



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	<a href="https://doi.org/10.11501/3184372">https://doi.org/10.11501/3184372</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	永尾寿浩
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第15847号
学位授与年月日	平成13年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	<i>Fusarium heterosporum</i> の生産するリバーゼの構造と安定性に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 ト部 格
	(副査) 教授 金谷 茂則 教授 原島 俊 教授 菅 健一 教授 塩谷 捨明 教授 吉田 敏臣 教授 関 達治

### 論文内容の要旨

本論文は、土壤より安定性に優れたリバーゼを生産する微生物の単離、そのリバ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、リバ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バーゼの生産、および安定な酵素の油脂加工への応用についてまとめたものである。

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

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

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

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

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

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

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

総括では、本研究で得られた成果をまとめて述べている。

### 論文審査の結果の要旨

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

これらの成果を要約すると以下のとおりである。

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

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