

氏 名	ふじ い りょう た 藤 井 亮 太
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1362 号
学位授与の日付	平成 15 年 5 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	Directed Evolution of Lipase for Altering Reaction Specificity (進化分子工学によるリパーゼの反応特異性の改変)

論文調査委員 (主査) 教授 坂田 完三 教授 江崎 信芳 教授 清水 昌

論 文 内 容 の 要 旨

リパーゼは、本来エステルを基質として加水分解する酵素であるが、catalytic triad や oxyanion hole といった活性部位の特徴的な構造や、酵素-アシル中間体を形成する二段階の反応機構など、アミド加水分解酵素であるセリンプロテアーゼと多くの類似点を持つ。しかし、リパーゼはエステル結合を特異的に加水分解する一方、アミド結合を加水分解することがほとんどできない(リパーゼの反応特異性)。そこで本研究では、ランダム変異と淘汰を繰り返すことでタンパク質をデザインする、いわゆる進化分子工学の手法を利用することで、リパーゼの反応特異性を改変し、アミドを加水分解するリパーゼを作製することを試みた。リパーゼは優れた立体選択性や位置選択性を持つことから、光学活性なアミンの合成やアミド型保護基の位置特異的な脱保護触媒などに広く応用することができる。

(1) Active-site titration によるリパーゼの分子活性の測定

リパーゼの活性を正確に評価するには、まずリパーゼの絶対量を求めなければならない。さらに進化分子工学においては、多数の変異体の活性を評価しなければならないため、リパーゼを迅速かつ簡便に定量する方法が不可欠である。そこで、リパーゼを滴定する試薬として、diethyl 4-methylumbelliferyl phosphate (1), ethyl hexyl 4-methylumbelliferyl phosphate (2), および ethyl 4-methylumbelliferyl heptylphosphonate (3) を合成した。これらは、リパーゼの活性中心と 1 : 1 で反応し、反応量と等量の蛍光物質を放出するため、蛍光物質の量から活性型リパーゼの絶対量を滴定することができる。阻害剤 1, 2 および 3 を *Pseudomonas aeruginosa* 由来のリパーゼと反応させた結果、二次反応速度定数 (k_{on}) はそれぞれ 1.8, 32 および $5600 \text{sec}^{-1} \text{M}^{-1}$ であり、長鎖のリン酸エステル 2 は短鎖の 1 より阻害活性が高く、またリン酸エステル 2 よりもホスホン酸エステル 3 がリパーゼを強く阻害することが判明した。最も阻害活性が高い 3 をリパーゼと反応させたところ、4.5nM のリパーゼを定量することができた。また、マイクロプレート上でリパーゼを菌体から発現させ、培養上清中のリパーゼのエステル加水分解速度を求めるとともに、3 を用いてリパーゼの濃度を求めることで、リパーゼの発現量に影響されない絶対的な活性として、リパーゼ 1 モルあたりのエステル加水分解活性(エステル基質に対する分子活性)を求めることができた。

(2) アミド加水分解活性の向上したリパーゼの作製

まず、*Pseudomonas aeruginosa* TE3285 由来リパーゼ遺伝子に、error-prone PCR 法を利用してランダム変異を導入し、発現用菌株である *P. aeruginosa* PAO1162 を形質転換して、変異リパーゼを発現する約 20,000 個のコロニーを作製した。このコロニーに対して、アミド基質 *N*-2-naphthyl oleamide (4) と Fast Garnet GBC の混合溶液を接触させた。変異リパーゼにより 4 が加水分解された場合、生成物である 2-naphthylamine と顕色剤である Fast Garnet GBC がカップリングしてアゾ色素を形成し、その結果コロニーが赤色に呈色する。コロニーの着色度をアミド加水分解活性の指標として、20,000 個のコロニーから 1000 個のコロニーを選抜した。次に選抜した変異リパーゼ定量的に評価するため、各コロニーから得た菌体を液体培養して、アミドならびにエステル加水分解活性を測定した。アミド加水分解活性は、上記のアミド基質 4 と顕色剤

