

|           |                                                                                                                                                                          |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | 河 野 光 登                                                                                                                                                                  |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                                                                                                                |
| 学 位 記 番 号 | 論 農 博 第 2311 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 2 項 該 当                                                                                                                                                  |
| 学位論文題目    | Studies on the crystal structure of <i>Rhizopus niveus</i> lipase and improvement of its functional characteristics<br>( <i>Rhizopus niveus</i> リパーゼの結晶構造とその機能性向上に関する研究) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 内 海 成 教 授 井 上 國 世 教 授 村 田 幸 作                                                                                                                               |

### 論 文 内 容 の 要 旨

リパーゼ (EC3.1.1.3-Triacylglycerol acylhydrolase) は天然に広く存在し、生体内での脂質の代謝に深く関与している。また、多くの微生物がリパーゼを生産することが知られている。微生物リパーゼは工業的に重要なものが多い。これらリパーゼの触媒機能は、①エステル加水分解、②エステル合成、③エステル転位に大別され、このうち非水状態でのエステル合成やエステル転位反応は、工業的に付加価値の高いエステル類の合成や油脂の改質等に利用されている。本論文ではまず、1, 3 位特異性に富み、油脂の改質によく利用されているクモノスカビ *Rhizopus niveus* リパーゼの精製とタンパク質化学的解析を行い、さらにその結晶構造を解明した。次に、本リパーゼ遺伝子のクローニングと酵母での発現系の構築を行い、発現リパーゼの特性を解析した。さらに、ランダム変異技術に基づいて反応至適温度を向上させることにより、エステル合成やエステル転位反応に有利なリパーゼの取得を行うとともに、その機能性向上の要因を立体構造に基づいて考察した。その内容の主な点は以下の通りである。

第1章では、*Rhizopus niveus* の培養上清より2種のリパーゼ (Lipase I 及び Lipase II) を電気泳動的に均一になるまで精製し、それらの構造と機能を解析した。Lipase I は、糖鎖が付加した A 鎖と活性中心を含む B 鎖から構成されたサブユニット構造を持つことを見い出した。また、Lipase II は、Lipase I が限定分解を受け、A 鎖と B 鎖の N 末端の一部を失って生成されることを明らかにした。さらに、Lipase I の A 鎖と B 鎖の N 末端部分は、リパーゼの機能発現に関与しないことを確認した。

第2章では、Lipase I 及び Lipase II がポリエチレングリコールを結晶化剤とすることで結晶化することを確認した。Lipase I については構造解析可能な質を持つ結晶が得られ、その結晶学的予備的データを解析した。

第3章では、Lipase I 単結晶の X 線構造解析を行い、多重重原子同型置換法により、解像度 2.2 Å, R 値 18.6% のモデルを構築した。その結果、電気泳動的に均一な Lipase I を用いて結晶化させたにもかかわらず、わずかに残存したプロテアーゼにより限定分解を受けることによって生じた Lipase II が結晶化していることが明らかとなった。Lipase II は、他の構造解析されたリパーゼと同様に典型的な  $\alpha/\beta$  ヒドロラーゼ構造をとっていることを確認した。

第4章では、*Rhizopus niveus* 菌体から抽出した染色体 DNA より Lipase I 遺伝子のクローニングを行った。このクローンから酵母発現プラスミドを構築し、酵母培養上清へのリパーゼの分泌・生産を検討した。菌株、プロモーター、コピー数などを選択することにより、酵母培養上清中 270 mg/l の高発現システムを確立した。

第5章では、酵母発現系からの組み換え型リパーゼを精製し、その構造と機能を解析した。その結果、組み換え型リパーゼには、天然の Lipase I と同様に糖鎖が付加されているが、高マンノース型の巨大糖鎖が付加したものとオリゴマンノース型の糖鎖が付加したものの2種の分子種があることを明らかにした。そして、それぞれの分子種には、A 鎖と B 鎖へのプロセッシングを受けたものと受けていないものがあり、合計4種の分子種が存在することを確認した。

