OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184372
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

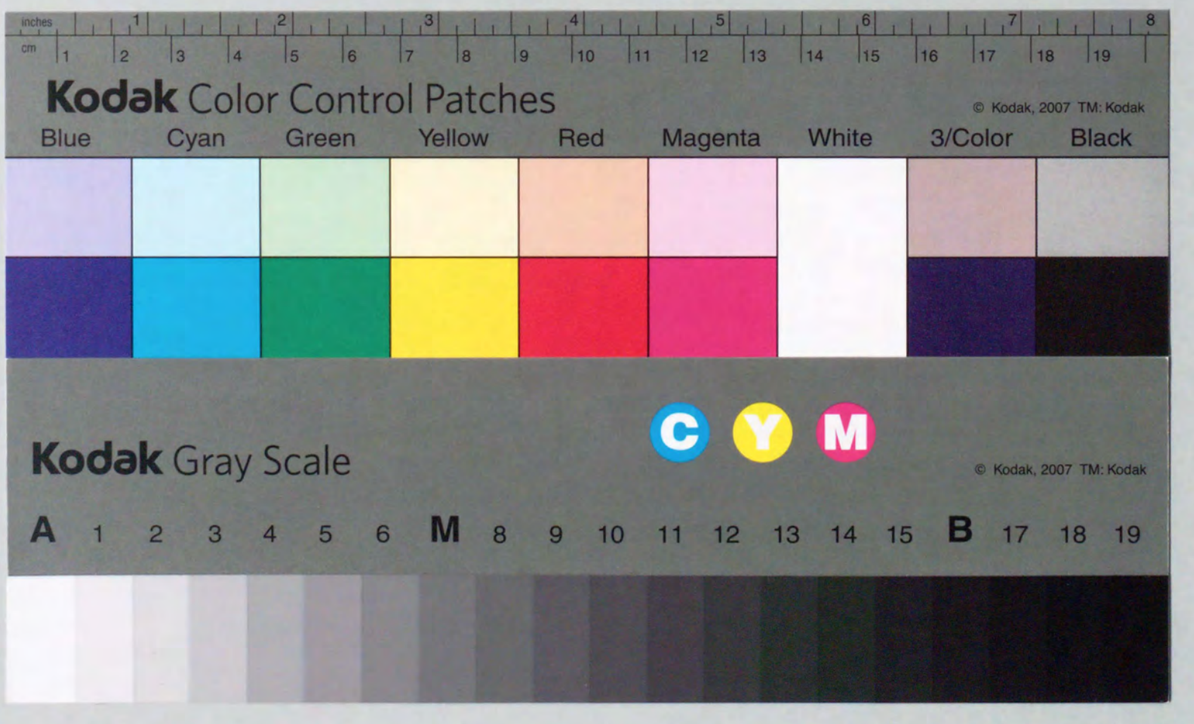
https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Fusarium heterosporum の生産するリパーゼの構造と安定性に関する研究

永尾寿浩

２０００年



Fusarium heterosporum の生産するリパーゼの構造と安定性に関する研究

２０００年
永尾寿浩

目次

緒論 3

第１章　*F. heterosporum* の生産する耐溶媒性リパーゼの精製と性質

第１節　緒言 8

第２節　実験材料及び実験方法 9

第３節　結果 １１

第４節　考察 ２０

第５節　要約 ２１

第２章　*F. heterosporum* リパーゼ cDNA のクローニング

第１節　緒言 ２２

第２節　実験材料及び実験方法 ２３

第３節　結果 ２５

第４節　考察 ３４

第５節　要約 ３７

第３章　*S. cerevisiae* における *F. heterosporum* リパーゼ cDNA の発現

第１節　緒言 ３８

第２節　実験材料及び実験方法 ３９

第３節　結果 ４３

第４節　考察 ５０

第５節　要約 ５１

第４章　*F. heterosporum* リパーゼのＣ末端ペプチドの役割

第１節　緒言 ５２

第２節　実験材料及び実験方法 ５３

第３節　結果 ５６

第４節　考察 ６４

第５節　要約 ６９

第５章　安定性に関与している *F. heterosporum* リパーゼのＣ末端ペプチド内アミノ酸残基

第１節　緒言　７０
第２節　実験材料及び実験方法　７１
第３節　結果　７６
第４節　考察　８２
第５節　要約　８３

第６章　耐熱性 *F. heterosporum* リパーゼによる構造脂質の製造

第１節　緒言　８４
第２節　実験材料及び実験方法　８６
第３節　結果　８９
第４節　考察　９８
第５節　要約　９９

総括　１００

引用文献　１０４

本論文に関係のある報告　１１４

その他の報告　１１５

謝辞　１１７

緒論

リパーゼ(triacylglycerol lipase, EC 3.1.1.3)は、高級脂肪酸トリグリセリドのエステル結合を加水分解し、脂肪酸とグリセロール、または部分アシルグリセロールを生成する酵素である(Fig.1)。

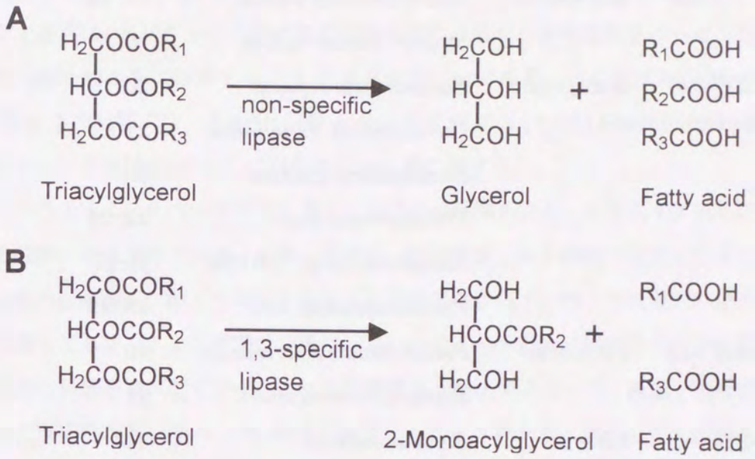


Fig.1.　Reaction of lipase.

リパーゼはアミラーゼやプロテアーゼと並んで、三大消化酵素の１つとして重要であるにもかかわらず、基質である油脂が水に不溶であり、酵素反応が不均一系で行われるために、その研究はアミラーゼやプロテアーゼに比べて立遅れていた。しかし近年、リパーゼがさまざまなエステルの合成や分解、エステル交換、ラセミ体の光学分割のための優れた生体触媒になることが実証され(1-4)、その研究が急速に進んできた。応用面では、消化薬、フレーバー剤の製造、臨床検査試薬、洗剤用酵素、カカオ脂様油脂の製造などに加えて、農薬・医薬品の光学活性な合成中間体の製造(5, 6)にリパーゼが用いられるようになってきている。さらに、多彩な生理活性を持ち、医薬品、化粧品、健康食品、各種の食品素材として利用されている高度不飽和脂肪酸の含量を高めた油や、高度

不飽和脂肪酸の体内への吸収性を高めた油などの高度加工にリパーゼが用いられている(7-16)。

Table 1. Classification of microbial lipases

Group	Size [a]	Specificity	Microorganism	References
I	~400	non-specific	*Staphylococcus aureus*	17, 18
			Staphylococcus hyicus	19
II	277-320	non-specific	*Burkholderia cepacia*	20
			Pseudomonas aeruginosa	21
			Burkholderia glumae	22
			Pseudomonas fragi	23, 24
			Pseudomonas sp. KWI-56	25-27
			Pseudomonas sp. 109	28, 29
III	449-613	1,3-specific	*Pseudomonas fluorescens*	30
			Serratia marcescens	31
IV	213	1,3 > 2	*Bacillus subtilis*	32
V	534-544	non-specific	*Candida rugosa*	33
			Geotrichum candidum	34-38
VI	269-277	1,3-specific	*Rhizopus delemar*	39, 40
			Rhizomucor miehei	41, 42
			Humicola lanuginose	43
			Penicillium camembertii	44, 45

[a] amino acid residues.

リパーゼは、動物の膵臓リパーゼがよく知られているが、工業的によく利用されているものは主に微生物由来のリパーゼである。現在までに多くの微生物由来のリパーゼ遺伝子がクローニングされており、これらはアミノ酸配列から大きく分類して6つのグループに分類される(Table 1、46)。また、同じグループに属するリパーゼは、よく似た立体構造を示し、脂肪酸特異性や位置特異性をはじめとした色々な作用特異性が類似して

いることがわかっている(47)。リパーゼを利用するには、その反応性(加水分解反応、エステル化反応、およびエステル転移反応)と基質特異性(脂肪酸特異性、アルコール特異性、位置特異性、トリグリセリド特異性、およびグリセリド特異性)を上手に組み合わせることによって利用が可能になるため、目的とする反応に適した酵素を検索するとき、この一次構造の相同性に基づいた分類が非常に参考になる。特に近年、天然に存在する油脂を生物にとって最適の形態に改良した油脂、構造脂質（グリセロール骨格の特定の位置に特定の脂肪酸が結合した脂質）が注目されている。構造脂質の製造には、Fig. 1 に示すように、トリグリセリドの全ての脂肪酸に作用する非特異的リパーゼではなく、1,3 位の脂肪酸のみに作用する 1,3 位特異的リパーゼを用いる必要がある(12, 16, 48)。Table 1 の分類では、グループ III とグループ VI のリパーゼ(*Penicillium camembertii* のリパーゼを除く)が 1,3 位特異的リパーゼに属する。

このように、リパーゼのさまざまな利用方法が開発され、ますます工業的に注目される酵素になってきている。しかしながら、生体触媒である酵素には安定性という問題点があり、高温下、酸・アルカリ条件下、有機溶媒存在下、および長期間の使用で酵素は失活してしまう。また酵素は、価格が高いために、工業的に利用する上での製造価格に大きく影響を及ぼしている。これらの問題点を解決するために、高温下や有機溶媒存在下で反応性が高いリパーゼ、酵素を固定化したとき繰り返し使用しても活性を失わないリパーゼ、安価に大量供給可能なリパーゼが要望されている。これまで、Table 1 に示すような微生物由来のリパーゼの中で、有機溶媒や熱に対する安定性に優れている酵素としては、*Pseudomonas* 属(25, 49)や *Bacillus* 属(50)などの生産するリパーゼが報告されているが、いずれも非特異的である。構造脂質の製造などに重宝されている 1,3 位特異的リパーゼの中には、安定性に優れたリパーゼはほとんど報告されていない。

そこで、熱や有機溶媒に対して安定なリパーゼの開発を目指し、本研究を開始した。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。

第1章では、土壌より有機溶媒に対して安定なリパーゼを生産する糸状菌 *Fusarium heterosporum* を単離した。このリパーゼを精製したところ、分子量は 31 kDa で、トリグリセリドの 1,3 位に特異的な酵素であることがわかった。また、dimethyl sulfoxide

(DMSO)などの種々の有機溶媒が50%存在しても安定であった。

第2章では、*F. heterosporum*の生産するリパーゼcDNAのクローニングを行った。本遺伝子は、32 アミノ酸残基のシグナルまたはプロ配列と推定される領域に続いて、301 残基の成熟リパーゼ配列をコードしており、*Rhizomucor miehei* や *Rhizopus delemar*の生産するgroup VIのリパーゼと相同性があった。しかしながら、相同性のあるリパーゼと比べ、*F. heterosporum*のリパーゼのC末端側は34 残基長くなっていた。すでに立体構造が報告されている *R. miehei* のリパーゼとの相同性から、*F. heterosporum*のリパーゼの構造を予測し、活性中心などに関与するアミノ酸残基を推定した。

第3章では、*F. heterosporum*のリパーゼcDNAを*Saccharomyces cerevisiae*で発現させた。*S. cerevisiae*のglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAP*)のプロモーターとターミネーターの間にリパーゼ cDNA(シグナル配列、プロ配列、および成熟リパーゼ配列を含む)を挿入した発現プラスミドを構築した。この発現プラスミドを持つ *S. cerevisiae* は、菌体外にリパーゼを分泌発現した。さらに宿主菌株と培地組成を変えることにより、リパーゼの生産量を39 μg/mlにまで上昇させることができた。この生産量は、元菌である *F. heterosporum* の生産量の約3倍であった。*S. cerevisiae* で発現したリパーゼを精製したところ、元菌の生産するリパーゼと同じ性質をもつ酵素(リパーゼA)の他に、SDS-PAGEで分子量の大きいリパーゼ(リパーゼB)も見出された。

第4章では、*S. cerevisiae* で発現させることによって新たに生じたリパーゼBの性質と構造の解析を行った。リパーゼBは、リパーゼAよりも熱や有機溶媒に対する安定性に優れていた。リパーゼBは、301アミノ酸残基からなる一本のポリペプチド鎖から成っていたが、リパーゼAは275 残基(N末端ペプチド)と26 残基(C末端ペプチド)からなる2本のポリペプチド鎖で構成されていた。したがって、C末端ペプチドがペプチド結合でN 末端ペプチドに結合しているとき、C末端ペプチドが酵素の高次構造の崩壊を防いでいると推定される。また、元菌の *F. heterosporum* ではC末端ペプチドの切断が完全であるために、培地中に安定なリパーゼBが見出されないが、*S. cerevisiae* でcDNAを発現させたとき、C末端ペプチドの切断が不完全であるために、2種類のリパーゼが混在したものとわかった。変異遺伝子(Arg275→Ala)を持つ *S. cerevisiae* は安定なリパーゼのみを生産したことから、元菌の生産するリパーゼよりも非常に安定なリパーゼを生産する菌株の育種に成功した。

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た。C末端ペプチド内26アミノ酸残基のアミノ酸変異株およびC末端側からの欠失変異株の解析から、Asp293 の側鎖の負電荷およびC末端側からの 13 アミノ酸残基からなるペプチド鎖が安定性に大きく関与していることが推定された。また、C末端ペプチドは、酵素の生産量にも影響を及ぼしていた。

第6章では、安定なリパーゼを油脂加工に応用した。まず、*S. cerevisiae* で生産されたR275Aリパーゼの固定化法を検討したところ、陰イオン交換樹脂Dowex WBAが固定化に最も適した担体であった。次に、この担体に固定化したリパーゼを用いて、融点の高いトリパルミチンとオレイン酸との間のアシドリシスにより、グリセリド骨格の1,3 位にオレイン酸、2 位にパルミチン酸の結合した構造脂質を製造した。反応温度を50℃とし、24 時間ごとに基質を交換して反応を繰り返したところ、220 日以上繰り返し使用しても高い反応性を示し、従来まで使用されてきた *R. miehei* の市販固定化リパーゼよりもはるかに安定性に優れていた。

以上、本研究によって、単離した新規なリパーゼの構造と安定性の関係を解析し、遺伝子に変異を加えることによって安定性が飛躍的に向上したリパーゼを酵母内で生産させることに成功した。この非常に安定なリパーゼを使用すれば、構造脂質の製造などの油脂加工への工業的利用が可能である。

第１章　*F. heterosporum* の生産する耐溶媒性リパーゼの精製と性質

第１節　緒言

近年リパーゼは、医薬品や農薬の中間体の製造(5, 6)、あるいは油脂の高度加工の触媒(7-16) などとして幅広く用いられている。しかし、酵素は高温下、酸、アルカリ、有機溶媒存在下などの過酷な条件下では不安定であるという問題点がある。たとえば、リパーゼは液状の基質に対しての反応性は高いが、基質が固体の時反応性が大きく減少する。これらを避けるためには、酵素の失活を犠牲にしてまでも、高温下や有機溶媒存在下で反応を行わなければならない。そこで、熱や有機溶媒に対する安定性に優れ、長期間の繰り返し使用に耐えるリパーゼの開発が要求されている。

これまでに、安定性の高いリパーゼとして *Pseudomonas* 属のリパーゼ(25, 49)などが知られているが、これらのリパーゼはトリグリセリドの全ての脂肪酸を加水分解する非特異的酵素である。これに対し、構造脂質の製造(12, 16, 48)などに有効であり、トリグリセリドの 1,3 位の脂肪酸を加水分解する 1,3 位特異的リパーゼには安定な酵素剤はほとんど報告されていない。

一般に、熱に対して安定性の高いリパーゼは、有機溶媒に対しても安定性が高い(25, 49, 50)。したがって、安定性の高いリパーゼをスクリーニングするときは、熱か有機溶媒かのどちらかでスクリーニングすれば良いと考えられる。

そこで本章では、リパーゼの工業的利用範囲の拡大のために、有機溶媒に対して安定性の高いリパーゼを生産する微生物の単離をおこなった。さらに、単離された微生物の種類を同定するとともに、同菌が生産するリパーゼの精製と性質の解析をおこなった。

第２節　実験材料及び実験方法

２－１．リパーゼ生産菌の検索

リパーゼ生産菌の一次スクリーニングは、オリーブ油を単一炭素源とし、胆汁末でエマルジョン化した寒天培地(51, 52)を用い、27℃で培養した。糸状菌および酵母の二次スクリーニングは 1%大豆油、2%ペプトン、1%酵母エキスからなる培地(pH 5.8)を、また細菌の二次スクリーニングは 1%大豆油、0.5%肉エキス、1%ペプトン、0.5%NaCl からなる培地(pH 7.0)を用いた。培養は 18φ試験管（実容 5 ml）で 27℃、２日間振とう培養し、培養液中のリパーゼ活性を測定した。

２－２．リパーゼ活性の測定

リパーゼ活性の測定は既報(50)にしたがっておこなった。反応溶液(10 mM $CaCl_2$、50 mM 酢酸緩衝液、pH 5.6)にオリーブ油（和光純薬、Osaka）1 g および適当量の酵素液を加え、500 rpm で回転撹拌しながら 30℃で 30 分間インキュベートした。反応後 20 ml のエタノールを加え、生成脂肪酸を 0.05 N KOH で滴定した。この反応条件下で 1 分間に 1 μmol の脂肪酸を遊離する活性を 1 単位(U)とした。

２－３．リパーゼ生産菌の培養

単離したリパーゼ生産菌の培養は、3%大豆油、4%コーンスティープリカー、0.1%酵母エキス、0.1%KH_2PO_4、0.05%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ からなる培地(pH 5.5)を用いた(52)。この培地 70 ml を入れた 500 ml 容の坂口フラスコで、25℃、65 時間培養を行った。

２－４．リパーゼの精製

全ての精製は、15℃以下で行った(53)。

（１）硫安分画　菌糸を除くために培養液を綿の布で濾過し、7000 X g で 20 分間遠心分離した。15%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた後、沈殿をセライトで濾過除去した。つづいて硫酸アンモニウム濃度を 80%飽和にして、沈殿をセライト濾過で回収した。沈殿を 10 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)に溶解し、同緩衝液で透析した。

（２）SP-Sephadex C-50 カラムクロマトグラフィー　10 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)で平衡化した SP-Sephadex C-50 カラム（3 X 40 cm、Pharmacia LKB Biotechnology、

Sweden）に透析した酵素液をチャージし、同緩衝液を含む0から0.6 MのNaClのグラジエント（600 ml）で溶出した。活性のあるフラクションを集めて、限外濾過で濃縮した。

（3）Sephadex G-75ゲル濾過　0.2 M NaClを含む20 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化したSephadex G-75ゲル濾過カラム（2 X 55 cm、Pharmacia LKB Biotechnology）に濃縮した酵素液をチャージし、同緩衝液で溶出した。活性のあるフラクションを集めて限外濾過で濃縮し、20 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)で透析した。

（4）焦点電気泳動　Pharmalyte（pH 3-10のグラジエント、Pharmacia LKB Biotechnology）を含む110 mlのカラムに酵素溶液を入れ、300 Vで18時間電圧をかけた。500 Vまで徐々に電圧を上げた後、この電圧で24時間保持した(54)。活性のあるフラクションを集めた後、（3）と同様にしてSephadex G-75ゲル濾過で混在しているPharmalyteを除去した。

2－5．リパーゼの性質の解析

Disc-PAGEはDavisら(55)の方法にしたがっておこなった。SDS-PAGEはLaemmli(56)の方法にもとづき、12%の分離用ゲルを用いておこなった。電気泳動後、Coomassie Brilliant Blueでタンパク質を染色した。ゲル濾過による分子量の測定は、2－4（3）.と同様におこない、ribonuclease A (13.7 kDa)、chymotrypsinogen A (25 kDa)、ovalbumin (45 kDa)、bovine serum albumin (68 kDa)を標準として分子量を決定した。リパーゼの糖含量は、フェノール硫酸法(57)で測定した。

リパーゼの位置特異性は、triolein を加水分解して得られる生成物を薄層クロマトグラフィーで分析することにより決定した(49)。N末端アミノ酸配列は、Applied Biosystems 470Aプロテインシーケンサーで分析した。

第3節　結果

3－1．リパーゼ生産菌の検索

土壌から、リパーゼ生産菌一次スクリーニング用培地でハローを形成した313株（細菌212株、酵母および糸状菌101株）を単離した。これらを二次スクリーニング用培地で培養し、3.5 U/ml以上のリパーゼを生産した9株を選択した(52)。

次に、この9菌株の培養ろ液を50% dimethyl sulfoxide (DMSO)中で30℃、20時間放置後、残存活性を測定し耐溶媒性酵素を検索した。なお、*Pseudomonas cepacia* のリパーゼ(25, 49)および *Geotrichum candidum* のリパーゼ(35, 58)をそれぞれ、耐溶媒性酵素、非耐溶媒性酵素の指標とした。その結果、3株（LCK-422, -8521, -9812）の生産するリパーゼは耐溶媒性を示した（Table 1-1）。これら3菌株の分生子の形態は類似していたので、最も生産性の良かったLCK-8521株を選択した。

Table 1-1.　Isolation of microorganisms producing solvent tolerant lipases

Strain	Lipase activity (U/ml)	Stability in 50% DMSO (%) [a]
Bacterium		
LCK-8311	6.3	43
Fungi		
LCK-324	6.5	0
LCK-422	6.8	101
LCK-424	3.5	25
LCK-521	5.9	0
LCK-2210	10.6	0
LCK-8521	14.4	98
LCK-9812	11.0	97
LCK-9532	6.2	21
Geotrichum candidum	−	0
Pseudomonas cepacia	−	103

[a] the remaining activity after incubating in 50% dimethyl sulfoxide (DMSO) at 30℃ for 20 h.

3－2．単離したリパーゼ生産菌の同定

単離したリパーゼ生産菌の形態的特徴（Fig. 1-1 と Table 1-2）から、Booth(59)と Gerlach, Nirenberg(60)の分類法にしたがい、この菌は糸状菌 *Fusarium heterosporum* と同定された。

Fig. 1-1. (A) SEM image and (B) light microscopy of *F. heterosporum*.

Table 1-2. Growth and morphological characteristics of filamentous fungus producing a solvent-tolerant lipase

Growth rate on malt extract agar medium:
greater than 9 cm in diameter at 25℃ for 4 d
Microconidia: could not be observed
Macroconidia: heterogeneous in size; with pedicellate foot cell; formed from simple phialide
Culture: pale pink to pale peach; red or reddish-brown pigment not produced

3－3．リパーゼの精製

F. heterosporum を培養し、その培養上清 1500 ml から、硫酸アンモニウム分画、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、および焦点電気泳動によりリパーゼを精製した(53)。このうち最終段階の焦点電気泳動のフラクションパターンを Fig. 1-2 に示す。活性のピークの前にショルダーピークが見られることから、*F. heterosporum* は等電点 7.0 の主成分と、それよりも等電点の低いタンパク質が混在していることがわかった。Table 1-3 に主成分のリパーゼの精製結果をまとめた。精製酵素は、初発の培養ろ液からの収率 38%、比活性 2010 U/ml まで精製され、Disc-PAGE および SDS-PAGE（Fig. 1-3）で単一バンドであった。

Table 1-3. Purification of lipase from *F. heterosporum*

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Activity yield (%)
Culture filtrate	62,700	66,100	0.95	100
Ammonium sulfate	58,300	4,390	13.3	93
SP-Sephadex C-50	46,000	227	203	73
Sephadex G-75	43,000	43.4	991	69
Isoelectric focusing	23,700	11.8	2010	38

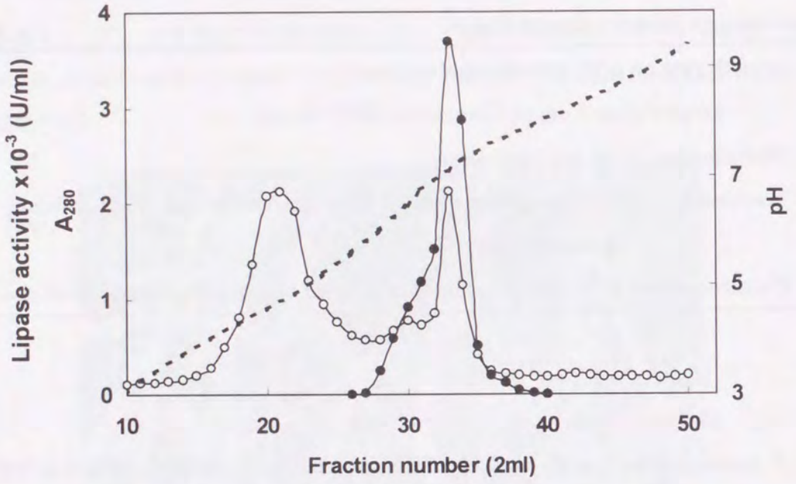


Fig. 1-2. Isoelectric focusing of *F. heterosporum* lipase using Pharmalyte 3-10. Symbols: ○, A_{280}; ●, lipase activity; ·····, pH.

3－4．リパーゼの分子量と糖含量

SDS-PAGE から求めた精製リパーゼの分子量は 31 kDa であり (Fig. 1-3)、Sephadex G-75 のゲル濾過クロマトグラフィーから求めた分子量は 30 kDa であった。これらの結果は、*F. heterosporum* のリパーゼはモノマー酵素であることを示している。

フェノール硫酸法(57)でリパーゼの糖含量を調べたが、糖は検出されなかった。

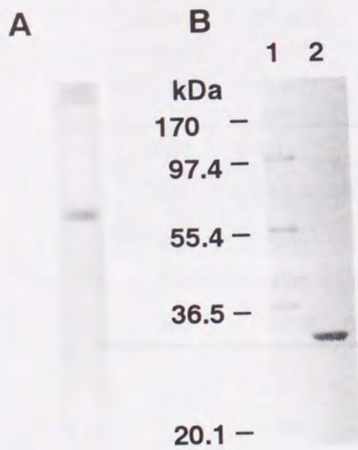


Fig. 1-3. PAGE of *F. heterosporum* lipase. (A) Disc-PAGE, and (B) SDS-PAGE. Lane 1, molecular markers; macroglobulin (170 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), glutamate dehydrogenase (55.4 kDa), lactate dehydrogenase (36.5 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa); lane 2, purified *F. heterosporum* lipase.

3－5．金属イオンおよび阻害剤の影響

Table 1-4 に金属塩の影響を調べた。Cu^{2+}は酵素活性を強く阻害し、Fe^{3+}、Co^{2+}、Hg^{2+}は 60%程度阻害した。EDTA は酵素活性に影響しなかったことから、本酵素は metalloenzyme ではないことがわかった。一般に、リパーゼの活性中心は Ser、His および Asp/Glu 残基で形成されていることから、各種阻害剤の影響を調べた。本酵素は、1 mM の diethyl pyrocarbonate (DEP) で 100%、5 mM の 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho- *p*-toluenesulfonate (CMC)で 70%の活性が阻害されたが、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)は活性を阻害しなかった。これらの結果は、His および Asp/Glu 残基が酵素活性に重要であることを示しているが、Ser 残基の関与はこの実験からは証明できなかった。

Table 1-4. Effect of metal ions and reagents of *F. heterosporum* lipase

Compounds	Concn. (mM)	Remaining activity (%)	Compounds	Concn. (mM)	Remaining activity (%)
$MgCl_2$	1.0	83	EDTA	1.0	92
$MnCl_2$	1.0	70	DEP	0.2	25
$FeCl_3$	1.0	42		1.0	0
$CoCl_2$	1.0	40	CMC	0.2	98
$NiCl_2$	1.0	77		1.0	69
$CuCl_2$	1.0	12		5.0	32
$ZnCl_2$	1.0	64	PMSF	1.0	98
$SnCl_2$	1.0	63		5.0	96
$BaCl_2$	1.0	77			
$HgCl_2$	1.0	45	None		100
$PdCl_2$	1.0	83			

The enzyme was incubated at 30℃ for 30 min with metal chlorides and EDTA in 50 mM acetate buffer (pH 5.6), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho- *p*-toluenesulfonate (CMC) in 100 mM glycine-HCl buffer (pH 5.5), and diethyl pyrocarbonate (DEP) in 100 mM phosphate buffer (pH 6.0). The remaining activity was measured under the standard conditions.

3－6．温度の影響

精製した *F. heterosporum* リパーゼの至適温度を 50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.6)中で調べたところ（Fig. 1-4）、40 から 50℃に最大の活性を示した。また、本酵素は 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.5)中では、40℃まで安定であることもわかった。

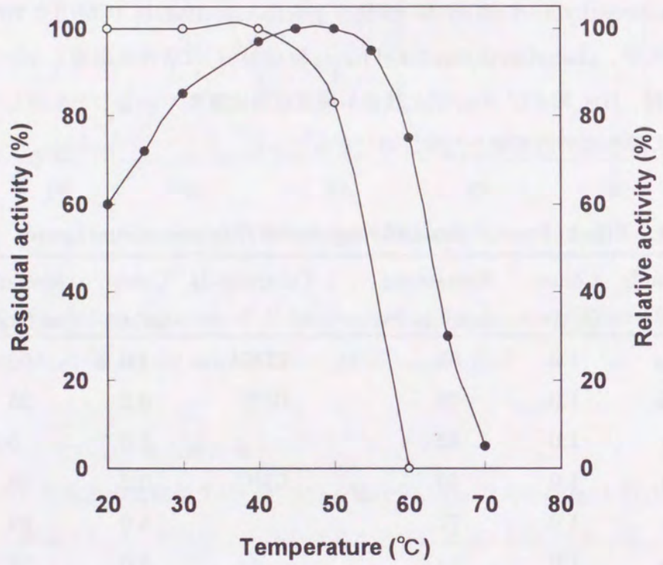


Fig. 1-4. Thermo stability (○) and optimum temperature (●) of *F. heterosporum* lipase. The remaining activity was measured after the incubation in 50 mM phosphate (pH 7.5) for 20 min at various temperatures. The optimum temperature was measured in 50 mM acetate (pH 5.6) for 60 min at various temperatures.

