

称号及び氏名	博士（工学）	河田 拓也
学位授与の日付	2010年3月31日	
論文名	組換えリパーゼの有機溶媒耐性の向上	
論文審査委員	主査	荻野 博康
	副査	小西 康裕
	副査	足立 元明

論文要旨

リパーゼは高級脂肪酸トリグリセリドの加水分解を触媒する酵素であり、動物では脂肪の分解や貯蔵に関与している。リパーゼは動物のみならず、植物、微生物に至るまで自然界に広く分布している酵素であり、とりわけ、微生物由来の酵素は多様性の高さ、および取り扱いの容易さから産業用の触媒として用いられることが多い。リパーゼの作用する基質は一般的に水に不溶または難水溶性基質であり、反応系に有機溶媒を添加することにより基質の溶解度を高め、反応速度や反応生成物の濃度を高めることができる。有機溶媒存在下では加水分解反応以外にも逆反応である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、リパーゼは脂質の改質、医薬品、農薬、香料、および機能性物質の合成など多用途に用いられている。しかしながら、リパーゼをはじめとする酵素はタンパク質でできており基質の溶解性向上や反応平衡の移動の為に添加した有機溶媒によるリパーゼの失活が問題となる。そのため、有機溶媒存在下でも安定なリパーゼが求められている。

有機溶媒耐性微生物 *Pseudomonas aeruginosa* LST-03株が産生するリパーゼ（LST-03リパーゼ）の dimethylsulfoxide（DMSO）、ethylenglycol、*n*-decane、benzene、および *n*-heptane 存在下における活性の半減期は30日以上であり、LST-03リパーゼは有機溶媒存在下において非常に安定なリパーゼであることが報告されている。さらに、LST-03リパーゼ遺伝子もクローニングされており、LST-03リパーゼ遺伝子の下流にはLST-03リパーゼの活性化に必要なリパーゼ特異的分子シャペロン遺伝子の存在も確認されている。また、相同性の高いリパーゼとの比較からLST-03リパーゼには1つのカルシウムイオンが配位していることが予想されている。過去の知見により、酵素の有機溶媒安定性は酵素の構造に依存しており、酵素の有機溶媒存在下での安定性に寄与するアミノ酸配列を変化させるタンパク質工学的手法により、既存の酵素の有機溶媒安定性を向上できると考えられている。しかし、LST-03リパーゼが有機溶媒存在下でも安定な要因は明らかにされていない。

本研究は組換えリパーゼの有機溶媒安定性の向上を目的とし、(1) 組換え LST-03 リパーゼの活性と安定性におよぼすカルシウムイオンの影響、(2) 有機溶媒安定性が向上した LST-03 リパーゼの取得とその変異部位の同定、(3) LST-03 リパーゼの有機溶媒安定性に関与する部位の同定と有機溶媒安定性の原因解明、を行ったものであり、以下に示す5章から構成される。

第1章では序論として、本研究の動機とその研究背景を中心に構成した。リパーゼの諸性

質や有機溶媒存在下でも安定な酵素に関するこれまでの知見と本研究の目的について述べた。

第2章では異種宿主を用いて発現した組換え LST-03 リパーゼの活性と安定性におよぼすカルシウムイオンの影響について述べた。また、カルシウムイオンの添加による LST-03 リパーゼの構造変化についても検討した。リパーゼ特異的分子シャペロンを用いて *in vitro* で活性化した組換え LST-03 リパーゼにカルシウムイオンを添加すると、構造が変化し、さらなる高活性化が促進された。また、組換え LST-03 リパーゼの pH と熱安定性におよぼすカルシウムイオンの影響はほとんどないが、カルシウムイオンの存在下では組換え LST-03 リパーゼの有機溶媒安定性は向上した。具体的には *n*-octane、*n*-heptane、*n*-hexane、cyclohexane、および toluene を添加した場合には、カルシウムイオン存在下で半減期が 1.3–2.9 倍長くなった。一方、*P. aeruginosa* LST-03 株の培養上清から調製された LST-03 リパーゼと組換え LST-03 リパーゼの有機溶媒安定性は大きく異なっていた。リパーゼ特異的分子シャペロンを用いての *in vitro* で活性化した LST-03 リパーゼは複合体を形成しており、リパーゼ特異的分子シャペロンとの複合体の形成が組換え LST-03 リパーゼの有機溶媒存在下での安定性に大きく影響していると考えられる。

第3章では、分子進化工学的手法により有機溶媒安定性が向上した LST-03 リパーゼの取得とその変異部位の同定について述べた。LST-03 リパーゼの全体的な立体構造は推定されるが、LST-03 リパーゼの有機溶媒安定性に関与する部位の詳細は明らかではない。そこで、分子進化工学的手法を用いて有機溶媒安定性が向上した LST-03 リパーゼの取得を試みた。まず、膨大な変異酵素ライブラリーの中から有機溶媒安定性が高い変異酵素を選択するために、DMSO を含むプレートを用いたハイスループットな選択方法を開発した。このハイスループットな方法と、酵素溶液を用いた有機溶媒安定性試験により、有機溶媒安定性が向上した4種類の変異型 LST-03 リパーゼを取得した。これらの変異型 LST-03 リパーゼの DMSO 存在下での半減期は野生型酵素の 1.6–2.9 倍長くなった。また、変異型 LST-03 リパーゼは DMSO 以外にも *n*-decane、*n*-octane、および cyclohexane 存在下での有機溶媒安定性が向上していた。さらに、4種類の変異型 LST-03 リパーゼの変異箇所を調べたところ、酵素分子の表面に位置するいくつかのアミノ酸残基が置換されていた。酵素分子表面に位置するアミノ酸残基が置換されたことにより、有機溶媒が酵素内部に進入することを妨げていると考えられる。また、いくつかのアミノ酸残基では側鎖が中性から塩基性に変化していた。変異型 LST-03 リパーゼのアミノ酸残基の側鎖の pI が塩基性に傾いたのは、有機溶媒安定性が向上した LST-03 リパーゼを選択する際に用いた有機溶媒として、塩基性有機溶媒である DMSO を用いたことが原因であると考えられる。

