

氏 名	たか はし しょう じ 高 橋 祥 司
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 1981 号
学位授与の日付	平 成 12 年 7 月 24 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	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	EXPRESSION OF FUNGAL LIPASE GENE IN YEAST AND ITS APPLICATION (糸状菌リパーゼ遺伝子の酵母における発現とその応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 渥 夫 教 授 今 中 忠 行 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

リパーゼは、様々なエステル合成や分解、エステル交換反応、ラセミ体の光学分割のための優れた生体触媒となりうる実証され、広範囲な工業的利用の展開が期待されている。それ故に、リパーゼの活性体での大量発現系が求められている。本論文は糸状菌 *Rhizopus oryzae* のリパーゼ (ROL) の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における発現ならびにその応用についての研究をまとめたものであり、緒論、結論および本論3編5章より成っている。

第1編では、ROLの *S. cerevisiae* における分泌発現系の構築および組換え ROL の諸性質について解析した。第1章では、*S. cerevisiae* における ROL の分泌発現系を構築した。ROL の成熟体 (mROL) とプロ体 (ProROL) を分泌シグナルとして酵母ペプチドフェロモン α -factor のプレ配列 (pre- α -factor) あるいはプレプロ配列 (prepro- α -factor) と融合した遺伝子を構築し *S. cerevisiae* において発現させた。その結果、リパーゼ活性は ProROL 遺伝子を導入した株の培地上清においてのみ見られた。精製した組換え ROL は異なる分子量の2つのタンパク質からなっており、1つは完全なプロ配列を持つ前駆体 ROL (rProROL) であり、もう1つはプロ配列中で切断を受けプロ配列のC末端28アミノ酸をもつ ROL (r28ROL) であった。第2章では、ROL の酵母内における切断の解析ならびに2つの組換え ROL (rProROL, r28ROL) を独立に単一生産する系の開発を検討した。切断部位の配列から、ROL の切断は酵母ゴルジ体膜局在の Kex2 エンドプロテアーゼ (Kex2p) によることが示唆されたので、酵母染色体上の KEX2 遺伝子の破壊ならびにプロ配列中の切断部位の変異を行ったところ、組換え ROL の切断は Kex2p によることが明らかとなった。rProROL は KEX2 遺伝子破壊株において発現させることにより単一生産することができた。一方、r28ROL は、プラスミドによる Kex2p との共発現では単一生産できなかったが、Kex2p のC末端にある膜貫通領域を切断した分泌型 Kex2p (sKex2p) との共発現により単一生産することに成功した。第3章では、2つの組換え ROL の諸性質について解析した。rProROL は糖鎖が付加されていたが、r28ROL には付加されていなかった。rProROL の耐熱性は r28ROL よりも高かった。この安定性は糖鎖によるものではなく、切断除去されたプロ配列部分によることを明らかにした。r28ROL は長鎖の脂肪酸エステル (炭素数18) に高い特異性を示したのに対し rProROL は低かった。また、両者のリパーゼ活性に著しい違いはなかったが、r28ROL のエステラーゼ活性は rProROL の約10倍高かった。

第2編では、ROL のプロ配列の生体内における構造形成機能について解析した。mROL だけを分泌発現させた場合、細胞内外に活性は見られなかったが、プロ配列と mROL を別々のプラスミドを用いて共分泌発現させた場合には活性・分泌ともに見られた。活性は α -factor のプロ配列との共分泌発現では見られないことから、ROL のプロ配列は細胞内において ROL の構造形成を仲介する分子内シャペロンとして機能していることが明らかとなった。また、プロ配列の欠失ならびに断片化の解析から、機能領域の存在を明らかにした。

第3編では、遺伝子工学的手法により酵母の細胞表層に活性体 ROL を提示した新規な生体触媒の開発を検討した。ROL のN末端に分泌シグナルとして pre- α -factor 配列を、C末端に細胞壁アンカリング領域として機能する酵母の性凝集素 α

-アグルチニン C 末端領域を融合した遺伝子を *S. cerevisiae* において発現させた。また、ROL の活性部位は C 末端近くにあることから直接 α -アグルチニンを結合させると活性の減少が考えられたので、ROL と α -アグルチニンの間にいくつかの長さの異なるセリンとグリシンからなるリンカーペプチドを挿入した融合遺伝子も構築した。形質転換細胞を用いた活性測定と蛍光抗体染色法による観察から、ROL が活性体として細胞表層に提示されていることが確認された。また、リンカーペプチドの挿入は活性増加に有効であった。ROL 提示酵母はトリオレインを加水分解し、トリオレインを唯一の炭素源とする培地において増殖した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、糸状菌 *Rhizopus oryzae* のリパーゼ (ROL) の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における発現およびその応用に関する研究をまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. ROL の *S. cerevisiae* における分泌発現系を構築し、ROL を活性体として分泌発現させることに成功した。
 2. 組換え ROL はプロ配列中で Kex2 エンドプロテアーゼ (Kex2p) により切断を受けたものと受けていないものから成っていたが、遺伝子工学的に Kex2p を欠失・改変することにより、それぞれを単一生産することに成功した。また、その諸性質の解析により、切断されたプロ配列は ROL の熱安定性、基質特異性、エステラーゼ活性に影響を与えていることを明らかにした。
 3. ROL の *S. cerevisiae* における活性体としての発現にはプロ配列が必須であることを明らかにした。また、プロ配列の成熟体 ROL への共有結合は ROL の活性発現において必須ではないことを明らかにし、ROL のプロ配列は細胞内において ROL の構造形成を仲介する分子内シャペロンとして機能していることを明らかにした。また、プロ配列中に機能領域が存在していることも明らかにした。
 4. 細胞壁結合領域として機能する酵母性凝集素 α -アグルチニンの C 末端領域を融合した ROL を構築することにより、*S. cerevisiae* の細胞表層に活性体として ROL を提示した新規な生体触媒の開発に成功した。また、ROL と α -アグルチニンの間に長さの異なるリンカーペプチドを挿入することにより、ROL 提示酵母の活性を増加させることに成功した。
- 以上のように、本論文は糸状菌リパーゼに関する基礎および応用研究をまとめたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成12年6月20日、論文内容とそれに関する事項について試問を行った結果、合格と認めた。