3－7．ｐＨの影響

精製した *F. heterosporum* リパーゼの至適ｐＨを Briton-Robinson buffer 中で調べたところ（Fig. 1-5）、40℃、pH 5.5-6.0 で最大の活性を示した。また、本酵素は pH 4-10 の同緩衝液中、30℃、４時間の処理を行っても安定であることがわかった。

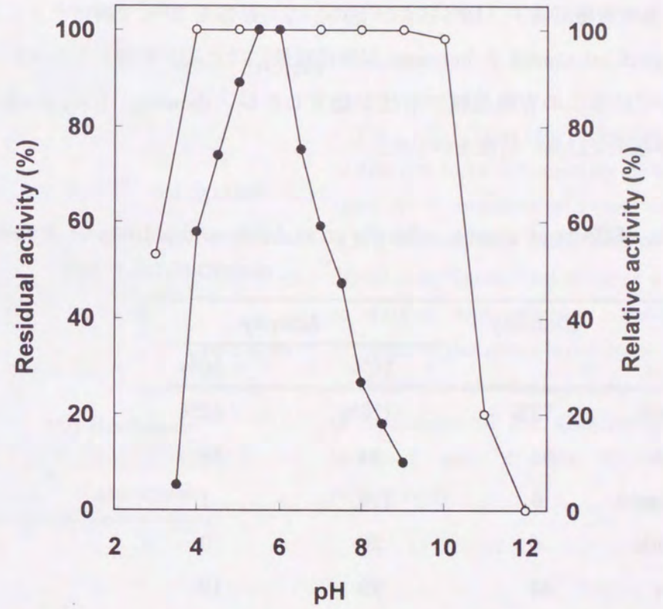


Fig. 1-5. pH stability (○) and optimum pH (●) of *F. heterosporum* lipase. The remaining activity was measured after incubation in Briton-Robinson buffer at 40℃ for 4h. Briton-Robinson buffer was used for the optimum pH at 30℃.

3－8．有機溶媒の影響

各種有機溶媒中での安定性を調べるために、50%有機溶媒を含む 50 mM酢酸緩衝液(pH 5.6)中、30℃、20 時間インキュベートした後の残存活性を調べた。なお、benzene, hexane, ether, *n*-butanol は水と混ざらない溶媒であるので、２層系のままで酵素を処理した。本酵素は *n*-butanol 以外の水と混ざらない溶媒には安定であり、さらに水に混ざる溶媒の中でも、DMSO には安定であった。

次に、各種有機溶媒中（10%および 50%）での活性を 30℃で調べたところ、10%の濃度であれば *n*-butanol と benzene 以外は活性にほとんど影響しなかった。50%の濃度の場合では多くの有機溶媒で活性が低下したが、dimethyl formamide (DMF)や DMSO 存在下では高い活性を示した。

Table 1-5. Effects of organic solvents on stability and activity of *F. heterosporum* lipase

Solvent	Stability	Activity	
		10%	50%
Methanol	73%	116%	62%
Ethanol	54	94	58
Isopropanol	6	116	1
n-Butanol	4	26	0
Acetone	34	99	19
DMF	56	93	92
DMSO	105	113	98
Acetonitrile	0	100	0
Dioxane	4	111	16
Hexane	131	93	32
Benzene	127	56	1
Ether	145	125	20
None	100	100	100

3－9．位置特異性

Figure 1-6 に triolein を基質とした反応生成物（加水分解率 10 および 14%）の薄層クロマトグラフィーを示す。なお、本反応は短時間で行っているので、グリセリドの２位から 1,3 位への非酵素的アシル基転移は無視できる。1,3-diolein と 1(3)-monoolein が反応生成物から見出されなかったので、本酵素はトリグリセリドの 1,3 位の脂肪酸を特異的に加水分解し、２位の脂肪酸には作用しないことがわかった。

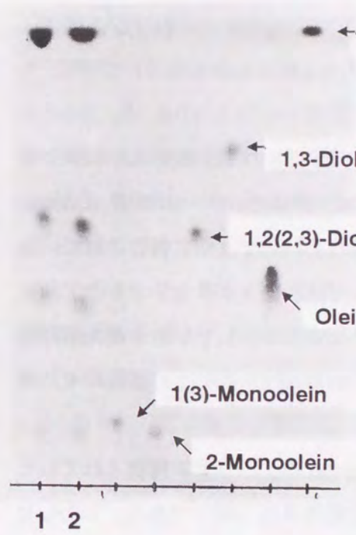


Fig. 1-6. Thin-layer chromatography of the products obtained by hydrolysis of triolein. A reaction mixture containing 0.1 g triolein was incubated at 40℃ for 10-20 min. Then, 7 ml of ether was added to extract the reaction products, and aliquots of the ether layer were subjected to thin-layer chromatography. The extent of hydrolysis of the samples applied to lanes 1 and 2 was 10 and 14%, respectively.

3－10．N末端アミノ酸配列

プロテインシーケンサーを用いて決定した *F. heterosporum* の精製リパーゼのN末端アミノ酸配列を Fig. 1-7 に示す。この配列と相同性のある蛋白質は NRBF および SWISSPROT データーバンクから見出されなかった。

1 Ala-Val-Thr-Val-Thr-Thr-Gln-Asp-Leu-Ser-
11 Asn-Phe-Arg-Phe-Tyr-Leu-Gln-His-Ala-Asp-
21 Ala-Ala-Tyr-Xaa-Asn-Phe-Asn-Thr-Ala-Val-
31 Gly-Lys-Pro-Val-His-Xaa-Ser-Ala-Gly-Asn-
41 Xaa-Pro-Asp-

Fig. 1-7. N-terminal amino acid sequence of *F. heterosporum* lipase. Xaa, not determined.

第４節　考察

土壌より有機溶媒に安定なリパーゼを生産する糸状菌 *F. heterosporum* を単離した(52)。このリパーゼを精製し(53)、その性質を調べたところ、50% DMSO を含む 50 mM 酢酸緩衝液中(pH 5.6)で 20 時間処理しても、その活性を失わなかった。これは、同条件で完全に失活する糸状菌 *G. candidum* (35, 58)や *Rhizopus delemar* (39, 40)の生産するリパーゼよりも優れており、また細菌 *Pseudomonas* 属(25, 49)や *Bacillus* 属(50)の耐溶媒性リパーゼに劣らない安定性であった。50%の有機溶媒中における活性は、*Pseudomonas* 属や *Bacillus* 属の耐溶媒性リパーゼには及ばないものの、DMSO や DMF 中では高い活性を保持していた。

精製した *F. heterosporum* のリパーゼは、トリグリセリドの 1,3 位のみを加水分解する（1,3 位特異的)。他の 1,3 位特異的リパーゼには、膵臓のリパーゼや *R. delemar* のリパーゼなどがあるが、耐溶媒性のある 1,3 位特異的リパーゼは殆ど報告されていない。また、耐溶媒性のある *Pseudomonas* 属のリパーゼは、トリグリセリドを全て加水分解する非特異的酵素であり、*Bacillus* 属のリパーゼは２位よりも 1,3 位を優先的に加水分解する。これらのことから、*F. heterosporum* の耐溶媒性リパーゼは新規な有用酵素であると考えられる。

F. heterosporum と同属である *Fusarium oxysporum* のリパーゼが精製されている(61)。両リパーゼの分子量はほぼ同じであり、また位置特異性も同じである。しかしながら、*F. oxysporum* のリパーゼは糖タンパクであるのに対して、*F. heterosporum* のリパーゼには糖鎖が検出されなかった。*F. heterosporum* のリパーゼは Zn^{2+}や Pb^{2+}によって失活しないのに対して、*F. oxysporum* のリパーゼはこれらの金属塩で強く不活性化される。さらに、*F. oxysporum* のリパーゼにはメチオニンが含まれていないのに対し、*F. heterosporum* のリパーゼにはメチオニンが 4.8 個含まれている(データーは、第２章の Table 2-1 で記載)。したがって、*F. heterosporum* のリパーゼは、*F. oxysporum* のリパーゼとは異なった新規なリパーゼであると考えられる。

なお本リパーゼは、275 残基と 26 残基からなる２本のペプチド鎖で構成されているが、このことについては第４章で詳細に述べる。また、Fig. 1-7 でＮ末端配列が１つしか得られなかったのは、HPLC で精製した酵素のＮ末端配列を分析したため、26 残基のペプチド鎖が分析されなかったものと考えられる。

第５節　要約

土壌から、有機溶媒に安定なリパーゼを生産する微生物を単離し、その胞子の形状などから、糸状菌 *F. heterosporum* と同定された。*F. heterosporum* を 3%大豆油、4%コーンスティープリカー、0.1%酵母エキス、0.1%KH_2PO_4、0.05%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ からなる培地(pH 5.5)で培養し、その培養上清に存在するリパーゼを、硫安分画、SP-Sephadex C-50、Sephadex G-75、および焦点電気泳動により、Disc-PAGE および SDS-PAGE で単一になるまで精製した。精製酵素は、分子量 31 kDa のモノマー酵素で、等電点は 7.0 であった。オリーブ油を基質としたとき、40℃における至適 pH は 5.5-6.0、pH 5.6 における至適温度は 45-50℃であった。pH 4-10 においては、30℃、４時間安定であり、また、pH 7.5 のリン酸緩衝液中では、40℃で 20 分間安定であった。DMSO、hexane、benzene、ether などの有機溶媒が 50%存在しても、30℃、20 時間安定であった。また、反応系に 50%の DMSO や DMF が存在しても、活性の減少は認められなかった。本リパーゼは、トリグリセリドの 1,3 位を特異的に加水分解した。各種阻害剤の影響から、His および Asp/Glu 残基が酵素活性に重要であることが示唆された。Ｎ末端アミノ酸配列は、Ala-Val-Thr-Val-Thr-Gln-Asp‥‥であり、データーベース上にある他の蛋白質との相同性はなかった。

第２章　*F. heterosporum* リパーゼ cDNA のクローニング

第１節　緒言

第１章では、有機溶媒に安定な 1,3 位特異的リパーゼを生産する糸状菌 *F. heterosporum* を土壌より単離し、その酵素の精製と性質の解析を行った(52, 53)。これまでに多くのリパーゼの遺伝子が単離され、その配列が明らかになっているが、微生物由来のリパーゼはその相同性から大きく分けて 6 つのグループに分類される(Table 1)。その中で、糸状菌由来のリパーゼは、非特異的である *G.candidum* のグループ(33-38)と、1,3 位特異的である *Rhizomucor miehei* のグループ(39-45)に分類される(46, 47)。しかし、*F. heterosporum* のリパーゼの配列はまだ調べられていない。

多くのリパーゼの X 線結晶解析がおこなわれ、立体構造が詳細に解析されている(62-68)。*F. heterosporum* のリパーゼの一次構造上の配列がわかれば、ホモロジーのあるリパーゼの構造を利用して、本リパーゼの立体構造を推定することが可能である。本リパーゼは、有機溶媒に安定であったが、*Pseudomonas* 属や *Bacillus* 属の耐溶媒性リパーゼの安定性には及ばない。したがって、リパーゼの構造を解析し、変異によってリパーゼの安定性をさらに向上させる必要がある。これには、リパーゼ遺伝子のクローニングを行わなければならない。

そこで本章では、*F. heterosporum* のリパーゼ cDNA のクローニングと一次構造上の配列、他のリパーゼとのホモロジー比較、および予測した立体構造について述べる。

第２節　実験材料及び実験方法

２－１．実験材料

制限酵素とその他の遺伝子操作関連試薬は、宝酒造(Kyoto)または東洋紡(Osaka)から、[α-^{32}P]dCTP (3,000 Ci/mmol) と [γ-^{32}P]ATP (6,000 Ci/mmol)は NEN Research Products (USA)よりそれぞれ購入した。*F. heterosporum* の培養は、3%大豆油、4%コーンスティープリカー、0.1%酵母エキス、0.1%KH_2PO_4、0.05%$MgSO_4 7H_2O$ からなる培地(pH 5.5)を用いた(52)。この培地 70 ml を入れた 500 ml 容の坂口フラスコで、25℃で培養を行った。*Escherichia* (*E.*) *coli* DH5 [*supE*44, *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1](69)、MV1184 [*ara*, Δ(*lac-proAB*), *rpsL*, *thi*, φ80*lacZ*ΔM15), Δ(*srl-recA*)306::Tn*10*(*tet* ^{r})/F' [*traD*36, *proAB*$^{+}$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15] (70)、プラスミド pUC119 (70)、およびヘルパーファージ M13KO7 (70)は、遺伝子操作に用いた。*E. coli* は、100 μg/ml のアンピシリンを含む LB 培地(71)で培養した。

２－２．Poly(A)$^{+}$RNA の調製

F. heterosporum を 30 時間培養後、培養液を濾紙(No.2、東洋濾紙)で濾過して、菌糸を得た。得られた菌糸は液体窒素ですぐに凍結し、液体窒素存在下で乳鉢の中ですりつぶした。さらに、5 M guanidine thiocyanate 溶液中で 30 分間ホモゲナイズした。Chirgwin ら(72)の方法に従い全 RNA を調製後、oligo(dT) cellulose (Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden)カラムクロマトグラフィー(73)で Poly(A)$^{+}$RNA を精製した。

２－３．*F. heterosporum* のリパーゼ cDNA の検索

cDNA ライブラリーは、10 mg の poly(A)$^{+}$RNA と Okayama-Berg cDNA library synthesis kit (東洋紡)を用いて、本キットに記載されている方法にしたがって作成した(74, 75)。*E. coli* DH5 の形質転換は、Hanahan ら(69, 71)の方法にしたがって行った。オリゴヌクレオチドプローブは、DNA 合成機(Oligo 1000, Beckman, USA)で作成し、[γ-^{32}P]ATP と T4 polynucleotide kinase で標識した。コロニーハイブリダイゼーションは、ナイロンメンブレン(Hybond-N, Amersham, UK)を用い、6 X SSC (20 X SSC = 3 M NaCl / 0.3 M sodium citrate)、0.1 % SDS, 0.1 mg/ml calf thymus DNA および 0.67 pmol/ml の標識プローブ存在下、45℃ 、24 時間おこなった。ハイブリダイゼー

ション後、4 X SSC と 0.1 % SDS を含む溶液でメンブレンを、45℃で 15 分間洗浄を行い、この洗浄操作を数回繰り返した。風乾後、X 線フィルム(RXO-G、富士フィルム、Kanagawa)で感光させ、陽性クローンを検出した。

2－4．塩基配列の決定

遺伝子操作は、Molecular Cloning (71) に記載されている方法にしたがって行った。cDNA 断片を pUC119 の両方向に連結後、exonuclease III と mung bean nucleases で処理して(76)デレーションプラスミドを作成した。ヘルパーファージ M13KO7 を用いて一本鎖 DNA を調製後、Sequenase ver.2 (United States Biochemical, USA)を用いたダイデオキシ法で cDNA の両鎖の全塩基配列を決定した(77)。得られた塩基配列は、DNASIS プログラム(日立ソフトウエア)で解析した。

2－5．立体構造の予測

F. heterosporum のリパーゼの立体構造は、*R. miehei* のリパーゼの立体構造(62-66)をモデルとして、CHARMm/QUANTA で予測した。

第3節　結果

1－1．　RNA の調製

リパーゼが最も盛んに生産されている時期を調べるために、*F. heterosporum* の培養の経時変化を調べた(Fig. 2-1)。対数増殖期の前期には培養液中にリパーゼ活性が殆ど見出されず、対数増殖期の終りから定常期にはいる頃にリパーゼが最も盛んに生産され、この時期のリパーゼ生産量はおよそ 0.04 mg lipase / g cell (wet wt.) / h であった。そこで、リパーゼ生産が最も盛んである菌体（培養開始から約 30 時間後）から全 RNA を調製した。約 3.0 g (wet wt.)の菌体から、15 mg の全 RNA と 0.75 mg の poly(A)+RNA を得た。

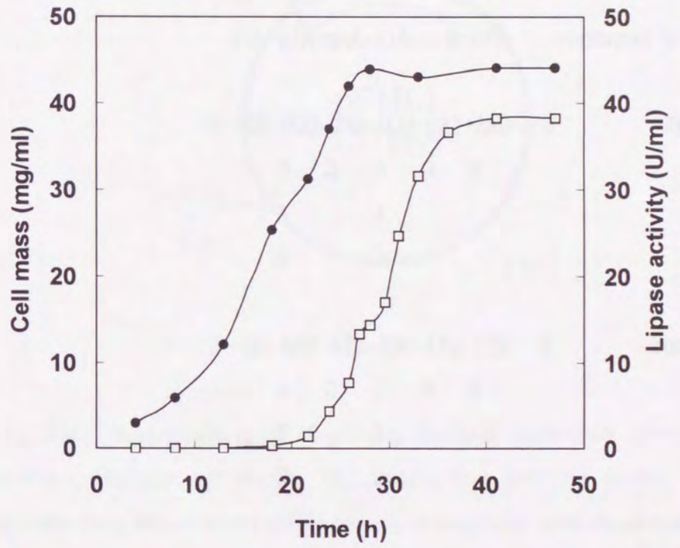


Fig. 2-1.　Time course of lipase production by *F. heterosporum*. Cultivation was carried out at 25℃ in 500 ml flask with 70 ml of 3%soybean oil, 4%corn steep liquor, 0.1%yeast extract, 0.1%KH_2PO_4, 0.05%$MgSO_47H_2O$ (pH 5.5). ●; Cell mass (wet wt.), □; lipase activity in the culture broth.

1－2．リパーゼcDNAのクローニング

Okayama-Berg法にしたがって、8 X 10^4 個の形質転換体を含むcDNAライブラリーを作成した。また、第1章で解析したN末端アミノ酸配列(Fig. 1-8)に基づいて作成したプローブ(Fig. 2-2)を ^{32}P で標識し、コロニーハイブリダイゼーションによって約12,000 個の形質転換体をスクリーニングしたところ、6個の陽性クローンを得た。この中にはDNA断片の少し短いクローンもあったが、いずれも制限酵素地図が同じであったので、最も長いDNA断片を持つクローンのプラスミドをpFHL1と命名した。このpFHL1の制限酵素地図をFig. 2-3に示す。

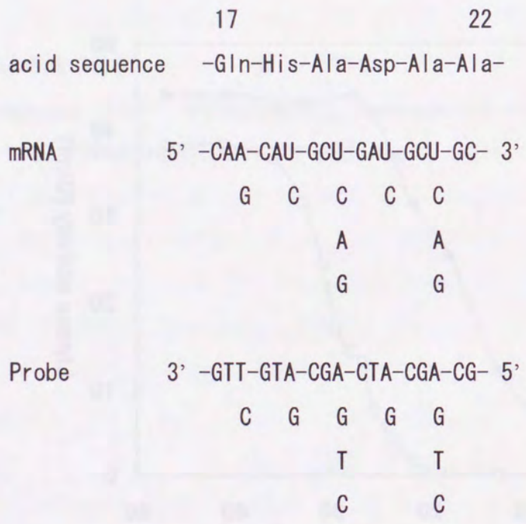


Fig. 2-2. Synthetic oligonucleotide probe used for isolating *F. heterosporum* lipase cDNA. The numbers on the amino acid sequence are those from the N-terminus.

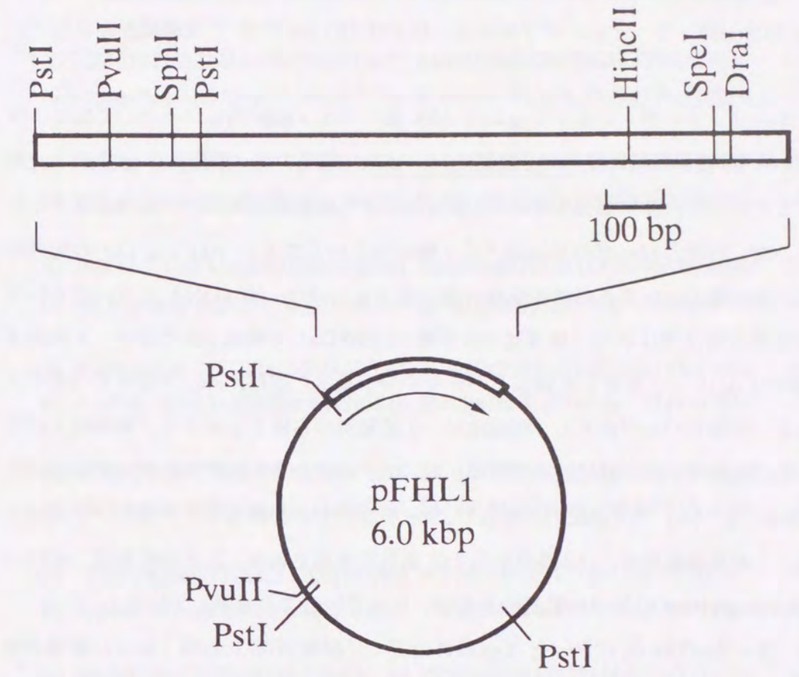


Fig. 2-3. Restriction map of pFHL1. Several restriction sites identified by restriction analysis are shown. The single line and the double lines indicate Okayama-Berg vector and a cDNA insert, respectively, and the arrow indicates the transcriptional direction of the lipase gene.

1－3．リパーゼ cDNA の塩基配列とアミノ酸配列

Figure 2-4 に、単離した cDNA の塩基配列を示す。本 cDNA は全長 1212 bp の DNA 断片と 76 bp の poly(A)$^+$RNA で構成され、62 bp の 5'上流領域、ATG コドンで始まる 999 bp のオープンリーディングフレーム、および 151 bp の 3' 下流領域が存在していた(78)。

このオープンリーディングフレームは 333 個のアミノ酸配列をコードしており、N 末端側から 33 番目以降の配列が、精製リパーゼのN末端アミノ酸配列(Fig. 1-8)と一致した。したがって、N 末端側からの 32 残基はシグナル配列またはプロ配列と推定される。ここで、精製リパーゼのN末端アミノ酸配列と同じである Ala-Val-Thr-の配列から順に正数の番号を、それ以前の配列に負の番号をつけた。本 cDNA にコードされている成熟蛋白質は 301 アミノ酸残基（分子量 32,690 Da）で構成されており、この分子量は SDS-PAGE から推定した精製リパーゼの分子量(31 kDa、Fig. 1-3)よりは若干大きかった。精製リパーゼのアミノ酸組成は、塩基配列から推定したアミノ酸組成とほぼ一致した(Table 2-1)。一般に、リパーゼ、エステラーゼ、セリンプロテアーゼには Gly – X – Ser – X – Gly の共通配列が存在し、Ser が活性中心を構成していることがわかっている。この共通配列が、142 番目から 146 番目に見出された。以上の結果は、pFHL1 が *F. heterosporum* のリパーゼ遺伝子をコードしていることを示している。

Asn – X – Ser/Thr (X は Pro と Asp 以外のアミノ酸配列)がある時、Asn に糖鎖が付加していると報告されている(79)。この共通配列は、*F. heterosporum* のリパーゼには存在していなかった。この事実は、フェノール硫酸法によって精製リパーゼから糖鎖が見出されなかった事実と一致する。


```
   1  ACACATCATCCTCTTCAGATCGACAATCC AACCCAATTGACTCTCATATTGAGACCTCT    59

  60 GTCATGATGCTCGTCCTATCTCTTCTTTCC ATAATTGCCTTTACGGCAGCTGGCCCAGTG   119
  32    MetMetLeuValLeuSerLeuLeuSer IleIleAlaPheThrAlaAlaGlyProVal   -14

 120 CCCTCTGTTGATGAGAATACTCGGGTACTT GAGCATCGAGCTGTGACAGTCACGACGCAG   179
 -13 ProSerValAspGluAsnThrArgValLeu GluHisArgAlaValThrValThrThrGln     7

 180 GATCTGTCAAATTTCAGGTTCTATCTCCAG CATGCTGATGCTGCGTATTGCAATTTCAAT   239
   8 AspLeuSerAsnPheArgPheTyrLeuGln HisAlaAspAlaAlaTyrCysAsnPheAsn    27

 240 ACGGCAGTTGGCAAACCAGTCCACTGCAGT GCCGGGAATTGTCCTGATATTGAAAAGGAC   299
  28 ThrAlaValGlyLysProValHisCysSer AlaGlyAsnCysProAspIleGluLysAsp    47

 300 GCTGCTATCGTTGTCGGATCGGTAGTTGGT ACGAAGACGGGCATCGGTGCCTATGTGGCA   359
  48 AlaAlaIleValValGlySerValValGly ThrLysThrGlyIleGlyAlaTyrValAla    67

 360 ACTGACAACGCTCGTAAGGAGATCGTTGTC TCTGTACGGGGCAGCATCAACGTGCGAAAC   419
  68 ThrAspAsnAlaArgLysGluIleValVal SerValArgGlySerIleAsnValArgAsn    87

 420 TGGATCACAAACTTCAACTTTGGTCAAAAG ACCTGCGACCTTGTTGCTGGCTGTGGCGTT   479
  88 TrpIleThrAsnPheAsnPheGlyGlnLys ThrCysAspLeuValAlaGlyCysGlyVal   107

 480 CACACCGGCTTCTTGGATGCTTGGGAGGAG GTTGCAGCCAATGTCAAAGCTGCTGTCTCA   539
 108 HisThrGlyPheLeuAspAlaTrpGluGlu ValAlaAlaAsnValLysAlaAlaValSer   127

 540 GCAGCGAAGACTGCAAACCCTACTTTCAAG TTCGTCGTTACCGGACACTCCCTCGGTGGT   599
 128 AlaAlaLysThrAlaAsnProThrPheLys PheValValThrGlyHisSerLeuGlyGly   147

 600 GCCGTCGCTACTATTGCGGCTGCGTACCTG CGCAAAGACGGCTTTCCTTTTGACCTCTAC   659
 148 AlaValAlaThrIleAlaAlaAlaTyrLeu ArgLysAspGlyPheProPheAspLeuTyr   167

 660 ACCTATGGCTCTCCAAGAGTAGGAAACGAC TTCTTCGCCAACTTCGTCACTCAGCAGACG   719
 168 ThrTyrGlySerProArgValGlyAsnAsp PhePheAlaAsnPheValThrGlnGlnThr   187

 720 GGCGCTGAATATCGCGTCACACATGGTGAT GACCCCGTCCCACGTCTTCCTCCTATCGTC   779
 188 GlyAlaGluTyrArgValThrHisGlyAsp AspProValProArgLeuProProIleVal   207
```

```
780 TTTGGATACCGTCACACTAGCCCAGAATAC TGGCTTAACGGTGGCCCACTTGATAAGGAC  839
208 PheGlyTyrArgHisThrSerProGluTyr TrpLeuAsnGlyGlyProLeuAspLysAsp  227

840 TACACCGTGACCGAGATCAAGGTTTGTGAG GGCATAGCGAACGTTATGTGCAATGGTGGC  899
228 TyrThrValThrGluIleLysValCysGlu GlyIleAlaAsnValMetCysAsnGlyGly  247

900 ACGATAGGTCTGGACATTCTTGCGCACATC ACCTATTTCCAGAGCATGGCCACTTGTGCA  959
248 ThrIleGlyLeuAspIleLeuAlaHisIle ThrTyrPheGlnSerMetAlaThrCysAla  267

960 CCAATCGCGATCCCATGGAAGAGGGACATG TCAGATGAGGAGTTGGAAAAGAAGTTGACT 1019
268 ProIleAlaIleProTrpLysArgAspMet SerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThr  287

1020 CAGTATAGCGAGATGGATCAGGAATTTGTT AAGCAGATGATTTAGGCCATGGAGAGAATT 1079
288 GlnTyrSerGluMetAspGlnGluPheVal LysGlnMetIle***                 301

1080 GGTCCATAGTCTTCCTTGCCGGCAAACAAC TGGTAAATGACTTTTGGACTTAGTATTGAA 1139

1140 GTGGGTTCTTAAAAAACATATTTTCTTTCT TACTAGTATAAATTAGTAGAATACTATTTA 1199

1200 AAATTTAGTAAGC---(poly A)---                                    1212
```

Fig. 2-4. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *F. heterosporum* lipase. The deduced amino acid sequence is presented under the nucleotide sequence. Nucleotides are numbered in the 5' to 3' direction beginning with the first residue of the cDNA. Amino acid residues are numbered from the N-terminus of mature lipase, and the signal sequence or prosequence is indicated by negative numbers. The nucleotide sequence hybridized with the synthetic oligonucleotide probe is underlined with a thick line. The N-terminal sequence determined by Edman degradation is underlined with a thin line. The arrow indicates the probable cleavage site with signal peptidase or trypsin-like protease. The stop codon is indicated by asterisks. The boxed sequence shows the consensus pentapeptide of lipase.

Table 2-1. Amino acid composition of *F. heterosporum* lipase

Amino acid	Observed [a]	Deduced [b]
Asx	35.3	34
Thr	23.2	25
Ser	11.6	12
Glx	21.1	22
Pro	14.7	13
Gly	28.1	26
Ala	32.4	32
Cys	6.9	8
Val	28.7	30
Met	4.8	5
Ile	14.1	16
Leu	16.2	14
Tyr	11.5	12
Phe	16.1	16
Lys	13.4	15
His	7.0	7
Arg	12.3	10
Trp	3.6	4

[a] Calculated result of amino acid analysis on the basis of the total number of amino acids, 301.

