

氏名	こ じま ゆう ぞう 小 嶋 裕 三
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論農博第 2609 号
学位授与の日付	平成 18 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Screening and applied studies of microbial lipases with unique substrate specificity (ユニークな基質特異性を有する微生物リパーゼの探索と応用に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 清水 昌 教授 喜多恵子 教授 阪井康能

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を含む油脂の分解あるいは改質を目的としてユニークな基質特異性を有する微生物リパーゼを検索し、取得した 2 種類のリパーゼの応用に関する検討を行った結果をまとめたものである。

- (1) トリアシルグリセロール (TG) に含まれる PUFA に高い反応性を示すリパーゼの検索を行い、*Pseudomonas fluorescens* HU380 株と *P. fluorescens* AK102 株の産生する 2 種類のリパーゼを取得した。HU380 株のリパーゼは、魚油中のエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) 含量の違いにかかわらず、EPA の遊離を優先させながらも、両 PUFA を効率よく遊離した。また、本酵素は、炭素鎖が 20 の各種 PUFA エステルに対しては、2 重結合の位置にかかわらず高い反応性を示した。一方、AK102 株のリパーゼは、魚油 TG 中に混在する EPA, DHA のうち DHA を優先的に遊離し、EPA に対しては高い反応性を示さなかった。また、炭素数 20 の PUFA エステルに対する本リパーゼの特異性は特徴的で、 $\Delta 5$ 位に二重結合が存在しないジホモ- γ -リノレン酸、20:2n-9 脂肪酸、20:4n-3 脂肪酸などのエステルにはよく作用し、ミード酸、アラキドン酸、EPA など $\Delta 5$ 位に二重結合を有する PUFA エステルに対する反応性は極めて低いものであった。このように、両リパーゼは互いに異なるユニークな脂肪酸特異性を有することが判明した。
- (2) 前記 2 種の菌株が産生するリパーゼを精製し、酵素学的諸性質を明らかにした。両酵素とも菌体外酵素として産生されたが、分子量、等電点、至適温度、至適 pH、グリセリドの位置に対する特異性、N 末端アミノ酸配列の相同性等が異なっており、両酵素は全く別のタンパク質であることが判明した。また、AK102 株のリパーゼは、アルカリ性 pH 域でも高い反応性と安定性を示し、界面活性剤に対する耐性も高く、衣料用洗剤に使用するリパーゼとして優れた性質を備えていることが判明した。
- (3) HU380 株のリパーゼ遺伝子 (*lipA*) をクローニングし、遺伝子の構造を明らかにした。*lipA* タンパク質の N 末端には、タンパク質輸送に関与する典型的なシグナル配列は存在せず、本リパーゼはシグナル配列非依存性の分泌機構によって菌体外へ分泌されることが予想された。*lipA* は、インクルージョンボディとして大腸菌で発現したが、不溶性のリパーゼを尿素により可溶化し、透析によりリフォールディングを行うことで、活性を有するリパーゼとして回収できた。得られたリパーゼの比活性は、親株とほぼ同一で培地当たりのリパーゼ生産能は親株の約 4 倍 (158 u/ml) であった。よって、大腸菌で高発現させることにより簡便な精製法で高純度のリパーゼを大量に取得する方法が確立された。
- (4) 本研究の 2 種類のリパーゼを用いて魚油を部分的に加水分解し、遊離した脂肪酸を分離、回収し、尿素付加法により EPA と DHA を濃縮した。反応途中における EPA, DHA に対する両リパーゼの特異性の差を利用することで、EPA と DHA が混在する油脂から HU380 株のリパーゼを用いることにより EPA を、AK102 株のリパーゼを用いることにより DHA をそれぞれ選択的に濃縮できることを示した。また、HU380 株のリパーゼによる EPA のアシドリシス反応では、低温ほど反応がよく進むことが観察された。一方、本リパーゼによる DHA のアシドリシス反応では、45°C で反応性を示さないが、10°C では EPA と同等の反応性を示した。このような性質は、比較した他のリパーゼとは明らかに異なるユニークなものであった。また、PUFA に対するエステル合成反応では両酵素とも既知のリパーゼに比し、顕著に高い合

成率を示した。これらの結果は、両リパーゼによる加水分解反応、アシドリシス反応およびエステル合成反応を利用することで、PUFA 含有油脂の改質が容易にできることを示している。

論文審査の結果の要旨

近年、脂質の栄養学的研究が進み、これまであまり知られていなかった油脂やそれを構成する脂肪酸の生理機能が解明されるとともに、それらを含む油脂や脂肪酸の供給が重要な課題となっている。これまでに報告されたリパーゼは、PUFA エステルに対する反応性が低く、PUFA を含む油脂を分解あるいは改質するうえで大きな障害となっている。本論文では、微生物の探索を通して見いだされたユニークな基質特異性、特に PUFA に高い反応性を示す 2 種の新規リパーゼについて、諸性質の酵素科学的、応用微生物学的解明および PUFA 含有油脂の分解や改質などの産業利用における有用性が示されている。主な成果は以下のとおりである。

- (1) PUFA エステルに高い特異性を示す新規リパーゼ 2 種を取得した。通常 EPA や DHA を含む油脂を加水分解反応に供した場合、EPA や DHA の含量の増加に伴い、遊離脂肪酸量の低下をきたし、多量の未分解のグリセリドが残存する。HU380 株のリパーゼは、EPA や DHA の含量にあまり関係なく加水分解反応が進むことから、両 PUFA の製造に有用であることが示されている。
- (2) 取得した 2 種類のリパーゼの酵素学的諸性質を明らかにすることで、産業界に新たなリパーゼを提供することが可能となった。特に、AK102 株のリパーゼが示す高い安定性とユニークな基質特異性は、衣料用洗剤や医薬中間体製造などの分野における本リパーゼの有用性を示すものである。
- (3) 本研究で確立された HU380 株由来のリパーゼ遺伝子の大量発現系の構築と酵素の簡便かつ高純度標品を得るための精製法の確立は、産業的観点から意義深いものである。
- (4) 魚油などに含まれる PUFA は、混合物として存在する 경우가多く、EPA や DHA など特定の PUFA を高純度化することは煩雑な操作を必要としコストを上昇させる要因となっている。本研究を通して示された両リパーゼの特徴的な PUFA 二重結合の位置認識性は、EPA と DHA が混在する油脂からそれぞれを選択的に濃縮するための基盤的特性となるものである。この知見は、他の PUFA 含有油脂にも応用可能であることを強く示唆するものである。
- (5) エステル交換反応やアシドリシス反応が低温 (10°C) 下でも十分可能なことを示したことは、高温条件下で酸化分解されやすい PUFA 含有油脂の改質にとって大きなブレイクスルーとなるものであり、その産業的意義は大きい。

以上のように本論文は、PUFA に高い反応性を示す 2 種のリパーゼを発見し、両リパーゼのユニークな反応性と基質特異性を示すことで、リパーゼの酵素科学に新しい知見をもたらしたものである。また、得られた成果を利用することで、油脂改質などの可能性を示したものであり、応用微生物学、油脂化学、応用酵素学に与えたインパクトは大きい。

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18年3月9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。