第6章では、A 鎖と B 鎖へのプロセッシングに関与していると考えられた *KEX2* 遺伝子の発現を制御することによって、第5章において確認した4種の組み換え型リパーゼを単離・精製し、それらの酵素的特性を解析した。その結果、A 鎖と

B鎖へのプロセッシングを受けていないリパーゼは高い耐熱性を示すことを見い出すとともに、これは温度上昇においても構造が維持されることによるものであることを確認した。

第7章では、ランダム変異技術を用いて、反応至適温度が野性型のものと比較して15°C向上した変異リパーゼを取得した。この変異型リパーゼの変異部位を同定し、野性型リパーゼとのキメラ酵素を作成・解析することによって、反応至適温度の向上に寄与した変異部位を特定した。さらに、第3章において解明したLipase IIの立体構造上の知見から反応至適温度向上の構造的要因を考察した。

## 論文審査の結果の要旨

近年、消費者の食品へのニーズは単に「美味しい」ものから、「美味しく」かつ「身体によい」ものへと、より付加価値の高い方向へ進んでいる。油脂の分野でも、物性面だけでなく、生理活性面でも優れた機能を持つ油脂が望まれている。このような機能を持つ油脂の開発には、エステル合成やエステル転位反応が必須となるが、この反応においてリパーゼは「安全な」生産手段として重要な役割を担っている。本論文は、このような油脂の改質に利用されるクモノスカビ *Rhizopus niveus* 由来リパーゼに関して、その立体構造を明らかにするとともに、酵母によるリパーゼ発現系を構築し、ランダム変異技術により機能性の向上したリパーゼを取得したものであり、評価される主な点は以下の通りである。

1. *Rhizopus niveus* の培養上清より2種のリパーゼ (Lipase I 及び Lipase II) を精製し、その特性を解析した。Lipase I は2つのポリペプチド鎖より成るサブユニット構造を持つこと、Lipase II は Lipase I の限定分解物であることを示した。

2. Lipase I 単結晶の構造解析により、この結晶が精製 Lipase I にわずかに残存したプロテアーゼにより限定分解を受け、生じた Lipase II が結晶化した特異的な結晶化の過程を経たものであることを明らかにした。そして、この Lipase II の構造を分解能 2.2 Å のレベルで解明し、リパーゼ特有の特徴を有していることを示した。

3. *Rhizopus niveus* 菌体から抽出した染色体 DNA から、リパーゼ遺伝子をクローニングし、このクローンを食品として安全性が認められている酵母を用いて、組み換え型リパーゼの分泌・生産を試みた。発現条件を工夫することによって、工業的に利用できるレベルにまで発現量を向上させることに成功した。これによって、蛋白質工学技術によるリパーゼの機能性向上の検討を可能にした。

4. 酵母培養上清中に分泌された組み換え型リパーゼには、糖鎖の鎖長の違いと、A鎖とB鎖へのプロセッシングの有無によって4種の分子種が存在することを明らかにした。さらに、これらの酵素的特性の解析より、A鎖とB鎖へのプロセッシングを受けていない分子種は、高い耐熱性を示すことを明らかにした。

5. ランダム変異技術により反応至適温度を向上させ、エステル合成やエステル転位反応に有利なリパーゼを取得した。この変異型リパーゼの3カ所の変異部位の中から、反応至適温度向上をもたらした1カ所のアミノ酸部位を特定した。さらに、本研究で解明した Lipase II の立体構造を基に、変異型リパーゼの反応至適温度向上の構造的要因を考察した。

以上のように、本論文は、*Rhizopus niveus* リパーゼの立体構造の解明や遺伝子のクローニングといった基礎的研究を踏まえた上で、酵母での大量発現系の構築や変異技術による機能性向上リパーゼの開発を達成したものであり、新食糧設計学、酵素化学、食糧安全利用学などに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12年4月13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。