[b] Values for the mature lipase deduced from the nucleotide sequence.

1－4．*F. heterosporum* のリパーゼと他のリパーゼとの比較

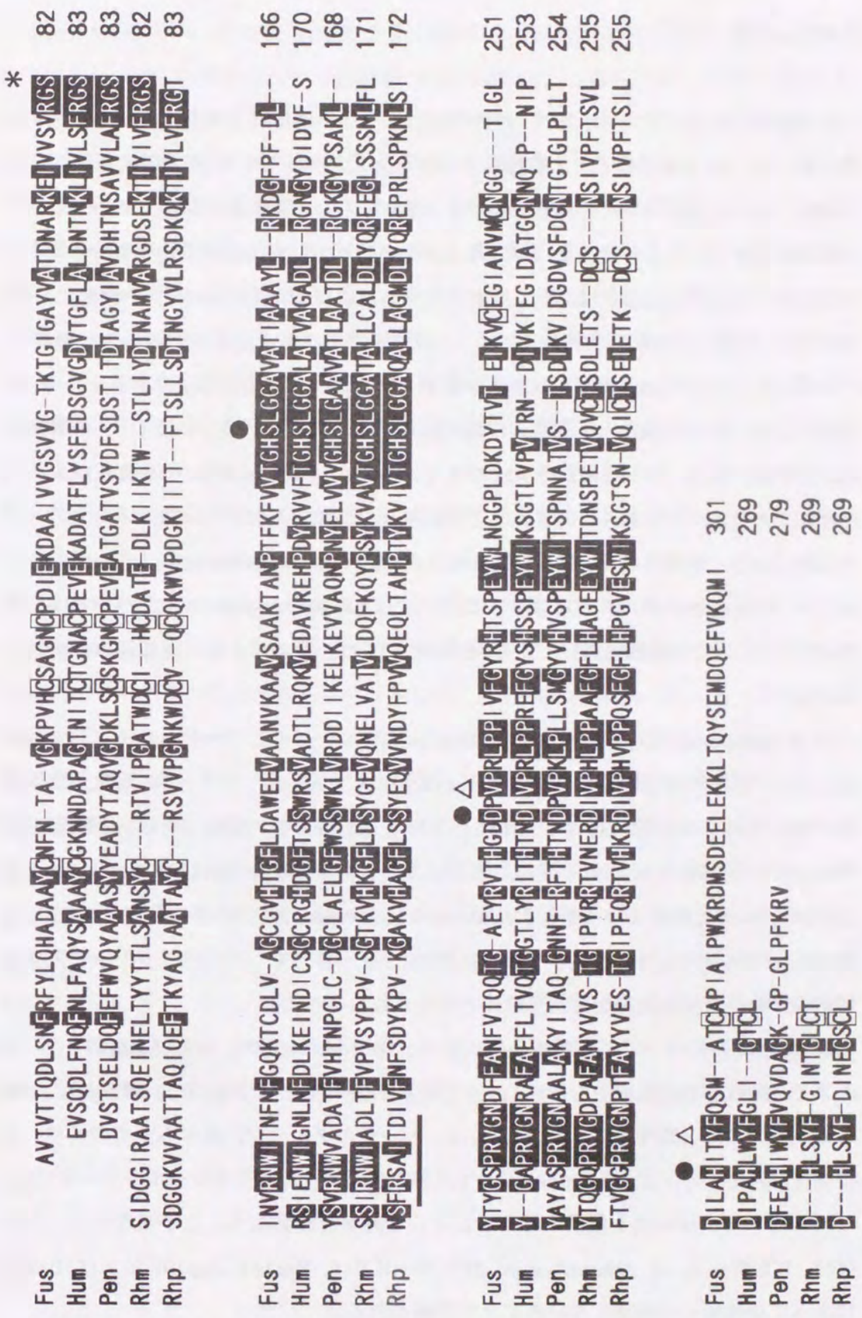
これまでに、動物細胞や糸状菌、細菌などから多くのリパーゼ遺伝子がクローニングされ、その塩基配列とアミノ酸配列が報告されている(46)。これらのリパーゼは、そのホモロジーからいくつかのグループに分類され、中でも糸状菌由来のリパーゼは、*G. candidum* (33-38)と *R. miehei* (39-45)のリパーゼに代表される２つのグループに分類される。*F. heterosporum* のリパーゼのホモロジーを検索した結果、本リパーゼは *R. miehei* のリパーゼのグループに属し、アミノ酸配列で *Humicola lanuginosa* のリパーゼと 39% (43)、*Penicillium camembertii* のモノおよびジグリセリドリパーゼと 38%

(44)、*R. miehei* (41)、*R. delemar* (39)、*Rhizopus niveus* (80)のリパーゼといずれも32%のホモロジーがあった(Table 2-2)。ホモロジーのあるリパーゼの成熟配列の比較をFig. 2-5に示す。リパーゼの共通配列であるGly – X – Ser – X – Glyの付近などでは、特に相同性が高かったが、N末端側の相同性は低かった。また、*F. heterosporum* のリパーゼのC末端側は、他のリパーゼよりも約34アミノ酸残基長かった。

Table 2-2. Amino acid homology of mature lipases

	% Homology with :				
Lipase	Fus	Hum	Pen	Rhm	Rhp
F. heterosporum (Fus)	100	39	38	32	32
H. lanuginosa (Hum)		100	40	31	32
P. camembertii (Pen)			100	30	29
R. miehei (Rhm)				100	57
R. delemar (Rhp)					100

Fig. 2-5. (Next page) Comparison of deduced amino acid sequence of *F. heterosporum* lipase with those of other fungal lipases. The deduced amino acid sequences of enzymes from *F. heterosporum* (Fus), *H. lanuginosa* (Hum), *P. camembertii* (Pen), *R. miehei* (Rhm), and *R. delemar* and *R. niveus* (Rhp) are aligned. The amino acid sequences of *R. delemar* and *R. niveus* lipases are the same. Dashes indicate gaps introduced into the sequences so that the maximum homology may be obtained. Identical amino acid in all or four of five enzymes are shown with white-on black letters. The Cys residues expected to form disulfide bonds are boxed. Closed circles and an asterisk indicate amino acid residues involved in the catalytic triad and oxyanion hole, respectively. Val and Tyr interacting with Asp203 in *R. miehei* lipase are indicated with open triangles. The sequence presumed to form the helical lid is underlined.



第4節　考察

F. heterosporum のリパーゼは、菌体外に分泌される蛋白質である。ほとんどの分泌蛋白質では、13 から 36 アミノ酸残基からなるシグナル配列が N 末端側に存在している(81)。シグナル配列の最も顕著な特徴は、疎水性アミノ酸残基が多いことと、そのC末端側が Ala であることである。また、*R. miehei* (41)と *R. delemar* (39)のリパーゼは、プレプロリパーゼとして生産され、それぞれ 24 および 26 残基のシグナル配列と、70 および 97 残基のプロ配列を持っていることが報告されている。*F. heterosporum* のリパーゼでも、始めの 32 残基がシグナル配列とプロ配列であると推定される。この 32 残基のうち、N末端側の 16 残基には疎水性のアミノ酸残基が多く、その C 末端側が Ala である。また、−1 残基目が Arg である。したがって、N末側の 16 残基がシグナル配列であり、それに続く 16 残基がプロ配列で、これがトリプシン様のプロテアーゼで切断されると推定される。この 16 残基のプロ配列は、*R. delemar* のリパーゼのプロ配列(97 残基)に比べれば非常に短い。これに対し、*F. heterosporum* のリパーゼはC末端側が約 34 アミノ酸残基長い。この理由については、第4章と第5章で詳細な検討をおこなう。

F. heterosporum のリパーゼは、*R. miehei* のグループのリパーゼとホモロジーがあり、アミノ酸配列の比較をおこなった(Fig. 2-5)。*R. miehei* のリパーゼの三次元立体構造が報告されており(62-66)、3カ所にジスルフィド結合(29-268、40-43、235-244)が存在している(Fig. 2-5、四角で囲った部分)。これらの6残基の Cys は *F. heterosporum* (24, 266, 36, 41, 236, 244 番目)、*R. delemar*、*R. niveus* のリパーゼで保存されていた。したがって、これらの6残基の Cys はジスルフィド結合をしており、リパーゼの立体構造の保持に重要な役割を持っていると考えられる。

R. miehei のリパーゼの X 線結晶解析から、Ser144, Asp203, および His257 の3つのアミノ酸残基が活性中心を形成していると報告されている(Fig. 2-5、●部分)。これらの3つのアミノ酸残基は、*R. miehei* のリパーゼのグループに属する全てのリパーゼで保存されている。*P. camembertii* のモノおよびジアシルグリセロールリパーゼでは、これらのアミノ酸残基を置換することによって酵素活性を失うことが報告されている(45)。したがって、*F. heterosporum* のリパーゼでは、Ser144, Asp198 および His256 によって活性中心を形成していることが示唆される。

R. miehei のリパーゼでは、Val205 と Tyr260 が水素結合を介して活性中心の Asp203 を安定化していると考えられている(Fig. 2-5、△部分)。これらの2つのアミノ酸残基は、ホモロジーのある全てのリパーゼ間で保存されていることから、*F. heterosporum* のリパーゼでも Val200 と Tyr259 が Asp198 を安定化していると推定される。

リパーゼがトリアシルグリセロールのエステル結合を加水分解する際、エステル結合の四面体中間体を安定化する「オキシアニオンホール」が必要である。*R. miehei* のリパーゼの酵素−阻害剤複合体の X 線結晶解析の結果より(62)、Ser82 の主鎖の窒素原子と、側鎖の OH 基の酸素原子からの水素結合によって四面体中間体が安定化されていることがわかっている(Fig. 2-5、＊部分)。この Ser 残基は、*R. delemar* と *R. niveus* 以外のリパーゼで保存されており、*F. heterosporum* のリパーゼでは Ser82 に相当する。*R. delemar* と *R. niveus* のリパーゼでは、この Ser が Thr83 になっているが、この Thr でもオキシアニオンホールの役割を果たすことができると推定される。

H. lanuginosa、*P. camembertii*、*R. niveus* のリパーゼの立体構造は、*R. miehei* のリパーゼとよく似ていることが報告されていることから(65)、*F. heterosporum* のリパーゼも *R. miehei* のリパーゼと似た立体構造をとっていると推定される。そこで、*R. miehei* のリパーゼの立体構造をモデルとして、*F. heterosporum* のリパーゼの立体構造を予測した(Fig. 2-6)。native の酵素ではリパーゼの活性中心は溶媒と接触しておらず、この上を「リッド」と呼ばれる一巻きのαヘリックス(85 から 91 番目のアミノ酸残基)が覆っており、外部と完全に遮断されている(Fig. 2-6, A)。酵素にインヒビターが結合すると、このリッドが活性部位の上部からそりかえり、native の酵素において溶媒に接していたループ中の親水性の部分を近くの極性表面のくぼみに埋めるようになる(Fig. 2-6, B)。反対にヘリックスの疎水性の部分は完全に露出し、活性部位付近の疎水性表面を広げている。この酵素−インヒビターの構造解析の結果は、実際の酵素と油脂の複合体構造に近いと推定される。すなわち、リッドの移動によって疎水性の油脂が酵素に吸着できるとともに、活性中心が基質と接触しやすくなっている。

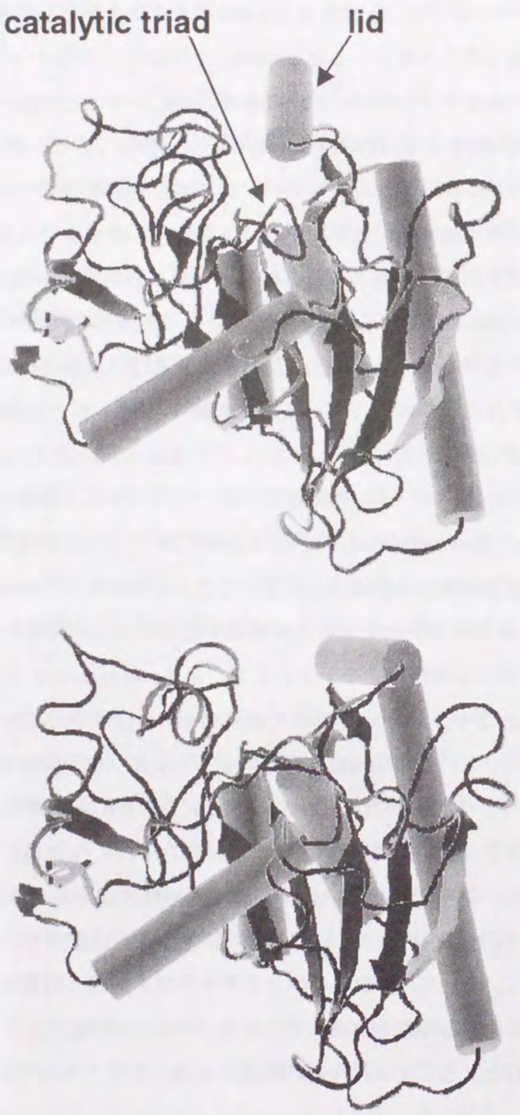


Fig. 2-6. The interfacial activation of *F. heterosporum* lipase. (A) Native enzyme, (B) lipase-inhibitor complex. The syringe and arrow indicate α-helix and β-sheet, respectively.

F. heterosporum のリパーゼの cDNA のクローニングをおこなった(78)。まず、*F. heterosporum* の細胞から poly(A)⁺RNA を抽出し、Okayama·Berg 法で cDNA ライブラリーを作成した。酵素のN末端アミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドプローブを用い、コロニーハイブリダイゼーションにより cDNA ライブラリーからリパーゼの cDNA をクローニングした。この cDNA は 1.3 kbp の挿入断片を持ち、塩基配列を調べたところ、999 bp のオープンリーディングフレームが存在していた。塩基配列から推定したアミノ酸配列は、エドマン分解で決定したN末端アミノ酸配列を含んでおり、リパーゼ、エステラーゼ、セリンプロテアーゼに見出される共通配列(Gly – X – Ser – X – Gly)も存在していた。32 アミノ酸残基のシグナル配列またはプロ配列に続いて、成熟リパーゼは 301 アミノ酸残基(32.7 kDa)で構成されていた。

このリパーゼは、アミノ酸配列上で *H. lanuginosa* のリパーゼと 39％、*P. camembertii* のモノおよびジグリセリドリパーゼと 38%、 *R. miehei* 、*R. delemar*、*R. niveus* のリパーゼといずれも 32%のホモロジーがあった。また本リパーゼは、他の相同性のあるリパーゼに比べて、C末端側が約 34 アミノ酸残基長かった。

すでに報告されている *R. miehei* のリパーゼの立体構造から、*F. heterosporum* のリパーゼの構造を推定した。活性中心は Ser144, Asp198, His256 の３つのアミノ酸残基で構成され、基質が加水分解される際の中間体を安定化するオキシアニオンホールには Ser82 が関与すると推定された。native の酵素では、活性中心の上を 85 から 91 番目のアミノ酸残基からなるαヘリックス、「リッド」が覆っていて、活性中心が溶媒と接触できない。しかし、酵素が基質に接近するとこのリッドが除去され、基質が活性中心に入り込むことが可能になると推定された。

第３章　*S. cerevisiae* における *F. heterosporum* リパーゼ cDNA の発現

第１節　緒言

第１章と第２章までで、既存の 1,3 位特異的リパーゼよりも安定性の高い *F. heterosporum* のリパーゼの精製と cDNA のクローニングを行ってきた。しかしながら、このリパーゼの安定性はまだ十分ではない。そこで、本リパーゼの安定性をさらに高める必要がある。この目的を達成するためには cDNA を異種菌株で発現させ、蛋白質工学的手法を用いた優良な変異株の取得が不可欠である。また、*Fusarium* 属は植物病原菌に属しているために、元菌の *F. heterosporum* で生産されたリパーゼを食品などに利用する場合、安全性試験をしなければならないという問題点がある。そこで、工業的に本リパーゼを利用するためには、安全性の高い宿主を用いた大量発現系が近道である。

F. heterosporum のリパーゼ cDNA の発現をおこなうためには、宿主の選択が重要であるため、*F. heterosporum* のリパーゼと相同性のあるリパーゼの発現に関する報告について調べた。*R. delemar* のリパーゼ cDNA は *E. coli* 内で高発現するが、活性のある蛋白質として発現せず、cytoplasm 内で不溶性体になる(40)。活性のある蛋白質にするためには、この不溶性蛋白質を refolding させなければならず、*E. coli* を使った系では変異株のスクリーニングや酵素の工業的利用が困難になる。*R. miehei* と *H. lanuginosa* のリパーゼは、*Aspergillus oryzae* を宿主とした時、活性のあるリパーゼとして発現する(42, 43)。しかし、この形質転換系では染色体遺伝子の中にランダムに遺伝子を挿入させるため、形質転換効率が低く、発現量は遺伝子が挿入された周辺の環境に依存する。したがって、*A. oryzae* の形質転換系では、変異株のスクリーニングなどが困難である。一方、*P. camembertii* のリパーゼは、*S. cerevisiae* を使って発現させている(45)。この系では外来遺伝子を載せたプラスミドを使用するため、形質転換効率が高く、変異株のスクリーニングが可能である。また、*S. cerevisiae* は古くから人類が使用してきた菌株なので、食品などに利用する際の安全性でも問題がない。しかし、*P. camembertii* のリパーゼの発現量はあまり多くない。そこで本章では、*S. cerevisiae* を宿主とした *F. heterosporum* のリパーゼ cDNA の発現をおこない、培養条件の検討により発現量の増加を試みた。さらに、*S. cerevisiae* で生産されたリパーゼの精製についても述べる。

第２節　実験材料及び実験方法

１－１．試薬と菌株

遺伝子操作に使用する制限酵素とその他の酵素類は宝酒造(Kyoto)または東洋紡(Osaka)より、酵母エキスとペプトンは和光純薬(Osaka)からそれぞれ購入した。その他の試薬は、特級を使用した。

大腸菌 DH5 [*supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1*] (69)とプラスミド pUC119 (70)は DNA の操作に使用した。プラスミド pFHL11-31 は、第２章で *F. heterosporum* リパーゼ cDNA の塩基配列決定の際に用いたデレーションプラスミドの１つで(78)、リパーゼの翻訳領域、26 bp の 5' 非翻訳領域、および 109 bp の 3' 非翻訳領域を含んでいる。*S. cerevisiae* の発現ベクターpYE22m は、サントリー㈱(Osaka)の許可の下、大阪大学工学部応用生物工学科の原島俊教授より御供与いただいたものである。*S. cerevisiae* SH1089 [*MAT*a, *ura3-52, leu2-3,112, trp1, pho3-1, pho5-1 (HIS4-lacZ, ura3-52)*]、SH2041 [*MAT*α, *ura3-1,2, leu2-3,112, trp1*]、SH2410 [*MAT*α, *bel2-6, ura3-52, trp1, leu2-3,112, his1-29, pho3-1, pho5-1* (*HIS4-lacZ, ura3-52*)]、SH2921 [*MAT*a, *bel2-6, gcn4-103, ura3-52, trp1, his1-29, pho3-1, pho5-1*]、および SH3744 [*MAT*a, *ura3-52, leu2-3,112, trp1, pho3-1, pho5-1*] は原島俊教授より譲渡された菌株で、リパーゼの発現に使用した。

１－２．リパーゼ cDNA の発現プラスミドの構築

DNA の操作は、Molecular Cloning (71) に記載されている方法にしたがって行った。リパーゼ cDNA を含む pFHL11-13 の *Eco*RI – *Spe*I 断片(1.44 kbp)を pUC119 の *Eco*RI – *Xba*I サイトに挿入し、できあがったプラスミドを pFHL13 と命名した。次に、pFHL13 の *Eco*RI – *Sal*I 断片(1.44 kbp)を pYE22m の *Eco*RI – *Sal*I サイトに挿入し、酵母での発現プラスミド pYGF2 (Fig. 3-1、9.4 kbp) とした。この pYGF2 は、*GAP*(*S. cerevisiae* の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、82)のプロモーターとターミネーターの間にリパーゼ cDNA が挿入されている。

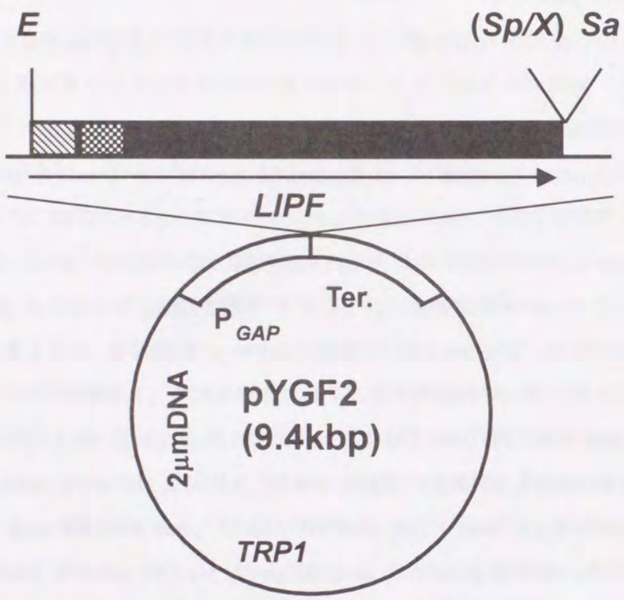


Fig. 3-1. Structure of plasmid pYGF2. Restriction sites are abbreviated as follows; E, *Eco*RI; Sp, *Spe*I; Sa, *Sal*I; X, *Xba*I. The promoter and terminator are shown as P_{GAP} and Ter., respectively. The hatched box, dotted box, and solid box are signal, pro, and mature sequence of *F. heterosporum* lipase, respectively. The transcriptional direction is indicated by an arrow. The 2 μmDNA replication origin and complementary gene of *trp1* in the host strain are shown as 2μmDNA and *TRP1*, respectively.

1－3．*S. cerevisiae* の形質転換と培養条件

S. cerevisiae の形質転換は、Ito らによって開発されたリチウム酢酸法(83)にしたがって行った。YPD 培地(1% yeast extract、2% peptone、および 2% glucose, pH 5.8)で 24 時間培養した培養液を新しい YPD 培地 10 ml に植菌(植菌量 2%)し、30℃で 5 時間振とう培養する。遠心分離により菌体を集め、2 ml の 0.1 M lithium acetate / TE buffer に懸濁する。30℃で 1 時間振とう後、遠心分離で菌体を集め、0.9 ml の 0.1 M lithium acetate / 15% glycerol / TE Buffer に懸濁し、competent cell とした。1.5 ml のマイクロチューブに 300 μl の competent cell、10 μl のプラスミド DNA(1-10 μg)、700 μl の 50% PEG 4000 を加えてよく撹拌し、30℃で 1 時間保温する。遠心分離(10,000 rpm, 5 秒)して上清を捨て、菌体を 100 μl の TE Buffer に懸濁し、選択培地に撒いた。形質転換体は、6.7 mg/ml Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco, USA), 5 mg/ml glucose, 20 μg/ml L-histidine, 20 μg/ml L-leucine, および 20 μg/ml uracil (pH 5.8)からなる最小寒天平板培地上で 30℃、2 日間培養することによって選択した。

形質転換体の培養は、YPD 培地または改良した培地を含む直径 18 ミリの試験管（実容 5 ml）または 500 ml の坂口フラスコ内で 27℃、3 日間振とうした。培養液の濁度は 600 nm の吸光度で測定し、1 OD は乾燥重量 0.43 mg/ml、菌数 1.8×10^7 cells/ml であった。

1－4．リパーゼ活性の測定と、*S. cerevisiae* で生産されたリパーゼの精製

リパーゼ活性の測定は、第 1 章、第 2 節、2－2 と同様にして行った(50)。

全ての精製は、15℃以下で行った(84)。5000 x g、10 分間の遠心分離で培養上清を集め、これを Minitan Ultrafiltration System (Millipore Corp., USA)の限外濾過膜で濃縮した。濃縮液を 10 mM 酢酸緩衝液、pH 4.5 (Buffer A)に対して透析し、Buffer A で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 column (3 X 20 cm; Pharmacia Biotech)に負荷した。非吸着画分を集め、限外濾過膜で濃縮した。さらに、0.2 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液(pH 6.5)で平衡化した Sephadex G-75 column (2.3 X 65 cm; Pharmacia Biotech)に酵素液をチャージし、流速 20 ml/h で溶出した。活性のある画分を Buffer A で透析し、同溶液で平衡化した SP-Sephadex C-50 column (1 X 17 cm; Pharmacia Biotech)に負荷した。溶出は、200 ml の Buffer A（0 - 0.4 M の NaCl グラジエント）でおこなった。

1－5．SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (56)の方法にもとづき、12%の分離用ゲルを用いておこなった。分子量マーカーは、Pharmacia LKB Biotechnology (Sweden)より調達した。電気泳動後、Coomassie Brilliant Blue でタンパク質を染色した。糖タンパクは、periodic acid-Schiff (PAS)法(85)で染色した。

1－6．ウエスタンプロット

マウス抗リパーゼモノクローナル抗体は、「単クローン抗体実験操作入門」（安藤民衛ら著, 86）に記載されている方法にしたがって調製した。

SDS-PAGE 後のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、3%の nonfat dried milk を含む TBS 溶液(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl)中で室温、2時間ブロッキングした。50 倍に希釈したマウス抗リパーゼモノクローナル抗体を含む抗体溶液(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 0.1% nonfat dried milk)中で膜を室温、2時間処理した後、TTBS (0.05% Tween 20 を含む TBS)で膜を洗浄した。続いて、250 倍希釈した horseradish peroxidase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体(Caltag, USA)を含む抗体溶液中でさらに3時間保温した。TTBS で膜を洗浄後、50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.05% diaminobenzidine, および 0.03% H_2O_2 を含む溶液中で発色させた。

1－7．糖鎖分解酵素処理

500 pmol のタンパクを 50 mM sodium phosphate (pH 8.5)で 10 分間煮沸した後、1 mU の *N*-glycosidase F (宝酒造)で 37℃、16 時間処理した。Endo-α-*N*-acetyl-galactosaminidase (Genzyme, USA)処理は、試薬に添付されている方法にしたがって行った。

第3節　結果

3－1．*S. cerevisiae* によるリパーゼ cDNA の発現

32 アミノ酸残基のシグナルまたはプロ配列、および 301 残基の成熟リパーゼ配列を含む *F. heterosporum* のリパーゼ cDNA を酵母の発現ベクターに組み込み、このプラスミド pYGF2 で5種類の酵母菌株を形質転換した(84)。全ての形質転換株の培養上清中にリパーゼ活性が存在し(Table 3-1)、菌体内にはリパーゼ活性は見出されなかった。発現したリパーゼ量は菌株によって異なり、SH2041 を形質転換した菌株 SH2041[pYGF2] (鍵括弧はプラスミドを保持している状態を示す)が最もリパーゼを多く生産した(10 U/ml)。宿主株 SH2041 と、リパーゼ cDNA のないプラスミドを持つ SH2041[pYE22m]はリパーゼを生産しなかったことから、*GAP* のプロモーターの下での cDNA の発現によって、*F. heterosporum* のリパーゼが生産されていることがわかった。さらに、リパーゼは菌体外に分泌されているので、*F. heterosporum* のシグナル配列は *S. cerevisiae* 内でも機能していることが示唆される(81)。

Table 3-1.　Lipase production by *S. cerevisiae* transformants harboring pYGF2

Transformant	Cell growth (OD_{600})	Activity [a] (U/ml)
SH1089[pYGF2]	19.2	3.0
SH2041[pYGF2]	18.8	10.1
SH2410[pYGF2]	17.0	0.1
SH2921[pYGF2]	17.2	5.0
SH3744[pYGF2]	25.3	1.0
SH2041[pYE22m]	19.8	N.D. [b]

Each transformant was cultivated in 5 ml YPD medium as described in Materials and Methods.

[a] In the culture supernatant.

[b] N.D.; not determined.

3－2．リパーゼ生産におよぼす培地組成の影響

リパーゼ生産量を増加させるために、*S. cerevisiae* SH2041[pYGF2] 株を選択し、培地組成の検討を行った(84)。

（1）糖源の種類

はじめに、様々な種類の糖を含む培地で *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2] を培養した。Table 3-2 に菌体量と培養上清中のリパーゼ活性を示す。スクロースがリパーゼ生産に最も効率的であり、一般に糖源としてよく使われているグルコースはあまり効率がよくなかった。

Table 3-2. Effect of sugars on lipase production by *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2]

Sugar	Cell growth (OD_{600})	Activity [a] (U/ml)
None	1.6	1.5
Glucose	19.5	12.0
Fructose	16.8	16.8
Mannose	17.0	18.3
Xylose	2.1	3.2
Galactose	22.2	20.5
Maltose	23.2	20.8
Sucrose	19.2	22.6
Lactose	2.1	4.6

The cultivation was performed in 5 ml of a medium containing 1% yeast extract, 2% peptone, and 2% sugar (pH 5.8). The other cultivation conditions were as described in Materials and Methods.

[a] In the culture supernatant.

（2）酵母エキス濃度

スクロースを含む培地中で酵母エキスの濃度を調べたところ(Table 3-3)、酵母エキス濃度の増加とともに菌体量とリパーゼ活性が上昇し、効率のよいリパーゼ生産には酵母エキス濃度が 3%以上必要であることがわかった。

Table 3-3. Effect of yeast extract concentration on lipase production by *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2]

Yeast ex. (%)	Cell growth (OD_{600})	Activity [a] (U/ml)
0	3.5	0
1	20.0	25.1
2	27.9	51.5
3	34.1	62.3
4	31.7	63.2
5	33.7	64.8

The cultivation was performed in 5 ml of a medium containing 2% peptone, 2% sucrose, and various concentration of yeast extract (pH 5.8). The other cultivation conditions were as described in Materials and Methods.

