

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Fusarium heterosporumの生産するリパーゼの構造と安定性に関する研究                                     |
| Author(s)    | 永尾, 寿浩  |
| Citation     |   |
| Issue Date   |   |
| Text Version | ETD   |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.11501/3184372">https://doi.org/10.11501/3184372</a> |
| DOI          | 10.11501/3184372  |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | なが おとし ひろ<br>永 尾 寿 浩   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (工 学)  |
| 学位記番号      | 第 1 5 8 4 7 号  |
| 学位授与年月日    | 平成13年1月29日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第2項該当   |
| 学位論文名      | <i>Fusarium heterosporum</i> の生産するリパーゼの構造と安定性に関する研究                                  |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 卜部 格<br><br>(副査)<br>教授 金谷 茂則 教授 原島 俊 教授 菅 健一<br>教授 塩谷 捨明 教授 吉田 敏臣 教授 関 達治 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、土壌より安定性に優れたリパーゼを生産する微生物の単離、そのリパーゼ遺伝子のクローニング、異種菌株での遺伝子の高発現、リパーゼの構造と安定性の関係の解析、変異による安定性の向上したリパーゼの生産、および安定な酵素の油脂加工への応用についてまとめたものである。

緒論では、本研究の背景をなす知見を概説し、本論文の目的と意義について述べている。

第1章では、新規なリパーゼを生産する糸状菌 *Fusarium heterosporum* を単離している。このリパーゼを精製して性質を調べたところ、本酵素は分子量約31kDa、トリグリセリドの1、3位に特異的で、DMSOなどの有機溶媒に対して安定であることを明らかにしている。

第2章では、リパーゼ遺伝子の単離と塩基配列の決定を行っている。本リパーゼは301アミノ酸残基で構成され、*Rhizomucor miehei* や *Rhizopus delemar* の生産するリパーゼと相同性がある。活性中心はセリン、アスパラギン酸、およびヒスチジン残基で構成され、この上を「リッド」と呼ばれる $\alpha$ -ヘリックスが覆っていると推定されている。

第3章では、本リパーゼ遺伝子を清酒酵母内で発現させている。酵母は菌体外にリパーゼを分泌し、培地をYPD培地から酵母エキス3%、ペプトン1%、スクロース4%からなる培地に改変することにより、リパーゼ生産量を約8倍上昇させることができています。

第4章では、酵母で発現させたリパーゼの中より、熱安定性が約14°C上昇した酵素を見出している。この酵素の構造を解析したところ、C末端側26残基(C末端ペプチド)の切断によって安定性が大きく低下することを明らかにしている。*F. heterosporum* ではC末端側ペプチドの切断が完全なために、安定性の低下したリパーゼしか生産しないが、酵母ではその切断が不完全のため、安定性の異なったリパーゼが混在している。そこで275番目のアルギニンをアラニンに置換することによって、C末端ペプチドの切断が行われなくなり、安定性の高いリパーゼのみを生産させることができています。

第5章では、C末端ペプチド内で安定性に関与しているアミノ酸残基を調べ、293番目のアスパラギン酸残基の負電荷が安定性に重要であると推定している。また、C末端側から13残基欠失させると、安定性が大きく減少することを明らかにしている。

第6章では、安定性の向上したリパーゼを固定化し、50°Cでオレイン酸によるトリパルミチンのアシドリシス反応を行っている。本固定化酵素は、従来の市販酵素よりもはるかに安定性が高く、活性の半減期が約370日である。

総括では、本研究で得られた成果をまとめて述べている。

### 論文審査の結果の要旨

タンパク質工学の手法を用いて種々の酵素機能の改良が試みられ、多くの知見が蓄積されつつある。本論文は、微生物由来のリパーゼを対象として、自然界から安定性に優れた酵素を生産する微生物を単離し、そのリパーゼの構造と安定性の解析から得られた知見をもとに、さらに安定性の向上したリパーゼを取得している。そして、その安定な酵素の油脂加工への応用も試みている。

これらの成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) 土壌より新規なリパーゼを生産する糸状菌 *Fusarium heterosporum* を単離し、そのリパーゼを精製して諸性質の検討を行い、工業的に有用な性質を備えていることを明らかにしている。
- (2) 新規リパーゼの遺伝子をクローニングしてその塩基配列を決定し、他のリパーゼとの相同性をもとにその構造を推定している。
- (3) 本リパーゼ遺伝子を酵母の異種タンパク質の分泌発現系に組み込み、さらに培養条件を検討することにより、リパーゼ生産量を約8倍上昇させている。
- (4) 酵母で発現させたリパーゼの中に熱安定性が向上したものが含まれていることを見出し、その酵素の構造を解析して、C末端のペプチドが安定性に関与していることを明らかにしている。
- (5) 部位特異的変異によりC末端ペプチドの切断が行われずその結果安定性の向上した変異型リパーゼの遺伝子を構築するとともに、C末端ペプチド内で安定性に関与しているアミノ酸残基の検討を行っている。
- (6) 安定性の向上した変異型リパーゼを固定化することにより、オレイン酸によるトリパルミチンのアシドリシス反応を50°Cで長期間安定に行えることを示している。

以上のように本論文は、リパーゼの安定性に関して得られた知見をもとに安定性に優れた酵素を取得しており、酵素工学ならびに応用生物学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。