンを含むプレート培地上で形質転換体が形成したクリアゾーンの大きさや液体培養したときの培養上清中のリパーゼの活性を測定した。13,600 の形質転換体の中から BTL2 を高分泌発現するものを 4 つ選抜した。最も高分泌発現した形質転換体の培養上清中のリパーゼ活性はコントロール株より約 130 倍高かった。BTL2 の mRNA 転写量は、コントロール株より 2.5 倍以上高かった。しかし、酵母 *S. cerevisiae* で発現した BTL2 には糖鎖が付加されていないかった。そこで、N 結合型糖鎖付加が行われるコンセンサス配列 (-NXS/T-) を部位特異的変異導入によって BTL2 のアミノ酸配列中に導入することにより、N 結合糖鎖付加された変異 BTL2 の作製を試みた。コンセンサス配列の導入により、6 つの N 結合型糖鎖付加変異 BTL2 を得た。特に糖鎖付加変異体 T236N は、糖鎖切断後の変異体 T236N と比べて、25% (v/v) エチレングリコール、DMSO、ジメチルホルムアミド存在下において安定性が高かった。本章において、酵母 *S. cerevisiae* による N 結合型糖鎖付加機構を用いた手法による糖鎖修飾はリパーゼの安定性を向上させる方法

として有効であった。

第 V 章では、本論文の各章の研究成果をまとめ、総括を述べた。本論文では、スクロース、デキストラン、*N* 結合型糖鎖でリパーゼを修飾することでリパーゼの活性や有機溶媒安定性を向上することに成功した。糖による酵素の修飾は、人体に無害な糖を用いることで製品への混入も問題とならない。また、本論文で用いた方法による糖修飾はリパーゼに限らず様々な酵素に対して用いることができる。そのため、糖修飾は有機溶媒存在下での酵素の活性や安定性を向上する、汎用的で有用な手法の一つとして有望であり、ファインケミカル生産において酵素を用いた環境調和型プロセスの構築への寄与が期待できる。

## 審査結果の要旨

本論文は、リパーゼの有機溶媒安定性の向上を目的とし、(1) リパーゼとスクロースを含む溶液を凍結乾燥する手法、(2) リパーゼに含まれるリシン残基の  $\epsilon$ -アミノ基と酸化したデキストリンに含まれるアルデヒド基を共有結合する手法、(3) 真核生物である酵母による N 結合型糖鎖付加機構を用いる手法の三つの手法によってリパーゼに糖を修飾し、リパーゼの有機溶媒安定性に及ぼす糖や糖鎖の影響を検討したものであり、以下に示す成果を得ている。

(1) リパーゼとスクロースを含む溶液を凍結乾燥する手法によるスクロース修飾は有機溶媒存在下でのリパーゼの安定性および活性を向上させた。

(2) リパーゼのリシン残基の  $\epsilon$ -アミノ基と酸化したデキストリンに含まれるアルデヒド基を共有結合する手法によるデキストリン修飾は有機溶媒存在下でのリパーゼの安定性を向上させた。また、修飾反応時に還元剤であるボランピリジン錯体を加えることで、修飾デキストリン量および修飾リパーゼの比活性を向上させ、さらに修飾時に高い活性を保持できた。

(3) 15 種類のプロモーター配列、15 種類の分泌シグナル配列、および 15 種類のターミネーター配列からなる発現カセットを含むコンビナトリアル DNA ライブラリーを用いて、一般的に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした分泌発現に用いられる発現カセットを用いた場合に比べ、培養上清中のリパーゼ活性が約 130 倍高い株を取得することができた。

(4) N 結合型糖鎖付加が行われるコンセンサス配列 (-NXS/T-) を部位特異的変異導入によって BTL2 のアミノ酸配列中に導入することにより 6 つの N 結合型糖鎖付加変異 BTL2 を得た。特に糖鎖付加変異体 T236N は、糖鎖切断後の変異体 T236N と比べて、有機溶媒存在下において安定性が高く、酵母 *S. cerevisiae* による N 結合型糖鎖付加機構を用いた手法による糖鎖修飾はリパーゼの安定性を向上させる方法として有効であった。

以上の諸成果は、様々な手法によって糖や糖鎖を修飾することによってリパーゼの有機溶媒安定性が向上することを示したものであり、糖修飾が有機溶媒存在下での酵素の活性や安定性を向上する、汎用的で有用な手法の一つとして有望であることを示している。また、申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。