[a] In the culture supernatant.

（3）ペプトン濃度

スクロースと、3%酵母エキスを含む培地でペプトン濃度の影響を調べたところ(Table 3-4)、菌体増殖にはペプトン濃度があまり影響しないが、リパーゼ生産には 1%以上のペプトンが必要であることがわかった。

Table 3-4. Effect of peptone concentration on lipase production by *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2]

Peptone (%)	Cell growth (OD_{600})	Activity [a] (U/ml)
0	31.8	37.0
1	30.7	61.3
2	31.1	58.3
3	30.6	55.3
4	27.7	56.7
5	27.1	55.0

The cultivation was performed in 5 ml of a medium containing 3% yeast extract, 2% sucrose, and various concentration of peptone (pH 5.8). The other cultivation conditions were as described in Materials and Methods.

[a] In the culture supernatant.

（4）スクロース濃度

最後に、3%酵母エキスと 1%ペプトンを含む培地でスクロース濃度の影響を調べた(Fig. 3-2)。菌体増殖は4%以上のスクロース濃度で一定値に達するが、リパーゼ生産量はスクロースが4%の時に最大になる。これは、高濃度のスクロースでリパーゼ生産が抑制されていることを示している。以上の結果より、糖の種類と濃度、酵母エキスの濃度が *S. cerevisiae* でのリパーゼ生産に重要であることがわかった。この最適化された培地(3%酵母エキス、1%ペプトン、4%スクロース、pH5.8)で *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2] を培養すると、78 U/ml のリパーゼを菌体外に生産する。この値は精製された *F. heterosporum* のリパーゼの比活性(53)から計算すると、39 μg/ml のタンパク量に相当し、YPD 培地で培養したときの約８倍、元菌の *F. heterosporum* の生産量(53)の約３倍である。

本項で述べた実験の他に、*S. cerevisiae* のガラクトース代謝に関与している galactokinase (*GAL1*) のプロモーター(87, 88)をもつ発現ベクターpYES2(Invitrogen, USA)に *F. heterosporum* の cDNA を連結したプラスミドpYGF1 を作成した。このプラスミドで、５種類の *S. cerevisiae* 菌株を形質転換したところ、SH3744[pYGF1]株が最も多くのリパーゼを生産した。培地組成の検討を行ったところ、3%酵母エキス、1%ペプトンおよび4%ガラクトースから成る培地の時に、20 U/ml のリパーゼを分泌生産したが、*GAP*プロモーターをもつ SH2041[pYGF2] 株の生産量には及ばなかった。

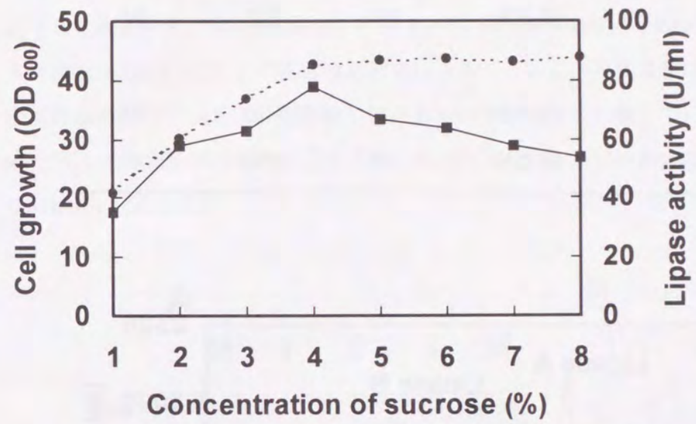


Fig. 3-2. Effect of the concentration of sucrose on lipase production by *S. cerevisiae*. The cultivation was carried out in 5 ml of a medium containing 3% yeast extract, 1% peptone, and various concentrations of sucrose (pH 5.8). The other cultivation conditions were as described in Materials and Methods. Symbols; ●, cell growth; ■, lipase activity in the culture supernatant.

３－３．*S. cerevisiae* によって生産されたリパーゼの精製

3%酵母エキス、1%ペプトン、4%スクロースを含む培地で *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2] を３日間培養し、その培養上清から酵素を精製した(84)。その結果を Table 3-4 に示す。最後の精製段階の SP-Sephadex C-50 イオン交換クロマトグラフィーで、２つの成分(リパーゼＡとＢ)に分かれた(Fig. 3-3)。リパーゼＢは少し幅広のピークであった。リパーゼＡの比活性はリパーゼＢのそれよりも高かった。

Table 3-4. Purification of lipase produced by *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2]

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Activity yield (%)
Culture supernatant	133,500	15,500	8.6	100
DEAE-Sephadex A-50	126,000	800	158	94
Sephadex G-75	85,500	104	822	64
SP-Sephadex C-50				
Lipase A	29,000	16	1810	22
Lipase B	53,000	33	1600	40

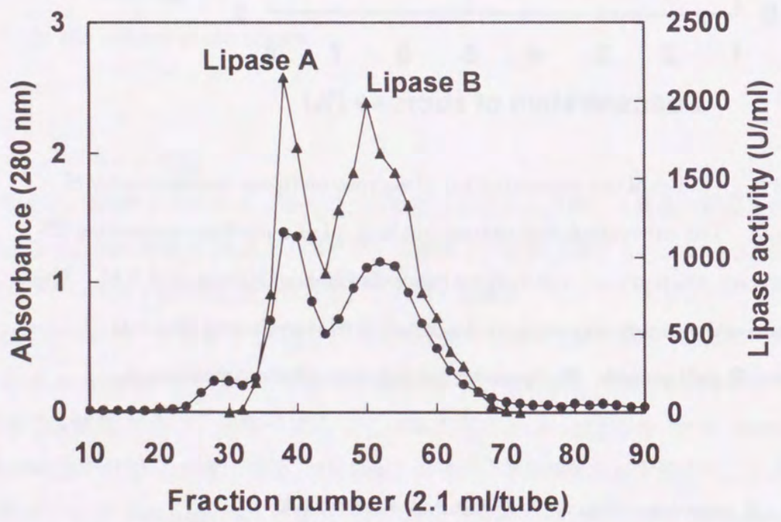


Fig. 3-3. SP-Sephadex C-50 ion-exchange column chromatography of lipase produced by *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2]. The column chromatography was carried out as described in Materials and Methods. Symbols; ▲, lipase activity; ●, A_{280}.

3－4．*S. cerevisiae* によって生産されたリパーゼの性質

精製したリパーゼAは、SDS-PAGE において 31 kDa のバンドとして見られ、これは *F. heterosporum* から精製したリパーゼ(53)の分子量と一致した(Fig. 3-4, A)(84)。一方、リパーゼBには複数のバンド(34-38 kDa)が存在していた。ウェスタンブロット解析より、リパーゼAとBの両タンパク質は、*F. heterosporum* から精製したリパーゼと同様に免疫反応を示した(Fig. 3-4, B)。また、両リパーゼはいずれも、PAS 染色によって染まらず、*N*-glycosidase F や Endo- α- *N*-acetylgalactosaminidase で処理した後も SDS-PAGE での移動度に変化はなかった。これらのことは、*S. cerevisiae* で生産されたリパーゼには糖鎖は付加されていないことを示唆している。リパーゼAのリパーゼの性質(熱安定性、至適温度、比活性など)は、*F. heterosporum* のリパーゼ(53)と同じであった。

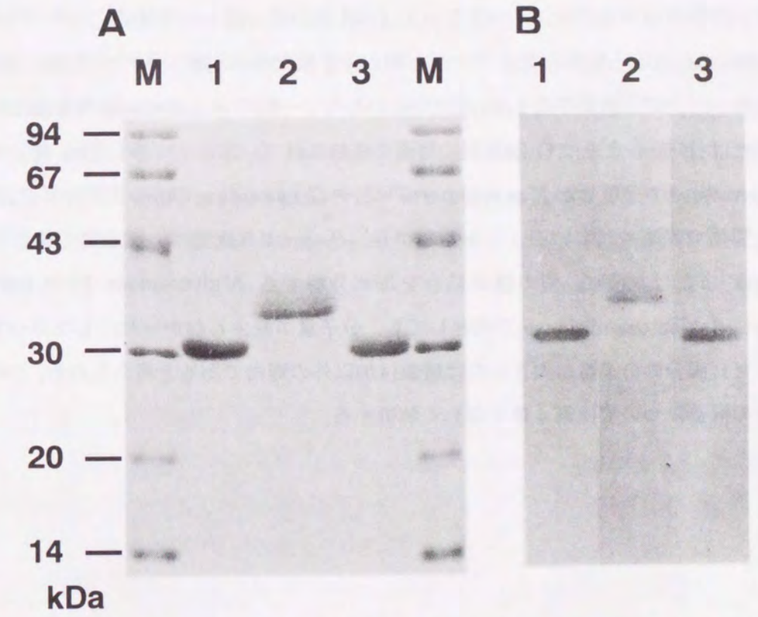


Fig. 3-4. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of lipases produced by *S. cerevisiae*. Lanes: M, molecular weight markers; 1, Lipase A; 2, Lipase B; 3, purified lipase produced by *F. heterosporum*.

第4節　考察

F. heterosporum のcDNAは、*GAP*プロモーターを用いて *S. cerevisiae* で効率よく発現させることができた(84)。また、*GAL1* のプロモーターよりも *GAP* のプロモーターの方がリパーゼ生産には効率的であり、両プロモーターに最適な宿主菌株も異なっていることがわかった。一般に、*S. cerevisiae* による外来タンパク質の発現は、プロモーター、宿主菌株、シグナル配列、プラスミドの安定性、および培地組成に依存する。本実験でも、プロモーター、宿主菌株、および培地組成を変えることによってリパーゼ生産量を飛躍的に向上させることができた。これらの因子と発現量の間の関係は解明されていないが、本実験で得られた結果は、他のタンパク質を *S. cerevisiae* 内で高発現させることに応用可能である。

S. cerevisiae SH2041[pYGF2]によって生産されたリパーゼは、SP-Sephadex C-50イオン交換クロマトグラフィーによって2つの成分に分離された(84)。リパーゼAは *F. heterosporum* から精製したリパーゼと同じ分子量であったが、リパーゼBには分子量の大きいバンドが複数存在していた(Fig. 3-4, A)。一般に *S. cerevisiae* で生産されたリパーゼは、N-linkまたはO-link型の糖鎖で修飾されていることが多い(89)。たとえば、*S. cerevisiae* で発現した *P. camembertii* (45)や *G. candidum* (90)のリパーゼは、N-link型の糖鎖で修飾されている。しかしながら、リパーゼB画分は、糖染色で染まらず、N-link または O-link 型の糖鎖結合を加水分解する *N*-glycosidase F や endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase で処理しても、分子量が減少しなかった。したがって、リパーゼB画分の分子量が大きいのは糖鎖付加以外の理由であると考えられる。このリパーゼの構造については第4章で詳しく解析する。

第5節　要約

S. cerevisiae の *GAP* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase をコードする遺伝子)のプロモーターとターミネーターの間に、*F. heterosporum* のリパーゼcDNA(シグナル配列、プロ配列および成熟リパーゼ配列を含む)を連結した発現プラスミドを構築した(84)。この発現プラスミドで5株の *S. cerevisiae* を形質転換し、YPD培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース)で形質転換体を培養したところ、発現量は異なっていたが、いずれも菌体外にリパーゼを分泌していた。これらの中で、最も生産量の多い SH2041[pYGF2] 株を選択し、培地組成の改良でリパーゼ生産量の増加を行った。3%酵母エキス、1%ペプトン、4%スクロースからなる培地の時に最も効率よくリパーゼを生産し、生産量は 78 U/ml、39 μg/ml であった。この酵母によって生産されたリパーゼを DEAE-Sephadex A-50 イオン交換クロマトグラフィー、Sephadex G-75 ゲル濾過クロマトグラフィー、および SP-Sephadex C-50 イオン交換クロマトグラフィーで精製した(84)。最終の精製段階で、活性のある2つの成分が見出された。1つの成分は、31 kDa の単一タンパクで、もう一つの成分は 34-38 kDa の複数のタンパクを含んでいた。31 kDa のリパーゼは、*F. heterosporum* から精製されたリパーゼと分子量、酵素的性質が同じであった。34-38 kDa のリパーゼは糖鎖を含んでいなかったため、糖鎖修飾以外の理由により、*F. heterosporum* のリパーゼよりも分子量が大きくなっていると考えられた。

第４章　*F. heterosporum* リパーゼのＣ末端ペプチドの役割

第１節　緒言

菌体外に分泌されるタンパク質の多くは、はじめにシグナル配列をもったプレプロタンパクとして合成された後、それが切断されて成熟タンパクとなる(81)。また、hydrolase、growth factor、hormone などはＮ末端側にプロ配列をもち、プロテアーゼによってこれが切断されてから成熟タンパクになる。多くのプロテアーゼはプレプロ酵素として合成され、Ｎ末端プロ配列が酵素活性を阻害するだけでなく、酵素の folding にも関与している(91-93)。*Rhizopus oryzae* のリパーゼも、プレプロリパーゼとして発現し、Ｎ末端側のプロ配列(97 アミノ酸残基)が酵素の folding と安定性に関与していることが報告されている(94)。しかしながら、Ｃ末端側のプロ配列に関する報告は少なく、*Thermus aquaticus* の aqualysin(95-96)、*Neisseria gonorrhoeae* の IgA プロテアーゼ(97)、*Serratia marcescens* のセリンプロテアーゼ(98)などしかない。

第３章までで、*F. heterosporum* の生産するリパーゼ cDNA をクローニングし(78)、塩基配列を決定した。このリパーゼは、32 残基のシグナルまたはプロ配列、および 301 残基の成熟リパーゼ配列が存在していた。アミノ酸配列をホモロジーのあるリパーゼと比較したところ、*F. heterosporum* の生産するリパーゼは、他のリパーゼよりもＣ末端が長いことから、Ｃ末端側に何らかの機能があると推定された。また、酵母内で cDNA を高発現させることにも成功し、２種類のリパーゼ（ＡとＢ）が存在していることを確認したが(84)、これらの構造の違いはまだ決められていない。

本章では、リパーゼＢがリパーゼＡよりも安定性に優れていることを見出したので、両リパーゼの構造を調べたところ、リパーゼＢの Arg275 と Asp276 の間のペプチド結合が切断されてリパーゼＡになること、Ｃ末端側 26 アミノ酸残基が酵素の安定性に関与していることを述べる。

第２節　実験材料及び実験方法

２－１．実験材料

遺伝子操作に使用する制限酵素とその他の酵素類は宝酒造(Kyoto)または東洋紡(Osaka)より、酵母エキスとペプトンは和光純薬(Osaka)からそれぞれ購入した。DEAE-Sephadex A-50、SP-Sephadex C-50、Sephadex G-75、およびタンパクの分子量マーカーは Pharmacia Biotech. (Uppsala, Sweden)より、オリゴヌクレオチドは Gibco / BRL (Rockville, USA)よりそれぞれ調達した。その他の試薬は特級を使用した。

大腸菌 CJ236 [*dut*1 *ung*1 *thi*-1 *relA*1 / pCJ105(F'*cam*^{r})]、BMH71-18 *mutS* [Δ(*lac-proAB*) *thi*-1 *supE mutS*215::Tn10(*tet*^{r}) / F' *traD*36 *proAB*$^+$ *lacI*^{q} *Z*ΔM15]、および MV1184 [Δ(*lac-proAB*) *ara rpsL thi*φ80 *lacZ*ΔM15) Δ(*srl-recA*)306::Tn10(*tet*^{r}) / F' *traD*36 *proAB*$^+$ *lacI*^{q}*Z*ΔM15] (71)は部位特異的変異遺伝子の作成に、大腸菌 DH5 [*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi 1 relA1*]とプラスミド pUC119(69-71)はその他の遺伝子操作にそれぞれ用いた。*S. cerevisiae* の発現ベクターpYE22m と、*S. cerevisiae* SH2041 [*MAT*α, *ura3-1,2, leu2-3,112, trp1*] は、大阪大学工学部応用生物工学科の原島俊教授より御供与いただいたものである。pFHL13、酵母用発現プラスミド pYGF2、および *S. cerevisiae* SH2041[pYGF2]はいずれも第３章で作成したものである(84)。

２－２．酵母の培養条件

S. cerevisiae は、3%酵母エキス、1%ペプトン、および 4%スクロース(pH 5.8)からなる培地(84)を含む 18-mm φ 試験管(実容 5 ml)または 500 ml 坂口フラスコ(実容 100 ml)で、27℃、３日間、振とう培養した。

２－３．リパーゼ活性の測定とリパーゼの精製

リパーゼ活性の測定は、第１章、第２節、２－２と同様にして行った(50)。

第３章と同様に、酵母の培養上清から、限外濾過、DEAE-Sephadex A-50 、Sephadex G-75、および SP-Sephadex C-50 によりリパーゼを再度精製した(84)。 最終段階の SP-Sephadex C-50 陽イオン交換クロマトグラフィーで、２つの成分に分離された(Fig. 4-1)。前と後のピークに存在するタンパク質をそれぞれ、リパーゼＡ、およびリ

パーゼBと命名した。活性の収率は42.4%で、リパーゼA、およびリパーゼBの比活性と等電点はそれぞれ1800、1600 U/mgおよびpI 4.7、5.0であった。

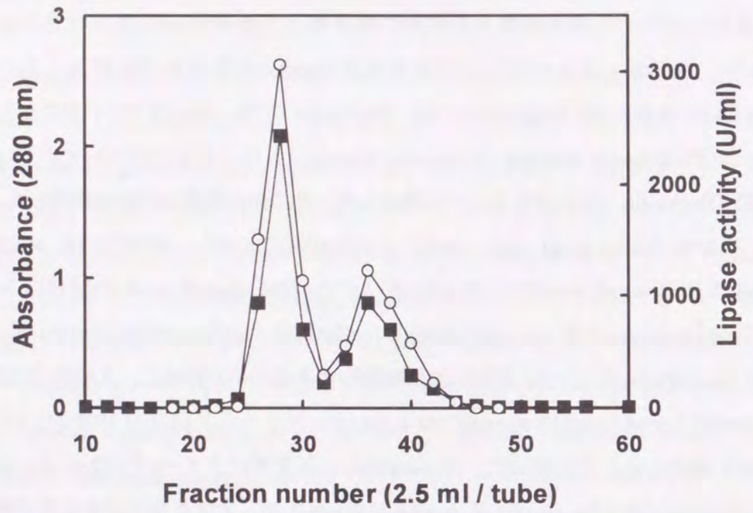


Fig. 4-1. SP-Sephadex C-50 ion-exchange column chromatography of lipase produced by *S. cerevisiae*. The lipase solution was applied to a SP-Sephadex C-50 chromatography (1 X 17 cm) equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), and elution was performed at a flow rate of 14 ml/h with an increasing gradient of 0 - 0.4 M NaCl in 200 ml of the same buffer. ○, Lipase activity; ■, A_{280}.

2－4．リパーゼの構造解析

SDS-PAGEは、Hamesの方法(99)にしたがって、分離ゲル濃度12%で行い、泳動後、Coomassie brilliant blueで染色した。酵素のN末端アミノ酸配列は、473A気相シーケンサー(Applied Biosystems, Foster, USA)を用いたエドマン分解法で決定した。リパーゼの分子量は、飛行時間型レーザーイオン化質量分析計(KOMPACT MALDI II、島津、Kyoto)を用い、±1%以内の誤差範囲で測定した。

2－5．リパーゼ変異株の作成

オリゴヌクレオチドプライマー 5' CCATGGAAGgccGACATGTCAGATG 3'、

5' CATGGAAGAGGtAgATcTCAGATGAGGAG 3'、および5' CTTGAGCATgcAGCTGTGACAGTC 3' (小文字は変異箇所を表す)はそれぞれ、R275A、Δ275、およびR-1A変異遺伝子の作成に用いた。部位特異的変異は、pFHL13を鋳型とし、Mutant-Kキット(宝酒造)を用いて、キットに記載されている方法にしたがって行った。その他の遺伝子操作は、Sambrookら(71)の方法にしたがって行った。ΔPRO変異株は、R-1A変異株の作成よって新たに生じる51 bpの *Pvu*II – *Pvu*II断片を欠失させることによって作成した。R275A ΔPRO変異株は、ΔPRO変異株にR275Aの部位特異的変異を導入することによって作成した。それぞれの変異株遺伝子の作成後、1.14 kbpの *Eco*RI-*Sal*I断片を酵母発現ベクターpYE22mの *Eco*RI-*Sal*I の間に連結した。

2－6．*S. cerevisiae*の形質転換

S. cerevisiae の形質転換と形質転換体の選択は、第3章、第2節、1－3に記載した方法と同様に行った(83)。

2－7．*S. cerevisiae*からの全RNAの抽出とノザンプロット解析

3 mlの培養液から遠心分離により *S. cerevisiae* 菌体を集め、3 mlの滅菌水で洗浄した。0.3 gのガラスビーズ(直径約0.5 mm)、0.3 mlのRNA extract solution (0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5)、および0.3 mlのphenol/$CHCl_3$ を加え、7分間、vortex mixerで攪拌することにより菌体を破砕した。遠心分離によって得られた上清に1 mlのエタノールを加え、–80 ℃で15分間保持した。遠心分離によって得られた沈殿を50 μlの滅菌水に溶解し、260 nmの吸光度でRNA濃度を決定した。

2.2 M formaldehyde/50% formamide中、65℃で変性した5 μgの全RNAを、1.1 M formaldehydeと20 mM MOPSを含む1%アガロースゲルで電気泳動後(100)、RNAをナイロンメンブレン(Hybond-N; Amersham, Buckinghamshire, UK)に転写した。pFHL13の1.14 kbp *Eco*RI-*Sal*I 断片をプローブとして、ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham)を用い、同キットに記載されている方法にしたがってノザンプロット解析を行った。

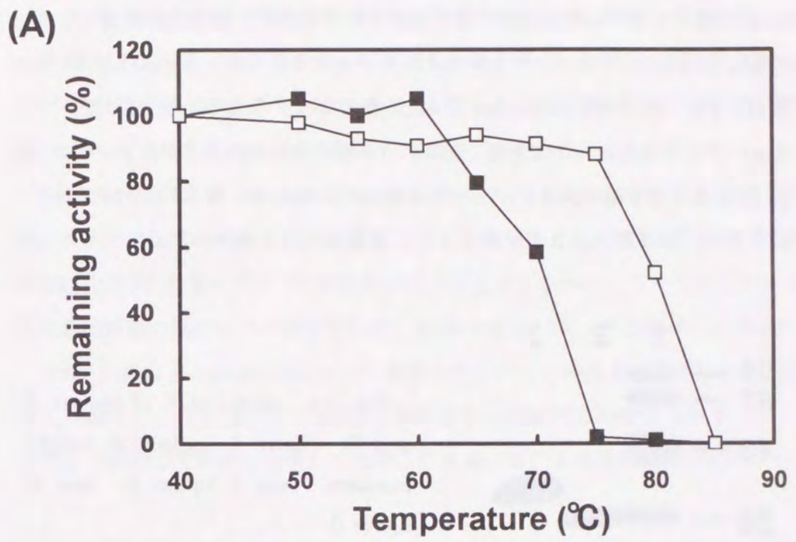
第３節　結果

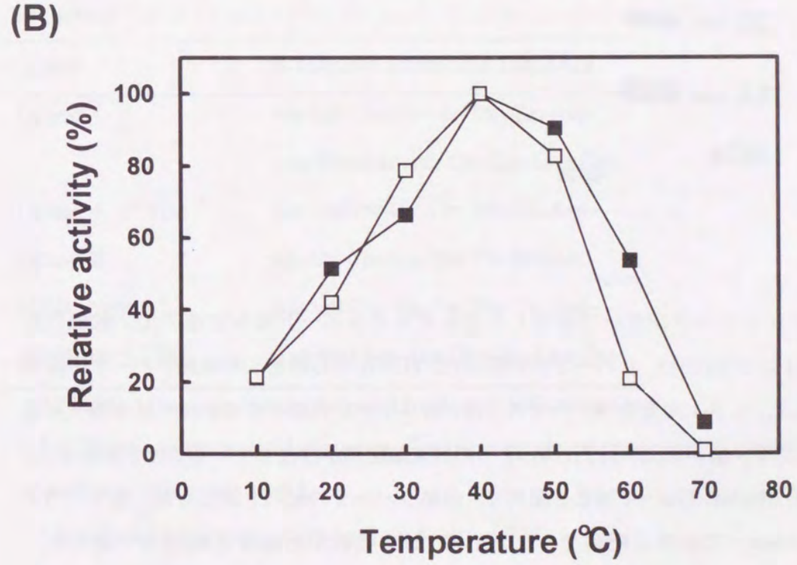
３－１．*S. cerevisiae* によって生産されたリパーゼの性質

S. cerevisiae によって生産されたリパーゼＡとＢの熱安定性を、50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.6)の下で測定した(Fig. 4-2 A)。リパーゼＡは 60℃まで、リパーゼＢは 75℃まで 30 分間それぞれ安定であった。リパーゼＡとＢの 77℃での熱失活の半減期はそれぞれ、0.36 および 81 分であった(101)。元菌の *F. heterosporum* から精製したリパーゼを同じ条件で測定したときの熱安定性はリパーゼＡと同じであった。しかし、第１章で 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.5)の下で *F. heterosporum* のリパーゼの熱安定性を測定したときは、40℃までしか安定でなかった(53)。これは、緩衝液と pH の違いによって安定性が大きく異なることを意味している。

次に、50%の methanol、ethanol、dimethylsulfoxide、acetone、acetonitrile、および *n*-hexane 存在下で 30℃、16 時間保温した後の残存活性を測定したところ、リパーゼＢはこれらの有機溶媒に対して非常に安定であったが、リパーゼＡは ethanol、acetone、および acetonitrile 存在下では完全に失活した。これに対し、上記有機溶媒を 50%含んだ反応系中、30℃でリパーゼ活性を測定したが、両リパーゼ間で活性に大きな違いはなかった。至適温度(Fig. 4-2 B)、脂肪酸特異性、オリーブ油に対する K_m 値は、いずれも両リパーゼ間で大きく変わらなかった。これらの結果より、リパーゼＡとＢの安定性は大きく異なるが、酵素活性は同じであることがわかった。

Fig. 4-2. (Next page) The thermostabilities and optimum temperatures of lipases A and B. (A) Effect of temperature on the stability. The enzyme (0.8 mg/ml) was kept at the indicated temperature for 30 min in 50 mM acetate buffer (pH 5.6), then placed on ice for 10 min. The remaining activity was expressed relative to that before incubation. (B) Effect of temperature on the activity. The activity at the indicated temperature was expressed as a percentage of the maximum activity. ■, Lipase A; □, lipase B.





3－2．リパーゼAとBの構造

SDS-PAGE で調べたリパーゼAとBの分子量はそれぞれ 31 と 34 kDa で、リパーゼAにはこの他に 10 kDa 以下のバンドも見出された(Fig. 4-3)。なお、Fig. 4-3 で用いたリパーゼ B は、Fig. 4-1 の SP-Sephadex C-50 の後のピークのうち、前半部分のフラクションチューブを分析したものである。後のピークの後半部分のフラクションチューブには、34 kDa より分子量の大きいバンドが存在しているため、後ろのピークを全て集めて分析すると、第３章 Fig. 3-4 A のように、複数のバンドがみられる。

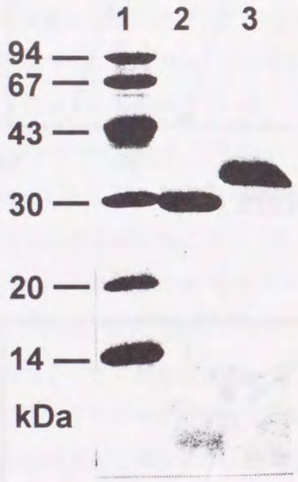


Fig. 4-3. SDS-PAGE of lipases A and B. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, lipase A; lane 3, lipase B.

プロテインシーケンサーで決定したそれぞれのリパーゼのN末端アミノ酸配列を Table 4-1 に示す(101)。リパーゼBの配列は、cDNA から推定した成熟リパーゼの配列と一致した。しかしながらリパーゼAでは、各エドマン分解のサイクルでほぼ等モル量の PTH アミノ酸が検出されたため、２つのN末端配列が存在していることがわかった。一つ目が Ala-Val-Thr…で始まる配列で、成熟リパーゼの配列と同じもの、もう一つが Asp-Met-Ser…で始まる配列で、cDNA の 276 番目から始まる配列と一致した。SDS-PAGE 後、リパーゼAの 31 kDa のバンドをプロテインシーケンサーで分析すると、Ala-Val-Thr…の配列のみが検出された。したがって、リパーゼBは 301 アミノ酸残基の一本のポリペプチド鎖で構成されているのに対して、リパーゼAは 275 と 26 残基からなる二本のポリペプチド鎖で構成されていることがわかった。飛行時間型レーザーイオン化質量分析計で測定した分子量(リパーゼA が 29, 068 と 3,103 Da、リパーゼBが 32,322 Da)は、アミノ酸配列から計算した分子量(リパーゼAが 29,513 と 3,195 Da、リパーゼBが 32,690 Da) とおおよそ一致した。ここで、275 残基のペプチド鎖をN末端ペプチド、26 残基のペプチド鎖をC末端ペプチドと命名した。

以上の結果より、リパーゼAは Arg275 と Asp276 の間のペプチド結合がトリプシン様のプロテアーゼで切断されることによって生成したものであり、C末端ペプチドは非共有結合で N 末端ペプチドに結合していることがわかった。リパーゼAの２本のペプチド鎖は精製の操作中には離れないが、SDS-PAGE によって分離すると考えられる。

なお、元菌の *F. heterosporum* から精製したリパーゼの構造はリパーゼAと同じであった。第１章のN末端アミノ酸配列分析で１つの配列しか検出されなかったのは、HPLC で精製した試料を分析したため、C末端ペプチドが失われたためと考えられる。

Table 4-1. N-Terminal amino acid sequences of lipases determined by the protein sequencer

Lipase	N-Terminal amino acid sequence
Lipase A	Ala-Val-Thr-Val-Thr-Thr-Gln-Asp-
	Asp-Met-Ser-Asp-Glu-Glu-Leu-Glu-
Lipase A, 31 kDa [a]	Ala-Val-Thr-Val-Thr-Thr-Gln-Asp-
Lipase B	Ala-Val-Thr-Val-Thr-Thr-Gln-Asp-
cDNA, from 1 [b]	Ala-Val-Thr-Val-Thr-Thr-Gln-Asp-
cDNA, from 276 [c]	Asp-Met-Ser-Asp-Glu-Glu-Leu-Glu-

[a] The 31-kDa polypeptide obtained by SDS-PAGE of lipase A.