第4章では、第3章で取得した有機溶媒安定性が向上した変異酵素のうち、複数の変異箇所を有する変異酵素に関しては単一変異を有する種々の変異型 LST-03 リパーゼを部位特異的変異により作成し、それらの変異型 LST-03 リパーゼの有機溶媒存在下での安定性を検討した。157 番目、164 番目、194 番目、202 番目、および 211 番目のアミノ酸残基を置換した変異型 LST-03 リパーゼの DMSO 存在下の半減期は野生型酵素の 2 倍以上であった。また、194 番目と 209 番目のアミノ酸残基が置換した LST-03 リパーゼの *n*-decane、*n*-octane、*n*-heptane、*n*-hexane、および cyclohexane 存在下の半減期は野生型酵素の 3 倍以上長かった。さらに、155 番目と 157 番目のアミノ酸残基が置換した LST-03 リパーゼの *n*-octane、*n*-heptane、*n*-hexane、および cyclohexane 存在下の半減期は野生型酵素の 2 倍以上長くなった。また、*P. aeruginosa* PAO1 リパーゼの立体構造をもとに分子力学計算により LST-03 リパーゼと変異型 LST-03 リパーゼの推定立体構造を構築し、変異型と野生型 LST-03 リパーゼの立体構造の違いについて調べた。有機溶媒安定性が向上した変異型 LST-03 リパーゼには新たな塩橋や水素結合の形成、および、疎水性コアの充填が見られた。このことから塩橋、水素結合や疎水結合といった酵素の構造を強固にすると考えられる構造変化が LST-03 リパーゼの有機溶媒安定性を向上させるものと考えられる。

第5章では、本研究の総括を述べた。

本研究において、異種宿主で発現した組換え LST-03 リパーゼに対し、カルシウムイオン

を配位することにより立体構造が変化し、高活性化することや、有機溶媒安定性の向上することを見いだした。また、分子進化工学的手法により有機溶媒安定性が向上した LST-03 リパーゼを取得した。さらに、部位特異的変異誘発により、単一の変異を有する酵素を作成し、LST-03 リパーゼの有機溶媒安定性に関する部位を同定した。また、分子力学計算により構築した野生型と変異型 LST-03 リパーゼの立体構造の違いについて検討し、酵素の有機溶媒安定性に対する新しい知見を得た。酵素には有機溶媒安定性に寄与するアミノ酸配列が存在し、タンパク質工学的手法により既存の酵素の有機溶媒安定性を向上できることを示した。

審査結果の要旨

本論文は、化学プロセスの触媒として利用可能な有機溶媒耐性リパーゼの開発を目的として行われたものであり、組換えリパーゼの活性と安定性におよぼす補因子の影響、有機溶媒耐性が向上したリパーゼの取得、および酵素の有機溶媒耐性の原因について研究したものであり、以下の成果を得ている。

- (1) リパーゼ特異的分子シャペロンを用いて *in vitro* で活性化した組換え LST-03 リパーゼにカルシウムイオンを添加すると、さらに高活性することを見出した。また、カルシウムイオンの添加による高活性化は、LST-03 リパーゼの構造が変化していることに起因していることを見出した。さらに、カルシウムイオンは組換え LST-03 リパーゼの熱安定性や pH 安定性にはあまり影響しないが、有機溶媒耐性を向上させる効果があることも見出した。
- (2) LST-03 リパーゼ遺伝子へのランダム変異誘発と有機溶媒耐性が向上したリパーゼを選択する分子進化工学的手法を用い、有機溶媒耐性が向上した変異型 LST-03 リパーゼを取得した。また、取得した変異型 LST-03 リパーゼの変異箇所を調べたところ、酵素分子の表面に位置するアミノ酸残基が置換されていることやアミノ酸残基の側鎖が中性から塩基性に変化していることを見出した。
- (3) 部位特異的変異誘発により単一のアミノ酸残基が置換した変異酵素を作成し、変異酵素の有機溶媒耐性について詳細に検討し、LST-03 リパーゼの有機溶媒耐性に寄与するアミノ酸残基を特定した。
- (4) 計算科学的手法により野生型と変異型 LST-03 リパーゼの立体構造を構築し、その構造の違いを見出すことにより、酵素の有機溶媒耐性の原因を検討した。その結果、有機溶媒耐性が向上した変異酵素には分子内塩橋や水素結合の増加、疎水性コアの充填が生じており、酵素の構造安定性を高める構造変化により酵素の有機溶媒耐性を向上できることを見出した。

以上の結果は、有機溶媒耐性が向上した酵素を取得しただけでなく、酵素の有機溶媒耐性を向上させる原因を解明したものであり、学術的、産業的価値が高い。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。

本委員会は、本論文の審査ならびに最終試験の結果から、博士（工学）の学位を授与することを適当と認める。