を用いて、生じる赤色色素の530nmの吸光度を測定することで求めた。エステル加水分解活性は、2-naphthyl oleate 5を用いて同様に求めた。エステル加水分解活性に対する相対的なアミド加水分解活性 (A/E ratio) を指標とし、アミド加水分解活性が向上した変異体を探索した。その結果、野生型と比較して A/E ratio が最高で2倍程度向上した5つの変異体(2E7, 5B5, 7B5, 8D11および10C11)を見出した。各変異体の培養上清において、アミドおよびエステル加水分解活性を求めるとともに、阻害剤3を用いてリパーゼの絶対量を求めることで、アミドおよびエステル基質に対するリパーゼの分子活性を求めた。5B5, 7B5, 8D11および10C11においては、アミド基質に対する分子活性が向上していることが判明した。一方2E7においては、アミド基質に対する分子活性が野生型とほとんど変化なく、エステル基質に対する分子活性が低下することで A/E ratio が向上したことがわかった。各変異体についてDNAシーケンシングを行ったところ、A/E ratio の向上に寄与する変異としてF207S, A213DおよびF265Lの3変異が同定された。類似のリパーゼの結晶構造から、立体構造上における変異部位を調べた結果、これらの変異は全て酵素表面に現れており、リパーゼのカルシウム結合部位の近傍に位置していた。したがって、発見された変異は、リパーゼのカルシウムの結合部位を介して、間接的にリパーゼの活性中心に影響を与え、アミドおよびエステル基質に対するリパーゼの反応特異性を変化させた可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

リパーゼは、広い基質特異性に加えて、すぐ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、実験室的にも工業的レベルでの物質生産においても、非常に汎用性の高い酵素の一つである。したがって、リパーゼで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の応用が期待され、有機合成における恩恵は計り知れない。本論文は、進化分子工学的手法を利用し、アミドを加水分解するリパーゼの作製を目指したものである。その評価すべき点は以下に示す通りである。

1. 溶液中のリパーゼのモル濃度を求めるため、リパーゼの活性中心と1:1で反応し、放出した蛍光物質の量から活性型リパーゼの絶対量を滴定できる試薬1, 2および3を合成した。最も阻害活性の高い3を用いることで、非常に低濃度(4.5nM)のリパーゼを定量できる、簡便かつ高感度なリパーゼ滴定剤の作製に成功した。
2. *Pseudomonas aeruginosa* TE3285 由来リパーゼ遺伝子にランダム変異を導入し、二段階のスクリーニングを経て、エステル加水分解活性に対するアミド加水分解活性 (A/E ratio) が最高で2倍程度向上した変異体を取得することができた。また、各変異体培養液のアミドおよびエステル加水分解活性を求めるとともに、滴定剤3を用いてリパーゼ濃度を測定し、アミドおよびエステル基質に対する分子活性を求めた。それにより、各変異リパーゼにおけるアミド加水分解活性およびエステル加水分解活性の変化を別個に求めることができた。
3. リパーゼに導入された変異は全て酵素表面に位置しており、リパーゼのカルシウム結合部位の近傍に分布していた。したがって、発見された変異は、リパーゼのカルシウム結合部位を介して、間接的にリパーゼの活性中心に影響を与え、アミドおよびエステル基質に対するリパーゼの反応特異性を変化させた可能性が示唆された。

部位特異的変異などのタンパク質工学的手法を用いて、リパーゼの基質特異性や熱安定性を改変する試みは珍しくないが、エステルおよびアミド基質に対する反応特異性を改変した例は過去に無く、きわめて独創的である。また、本論文中で構築した条件で、ランダム変異とスクリーニングを繰り返すことにより、リパーゼの反応特異性をさらに大きく変化させることが期待でき、今後の研究発展の礎となる条件を構築したという点からも評価に値する。

以上のように本論文は、進化分子工学によりリパーゼの反応特異性を改変し、アミド加水分解活性を向上させたものであり、有機合成化学、生物有機化学、酵素化学などの分野に対して寄与するところが大きい。

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15年3月24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。