[b] N-Terminal amino acid sequence of mature lipase estimated from the nucleotide sequence of the lipase cDNA.

[c] Amino acid sequence starting from position 276.

3－3．C末端ペプチドの役割

C末端ペプチド26残基の役割を調べるために、2つの変異株を構築した(Fig. 4-4)。一つはR275Aで、C末端ペプチドが切断されなくするようにするためにArg275をAlaに置換した変異株である。もう一つはΔ275 で、C末端ペプチドを欠失させるためにAsp276 を amber codon に置換した変異株である(101)。それぞれの変異株の酵母での発現プラスミドを、pYGF2R275A およびpYGF2Δ275 とした。各変異株遺伝子をもった *S. cerevisiae* SH2041 を培養したところ、*S. cerevisiae* [pYGF2R275A] は63 U/mlのリパーゼを生産し、これは野生株 *S. cerevisiae* [pYGF2] の生産量(54 U/ml)とほぼ同レベルであった。これに対し、*S. cerevisiae* [pYGF2Δ275] の培養上清中にはわずかのリパーゼ活性(2 U/ml)しかなかった。

それぞれの酵母の培養上清を濃縮し、SDS-PAGE で分析した(Fig. 4-5 A)。*S. cerevisiae* [pYGF2] は36, 34, 31 kDaの3つのリパーゼを作るのに対し(lane 2)、*S. cerevisiae* [pYGF2R275A] は36, 34 kDaの2つのリパーゼを生産した(lane 3)。しかしながら、これらのリパーゼのバンドは、*S. cerevisiae* [pYGF2Δ275] の培養上清から検出されなかった(lane 4)。36 kDaの蛋白は、そのN末端アミノ酸配列がGly-Pro-Val…であったことから、16 アミノ酸残基のプロ配列を持ったプロリパーゼであると推定される。これは、プロ配列の切れ残ったリパーゼが少量存在していることを意味している。34 kDaと31 kDaのタンパクはそれぞれ、リパーゼAとリパーゼBの移動度と同じであった。それゆえ、*S. cerevisiae* [pYGF2R275A] はC末端ペプチドが切断されていないリパーゼを生産していると結論できる。

Δ275 遺伝子から転写されるmRNAの量を調べるために、リパーゼcDNAをプローブとしてノザンブロット解析を行った(Fig. 4-5 B)。リパーゼ cDNA を持たない *S. cerevisiae* [pYE22m] のRNAからはハイブリダイズするバンドが検出されなかったが(lane 1)、pYGF2, pYGF2R275A, pYGF2Δ275 を持った *S. cerevisiae* から一本のバンドが検出された(lane 2-4)。これらのバンドの濃さは全て同じであったので、Δ275 の遺伝子は野生型やR275遺伝子と同じレベルで転写されることが示唆される。したがって、C末端ペプチドは翻訳以降の過程におけるリパーゼ生産に重要な役割を果たしていると推定される。

R275A とΔ275 の熱安定性を、培養上清から得た粗酵素で測定した。R275A のリパーゼの熱安定性はリパーゼ B と同じであったのに対し、Δ275 のリパーゼはリパーゼA

よりも不安定であった。Δ275 のリパーゼとリパーゼAの67℃での熱失活の半減期はそれぞれ3.5分と39分であり、約11倍の差があった。しかしながらこの差は、リパーゼAとBの熱安定性の差よりは小さかった。

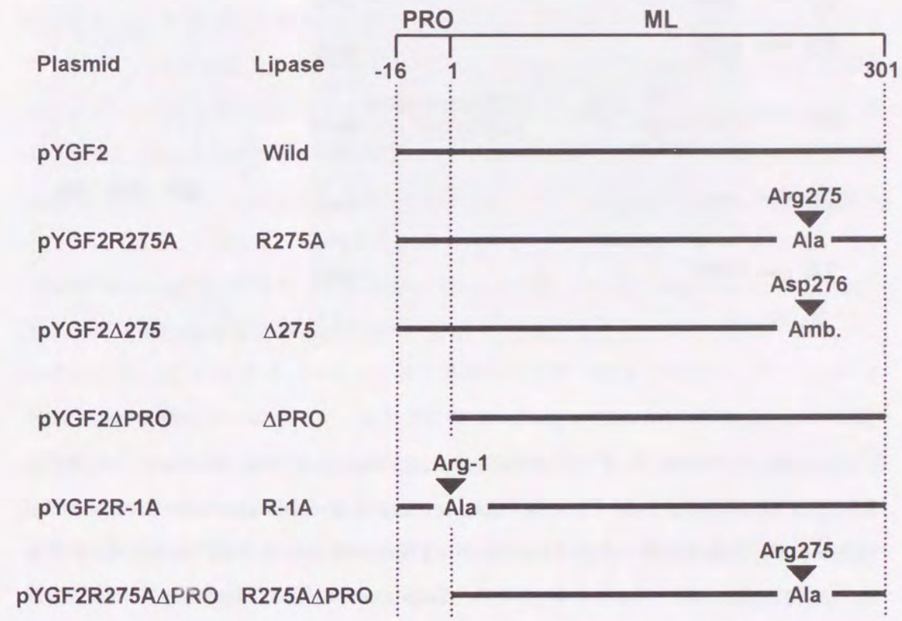


Fig. 4-4. Schematic structures of lipase mutants. Amino acid residues are numbered from the N-terminus of mature lipase, and the prosequence is indicated by negative numbers. PRO, prosequence; ML, mature lipase; Amb, amber codon.

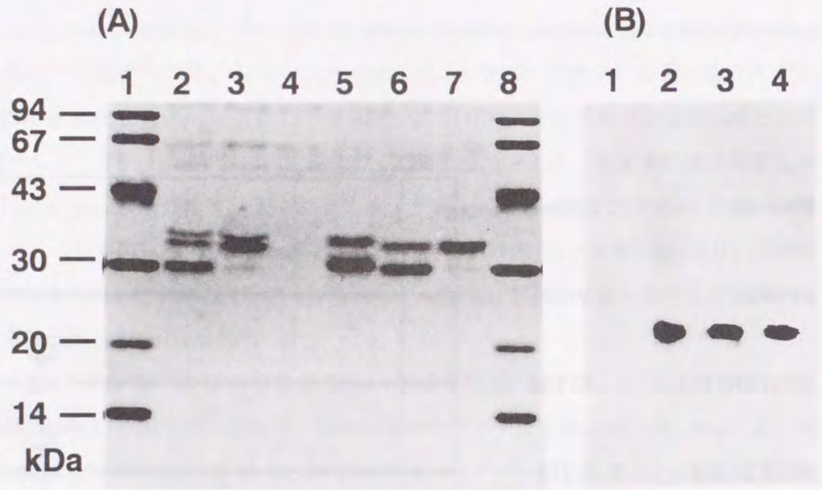


Fig. 4-5. SDS-PAGE of lipase mutants and Northern blot analysis. (A) SDS-PAGE of lipase mutants. Culture supernatants of *S. cerevisiae* were concentrated 50 times by ultrafiltration, and the resulting concentrates (0.3 μl) were subjected to the electrophoresis: Lanes 1 and 8, molecular weight markers; lane 2, *S. cerevisiae* [pYGF2]; lane 3, *S. cerevisiae* [pYGF2R275A]; lane 4, *S. cerevisiae* [pYGF2Δ275]; lane 5, *S. cerevisiae* [pYGF2R-1A]; lane 6, *S. cerevisiae* [pYGF2ΔPRO]; lane 7, *S. cerevisiae* [pYGF2R275AΔPRO]. (B) Northern blot analysis. Total RNA was extracted from *S. cerevisiae* strains, and lipase cDNA was used as a probe: Lane 1, *S. cerevisiae* [pYE22m]; lane 2, *S. cerevisiae* [pYGF2]; lane 3, *S. cerevisiae* [pYGF2R275A]; lane 4, *S. cerevisiae* [pYGF2Δ275].

3－4．プロ配列の影響

R. delemar のリパーゼでは、N末端側に位置している 97 アミノ酸残基のプロ配列がリパーゼの安定性に関与しているという報告がある(94, 102)。そこで、*F. heterosporum* のリパーゼのプロ配列と推定される配列(16 アミノ酸残基)の役割について調べるために、3種類の変異リパーゼ：R-1A(Arg-1 を Ala に置換し、プロ配列を切れなくした)、ΔPRO(プロ配列を欠失させた)、R275AΔPRO(プロ配列が欠失し、C末端ペプチドが切断されなくした)を構築した(Fig. 4-4)。それぞれの変異リパーゼを発現するプラスミドを pYGF2R-1A、pYGF2ΔPRO、pYGF2R275AΔPRO と名づけた。*S. cerevisiae* [pYGF2 ΔPRO] は 34 kDa と 31 kDa のリパーゼを(Fig. 4-5 lane 6)、*S. cerevisiae* [pYGF2 R275AΔPRO] は 34 kDa のリパーゼのみ(lane 7)をそれぞれ生産した。34 kDa と 31 kDa のリパーゼは、リパーゼBとAの移動度とそれぞれ一致した。*S. cerevisiae* [pYGF2R-1A] は 36 kDa と 32 kDa のリパーゼを生産し(lane 5)、これらのリパーゼは、*S. cerevisiae* [pYGF2 ΔPRO] の生産するリパーゼの分子量よりも少し大きかった。36 kDa のリパーゼは、野生型遺伝子を持つ酵母が生産するプロリパーゼ(36 kDa)の移動度と一致した。これらの結果は、*S. cerevisiae* [pYGF2R-1A] がプロ配列を持ったリパーゼのみを、*S. cerevisiae* [pYGF2 ΔPRO] と *S. cerevisiae* [pYGF2 R275AΔPRO] がプロ配列を持たないリパーゼを生産していることを示している。また、ΔPRO、R275AΔPRO、および R-1A のリパーゼ遺伝子を持つ酵母を培養したところ、そのリパーゼ生産量はそれぞれ 54.3、51.7、および 64.7 U/ml であった。これらの生産量は変異株間で大きく変わっていないことから、プロ配列はリパーゼ生産にあまり影響していないことが示唆される。

S. cerevisiae [pYGF2 ΔPRO] の生産する 34 kDa と 31 kDa のリパーゼ、*S. cerevisiae* [pYGF2R-1A] の生産する 36 kDa と 32 kDa のリパーゼをそれぞれ精製した。31 kDa と 32 kDa のリパーゼからは、SDS-PAGE でC末端ペプチドのバンドが検出された。34 kDa と 36 kDa のリパーゼの比活性は、31 kDa と 32 kDa のリパーゼの比活性よりもわずかに小さかったが、いずれもリパーゼAとBの比活性と大差なかった。34 kDa と 36 kDa のリパーゼの熱安定性はリパーゼBと、31 kDa と 32 kDa のリパーゼの熱安定性はリパーゼAとそれぞれ同一であった。以上の結果より、プロ配列は熱安定性に全く影響を与えておらず、C末端ペプチドが切断されるかどうかのみで安定性が決定されていることがわかった。

第4節　考察

本章では、*F. heterosporum* のリパーゼcDNAを保持した *S. cerevisiae* によって生産される2種のリパーゼ、AとBの構造と安定性の関係について述べてきた(101)。リパーゼBは 301 アミノ酸残基からなる一本のポリペプチド鎖で構成されていた(Fig. 4-6)。これに対し、Arg275 と Asp276 の間のペプチド結合がトリプシン様のプロテアーゼで切断された結果、リパーゼAは二本のポリペプチド鎖(275 残基のN末端ペプチドと 26 残基のC末端ペプチド)を持っていた。C末端ペプチドが切断されていないリパーゼBは、リパーゼAよりも非常に安定性に優れていた。したがって、安定性の高いリパーゼBは、次にように説明可能である。C末端ペプチドが酵素の本体であるN末端ペプチドにペプチド結合で結合しているとき、C末端ペプチドが酵素の高次構造の崩壊を防いでいる(Fig. 4-6)。そして、C末端ペプチドが切断されてしまうと、たとえそれが非共有結合で酵素本体に結合していても、安定化の機能を失う。その結果、リパーゼAの高次構造が崩壊しやすくなると考えられる。

26 アミノ酸残基のC末端ペプチドを欠失させた遺伝子Δ275 は、*S. cerevisiae* 内で野生型遺伝子と同程度に転写されるが、*S. cerevisiae* [pYGF2Δ275] の培養上清にはリパーゼがほとんど存在していなかった。これらの結果に対して、次の2つの可能性が考えられる。(i)C末端ペプチドは、分泌に重要である、(ii)C末端ペプチドの欠失によって安定性を失ったリパーゼは、菌体内外のプロテアーゼによって分解される。しかし、*S. cerevisiae* [pYGF2Δ275] の菌体破砕液にはリパーゼ活性が検出されなかったことから、(i)の可能性はないと考えられる。

C末端ペプチドの 26 アミノ酸残基は、荷電したアミノ酸残基を多く持っている(Fig. 4-6)。N末端ペプチド内の荷電したアミノ酸残基は 18.9%であるのに対し、C末端ペプチド内のそれは 42.3%である(26 残基中 11 個、Asp が3残基、Glu が5残基、Lys が3残基)。この事実より、荷電したアミノ酸残基がリパーゼの安定化に関与しているのかもしれない。

F. heterosporum のリパーゼの推定される生産機構を Fig. 4-7 にまとめた。*F. heterosporum* の菌体内では、まず初めに 333 アミノ酸残基からなるプレプロリパーゼとして発現した後、32 残基のシグナルまたはプロ配列が切断されて 301 残基のリパーゼBが生成する。続いて、菌体内外でトリプシン様のプロテアーゼによって Arg275 と

Asp276 の間のペプチド結合が切断されるが、C末端ペプチドがN末端ペプチドと非共有結合したままであるリパーゼAを培地中に放出する。この切断は完全であるために、*F. heterosporum* の培養上清中にはリパーゼBが見出されない。*F. heterosporum* のcDNAを保持した *S. cerevisiae* [pYGF2] でも同様な機構でリパーゼが生産されるが、C末端ペプチドの切断が不完全であるために、培養上清中にはリパーゼAとBの混合物が存在する。また、プロ配列の切断も不完全であるために、プロリパーゼも培養上清中に少量見出される。元菌の *F. heterosporum* は安定性の高いリパーゼBを培地中に放出しないが、Arg275 を Ala に置換した変異遺伝子を持つ *S. cerevisiae* [pYGF2R275A] は、安定性の高いリパーゼのみを生産する。したがって、*S. cerevisiae* [pYGF2R275A] を培養することにより、元菌のリパーゼより安定性を飛躍的に向上させたリパーゼを生産することが可能になった。

F. heterosporum のリパーゼと相同性のある *R. oryzae* のリパーゼは、97 アミノ酸残基のプロ配列を持っている(94, 102)。菌体内でプレプロリパーゼが生産された後、シグナル配列とプロ配列が切断され、成熟リパーゼが培地中に放出される(Fig. 4-8)。また、培地中にはプロリパーゼがほとんど見出されない。*R. oryzae* のリパーゼのプロ配列は酵素の folding に必要であり、プロリパーゼは成熟リパーゼよりも安定性が高いことが報告されている。また、プロ配列を欠失させた遺伝子を持つ酵母は、活性のあるリパーゼを生産しない。*F. heterosporum* のリパーゼにも 16 残基からなるプロ配列と推定される配列が存在しているが、この配列は酵素の生産量や安定性には関与していない。逆に、*F. heterosporum* のリパーゼのC末端側は *R. oryzae* のリパーゼよりも 34 アミノ酸残基長く、*F. heterosporum* のC末端ペプチドが酵素の安定性に関与している。さらに、*F. heterosporum* のリパーゼのC末端ペプチドを欠失させた遺伝子を持つ酵母は、リパーゼをほとんど生産しない。したがってこれらの事実は、*F. heterosporum* のリパーゼのC末端ペプチドは、*R. oryzae* のリパーゼのプロ配列と同じ機能を持っていることを示唆しており、*R. oryzae* のリパーゼでも、プロ配列が切断されない変異株を作成すれば、*R. oryzae* の生産するリパーゼよりも安定性の向上したリパーゼの生産が可能となる。

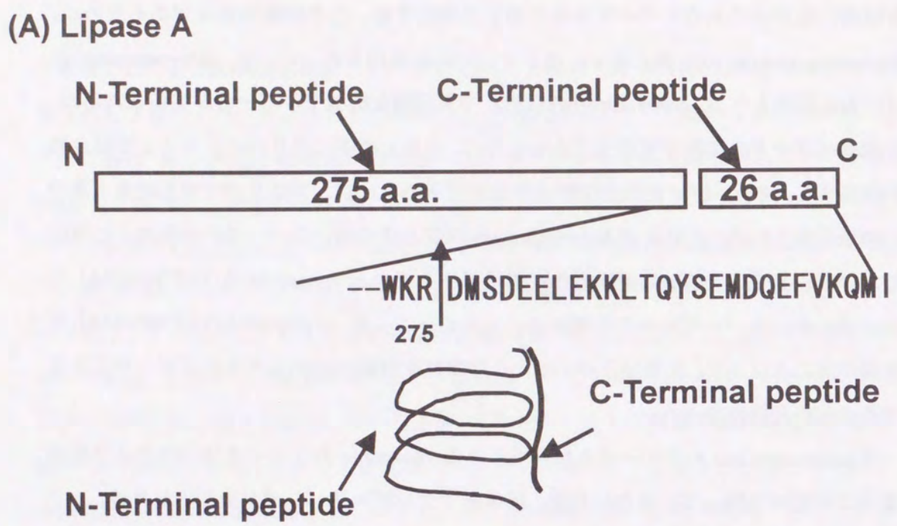


Fig. 4-6. Schematic structure of lipases A and B. The arrow indicate the cleavage site by a trypsin-like protease. N, N-terminus; C, C-terminus; a.a., amino acid residues.

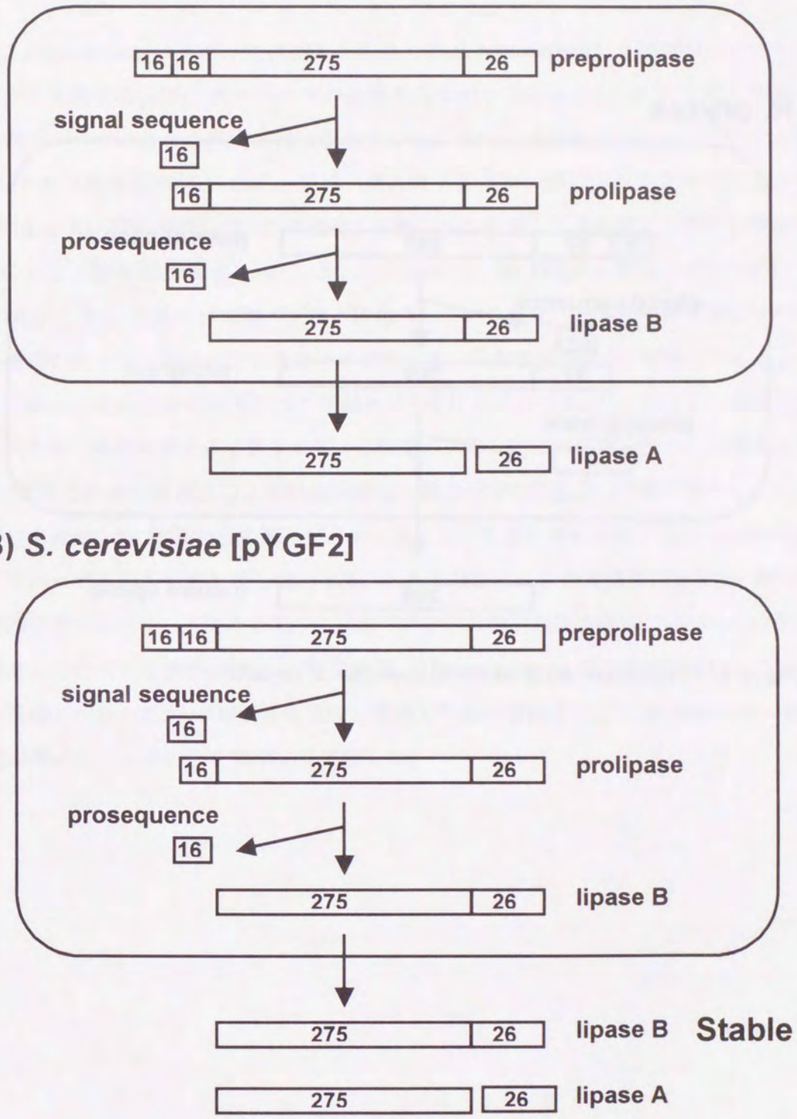


Fig. 4-7. Production mechanism of lipase by (A) *F. heterosporum* and (B) *S. cerevisiae* [pYGF2] harboring *F. heterosporum* lipase cDNA.

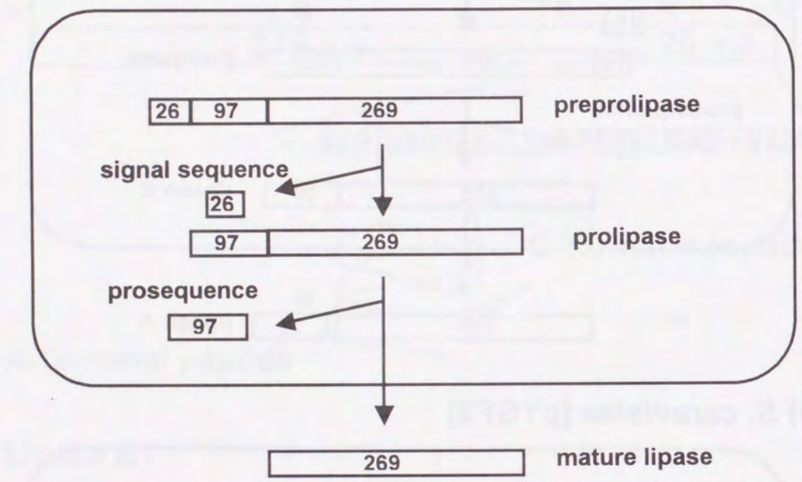


Fig. 4-8. Production mechanism of lipase by *R. oryzae*.

第5節　要約

F. heterosporum のリパーゼ cDNA を保持した *S. cerevisiae* は、2種類のリパーゼ、AとBを生産する(101)。両リパーゼの至適温度は同じであるにもかかわらず、リパーゼBはリパーゼAよりも熱安定性に優れていた。リパーゼBは一本のポリペプチド鎖(301 アミノ酸残基)であったが、リパーゼAはトリプシン様のプロテアーゼによってArg275 と Asp276 の間のペプチド結合が切断された結果、二本のポリペプチド鎖(275と 26 アミノ酸残基)で構成されていた。したがって、26 残基のC末端ペプチドがペプチド結合で 275 残基のN末端ペプチドに結合しているとき、C末端ペプチドがリパーゼの構造の安定性に関与していることがわかった。C末端ペプチドが切断されると、たとえそれが非共有結合でN末端ペプチドと相互作用していても、リパーゼBの強固な構造は失われ、安定性が大きく低下する。C末端ペプチド内には荷電したアミノ酸残基が多いので、これらの荷電アミノ酸残基が酵素の構造安定化に重要な役割を果たしていると推定される。26 残基のC末端ペプチドを欠失させた遺伝子を保持した *S. cerevisiae* は、リパーゼをほとんど生産しなかった。しかしながら、この変異株の mRNA 量は野生型株と変わらなかったことから、C末端ペプチドは翻訳以降の過程でリパーゼの生産に関与している可能性が示唆された。元菌の *F. heterosporum* は安定性の高いリパーゼBを生産しなかったが、Arg275 を Ala に置換した変異遺伝子をもつ *S. cerevisiae* は安定性の高いリパーゼのみを効率よく生産した。

第５章　安定性に関与している *F. heterosporum* リパーゼのＣ末端ペプチド内アミノ酸残基

第１節　緒言

酵素の安定性を上げることは、酵素の実用化面で非常に重要なことである。これまで酵素の安定性を向上させる方法として、相同性のある安定な酵素の立体構造にもとづいて、特定の部位に特異的に変異を導入する方法がある(103-105)。また、構造遺伝子のランダム変異や(106)、Ｃ末端側へのランダムペプチド付加などによって(107)、安定性の向上した変異株をスクリーニングする方法も採られてきた。

F. heterosporum のリパーゼは、333 アミノ酸残基のプレプロリパーゼとして生産された後、301 残基の成熟リパーゼ（リパーゼＢ）が生成する(101)。つづいて、Arg275 と Asp276 の間のペプチド結合が切断され、26 残基のＣ末端ペプチドが酵素本体に相互作用したままであるリパーゼＡに変換される。*F. heterosporum* は、Ｃ末端ペプチドの切断が完全であるために、リパーゼＡのみを生産する。これに対し、*F. heterosporum* の cDNA を酵母内で発現させたとき、Ｃ末端ペプチドの切断が不完全であるため、２種類のリパーゼ(ＡとＢ)を生産する。リパーゼＢはＡよりも非常に熱安定性に優れていることから、Ｃ末端ペプチドは酵素の安定性に重要であることがわかった。また、Ｃ末端ペプチドを切断されないようにしたリパーゼ遺伝子をもつ変異株を作成することによって、元菌の生産するリパーゼよりも安定性の高いリパーゼを生産することができた。したがって、このＣ末端ペプチドの機能を調べることは、産業用酵素の構造と安定性の関係の解明、および酵素の安定性改良につながると期待される。そこで本章では、*F. heterosporum* のリパーゼの安定性に関与しているＣ末端ペプチド内アミノ酸残基を特定することを試みた。

第２節　実験材料及び実験方法

２－１．実験材料

遺伝子操作に使用する制限酵素とその他の酵素類は宝酒造(Kyoto)または東洋紡(Osaka)より、酵母エキスとペプトンは和光純薬(Osaka)からそれぞれ購入した。DEAE-Sephadex A-50 、SP-Sephadex C-50、 Sephadex G-75、およびタンパクの分子量マーカーは Pharmacia Biotech. (Uppsala, Sweden)より、オリゴヌクレオチドは Gibco / BRL (Rockville, MD, U.S.A.)よりそれぞれ調達した。その他の試薬は、特級を使用した。

大腸菌 CJ236 [*dut*1 *ung*1 *thi*-1 *relA*1 / pCJ105(F'*cam*^{r})]、BMH71-18 *mutS* [Δ(*lac proAB*) *thi*-1 *supE mutS*215::Tn10(*tet*^{r}) / F' *traD*36 *proAB*$^+$ *lacI*^{q} *Z*ΔM15]、および MV1184 [Δ(*lac-proAB*) *ara rpsL thi*(ϕ80 *lacZ*ΔM15) Δ(*srl-recA*)306::Tn10(*tet*^{r}) / F' *traD*36 *proAB*$^+$ *lacI*^{q}*Z*ΔM15] (71)は部位特異的変異遺伝子の作成に、大腸菌 DH5 [*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]とプラスミド pUC119(69-71)はその他の遺伝子操作にそれぞれ用いた。部位特異的変異遺伝子の鋳型として用いたプラスミド pFHL13R275A は第４章で作成したものを用いた。*S. cerevisiae* の発現ベクター pYE22m および *S. cerevisiae* SH1089[*MAT*a, *ura3-52, leu2-3,112, trp1, pho3-1, pho5-1 (HIS4-lacZ, ura3-52)*] は原島俊教授より譲渡されたものである。

２－２．部位特異的変異遺伝子の作成

リパーゼ変異株の作成に用いたオリグヌクレオチドプライマーを Fig. 5-1 と Fig. 5-2 に示す。部位特異的変異は、鋳型遺伝子 pFHL13R275A と Mutant-K キット(宝酒造)を用い、キットに記載されている方法にしたがって行った。R275A、D293A、D279A の全塩基配列、およびその他の変異遺伝子の変異部位周辺の塩基配列は、DNA シーケンサーDSQ-1000L (島津、Kyoto) と、FITC で標識したオリグヌクレオチドプライマーSEQ-1 (5' GAACCCACTTCAATACTAAGTCC 3', Amersham Pharmacia Biotech.) を用いて行った。その他の遺伝子操作は、Sambrook ら(71)の方法にしたがって行った。それぞれの変異株遺伝子の作成後、1.14 kbp の *Eco*RI-*Sal*I 断片を pYE22m の *Eco*RI-*Sal*I の間に連結し、できあがったプラスミドで *S. cerevisiae* を形質転換した。

```
                275             280             285             290             295             300
R275A  --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThrGlnTyrSerGluMetAspGlnGluPheValLysGlnMetIle***
       --TGGAAGGCCGACATGTCAGATGAGGAGTTGGAAAAGAAGTTGACTCAGTATAGCGAGATGGATCAGGAATTTGTTAAGCAGATGATTTAGGCCATGGAGAGA

                                                                                    R275A/I301A  AAGCAGATGgcTTAGGCCATGGAGAG
                                                                                 R275A/M300A  GTTAAGCAGgcGATTTAGGCCATGG
                                                                              R275A/Q299A  ATTTGTTAAGgcGATGATTTAGGCC
                                                                           R275A/K298A  GAATTTGTTgcGCAGATGATTTAGG
                                                                        R275A/V297A  TCAGGAATTTGcTAAGCAGATGATT
                                                                     R275A/F296A  GGATCAGGAAgcTGTTAAGCAGATG
                                                                  R275A/E295A  ATGGATCAGGcATTTGTTAAGCAG
                                                               R275A/Q294A  CGAGATGGATgcGGAATTTGTTAAG
                                                            R275A/D293A  AGCGAGATGGcTCAGGAATTTGTT
                                                            R275A/D293E  AGCGAGATGGAgCAGGAATTTGTTAAG
                                                          R275A/D293N  TAGCGAGATGaATCAGGAATTTG
                                                            R275A/D293K  AGCGAGATGaAgCAGGAATTTGTTAAG
                                                       R275A/M292A  TATAGCGAGgcGGATCAGGAATTTG
                                                    R275A/E291A  CAGTATAGCGcGATGGATCAGGAA
                                                 R275A/S290A  ACTCAGTATgcCGAGATGGATCAGG
                                              R275A/Y289A  TTGACTCAGgcTAGCGAGATGGATC
                                           R275A/Q288A  AAGTTGACTgcGTATAGCGAGATGG
                                        R275A/T287A  AAGAAGTTGgCTCAGTATAGCGAG
                                     R275A/L286A  GAAAAGAAGgcGACTCAGTATAGCG
                                  R275A/K285A  TTGGAAAAGgcGTTGACTCAGTATAG
                               R275A/K284A  GAGTTGGAAgcGAAGTTGACTCAGT
                            R275A/E283A  GAGGAGTTGGcAAAGAAGTTGACTC
                         R275A/L282A  GATGAGGAGgcGGAAAAGAAGTTGAC
                      R275A/E281A  TCAGATGAGGcGTTGGAAAAGAAG
                   R275A/E280A  ATGTCAGATGcGGAGTTGGAAAAG
                R275A/D279A  GACATGTCAGcTGAGGAGTTGGAAA
                R275A/D279E  GACATGTCAGAgGAGGAGTTGGAAAAG
                R275A/D279N  GACATGTCAaAcGAGGAGTTGGAAAAG
                R275A/D279K  GACATGTCAaAgGAGGAGTTGGAAAAG
             R275A/S278A  GCCGACATGgCAGATGAGGAGTTG
          R275A/M277A  AAGGCCGACgcGTCAGATGAGGAGTTG
       R275A/D276A  TGGAAGGCCGcCATGTCAGATGAG
```



```
                275             280             285             290             295             300
R275A     --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThrGlnTyrSerGluMetAspGlnGluPheValLysGlnMetIle***
          --TGGAAGGCCGACATGTCAGATGAGGAGTTGGAAAAGAAGTTGACTCAGTATAGCGAGATGGATCAGGAATTTGTTAAGCAGATGATTTAGGCCATGGAGAG

R275A/Δ299 --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThrGlnTyrSerGluMetAspGlnGluPheValLysGln
                                                                                    GTTAAGCAGtaGATTTAGGCCATGGAG

R275A/Δ297 --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThrGlnTyrSerGluMetAspGlnGluPheVal
                                                                                 GGAATTTGTTtAGCAGATGATTTAGG

R275A/Δ295 --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThrGlnTyrSerGluMetAspGlnGlu
                                                                              GATCAGGAATagGTTAAGCAGATGATTTAGGC

R275A/Δ293 --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThrGlnTyrSerGluMetAsp
                                                                           GAGATGGATtAGGAATTTGTTAAGCAGATG

R275A/Δ290 --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThrGlnTyrSer
                                                                     CAGTATAGCtAGATGGATCAGGAATTTG

R275A/Δ288 --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeuGluLysLysLeuThrGln
                                                           GTTGACTCAGTAgAGCGAGATGGATCAGG

R275A/Δ282 --TrpLysAlaAspMetSerAspGluGluLeu
                                  GATGAGGAGTTGtAgAAGAAGTTGACTCAG

Δ275       --TrpLysArg
           CATGGAAGAGGtAgATGTCAGATGAGGAG
```

Fig. 5-1. （前々ページ） Synthetic oligonucleotide primers used for the construction of mutants of *F. heterosporum* lipase. Amino acid and nucleotide sequences of the C-terminal peptide are shown in the second and third lines, respectively, and the double underlines indicate the mutation site in R275A. The R275A gene was used as the template for the construction of each mutant. The small letters and underlines indicate the mutated nucleotides and the codon of Ala, respectively. The left side of the oligonucleotide is the 5' terminus.

Fig. 5-2. （前ページ） Amino acid sequences on the C-terminal peptide of the deletion-mutant-lipases, and synthetic oligonucleotide primers used for the construction of mutants. Amino acid and nucleotide sequences of the C-terminal peptide of R275A are shown in the second and third lines, respectively. The double underlines indicate the mutation site of R275A. The Δ275 mutant was constructed using the wild-type lipase gene as a template, and the R275A gene was used as the template for the construction of the other mutants. The small letters and underlines indicate the mutated nucleotides and the stop codon, respectively. The left side of the oligonucleotide is the 5' terminus.

２－３．*S. cerevisiae* の形質転換

S. cerevisiae の形質転換と形質転換体の選択は、第３章、第２節、１－３に記載した方法と同様に行った(83)。

２－４．リパーゼ活性の測定

リパーゼ活性の測定は、第１章、第２節、２－２と同様にして行った(50)。*K*m 値の測定は、PVA エマルジョン法で測定した。40 ml のオリーブ油と、80 ml の 2% polyvinyl alcohol(重合度 2000)をホモゲナイザーで混合し、出来上がった基質エマルジョンを 1.33% polyvinyl alcohol で２から５倍に希釈した。5 ml の基質エマルジョン、2 ml の

100 mM Na-リン酸緩衝液(pH 7.0) および酵素溶液を混合し、30℃で 30 分間反応させた。20 ml のエタノールを加えて反応を停止させた後、遊離した脂肪酸を 50 mM KOH で滴定した。

２－５．酵母の培養条件と粗酵素液の調製

S. cerevisiae は、3%酵母エキス、1%ペプトン、および 4%スクロース(pH 5.8)からなる培地(84)を含む 18-mm φ 試験管(実容 5 ml)または 500 ml 坂口フラスコ(実容 100 ml)で、27℃、3 日間、振とう培養した。200 ml の培養上清に、75%飽和になるように硫安を加え、セライト濾過で得られた沈殿を 5 ml の水に溶かした。

２－６．酵母の菌体破砕液の調製

5 ml の酵母菌体を遠心分離で集めた後、5 ml の水で２回洗浄した。菌体に 0.3 g の glass beads (0.5 mm) と 0.3 ml の 50 mM Na-酢酸緩衝液 (pH 5.6)を加え、ボルテックスミキサーで 15 分間攪拌し、菌体破砕液とした。

２－７．熱安定性の測定

濃縮した粗酵素液を buffer A (10 mM $CaCl_2$ 、100 mM acetate; pH5.6)で 10 倍に希釈し、0.5 ml のマイクロチューブ内で各温度 30 分間加熱した。５種類の温度で測定した残存活性を用いて、*T*m 値を求めた。ただし *T*m 値とは、30 分間の加熱で残存活性が 50%になる温度である。リパーゼＡとＢの *T*m 値は、buffer A で希釈した 150 μg/ml の精製酵素で測定した。*T*m 値は±0.5℃以内の誤差範囲内で測定した。

２－８．SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE は、Hames の方法(99)にしたがって、分離ゲル濃度 12%で行った。濃縮した粗酵素溶液 1 μl を電気泳動に供し、タンパクを Quick-CBB kit (Wako Pure Chemical Industries) で染色した。リパーゼタンパクのバンドの濃さは、イメージ解析ソフト(Ultimage Pro version 2.6, Graftek S.A., USA)で測定した。

第３節　結果

３－１．Ｃ末端ペプチドのアミノ酸変異

野生型リパーゼ遺伝子を保持した *S. cerevisiae* SH1089[pYGF2]株は、異なった熱安定性を持つ２種類のリパーゼ(リパーゼＡとＢ)を生産するが、Arg275 を Ala に置換した変異遺伝子を持つ *S. cerevisiae* SH1089[pYGF2R275A]株は、安定性の高いリパーゼのみを生産する(101)。両株のリパーゼ生産性はほぼ同じであり、R275A リパーゼの熱安定性はリパーゼＢと同じである。したがって、Ｃ末端ペプチドの変異リパーゼを作成する鋳型遺伝子には、野生型遺伝子ではなく、R275A 遺伝子を使った。

Ｃ末端ペプチド内 26 アミノ酸残基それぞれの側鎖の影響を調べるために、各々のアミノ酸残基を１つずつ個別に Ala に置換した変異遺伝子を作成し、それぞれの変異遺伝子を酵母内で発現させた(108)。リパーゼの生産量を SDS-PAGE のバンドの濃さに置き換えて測定し、R275A 株のリパーゼ生産量に対する各変異株の生産量の相対値で表示した(Table 5-1)。なお、R275A 株の培養上清中のリパーゼ活性は約 80 U/ml であり、各変異株の培養上清中のリパーゼ活性は、SDS-PAGE のバンドの濃さと相関した。26 種類の変異株の中で、D293A 変異株のリパーゼ生産量の変化が最も著しく、変異前の R275A 株の 19%にまで減少した。また、D279A と Y289A 変異株の生産量も、それぞれ R275A 株の 51 および 65%にまで低下した。R275A, D279A および D293A 変異株の細胞破砕液中にはリパーゼ活性がほとんど存在していなかった(Table 5-2)。さらに、酵素生産量が低下した各変異株の mRNA 量は、R275A 株の mRNA 量と大きく変わらなかった。これらの事実より、変異株の生産量が低下したのは、比活性や分泌効率の低下以外の、転写以降の過程に原因があると推定される。

次に、各変異リパーゼの熱安定性を Table 5-1 に示す。なお熱安定性は、100 mM 酢酸緩衝液(pH 5.6)中、30 分間の加熱処理で残存活性が 50%になる温度；*T*m で表した。また、R275A リパーゼの粗酵素の *T*m は 79.8℃で、この値は精製リパーゼＢ(*T*m=80.0℃)と同じであるが、精製リパーゼＡ(*T*m=66.2℃)よりもはるかに高かった。また、精製 R275A リパーゼの *T*m (80.0℃) は粗酵素の R275A リパーゼと同じであったので、酵素溶液中の狭雑蛋白質などは *T*m に全く影響していなかった。

Table 5-1.　Productivity and thermostability of lipases with mutated amino acids of the C-terminal peptide

Mutant lipase	Lipase production [a]	Thermostability	
		T_m [b]	ΔT_m [c]
	(%)	(℃)	(℃)
R275A	100	79.8	
R275A / I301A	90	79.8	0
R275A / M300A	92	78.8	-1.0
R275A / Q299A	95	79.5	-0.3
R275A / K298A	88	79.6	-0.2
R275A / V297A	97	79.0	-0.8
R275A / F296A	100	77.3	-2.5
R275A / E295A	89	79.1	-0.7
R275A / Q294A	94	77.9	-1.9
R275A / D293A	19	61.1	-18.7
R275A / M292A	92	77.8	-2.0
R275A / E291A	83	77.4	-2.4
R275A / S290A	91	78.7	-1.1
R275A / Y289A	65	70.9	-8.9
R275A / Q288A	97	80.4	0.6
R275A / T287A	86	76.9	-2.9
R275A / L286A	101	76.1	-3.7
R275A / K285A	100	77.2	-2.6
R275A / K284A	97	79.3	-0.5
R275A / E283A	89	79.3	-0.5
R275A / L282A	103	75.9	-3.9
R275A / E281A	96	78.6	-1.2
R275A / E280A	95	79.8	0
R275A / D279A	51	66.5	-13.3
R275A / S278A	96	79.8	0
R275A / M277A	97	79.3	-0.5
R275A / D276A	96	80.2	0.4
Δ275	2.5	60.2	-19.6

[a] Lipase productivity of each mutant is expressed relative to that of the R275A mutant.

[b] The temperature at which heating for 30 min results in 50% decrease in activity.

[c] The difference between the T_m values of the mutant and R275A lipases.

Table 5-2. Distribution of lipase produced by *S. cerevisiae* carrying a mutant lipase gene

Mutant lipase	Lipase activity (U / ml·culture)	
	Culture supernatant	Cell homogenate
None [a]	< 0.001	< 0.001
R275A	76.6	0.122
Δ275	2.5	0.120
R275A / D293A	14.6	0.085
R275A / D279A	36.4	0.081

[a] *S. cerevisiae* SH1089 [pYE22m] not harboring a lipase gene.

Asp293 を Ala に置換した D293A リパーゼの *T*m が 79.8℃から 61.1℃に低下した。この値は、C 末端ペプチド 26 残基を欠失させたΔ275 変異リパーゼの *T*m(60.2℃)と同レベルであり、リパーゼAの *T*m よりも 5.1℃低かった。この変異リパーゼに次いで、D279A と Y289A の変異リパーゼもそれぞれ *T*m が 66.5 および 70.9℃にまで低下した。*T*m の低下は、リパーゼ生産量の低下とよく相関していたことから、Asp279, Tyr289 および Asp293 はリパーゼの安定性と生産量の両方に重要であることがわかった。

3－2．Asp293 と Asp279 の変異リパーゼ

Asp293 と Asp279 は、Tyr289 よりもリパーゼの安定性に重要であり、側鎖に負電荷を持っている。したがって、これらの側鎖の負電荷がN末端ペプチドとイオン結合しているのではないかと推定した。そこで、Asp293 と Asp279 をさらに、Glu, Asn, および Lys に置換してその影響を調べた(108)。Table 5-3 に各変異株の培養上清中の酵素生産量と、変異リパーゼの熱安定性を示した。Asp293 を中性または正電荷をもつアミノ酸残基(Ala, Asn, Lys)に置換すると、リパーゼ生産量と熱安定性は大きく減少した。しかしながら、D293E リパーゼの熱安定性は少し低下したが、D293A, D293N, D293K リパーゼほどは低下しなかった。したがって、Asp293 の側鎖の負電荷が酵素の生産性と熱安定性に関与していると考えられる。この負電荷が、N末端ペプチド内にある未知の正電荷とイオン結合していると推定される。これに対して、Asp279 を Ala に置換し

たときは生産量と安定性が低下したが、Glu, Asn, Lys に置換しても生産量と安定性はあまり大きく低下しなかった。これらの事実は、Asp279 の側鎖は何らかの形で重要ではあるが、この側鎖の負電荷はあまり生産量と安定性に影響を及ぼしていないことを示唆している。

Asp279 または Asp293 を置換した各変異株の培養上清中のリパーゼ活性は、SDS-PAGE のバンドの濃さから推定したリパーゼ生産量と相関していることから、各変異リパーゼの比活性は R275A リパーゼのそれと変わっていない。また、各変異リパーゼの *K*m 値は R275A リパーゼと大きく違っていなかった(Table 5-3)。これらの結果より、Asp279 と Asp293 は酵素の触媒活性にはあまり影響を与えていないことを示している。

Table 5-3. Productivity, thermostability and *K*m value of lipases with mutated Asp279 and Asp293

Mutant lipase	Lipase production [a]	Thermostability		K_m [d]
		T_m [b]	ΔT_m [c]	
	(%)	(℃)	(℃)	(mM)
R275A	100	79.8		72
R275A / D293A	19	61.1	-18.7	57
R275A / D293E	76	69.9	-9.9	76
R275A / D293N	16	60.1	-19.7	67
R275A / D293K	9	58.2	-21.6	59
R275A / D279A	51	66.5	-13.3	39
R275A / D279E	102	77.9	-1.9	109
R275A / D279N	96	78.0	-1.8	116
R275A / D279K	89	75.7	-4.1	103

[a] Lipase productivity of each mutant is expressed relative to that of R275A mutant.

[b] The temperature at which heating for 30 min results in 50% decrease in activity.

[c] The difference between the T_m values of the mutant and R275A lipases.

[d] The K_m values of the purified lipases A and B were 75 and 61 mM, respectively.

3－3．欠失変異株

C末端ペプチドの側鎖と主鎖を含めたペプチド鎖の影響を調べるために、C末端側からの欠失変異株を作成した(108)。出来上がった変異リパーゼのC末端付近の構造をFig. 5-2 に示す。4残基までの欠失ではリパーゼの生産量に大きく影響しなかった(Table 5-4)。6残基以上を欠失させたとき、欠失サイズの増加とともに酵素生産量が次第に減少した。C末端ペプチド 26 残基を全て欠失させた変異株(Δ275)の生産量は、R275 株の 2.5%であった。各変異株のリパーゼ生産量は培養上清中のリパーゼ活性とよく相関していることから、各リパーゼの比活性はほぼ同一である。*K*m 値は R275A リパーゼと大きく変わらなかったことより、酵素活性は欠失により影響を受けないことが分かった。

欠失変異リパーゼの熱安定性を調べたところ、わずか2残基の欠失でも *T*m が 2.2℃低下した。さらに欠失サイズが増加するとともに *T*m が次第に減少し、*T*m は 13 残基以上の欠失で最低に達した(Table 5-4)。これに対して、Asp293 と Tyr289 を除いて、これらC末端側 13 アミノ酸残基のうちの1アミノ酸残基だけの側鎖を Ala に置換したときは、熱安定性は大きく低下していなかった(Table 5-1)。したがって、欠失変異リパーゼの安定性の減少は、次のような2つの可能性で説明できる：(i)C 末端側からのわずか2残基の欠失であっても、Asp293 または Tyr289 を主とする側鎖とN末端ペプチドとの間の相互作用が弱められる。(ii)側鎖と主鎖を含むC末端ペプチドのペプチド鎖全体（中でも特に、C末端側からの 13 残基）がN末端ペプチドと相互作用している。

Table 5-4. Productivity, thermostability and K_m value of lipases having different sizes of C-terminal deletion

Mutant lipase	Deletion size (residues)	Lipase production [a] (%)	Thermostability T_m [b] (℃)	Thermostability ΔT_m [c] (℃)	K_m (mM)
R275A	0	100	79.8		72
R275A / Δ299	2	97.6	77.6	-2.2	75
R275A / Δ297	4	95.8	73.4	-6.4	82
R275A / Δ295	6	75.0	65.3	-14.5	80
R275A / Δ293	8	35.0	64.1	-15.7	91
R275A / Δ290	11	15.7	63.0	-16.8	95
R275A / Δ288	13	12.5	60.1	-19.7	77
R275A / Δ282	19	9.4	60.5	-19.3	101
Δ275	26	2.5	60.2	-19.6	105

[a] Lipase productivity of each mutant is expressed relative to that of R275A mutant.

[b] The temperature at which heating for 30 min results in 50% decrease in activity.

[c] The difference between the T_m values of the mutant and R275A lipases.

第4節　考察

C末端ペプチド内アミノ酸残基の置換変異株と欠失変異株の解析によって、本リパーゼの安定性に関与している主な部位を推定した(108)。

(i)C末端ペプチド(26 アミノ酸残基)とN末端ペプチド(275 アミノ酸残基)との間のペプチド結合。

(ii)Asp293 の側鎖の負電荷と、N末端ペプチド内にあるアミノ酸残基の正電荷との間のイオン結合。

(iii)C末端側からの 13 アミノ酸残基からなるペプチド鎖。

この他に、Asp279 と Tyr289 の側鎖も重要であることがわかった。

また、今回作成した変異株で、リパーゼの熱安定性の低下した全ての変異株の酵素生産性は減少していた。各変異リパーゼの *Km* 値、比活性、分泌効率は変わっておらず、mRNA 量も変異前と同じであった。したがって、C末端ペプチドの機能が失われることによって酵素の高次構造が不安定になり、細胞内外のプロテアーゼによって酵素が分解されたために、培地中に見出される酵素量が減少したと推定される。

第5節　要約

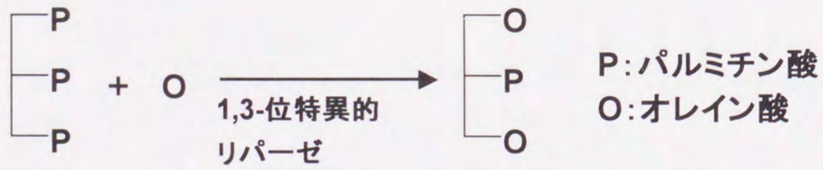
F. heterosporum のリパーゼは、275 残基のN末端ペプチドと、26 残基のC末端ペプチドで構成されている。C末端ペプチドの切断によって、リパーゼの熱安定性が大きく低下する(101)。そこで、酵素の安定性に関与しているC末端ペプチド内アミノ酸残基の特定を行った(108)。Asp293 を Ala, Asn, Lys に置換すると熱安定性が非常に低下するが、Glu に置換したときは、さほど顕著には安定性が低下しなかった。これらの事実より、Asp293 の側鎖の負電荷と、N末端ペプチド内にあるアミノ酸残基の正電荷との間でのイオン結合によって、リパーゼが安定化されていると推定される。

C末端側から欠失させると、欠失サイズの増加とともにリパーゼの安定性が低下した。13 残基を欠失させたリパーゼの安定性は、26 残基全てを欠失させたリパーゼの安定性と同レベルであった。したがってこの結果は、26 残基の中でも C 末端側からの 13 アミノ酸残基からなるペプチド鎖がリパーゼの安定性に重要であることを示唆している。さらに、熱安定性の低下した変異株のリパーゼ生産量も低下していたことから、Asp293 やC末端側 13 アミノ酸残基は酵素生産量に関与していることも分かった。

第６章　耐熱性 *F. heterosporum* リパーゼによる構造脂質の製造

第１節　緒言

母乳中には 20-25%のパルミチン酸(16:0)が含まれており、その約 70%はトリグリセリドの２位に結合している(109, 110)。これに対し、植物油ではパルミチン酸の 80%以上がトリグリセリドの 1,3 位に結合している。したがって植物油を摂取した場合、1,3 位に特異的な膵臓リパーゼによってトリグリセリド中のパルミチン酸が加水分解されてしまう。遊離したパルミチン酸はカルシウムと結合して不溶性のカルシウム石鹸を形成し、排泄物として排泄されるため、栄養分とカルシウムのロスとなる(111)。そこで、グリセロール骨格の 1,3 位にオレイン酸、2 位にパルミチン酸が結合した構造脂質（1,3-oleoyl- 2-palmitoyl- glycerol、以下 OPO と略す）は、栄養分とカルシウムのロスをなくすための油脂として期待されており(112)、ヨーロッパなどでは乳児用粉ミルクの成分として利用されている。この OPO は、固定化した 1,3 位特異的リパーゼを触媒とし、トリパルミチンとオレイン酸とのアシドリシスにより製造することができる。しかし、原料であるトリパルミチンの融点が高いために、OPO を有機溶媒を含まない反応系で製造するには高い温度で反応させなければならない。従来まで使用されている *Rhizomucor miehei* 由来の固定化リパーゼ Lipozyme IM60 は、高温下では不安定であるために、耐熱性の優れたリパーゼの開発が望まれている。



第１章から第５章までで、糸状菌 *F. heterosporum* のリパーゼの構造と安定性の関係を解明してきた。このリパーゼの Arg275 を Ala に置換した変異型遺伝子(R275A)をもつ *S. cerevisiae* はＣ末端ペプチドが切断されていないリパーゼのみを高発現したことから(101, 108)、元菌の *F. heterosporum* では生産されなかった安定性の極めて高いリパーゼ(R275A)を酵母で生産することができるようになった。そこで本章では、この安定性の高まった R275A リパーゼの工業的利用をめざし、本酵素の固定化条件の検討と、その固定化酵素を用いた OPO の製造をおこなった。また、高温下における固定化酵素の安定性を従来の酵素と比較した。

第２節　実験材料及び実験方法

２－１．試薬

Yeast nitrogen base w/o amino acids は(Difco, USA)より、オリーブ油、酵母エキスおよびポリペプトンは和光純薬(Osaka)より、スクロースは台糖㈱よりそれぞれ購入した。マグロ油由来の脂肪酸エチルエステルはマルハ㈱より供与されたものを使用した。オレイン酸は東京化成から購入したものを、トリパルミチンは東京化成から購入したものを用い、それぞれの脂肪酸組成を Table 6-1 に示した。

Table 6-1.　Fatty acid composition of tripalmitin and oleic acid (mol %)

	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	Other
Tripalmitin	1.99	89.23	7.76	0	0	1.02
Oleic acid	0	0	2.40	87.01	3.53	7.06

ケイソウ土粒担体は昭和化学工業より、陰イオン交換樹脂および多孔性樹脂 Dowex 66, Dowex WBA, Dowex 77, Dowex MWA は Dow Chemical 社より、Duolite A7, Duolite A568K, Duolite S874, Duolite S876, Duolite S877 は Rhom and Haas 社より、Amberlite IRA904, AmberliteIR96SB, AmberliteXAD はオルガノ㈱よりそれぞれ購入した。また、セラミック担体 Toyonite 200-M と Toyonite 200-A は東洋電化工業㈱より供与されたものを使用した。その他の試薬は、ナカライテスク(Kyoto)より購入した。

２－２．酵素の調製

F. heterosporum の野生型酵素は、第３章で作成した酵母 *S. cerevisiae* SH1089[pYGF2] 株 (84) を、R275A の酵素は第５章で使用した *S. cerevisiae* SH1089[pYGF2R275A]株(108)をそれぞれ培養することにより調製した。

酵母の前培養は、150 ml の最小培地 (6.7 mg/ml yeast nitrogen base w/o amino acids, 5 mg/ml グルコース, 20 μg/ml ウラシル, 20 μg/ml ヒスチジン, 20 μg/ml ロイシン, pH 5.8) を入れた 500 ml の坂口フラスコ中で、27℃、24 時間振とうしながらおこなった。本培養は、170 ml の YPSuc 培地 (3% 酵母エキス、1% ポリペプトン、4 % スクロース、pH 5.8)(84)を入れた 500 ml の坂口フラスコ中に前培養液を 2%加え、27℃、３日間振とうしながらおこなった。5000 ml の培養液を遠心分離して培養上清を回収した後、培養上清を 75%飽和の硫酸アンモニウムで硫安塩析した。遠心分離により回収した沈殿を少量の水で溶かし、透析膜中で２日間透析をして脱塩した。さらに、ポリエチレングリコール 20000 で濃縮して、粗酵素液とした。

なお、*R. delemar* の酵素は田辺製薬㈱から供与されたタリパーゼを *F. heterosporum* のリパーゼと同じ方法で固定化した。*Rhizomucor* (*R.*) *miehei* の酵素は Novo Nordisk 社より購入した固定化リパーゼ Lipozyme IM60 をそれぞれ使用した。

２－３．酵素の固定化

固定化担体１g 当たりの酵素量が 5000 U になるようにリパーゼの水溶液に担体を懸濁した後、減圧下で乾燥して固定化酵素を調整した。

２－４．反応

マグロ油由来のエチルエステルのラウリルアルコールによるアルコリシス反応は、脂肪酸エチル／ラウリルアルコールの混液(1:3, mol/mol)、および基質混液に対して 4%の固定化酵素をネジ蓋付きバイアル瓶に入れ、30℃で振とう（130 往復／分）しながら 16 時間インキュベートした。反応率はエチルエステルとラウリルエステルを合わせた量に対するラウリルエステル量を mol%で表した。

トリパルミチンのオレイン酸によるアシドリシス反応は、基質混液と固定化酵素をネジ蓋付きバイアル瓶に入れ、50℃で振とう（130 往復／分）しながらインキュベートした。反応率はグリセリド画分に取り込まれたオレイン酸量(mol%)で表した。

２－５．分析

脂肪酸エチルエステルをラウリルアルコールでアルコリシスした反応液中のエチルエステルとラウリルエステルは、反応後の試料を直接ガスクロマトグラフィーで分析した。ガスクロマトグラフィーは、Hewlett-Packard 5890 に DB-5 キャピラリーカラム（0.25 mm X 10 m, J&W Scientific Co.）を装着し、150 から 300℃まで 10℃/min で昇温させ、300℃で 10 分間保温した。注入口温度は 245℃で、検出には FID を用い、

検出温度は320℃とした。キャリヤーガスはヘリウム（流速25 cm/min）を用い、スプリット比は100:1とした。

トリパルミチンをオレイン酸でアシドリシスした反応液からのグリセリドの回収は、1-3 gの反応混液に50 mlの0.5N KOH(20%エタノール溶液)を加え、70 ml のヘキサンでグリセリドを回収した。グリセリド中に含まれている脂肪酸は、Na-メチラートを触媒としてメチル化した後、DB-23 キャピラリーカラム（0.25 mm X 30 m; J&W Scientific Co.）を用いたガスクロマトグラフィー（Hewlett-Packard 5890）により分析した。カラム温度は、150から170℃までは4℃/min、170から195℃までは5℃/min、195から215℃までは10℃/minで昇温させ、215℃で5分間保温した。注入口温度は245℃で、検出にはFIDを用い、検出温度は250℃とした。キャリヤーガスはヘリウム（流速25 cm/min）を用い、スプリット比は100:1とした。

高速液体クロマトグラフィーによる解析は、ODSカラム（Cosmosil 5C18-AR, 4.6 X 150 mm X 2）とLC-9Aポンプ（島津）、示差屈折計RID-10A（島津）を用いて、カラム温度40℃、溶媒アセトン／アセトニトリル = 3:1(vol/vol)、流速0.4 ml/minで分析した。

分子量の測定は、PE BiosystemsのMALDI-TOFMS（Voyager Linear DE-SY）を用いた。20 μlのα-cyano-4-hydroxycinnamic acid溶液（10 mg/ml 、50%アセトン水溶液）に試料1 μlを懸濁し、そのうち1 μlをマススペクトルで分析した。

第3節　結果

3－1．固定化担体の影響

F. heterosporum の耐熱性酵素R275Aの固定化に適する担体のスクリーニングを行った。はじめは、固定化酵素の活性測定が容易であるマグロ油由来のエチルエステルのラウリルアルコールによるアルコリシス反応で行った。担体1gに対してR275Aの酵素が5000 Uになるように酵素を固定化し、それぞれの固定化酵素のアルコリシス活性を測定した(Table 6-2)。

Table 6-2. Alcoholysis activity of *F. heterosporum* R275A lipase immobilized on various carriers

Carrier	Alcoholysis (%)	Carrier	Alcoholysis (%)
ケイソウ土粒担体	20.87	Dowex WBA	28.24
ベルファインBG10-1	5.93	Dowex 66	18.21
ベルファインAB10-04	1.01	Dowex 77	21.44
イソライトCG-1	19.95	Dowex MWA	28.58
アルプス	7.14	XUS-40285	8.30
SM-10	6.40	AmberliteIR96SB	21.21
Duolite A568K	8.17	Amberlite IRA904	33.41
Duolite A7	16.61	AmberliteXAD	4.70
Duolite S874	5.17	Toyonite 200-A	15.72
Duolite S876	28.38	Toyonite 200-M	26.97
Duolite S877	10.84		

Alcoholysis of ethyl esters originating from tuna oil with lauryl alcohol was performed as follows: A mixture of ethyl esters/lauryl alcohol (1:3, mlo/mol) and 4% immobilized lipase was incubated at 30℃ for 16 h.

次に、アルコリシス活性の高かった担体などを８種類選択し、トリパルミチンのオレイン酸によるアシドリシス反応を調べた(113)。トリパルミチンとオレイン酸のモル比を 1:2(wt/wt)、基質量 4 g、酵素量 8%で 50℃、24 時間反応を行い、24 時間ごとに基質を新しいものと交換して反応を繰り返した。なお、１回目の反応時にのみ 2%の水を加えて酵素の活性化を行った。

結果を Table 6-3 に示す。陰イオン交換樹脂 Duolite A7, Dowex WBA, Dowex 77, Dowex MWA, Amberlite IRA904 を担体として用いたとき、高いエステル交換活性を示した。この結果は、*R. delemar* のリパーゼの固定化担体に適する担体が陰イオン交換樹脂であったことと同じである(114)。反応を繰り返したとき、Amberlite IRA904 を担体にした固定化酵素は、６回目の反応が１回目の反応の約 64%にまで低下した。これに対し、Dowex WBA や Dowex MWA を担体にした固定化酵素は、６回目の反応でも高いエステル交換活性を維持していた。これは、*R. delemar* のリパーゼの固定化担体でみられた現象と同じである(114)。Dowex MWA よりも Dowex WBA の方がわずかに酵素活性が高かったので、今後は Dowex WBA を担体として用いることにした。

Table 6-3. Acidolysis activity of *F. heterosporum* R275A lipase immobilized on various carriers

Carrier	Acidolysis (%)			
	1 st	2 nd	3 rd	6 th
ケイソウ土粒	0.96	0.40	0	0
Duolite A7	45.75	46.58	46.18	36.18
Duolite S876	0.92	0.33	0.70	0.31
Dowex WBA	47.56	52.40	48.46	49.15
Dowex 77	46.35	44.80	43.08	41.75
Dowex MWA	47.17	50.30	48.43	48.24
Amberlite IRA904	45.10	40.19	41.33	28.74
Toyonite 200-M	1.84	0.33	0.93	0.43

A mixture of tripalmitin/oleic acid (1:2, w/w) and 8% immobilized lipase was incubated at 50℃ for 24 h with shaking. Acidolysis activity was expressed as the oleic acid content in glycerides.

３－２．反応条件の検討

我々はすでに、*R. delemar* のリパーゼをセラミック担体 SM-10 に固定化したとき、１回目の反応時にのみ水を添加して酵素を活性化しなければならないことを報告している(12)。そこで、*F. heterosporum* の R275A リパーゼを Dowex WBA に固定化したときの最適な水分量（一回目の反応時にのみに水を入れた）を調べた(113)。

Table 6-4 に結果を示す。*R. delemar* のリパーゼを SM-10 に固定化したときとは違い、水分量０％でもエステル交換活性を示したが、２％の水分を添加したときの活性が最も高かったことから、水によって若干の酵素の活性化が起きていると推定される。２回目以降の反応では水を入れなかったが、４％以下の水分量では反応性の低下はみられなかった。しかし水分量が８％の時、２回目の反応以降で活性が大きく低下している。これは、過剰の水によって酵素が担体から遊離したためと考えられる。

Table 6-4. Effect of the water content on the acidolysis activity of immobilized R275A lipase.

Water content	Acidolysis (%)			
	1 st	2 nd	3 rd	4 th
0 %	31.70	32.65	32.43	30.29
1 %	46.81	48.86	47.66	46.08
2 %	48.65	50.18	51.60	49.54
4 %	43.36	46.32	49.36	46.20
8 %	39.52	26.47	21.97	22.52

A mixture of tripalmitin/oleic acid (1:2, w/w) and 8% immobilized lipase was incubated at 50℃ for 24 h with shaking. Acidolysis activity was expressed as the oleic acid content in glycerides.

次に、酵素量の影響について調べた(Fig. 6-1)。基質混液に対して固定化酵素量が2-8%の時、酵素量の増加とともに反応初期である3時間目での反応性が増加し、2%増えるごとに反応性が約2倍になっていたことから、6%以下では反応性が少し悪いと考えられる。したがって、8%以上の酵素濃度が必要であるとした。

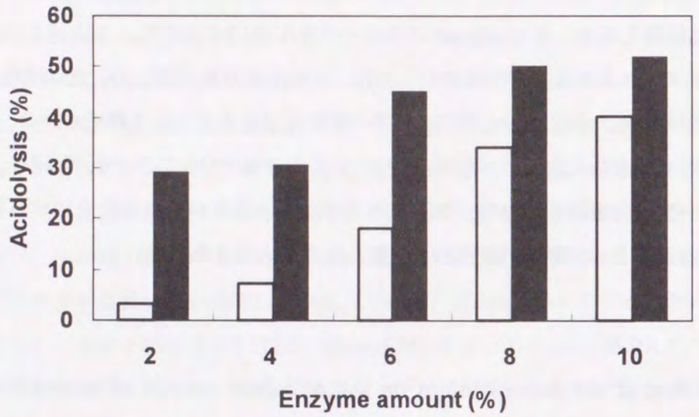


Fig. 6-1. Effect of enzyme amount on the acidolysis activity of immobilized R275A lipase. A mixture of tripalmitin/oleic acid (1:2, w/w) and various amounts of the immobilized lipase was incubated at 50℃ for 3 h(open box) or 24 h(closed bux) with shaking. Acidolysis activity was expressed as the oleic acid content in glycerides.

3－3．反応の経時変化

固定化担体と反応条件の検討の結果、*F. heterosporum* の R275A リパーゼを Dowex WBA に固定化し(5000 U/g-担体)、トリパルミチンとオレイン酸のモル比を 1:2(wt/wt)、固定化酵素量を基質混液に対して 8%とし、50℃、24 時間反応を行うことに決定した。なお酵素の活性化は、1 回目の反応時にのみ基質混液に対して 2%の水を加えて行った。この反応条件下において、グリセリド画分の脂肪酸組成の経時変化を Fig. 6-2 に示す(113)。反応開始から 6 時間目までは急激にパルミチン酸(16:0)が減少してオレイン酸(18:1)が取り込まれ、その後徐々に 18:1 の取り込み速度が減少し、24 時間後にほぼ平衡に達した。この時のオレイン酸取り込み量は約 50 mol%であり、1,3-位の脂肪酸の約 75%がエステル交換されたことになる。

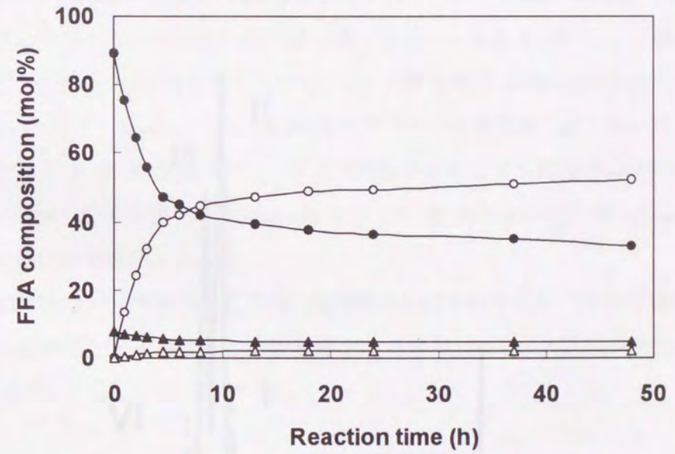


Fig. 6-2. Time course of acidolysis of tripalmitin with oleic acid using immobilized R275A lipase. A mixture of tripalmitin/oleic acid (1:2, w/w) and 8% immobilized lipase was incubated at 50℃. Acidolysis activity was expressed as the oleic acid content in glycerides. ●, 16:0 ; ▲, 18:0 ; ○, 18:1 ; △, 18:2 .

3－4．生成物の分析

トリパルミチンのオレイン酸によるアシドリシス反応によって生成したグリセリド画分をHPLCで分析した(Fig. 6-3)(113)。各ピークを分取し、その脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで調べた。その結果、ピークIIが目的のOPOであり、ピークIはオレイン酸が3つ入ったOOO、ピークIIIはオレイン酸が1つ入ったOPP、ピークIVが未反応のトリパルミチン(PPP)であった。また、これらのピークの比は、I: II: III: IV = 8:40:29:6であった。なお、IVより後ろのピークはトリパルミチンに混在している18:0が入ったグリセリド、Iより前のピークはオレイン酸に混在している18:2などが入ったグリセリドであり、13分のピークはジグリセリドである。次に、精製したOPOの分子量を飛行時間型レーザーマススペクトルで調べた。Na^+でイオン化された$[M+Na]^+$ピーク、分子量 882.55(理論値:882.40)が観測された。これらの結果は、生成したグリセリドがOPOであることを支持している。なお、反応液中にOOOが存在している理由としては、混在しているジグリセリドの2位と1,3位間でのアシル基転移に由来すると推定される。

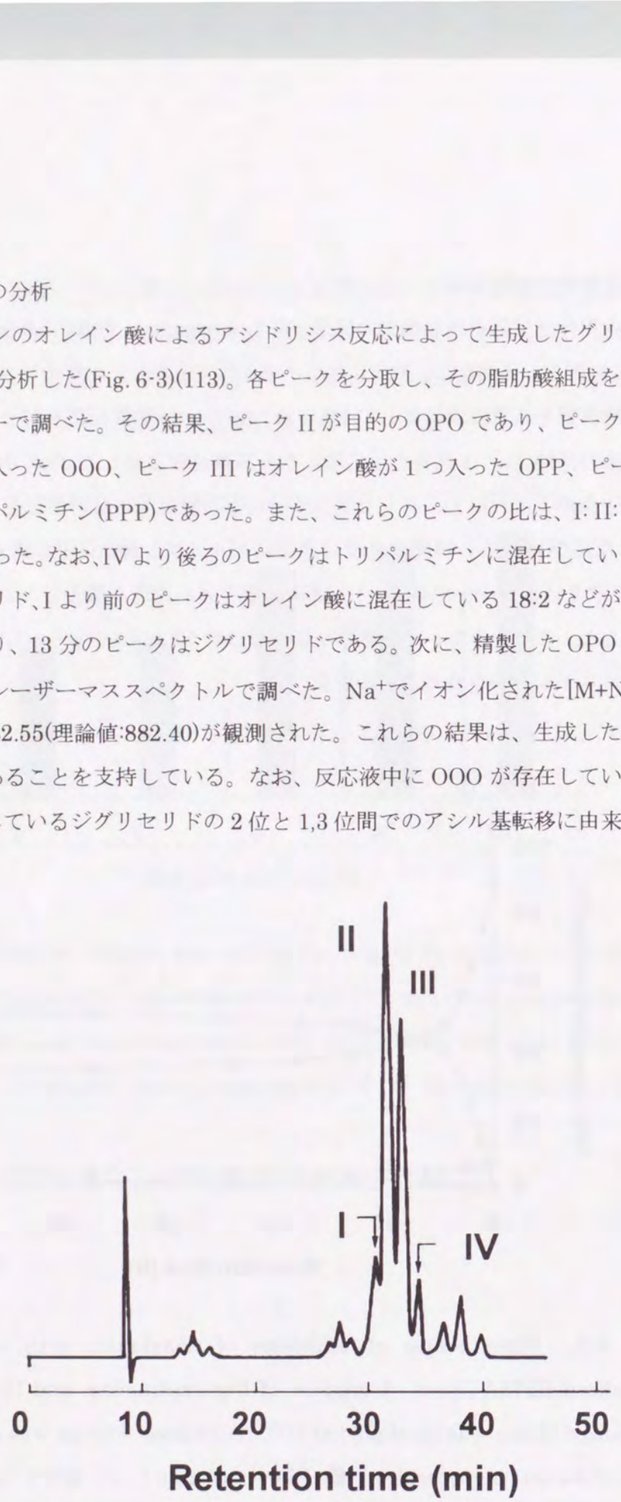


Fig. 6-3. HPLC analysis of the acidolysis products of tripalmitin with oleic acid using immobilized R275A lipase.

3－5．固定化酵素の安定性と他の酵素との比較

安定性の高い*F. heterosporum*のR275Aリパーゼの他に、野生型*F. heterosporum*リパーゼ、*R. delemar*のリパーゼ、および*R. miehei*のリパーゼを用いて、トリパルミチンのオレイン酸によるアシドリシス反応の安定性比較を行った(113)。R275Aリパーゼ、野生型*F. heterosporum*リパーゼ、および*R. delemar*のリパーゼはDowex WBAに固定化(5000 U/g·担体)した酵素を、*R. miehei*の酵素はNovo Nordisk社より購入した固定化リパーゼLipozyme IM60をそれぞれ用いた。また、反応速度がほぼ同じ程度になる酵素量を調べ、R275Aリパーゼは基質混液に対して8%、それ以外の酵素は6%で行った。3－4．に記載した反応条件で50℃、24時間反応後、基質混液を新しい基質と交換し、反応を繰り返した。毎回の反応時、3時間と24時間後に基質混液をサンプリングし、グリセリド中に取り込まれたオレイン酸量をアシドリシス活性とした。

初期反応である3時間後のアシドリシス活性を、1回目の活性を100%とした相対活性で比較した(Fig. 6-4)。従来までOPOの製造に用いられてきた*R. miehei*のリパーゼは、80日で活性が1回目の反応の35%まで低下するのに対して、R275Aのリパーゼでは80日後でも87%の活性を保持していた。また、野生型*F. heterosporum*リパーゼや*R. delemar*のリパーゼと比べても、R275Aのリパーゼの安定性は優れていた。反応がほぼ平衡に達する 24 時間後のアシドリシス活性を比較しても同様の結果が見られ、R275Aリパーゼ、野生型*F. heterosporum*リパーゼ、*R. delemar*のリパーゼ、*R. miehei*リパーゼの順に安定性が高かった。

次に、R275Aリパーゼを用いてさらに長期間の反応を繰り返し、24時間後のアシドリシス活性を調べた(Fig. 6-5)。この酵素を220日使用しても、エステル交換率が1回目の88%までしか低下していなかった。

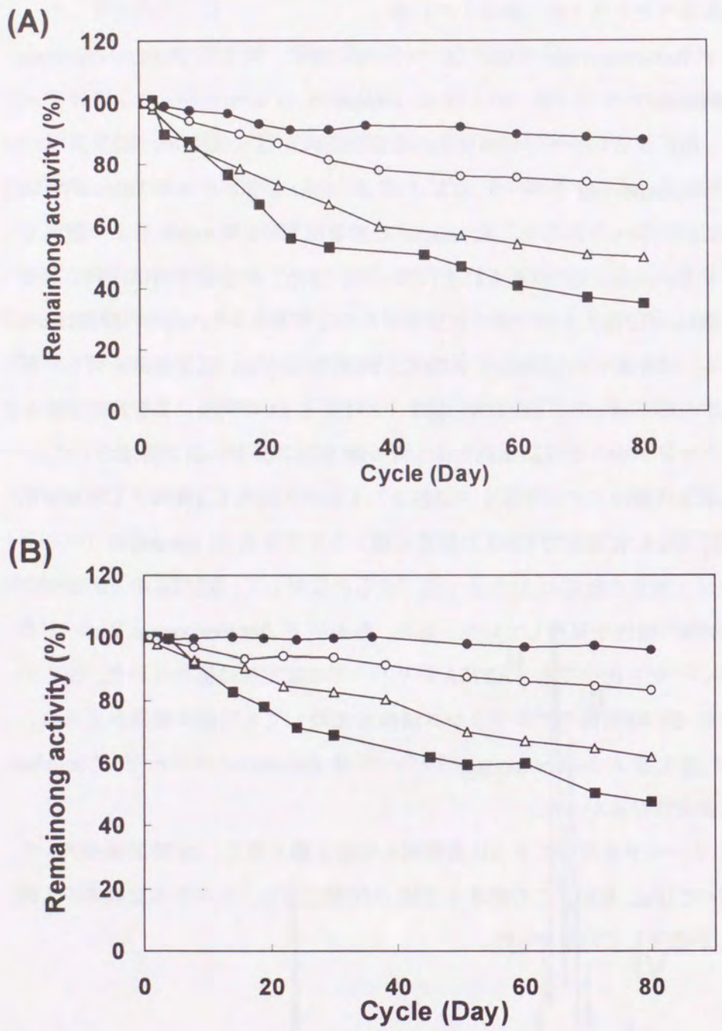


Fig. 6-4. Stability of various immobilized lipases in acidolysis of tripalmitin with oleic acid. The acidolysis was conducted under the conditions described in Fig. 6-2, and repeated by transferring the immobilized lipase to a fresh substrate mixture every 24 h. (A) Activity of immobilized lipase after 3-h reaction; (B) after 24-h reaction. ●, *F. heterosporum* R275A lipase; ○, *F. heterosporum* wild lipase; △, *R. delemar* lipase; ■, Lipozyme IM60.

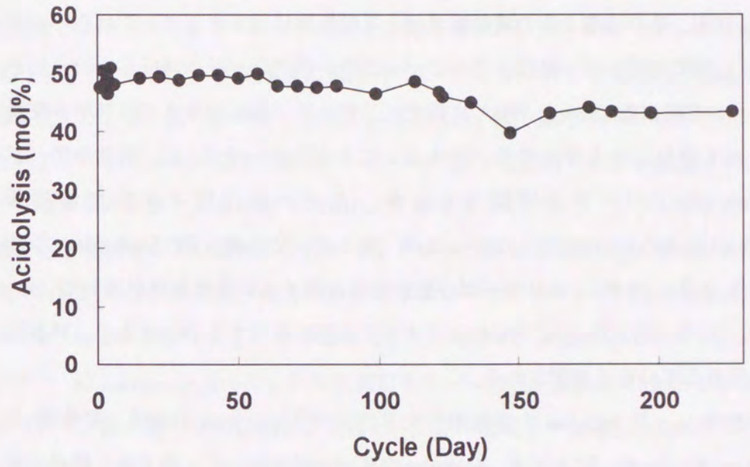


Fig. 6-5. Stability of immobilized R275A lipase in acidolysis of tripalmitin with oleic acid. The acidolysis was conducted under the conditions described in Fig. 6-2, and repeated by transferring the immobilized lipase to a fresh substrate mixture every 24 h. Acidolysis activity was expressed as the oleic acid content in glycerides.

第4節　考察

F. heterosporum の生産するリパーゼよりも安定性の高い R275A リパーゼを酵母で生産し(101, 108)、その培養上清の濃縮酵素液を各種担体に固定化した。これらの固定化酵素を用い、50℃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たところ、陰イオン交換樹脂 Dowex WBA に固定化したとき、最も効率よくエステル交換され、繰り返し使用しても活性の低下が少ないことがわかった(113)。第3章で、*F. heterosporum* のリパーゼを精製するとき、リパーゼは陰イオン交換樹脂 DEAE-Sephadex A-50 には吸着しなかったが、陽イオン交換樹脂 SP-Sephadex C-50 には吸着した。しかしながら、本リパーゼの固定化には陰イオン交換樹脂が適していた。したがって、リパーゼは Dowex WBA のイオン交換基に吸着するのではなく、担体に疎水結合で吸着していると推定される。

本固定化酵素と、*R. miehei* の市販固定化リパーゼ(Lipozyme IM60)、野生型 *F. heterosporum* リパーゼ、および *R. delemar* のリパーゼを用いて、繰り返し使用による安定性を比較したところ、R275A リパーゼ、野生型 *F. heterosporum* リパーゼ、*R. delemar* のリパーゼ、*R. miehei* リパーゼの順に安定性が高かった(113)。Lipozyme IM60 の活性の半減期は約 45 日であった。これに対して、R275A のリパーゼでは 220 日使用しても活性が1回目の 88%までしか低下しない。Fig. 6-4.のグラフを延長して計算したところ、活性の半減期は約 370 日であると推定された。また、野生型 *F. heterosporum* リパーゼと *R. delemar* の固定化リパーゼの半減期はそれぞれ約 150, 65 日であると推定された。

リパーゼの位置特異性は、トリグリセリドの全てを加水分解する非特異的リパーゼと、1,3-位のみを加水分解する 1,3-位特異的リパーゼに大別される。前者の非特異的リパーゼの中には耐熱性のリパーゼも多く存在している。しかしながら、構造脂質の製造に有効である 1,3-位特異的リパーゼには、これまで安定性の高い固定化リパーゼが存在していなかった。本研究で、安定性の高いリパーゼを生産する *F. heterosporum* の単離、遺伝子操作による安定性向上、および固定化に適する担体の検索によって、高温下で長期間の繰り返し使用が可能な 1,3-位特異的固定化リパーゼを創製することができた。今後、高い温度での本リパーゼの工業的利用が期待される。

第5節　要約

F. heterosporum は 1,3-位特異的リパーゼを生産する。この cDNA に変異を加えて安定性を高めた R275A リパーゼの固定化条件を調べた(113)。50℃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たところ、陰イオン交換樹脂 Dowex WBA に固定化したとき、最も効率よくエステル交換され、繰り返し使用しても活性の低下が少ないことがわかった。反応に及ぼすいくつかの因子を検討した結果を基に、トリパルミチンとオレイン酸の混合比を 1:2(wt/wt)、酵素量 8%とした。この条件下で 24 時間反応を行うと、オレイン酸のトリグリセリド中への取り込み量は約 50%に達した。反応液から回収したグリセリド画分を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ、最大ピークが OPO であることが確認できた。つぎに、従来このような反応に利用されてきた *Rhizomucor miehei* の市販固定化リパーゼ(Lipozyme IM60)と本固定化酵素を用いて、繰り返し使用による安定性を、反応の初期（3時間後）のエステル交換率で比較した。Lipozyme IM60 は 80 日で活性が1回目の反応の 35%まで低下するのに対して、R275A のリパーゼでは 80 日後でも 87%の活性を保持していた。食品添加物として使用されている *Rhizopus delemar* のリパーゼを Dowex WBA に固定化した酵素と比較しても、R275A の固定化リパーゼは安定性に優れていた。また、本固定化酵素は 220 日以上使用しても、エステル交換反応が平衡に達する 24 時間後の活性が1回目の反応の 88%までしか低下していなかった。

総括

土壌から、有機溶媒に安定なリパーゼを生産する微生物を単離し(52)、胞子の形状などから、糸状菌 *Fusarium heterosporum* と同定した(53)。この *F. heterosporum* を 3% 大豆油、4%コーンスティープリカー、0.1%酵母エキス、0.1%KH_2PO_4、0.05%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ からなる培地(pH 5.5)で培養し、その培養上清から硫安分画、SP-Sephadex C-50、Sephadex G-75、および焦点電気泳動により、収率 38%、Disc-PAGE および SDS-PAGE で単一になるまで精製した(53)。SDS-PAGE で調べた精製酵素の分子量は 31 kDa のモノマー酵素で、等電点は 7.0 であった。オリーブ油を基質としたとき、40℃における至適 pH は 5.5-6.0、pH 5.6 における至適温度は 45-50℃であった。pH 4-10 においては、30℃、4時間安定であり、また pH 7.5 のリン酸緩衝液中では、40℃で 20 分間安定であった。DMSO、*n*-hexane、benzene、ether などの有機溶媒が 50%存在しても、30℃、20 時間安定であった。また、反応系に 50%の DMSO や DMF が存在しても、活性の減少は認められなかった。各種阻害剤の影響から、His および Asp/Glu 残基が酵素活性に重要であるこが示唆された。N末端アミノ酸配列は、Ala-Val-Thr-Val-Thr-Gln-Asp……であり、他の蛋白質との相同性はなかった。

次に、*F. heterosporum* のリパーゼの cDNA のクローニングをおこなった(78)。*F. heterosporum* の細胞から poly(A)$^+$RNA を抽出し、Okayama-Berg 法で cDNA ライブラリーを作成した。酵素のN末端アミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドプローブを用い、コロニーハイブリダイゼーションにより cDNA ライブラリーからリパーゼの cDNA をクローニングした。この cDNA は 1.3 kbp の挿入断片を持ち、塩基配列を調べたところ、999 bp のオープンリーディングフレームが存在していた。塩基配列から推定したアミノ酸配列には、エドマン分解で決定したN末端アミノ酸配列が含まれており、リパーゼ、エステラーゼ、セリンプロテアーゼに見出される共通配列(Gly－X－Ser－X－Gly)も存在していた。32 アミノ酸残基のシグナル配列またはプロ配列と推定される配列に続いて、成熟リパーゼは 301 アミノ酸残基(32.7 kDa)で構成されていた。

このリパーゼは、アミノ酸配列上で *H. lanuginosa* のリパーゼと 39%、*P. camembertii* のモノおよびジグリセリドリパーゼと 38%、*R. miehei*、*R. delemar*、*R. niveus* のリパーゼといずれも 32%のホモロジーがあった。また本リパーゼは、他の相同性のあるリパーゼに比べて、C末端側が約 34 アミノ酸残基長かった。すでに報告

されている *R. miehei* のリパーゼの立体構造から、*F. heterosporum* のリパーゼの構造を推定した。活性中心は Ser144, Asp198, His256 の3つのアミノ酸残基で構成され、基質が加水分解される際の中間体を安定化するオキシアニオンホールには Ser82 が関与していた。native の酵素では、活性中心の上を 85 から 91 番目のアミノ酸残基からなるαヘリックス、「リッド」が覆っていて、活性中心が溶媒と接触できない。しかし、酵素が基質に接近するとこのリッドが除去され、基質が活性中心に入り込むことが可能になることがわかった。

S. cerevisiae の *GAP* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase をコードする遺伝子)のプロモーターとターミネーターの間に、*F. heterosporum* のリパーゼ cDNA (シグナル配列、プロ配列および成熟リパーゼ配列を含む)を連結した発現プラスミドを構築した(84)。この発現プラスミドで5種類の *S. cerevisiae* 株を形質転換し、YPD 培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース)で形質転換体を培養したところ、発現量は異なっていたが、いずれも菌体外にリパーゼを分泌していた。これらの中で、最も生産量の多い SH2041[pYGF2] 株を選択し、培地組成の改良でリパーゼ生産量の増加を行った。3%酵母エキス、1%ペプトン、4%スクロースからなる培地の時に最も効率よくリパーゼが生産され、生産量は 78 U/ml、39 μg/ml であった。この酵母によって生産されたリパーゼを DEAE-Sephadex A-50 イオン交換クロマトグラフィー、Sephadex G-75 ゲル濾過クロマトグラフィー、および SP-Sephadex C-50 イオン交換クロマトグラフィーで精製した。最終の精製段階で、活性のある2つの成分が見出された。1つの成分は、31 kDa の単一タンパクで、もう一つの成分は 34-38 kDa の複数のタンパクを含んでいた。ここで、前者をリパーゼA、後者をリパーゼBと命名した。リパーゼAは、*F. heterosporum* から精製されたリパーゼと分子量、酵素的性質が同じであった。

両リパーゼの至適温度は同じであるにもかかわらず、リパーゼBは、リパーゼAよりも非常に熱安定性に優れていた(101)。リパーゼBは一本のポリペプチド鎖(301 アミノ酸残基)であったが、リパーゼAはトリプシン様のプロテアーゼによって Arg275 と Asp276 の間のペプチド結合が切断された結果、二本のポリペプチド鎖(275 アミノ酸残基のN末端ペプチドと 26 アミノ酸残基のC末端ペプチド)で構成されていた。したがって、26 残基のC末端ペプチドがペプチド結合で 275 残基のN末端ペプチドに結合しているとき、C末端ペプチドがリパーゼの構造を安定化していることがわかった。C末端ペプチドが切断されると、たとえそれが非共有結合でN末端ペプチドと相互作用してい

ても、リパーゼBの強固な構造は失われ、安定性が大きく低下した。C末端ペプチド内には荷電したアミノ酸残基が多いので、これらの荷電アミノ酸残基が酵素の構造安定化に重要な役割を果たしていると推定される。26 残基のC末端ペプチドを欠失させた遺伝子を保持した *S. cerevisiae* は、リパーゼをほとんど生産しなかった。しかしながら、この変異株の mRNA 量は野生株と変わらなかったことから、C末端ペプチドは翻訳以降の過程でリパーゼの生産に関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、*F. heterosporum* のリパーゼの生産機構を推定した。*F. heterosporum* の菌体内では、まず初めに 333 アミノ酸残基からなるプレプロリパーゼとして発現した後、16 残基のシグナル配列、および 16 残基のプロ配列と推定される配列が切断されて 301 残基のリパーゼBが生成する。続いて、菌体内外でトリプシン様のプロテアーゼによって Arg275 と Asp276 の間のペプチド結合が切断されたリパーゼAを培地中に放出する。この切断は完全であるために、*F. heterosporum* の培養上清中には安定なリパーゼBが見出されない。*F. heterosporum* の cDNA を保持した *S. cerevisiae* [pYGF2] でも同様な機構でリパーゼが生産されるが、C末端ペプチドの切断が不完全であるために、培養上清中にはリパーゼAとBの混合物が存在する。Arg275 を Ala に置換した変異遺伝子を持つ *S. cerevisiae* [pYGF2R275A] は、安定性の高いリパーゼのみを生産する。したがって、*S. cerevisiae* [pYGF2R275A] を培養することにより、元菌の生産するリパーゼより安定性を飛躍的に向上させたリパーゼを生産することができた。また、*F. heterosporum* は植物病原菌に属するために、本リパーゼを食品添加物に利用しにくいが、酵母は安全な宿主であるために、*S. cerevisiae* [pYGF2R275A]の生産したリパーゼの工業的利用が期待できる。

F. heterosporum のリパーゼと相同性のある *R. oryzae* のリパーゼは、N末端側に 97 アミノ酸残基のプロ配列を持っている。これに対し、*F. heterosporum* のリパーゼにはプロ配列が 16 残基しかなく、代わりに *F. heterosporum* のリパーゼのC末端側は *R. oryzae* のリパーゼよりも 34 アミノ酸残基長い。*F. heterosporum* のリパーゼのC末端ペプチド(26 アミノ酸残基)と、*R. oryzae* のリパーゼのプロ配列(97 アミノ酸残基)は同じ機能を持っており、酵素の安定性と生産量に関与していることが示唆された。

次に、酵素の安定性に関与しているC末端ペプチド内アミノ酸残基の特定を行った(108)。Asp293 を Ala, Asn, Lys に置換すると熱安定性が非常に低下するが、Glu に置換したときは、さほど顕著には安定性が低下しなかった。これらの事実より、Asp293

の側鎖の負電荷と、N末端ペプチド内にあるアミノ酸残基の正電荷との間でのイオン結合によって、リパーゼが安定化されていると推定される。C末端側から欠失させると、欠失サイズの増加とともにリパーゼの安定性が低下した。13 残基を欠失させたリパーゼの安定性は、26 残基全てを欠失させたリパーゼの安定性と同レベルであった。したがって、26 残基のうち C 末端側からの 13 アミノ酸残基からなるペプチド鎖がリパーゼの安定性に特に重要であることを示唆している。さらに、熱安定性の低下した変異株のリパーゼ生産量も低下していたことから、Asp293 や C 末端側 13 アミノ酸残基は酵素生産量に関与していることも分かった。

最後に、安定性を高めた R275A リパーゼの工業的利用を目指した(113)。まず、このリパーゼの固定化条件を調べた。50℃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たところ、陰イオン交換樹脂 Dowex WBA に固定化したとき、最も効率よくエステル交換され、繰り返し使用しても活性の低下が少ないことがわかった。反応に及ぼすいくつかの因子を検討した結果を基に、トリパルミチンとオレイン酸の混合比を 1:2(wt/wt)、酵素量 8%とした。この条件下で 24 時間反応を行うと、オレイン酸のトリグリセリド中への取り込み量は約 50%に達した。反応液から回収したグリセリド画分を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ、最大ピークが OPO であることが確認できた。つぎに、従来このような反応に利用されてきた *R. miehei* の市販固定化リパーゼ(Lipozyme IM60)と本固定化酵素を用いて、繰り返し使用による安定性を、反応の初期（3時間後）のエステル交換率で比較した。Lipozyme IM60 は 80 日で活性が 1 回目の反応の 35%まで低下するのに対して、R275A のリパーゼでは 80 日後でも 87%の活性を保持していた。食品添加物として使用されている *R. delemar* のリパーゼを Dowex WBA に固定化した酵素と比較しても、R275A の固定化リパーゼは安定性に優れていた。また、本固定化酵素は 220 日以上使用しても、エステル交換反応が平衡に達する 24 時間後の活性が 1 回目の反応の 88%までしか低下しておらず、活性の半減期が約 370 日と推定された。

以上のように、本研究によって、遺伝子操作で安定性を高めた 1,3 位特異的リパーゼの生産に成功し、リパーゼの構造と安定性の関係が解明された。また、この安定なリパーゼを使った高温下での油脂の高度加工も可能であることが実証され、今後の工業的利用が期待される。

引用文献

1. **Zaks, A. and Klibanov, A. M.**: Enzymic catalysis in organic media at 100℃. Science, **224**, 1249-1251 (1984).
2. **Yamane, T.**: Enzyme technology for the lipids industry. J. Am. Oil. Chem. Soc., **64**, 1657-1662 (1987).
3. **Jones, J.B.**: Enzymes in organic synthesis. Tetrahedron, **42**, 3351-3403 (1986).
4. **Klibanov, A.M.**: Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. Acc. Chem. Res., **23**, 114-120 (1990).
5. **Fukusaki, E., Senda, S., Nakazono, Y., and Omata, T.**: Lipase-catalyzed kinetic resolution of methyl 4-hydroxy-5-tetradecynoate and its application to a facile synthesis of Japanese beetle pheromone. Tetrahedron, **47**, 6223-6230 (1991).
6. **Matsumae, H., Furui, M., Shibatani, T., and Tosa, T.**: Production of optically active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from *Serratia marcescens* on a hollow-fiber membrane reactor. J. Ferment. Bioeng., **78**, 59-63 (1994).
7. **Macrae, A. R.**: Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. J. Am. Oil. Chem. Soc., **60**, 291-294 (1983).
8. **McNeill, G. P. and Yamane, T.**: Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. J. Am. Oil. Chem. Soc., **68**, 6-10 (1991).
9. **Shimada, Y., Maruyama, K., Okazaki, S., Nakamura, M., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. J. Am. Oil. Chem. Soc., **71**, 951-954 (1994).
10. **Foglia, T. A. and Sonnet, P. E.**: Fatty acid selectivity of lipases: γ-linolenic acid from borage oil. J. Am. Oil. Chem. Soc., **72**, 417-420 (1995).
11. **Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, K., Nagao, T., Nakayama, S., Nakano, H., and Tominaga., Y.**: Enrichment of arachidonic acid: selective hydrolysis of a single-cell oil from *Mortierella* with *Candida cyrindracea* lipase. J. Am. Oil. Chem. Soc., **72**, 1323-1327 (1995).
12. **Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, K., Nagao, T., Nakayama, S., Nakano, H., and Tominaga., Y.**: Production of structured lipid containing docosa- hexaenoic and caprylic acid using immobilized *Rhizopus delemar* lipase. J. Ferment. Bioeng., **81**, 299-303 (1996).
13. **Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Kuramoto, T., Nagao, T., Gemba, M., and Tominaga, Y.**: Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acid from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. J. Am. Oil. Chem. Soc., **74**, 97-101 (1997).
14. **Shimada, Y., Sugihara, A., Yodono, S., Nagao, T., Maruyama, K., Nakano, H., Komemushi, S., and Tominaga, Y.**: Enrichment of ethly docosahexaenate by selective alcoholysis with immobilized *Rhizopus delemar* lipase. J. Ferment. Bioeng., **84**, 138-143 (1997).
15. **Shimada, Y., Sugihara, A., Shibahiraki, M., Fujita, H., Nakano, H., Nagao, T., Terai, T., and Tominaga, Y.**: Purification of γ-lionlenic acid from borage oil by a two-step enzymatic method. J. Am. Oil. Chem. Soc., **74**, 1465-1470 (1997).
16. **Shimada, Y., Nagao, T., Hamasaki, Y., Akimoto, K., Sugihara, A., Fujikawa, S., Komemushi, S., and Tominaga, Y.**: Enzymatic synthesis of structured lipid containing arachidonic and palmitic acids. J. Am. Oil. Chem. Soc., **77**, 89-93 (2000).
17. **Lee, C.Y., and Iandolo, J.**: Mechanism of bacteriophage conversion of lipase activity in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., **164**, 288-293 (1985).
18. **Lee, C.Y., and Iandolo, J.**: Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene. J. Bacteriol., **166**, 385-391 (1986).
19. **Gotz, F., Popp, F., Korn, E., and Schleifer, K.H.**: Complete nucleotide sequence of the lipase from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. Nucleic Acid Res., **13**, 5898-5906 (1985).
20. **Jorgensen, S., Skov, K.W., and Diderichsen, B.**: Cloning, sequence, and expression of the lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. J. Bacteriol., **173**, 559-567 (1991).
21. **Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C., and Winkler, U.K.**: Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Ganeral microbiology, **138**, 1325-1335 (1992).
22. **Frenken, L.G.J., Egmond, M.R., Batenburg, A.M., Bos, J.W., Visser, C., and Verrips, C.T.**: Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site

residues. Appl. Environ. Microbiol., 58, 3787-3791 (1992).

23. Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y., and Takagi, Y.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. Biochem. Biophys. Res. Commum., 141, 185-190 (1986).

24. Aoyama, S., Yoshida, N., and Inouye, S.: Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*. FEBS Lett., 242, 36-40 (1988).

25. Iizumi, T., Nakamura, K., and Fukase, T.: Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agric. Biol. Chem., 54, 1253-1258 (1990).

26. Iizumi, T., Nakamura, K., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., and Fukase, T.: Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator gene from *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agric. Biol. Chem. 55, 2349-2357 (1991).

27. Iizumi, T. and Fukase, T.: Role of the gene encoding lipase activator from *Pseudomonas* sp. strain KWI-56 in *in vitro* activation of lipase. Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1023-1027 (1994).

28. Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T., and Yamada, Y.: Purification, characterization, and molecular cloning lactonizing lipase from *Pseudomonas* species. J. Biol. Chem., 266, 18135-18140 (1991).

29. Ihara, F., Okamoto, I., Nihira, T., and Yamada, Y.: Requirement in *trans* of the downstream *limL* gene for activation of lactonizing lipase from *Pseudomonas* sp. 109. J. Ferment. Bioeng., 73, 337-342 (1992).

30. Chung, G.H., Lee, Y.P., Jeohn, G.H., Yoo, O.J., and Rhee, J.S.: Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. Agric. Biol. Chem., 55, 2359-2365 (1991).

31. Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K., Komatsubara, S., Shibatani, T., and Tosa, T.: The *lipA* gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. J. Bacterio., 176, 1949-1956 (1994).

32. Dartois, V., Baulard, A., Schanck, K., and Colson, C.: Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168, B.B.A., 1131, 253-260 (1992).

33. Kawaguchi, Y., Honda, H., Morimura, J.T., and Iwasaki, S.: The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. Nature, 341, 164-166 (1989).

34. Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Iizumi, T., and Tsunasawa, S.: cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase. J. Biochem., 106, 383-388 (1989).

35. Shimada, Y., Sugihara, A., Iizumi, T., and Tominaga, Y.: cDNA cloning and characterization of *Geotrichum candidum* lipase II. J. Biochem., 107, 703-707 (1990).

36. Shimada, Y., Sugihara, A., Nagao, T., and Tominaga, Y.: Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. J. Ferment. Bioeng., 74, 77-80 (1992).

37. Nagao, T., Shimada, Y., Sugihata, A., and Tominaga, Y.: Cloning and sequencing of two chromosomal lipase gene from *Geotrichum candidum*. J. Biochem, 113, 776-780 (1993).

38. Sugihara, A., Shimada, Y., Nakamura, M., Nagao, T., and Tominaga, Y.: Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipase. Protein Engineering, 7, 585-588 (1994).

39. Haas, M.J., Allen, J., and Berka, T.R.: Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. Gene, 109, 107-113 (1991).

40. Joerger, R. D. and Haas, M. J.: Overexpression of a *Rhizopus delemar* lipase gene in *Escherichia coli*. Lipids, 28, 81-88 (1993).

41. Boel, E., Huge-Jensen, B., Christensen, M., Thim, L., and Fill, N.P.: *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. Lipids, 23, 701-706 (1988).

42. Huge-Jensen, B., Andreasen, F., Christensen, T., Christensen, M., Thim, L., and Boel, E.: *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*. Lipids, 24, 781-785 (1989).

43. Boel, E. and Huge-Jensen, B.: Manufacture of *Humicola lanuginosa* lipase by recombinant Aspergillus. Eur. Patent 0,305,216,A1 (1989).

44. Yamaguchi, S., Mase, T., and Takeuchi, K.: Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150. Gene, 103, 61-67 (1991).

45. Yamaguchi, S., Mase, T., and Takeuchi, K.: Secretion of mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii* U-150 by *Saccharomyces cerevisiae* and site-directed mutagenesis of the putative catalytic sites of the lipase. Biosci. Biotech. Biochem., 56,

315-319 (1992).

46. **Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Microbial lipase: Structure and production in Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications, p. 359-371. *In* Murooka, Y. and Imanaka, T. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York (1994).
47. 島田、杉原、富永: リパーゼを用いた高度不飽和脂肪酸含有油の高度加工, 油脂, **50**, 66-70 (1997).
48. **Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Yokota, T., Nagao, T., Komemushi, S., and Tominaga, Y.**: Production of structured lipid containing essential fatty acid by immobilized *Rhizopus delemar* lipase. J. Am. Oil. Chem. Soc., **73**, 1415-1420 (1996).
49. **Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S., and Tominaga, Y.**: Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. J. Biochem., **112**, 598-603 (1992).
50. **Sugihara, A., Tani, T., and Tominaga, Y.**: Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. J. Biochem., **109**, 211-216 (1991).
51. 島田、杉原、中村、富永: *Geotrichum candidum* リパーゼ高生産性変異株の単離, 科学と工業, **64**, 95-98 (1990).
52. 島田、古賀、杉原、永尾、板井、富永: 耐溶媒性リパーゼ生産菌の単離と培養条件の検討, 科学と工業, **66**, 370-374 (1992).
53. **Shimada, Y., Koga, C., Sugihara, A., Nagao, T., Takada, N., Tsunasawa, S., and Tominaga, Y.**: Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. J. Ferment. Bioeng., 75, 349-352 (1993).
54. **Vesterberg, O. and Svensson, H.**: Isoelectric fraction, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. Acta Chem. Scand., **20**, 820-834 (1966).
55. **Davis, B.J.**: Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. Ann. N.Y. Acad. Sci., **121**, 404-427 (1964).
56. **Laemmli, U.K.**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685 (1970).
57. **Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F.**: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., **28**, 350-356 (1956).

58. **Sugihara, A., Shimada, Y., Tominaga, Y.**: Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. J. Biochem., **107**, 426-430 (1990).
59. **Booth, C.**: The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks. (1971).
60. **Gerlach, W. and Nirenberg, H.**: The genus *Fusarium*. A pictorial atlas. Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin (1982).
61. **Hoshino, T., Sakaki, T., Watanabe, Y., Nagasawa, T., and Yamane, T.**: Purification and some characteristic of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Biosci. Biotech. Biochem., **56**, 660-664 (1992).
62. **Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A., and Thim, L.**: A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase- inhibitor complex. Nature, **351**, 491-494 (1991).
63. **Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., and Menge, U.**: A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. Nature, **343**, 767-770 (1990).
64. **Derewenda, Z. S., Derewenda, U., and Dodson, G. G.**: The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglycerol lipase at 1.9 A resolution. J. Mol. Biol., **227**, 818-839 (1992).
65. **Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Dodson, G. G., Yamaguchi, S., Haas, M. J., and Derewenda, Z. S.**: An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. Nature Structural Biology, **1**, 36-47 (1994).
66. **Derewenda, U., Brzozowski, A.M., Lawson, D.M., and Derewenda, Z.S.**: Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. Biochemistry, **31**, 1532-1541 (1992).
67. **Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S., and Cygler, M.**: Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. Nature, **351**, 761-764 (1991).
68. **Winkler, F.K., D'Arcy, A., and Hunziker, W.**: Structure of human pancreatic lipase. Nature, **343**, 771-774 (1990).

69. **Hanahan, D.**: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., **166**, 577-580 (1983).

70. **Vieira, J. and Messing, J.**: Production of single-stranded plasmid DNA, p. 3-13. *In* Abelson, J.N. and Simon, M.I. (eds.), Methods Enzymology Vol. 153, Academic Press, New York (1987).

71. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.**: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

72. **Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J.**: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry, **18**, 5294-5299 (1979).

73. **Aviv, H. and Leder, P.**: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 1408-1412 (1972).

74. **Okayama, H. and Berg, P.**: High-efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol., **2**, 161-170 (1982).

75. **Okayama, H. and Berg, P.**: A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. Mol. Cell. Biol., **3**, 280-289 (1983).

76. **Henikoff, S.**: Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene, **28**, 351-359 (1984).

77. **Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.**: DNA sequencing with chain- terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 5463-5467 (1977).

78. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding a lipase from *Fusarium heterosporum*. J. Biochem., **116**, 536-540 (1994).

79. **Kornfeld, R. and Kornfeld, S.**: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, p. 631-664. *In* Richardson, C.C., Boyer, P.D., Dawid, I.B., and Meister, A. (eds.), Ann. Rev. Biochem. Vol. 54, Annual Reviews Inc., California (1985).

80. **Kugimiya, W., Otani, Y., Kohno, M., and Hashimoto, Y.**: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding *Rhizopus niveus* lipase. Biosci. Biotech. Biochem., **56**, 716-719 (1992).

81. **Briggs, M.S. and Gierasch, L.M.**: Molecular mechanisms of protein secretion: The role of the signal sequence, p. 109-180. *In* Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., and Richards, F.M. (eds.), Adv. Protein Chem. Vol. 38, Academic press, New York (1986).

82. **Holland, J.P. and Holland, M.J.**: The primary structure of a glyceraldehydes -3-phosphate dehydrogenase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., **254**, 9839-9845 (1979).

83. **Ito, H., Fukuda, K., Murata, K., and Kimura, A.**: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol., **153**, 163-168 (1983).

84. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: high-level production and purification. J. Ferment. Bioeng., **81**, 488-492 (1996).

85. **Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H., and Woodlock, J. J.**: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Anal. Biochem., **30**, 148-152 (1969).

86. 安藤、千葉: 単クローン抗体実験操作入門, 講談社 (1991).

87. **Johnston, M. and Davis, R. W.**: Sequences that regulate the divergent *GAL1- GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., **4**, 1440-1448 (1984).

88. 永尾、島田、杉原、富永: *Saccharomyces cerevisiae* による *Fusarium heterosporum* のリパーゼ cDNA の発現, 科学と工業, **70**, 128-132 (1996).

89. **Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L. E., and Jackson, B. J.**: Protein glycosylation in yeast. Ann. Rev. Biochem., **56**, 915-944 (1987).

90. **Vernet, T., Ziomek, E., Recktenwald, A., Schrag, J. D., Montigny, C., Tessier, D., Thomas, D. Y., and Cygler, M.**: Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. J. Biol. Chem., **268**, 26212-26219 (1993).

91. **Ikemura, H., Takagi, H., and Inouye, M.**: Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **262**, 7859-7864 (1987).

92. **Winther, J.R. and Sφrensen, P.**: Propeptide of carboxypeptide Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **88**, 9330-9334 (1991).

93. **Baker, D., Sohl, J.L., and Agard, D.A.**: A protein-folding reaction under kinetic control. Nature, **356**, 263-265 (1992).

94. **Beer, H.D., Wohlfahrt, G., Schmid, R.D., and McCarthy, J.E.G.**: The folding and activity

of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence. Biochem. J., 319, 351-359 (1996).

95. **Terada, I., Kwon, S.-T., Miyata, Y., Matsuzawa, H., and Ohta, T.**: Unique precursor structure of an extracellular protease, aqualysin I, with NH_2- and COOH-terminal pro-sequences and its processing in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **265**, 6576-6581 (1990).

96. **Lee, Y.-C., Ohta, T., and Matsuzawa, H.**: A non-covalent amino-terminal pro-region aids the production of active aqualysin I (a thermophilic protease) without the carboxy-terminal pro-sequence in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., **92**, 73-77 (1992).

97. **Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T.F.**: Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Nature, **325**, 458-462 (1987).

98. **Miyazaki, H., Yanagida, N., Horinouchi, S., and Beppu, T.**: Characterization of the precursor of *Serratia marcescens* serine protease and COOH-terminal processing of the precursor during its excretion through the outer membrane of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **171**, 6566-6572 (1989).

99. **Hames, B.D.**: One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, p. 1-147. *In* Hames, B.D. and Rickwood, D. (ed.) Gel electrophoresis of proteins, a practical approach, 2nd ed. IRL Press, Oxford (1990).

100. **Lehrach, H., Diamond, J.M., Wozney, J.M. and Boedtker, H.**: RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry, **16**, 4743-4751 (1977).

101. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: C-terminal peptide of *Fusarium heterosporum* lipase is necessary for its increasing thermostability. J. Biochem., **124**, 1124-1129 (1998).

102. **Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H.D., Bornscheuer, U.H., Schmid, R.D., and Tanaka, A.**: Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng., **86**, 164-168 (1998).

103. **Matthews, B.W.**: Studies on protein stability with T4 lysozyme, p. 249-278. *In* Eisenberg, D.S. and Richards, F.M. (ed.) Advances in protein chemistry, Vol. 46. Academic Press, New York (1995).

104. **Watanabe, K., Masuda, T., Ohashi, H., Mihara, H., and Suzuki, Y.**: Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Eur. J. Biochem., **226**, 277-283 (1994).

105. **Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y., and Suzuki, Y.**: The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 A resolution: Structural characterization of proline-substitution site for protein thermo- stabilization. J. Mol. Biol., **269**, 142-153 (1997).

106. **Makino, Y., Negoro, S., Urabe, I., and Okada, H.**: Stability-increasing mutants of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3, J. Biol. Chem., **264**, 6381-6385 (1989).

107. **Matsuura, T., Miyai, K., Trakulnaleamsai, S., Yomo, T., Shima, Y., Miki, S., Yamamoto, K., and Urabe, I.**: Evolutionary molecular engineering by random elongation mutagenesis. Nature Biotechnology, **17**, 58-61 (1999).

108. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Amino acid residues contributing to stabilization of *Fusarium heterosporum* lipase. J. Biosci. Bioeng., **89**, 446-450 (2000).

109. **Breckenridge, W.C., Marai, L., and Kuksis, A.**: Triglyceride structure of human milk fat. Can. J. Biochem., **47**, 761-769 (1969).

110. **Martin, J.-C., Bougnoux, P., Antoine, J.-M., Lanson, M., and Couet, C.**: Triglycerol structure of human colostrums and mature milk. Lipids, **28**, 637-643 (1993).

111. **Jensen, C., Buist, N.R., and Wilson, T.**: Absorption of industrial fatty acids from long chain or medium chain triglycerides in very small infants. Am. J. Clin. Nutr. **43**, 745-751 (1986).

112. **Innis, S.M., Dyer, R., and Nelson, C.M.**: Evidence that palmitic acid is absorbed as sn-2 monoacylglycerol from human milk by breast-fed infants. Lipid, **29**, 541-545 (1994).

113. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Production of structured lipid containing oleic and palmitic acids in an organic solvent-free system with thermostable *Fusarium heterosporum* lipase. J. Am. Oil. Chem. Soc., 投稿中

114. 島田、永尾、川島、山本、杉原、米虫、富永: *Rhizopus delemar* リパーゼの固定化, 科学と工業, **74**, 117-121 (2000).

本論文に関係のある報告

1. 島田、古賀、杉原、永尾、板井、富永: 耐溶媒性リパーゼ生産菌の単離と培養条件の検討, 科学と工業, 66, 370-374 (1992).
2. **Shimada, Y., Koga, C., Sugihara, A., Nagao, T., Takada, N., Tsunasawa, S., and Tominaga, Y.**: Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. J. Ferment. Bioeng., 75, 349-352 (1993).
3. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding a lipase from *Fusarium heterosporum*. J. Biochem., 116, 536-540 (1994).
4. 永尾、島田、杉原、富永: *Saccharomyces cerevisiae* による *Fusarium heterosporum* のリパーゼ cDNA の発現, 科学と工業, 70, 128-132 (1996).
5. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: high-level production and purification. J. Ferment. Bioeng., 81, 488-492 (1996).
6. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: C-terminal peptide of *Fusarium heterosporum* lipase is necessary for its increasing thermostability. J. Biochem., 124, 1124-1129 (1998).
7. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Amino acid residues contributing to stabilization of *Fusarium heterosporum* lipase. J. Biosci. Bioeng., 89, 446-450 (2000).
8. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y.**: Use of thermostable *Fusarium heterosporum* lipase for production of structured lipid containing oleic and palmitic acids. J. Am. Oil. Chem. Soc., 投稿中

その他の報告

<u>その他のリパーゼに関する文献</u>

1. **Shimada, Y., Sugihara, A., Nagao, T., and Tominaga, Y.**: Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. J. Ferment. Bioeng., 74, 77-80 (1992).
2. **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihata, A., and Tominaga, Y.**: Cloning and sequencing of two chromosomal lipase gene from *Geotrichum candidum*. J. Biochem, 113, 776-780 (1993).
3. **Sugihara, A., Shimada, Y., Nakamura, M., Nagao, T., and Tominaga, Y.**: Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipase. Protein Engineering, 7, 585-588 (1994).
4. **Shimada, Y., Nagao, T., Sugihara, A., Iizumi, T., Yui, T., Nakamura, K., Fukase, T., and Tominaga, Y.**: Cloning and sequence analysis of an esterase gene from *Pseudomonas* sp. KWI-56. BBA, 1174, 79-82 (1993).
5. **Sugihara, A., Shimada, Y., Nagao, T., Iizumi, T., Nakamura, K., Fukase, T., and Tominaga, Y.**: Purification and characterization of a carboxyesterase from *Pseudomonas* sp. KWI-56. Biosci. Biotech. Biochem., 58, 752-755 (1994).
6. **Sugihara, A., Senoo, T., Enoki, A., Shimada, Y., Nagao, T., and Tominaga, Y.**: Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 277-281 (1995).
7. **Sugihara, A., Shimada, Y., Takada, N., Nagao, T., and Tominaga, Y.**: *Pecicillium abeanum* lipase: Purification, characterization, and its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. J. Ferment. Bioeng., 82, 498-501 (1996).

<u>油脂の高度加工に関する文献</u>

1. 島田、杉原、永尾、北井、中村、玄番、富永: ランダムエステル交換油を用いたリパーゼの脂肪酸特異性の評価, 科学と工業, 69, 95-99 (1995).
2. **Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, K., Nagao, T., Nakayama, S., Nakano, H., and Tominaga., Y.**: Enrichment of arachidonic acid: selective hydrolysis of a single-cell oil from *Mortierella* with *Candida cyrindracea* lipase. J. Am. Oil. Chem. Soc., 72, 1323-1327 (1995).
3. **Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, K., Nagao, T., Nakayama, S., Nakano, H., and Tominaga., Y.**: Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprylic

acid using immobilized *Rhizopus delemar* lipase. J. Ferment. Bioeng., 81, 299-303 (1996).

4. **Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Yokota, T., Nagao, T., Komemushi, S., and Tominaga, Y.**: Production of structured lipid containing essential fatty acid by immobilized *Rhizopus delemar* lipase. J. Am. Oil. Chem. Soc., 73, 1415-1420 (1996).
5. **Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Kuramoto, T., Nagao, T., Gemba, M., and Tominaga, Y.**: Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acid from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. J. Am. Oil. Chem. Soc., 74, 97-101 (1997).
6. **Shimada, Y., Sugihara, A., Yodono, S., Nagao, T., Maruyama, K., Nakano, H., Komemushi, S., and Tominaga, Y.**: Enrichment of ethly docosahexaenate by selective alcoholysis with immobilized *Rhizopus delemar* lipase. J. Ferment. Bioeng., 84, 138-143 (1997).
7. **Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Nagao, T., Suenaga, M., Nakai, S., and Tominaga, Y.**: Fatty acid specificity of *Rhizopus delemar* lipase in acidolysis. J. Ferment. Bioeng., 83, 321-327 (1997).
8. **Shimada, Y., Sugihara, A., Shibahiraki, M., Fujita, H., Nakano, H., Nagao, T., Terai, T., and Tominaga, Y.**: Purification of γ-lionlenic acid from borage oil by a two-step enzymatic method. J. Am. Oil. Chem. Soc., 74, 1465-1470 (1997).
9. **Shimada, Y., Nagao, T., Hamasaki, Y., Akimoto, K., Sugihara, A., Fujikawa, S., Komemushi, S., and Tominaga, Y.**: Enzymatic synthesis of structured lipid containing arachidonic and palmitic acids. J. Am. Oil. Chem. Soc., 77, 89-93 (2000).

大学時代におこなった研究

1. **Nagao, T., Makino, Y., Yamamoto, K., Urabe, I., and Okada, H.**: Stability -increasing mutants of glucose dehydrogenase. *FEBS LETTERS*, 253, 113 (1989)
2. **Nagao, T., Mitamura, T., Wang, X.H., Negoro, S., Yomo, T., Urabe, I., and Okada, H.**: Cloning, nucleotide sequence, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J. Bacteriol.*, **174**, 5013 (1992)

謝　辞

本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科　卜部　格教授に、深甚なる感謝の意を表します。また、懇切なるご助言、御教示を賜りました大阪大学大学院工学研究科　原島　俊教授ならびに金谷茂則教授に心から感謝いたします。

また、本研究を行う機会と御鞭撻を賜りました大阪市立工業研究所所長　富永嘉男博士、生物化学課前課長　濱田信威博士、および生物化学課課長　北畑　寿美雄博士に深く感謝します。

本研究を実施するにあたり、終始御指導、御討論頂きました、大阪市立工業研究所　生物化学課研究主幹　杉原耿雄博士、および生物化学課研究副主幹　島田裕司博士に厚く御礼申し上げます。また、菌株の同定に終始ご協力賜りました　高田信男博士、および酵母の発現プラスミドと菌株を御供与頂いた　原島　俊教授に深く感謝いたします。さらに、本研究に御助言と御協力を頂きました古賀千種先生、および大阪市立工業研究所生物化学課の皆様に感謝いたします。