

Title	Pseudomonas sp. 109 株由来の大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ
Author(s)	井原, 史雄
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3087924
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

Pseudomonas sp. 109株由来の
大環状ラクトン合成能を有する
リパーゼ

1992年

井原史雄

Pseudomonas sp. 109 株由来の、
大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ

1992 年

井原史雄

目次

第1章	緒論	1
第2章	大環状ラクトン合成能を有する リパーゼの精製	
第1節	緒言	7
第2節	実験材料および方法	8
第3節	結果および考察	10
第4節	要約	16
第3章	大環状ラクトン合成能を有する リパーゼの基質特異性	
第1節	緒言	17
第2節	実験材料および方法	18
第3節	結果および考察	19
第4節	要約	22
第4章	大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ 遺伝子のクローニング	
第1節	緒言	24
第2節	実験材料および方法	25
第3節	結果および考察	27
第4節	要約	36

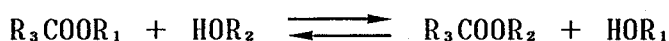
第 5 章	リパーゼ遺伝子の下流に位置し、 リパーゼの活性化に関与する遺伝子	
第 1 節	緒 言	37
第 2 節	実験材料および方法	38
第 3 節	結果および考察	39
第 4 節	要 約	49
第 6 章	<u>Pseudomonas</u> sp. 109 株の産生する その他のリパーゼ	
第 1 節	緒 言	50
第 2 節	実験材料および方法	51
第 3 節	結果および考察	52
	1. <u>lipA</u> 遺伝子	52
	2. <u>lipB</u> 遺伝子	58
	3. <u>lipC</u> 遺伝子	65
	4. <u>Pseudomonas</u> sp. 109 株由来 リパーゼの多形性	67
第 4 節	要 約	72
第 7 章	総 括	73
	引用文献	75
	本論文に関係のある報告	78

第1章 緒論

リパーゼは アミラーゼ、プロテアーゼと共に三大消化酵素のひとつとして古くから知られており、動物、植物、および微生物に広く分布している。また、リパーゼの重要性は 医学、生理学、生化学などの分野で難水溶性脂肪の体内摂取と関連して古くから注目され、基礎的研究がなされている。更に最近では有機合成化学における触媒としての観点からも種々の応用研究がなされてきている。しかしながら、歴史的に見るとリパーゼの研究は他の加水分解酵素に比較して遅れていた。この理由として、1) リパーゼの基質が水に対して不溶性であるため反応系が不均一系となり、速度論的解析が困難であること、2) そのためリパーゼの精製が進まず酵素本態の解明が遅れたこと、3) リパーゼが一般的に不安定であり、取り扱いが困難であるとされてきたこと、などが挙げられる。1962年に Aspergillus niger 由来のリパーゼが初めて単離精製され、結晶化されるに至り、リパーゼの本態が明かとなった(1)。この後、遺伝子工学的手法などの飛躍的な進歩も手伝い、種々の生物由来のリパーゼについて多くの知見が得られたことで、生物種の相違によるリパーゼの多様性が明らかになった。すなわち、カビなどの微生物由来のリパーゼは単一の蛋白質であるのに対し、動物由来の膵臓リパーゼはコリパーゼと呼ばれる分子量 約 10,000 の蛋白質、およびコール酸の共同作用をその活性発現に必要とすること(2)、ヒマシリパーゼでは種子中の脂質と耐熱性蛋白質とが活性発現に関与していること(3,4) が知られている。給源の相違によるリパーゼの多様性はリパーゼの反応特異性、あるいは基質特異性の多様さを反映するものであり、応用面では応用目的に応じたりパーゼの選択が必要とされている。

一方、最近では有機合成の面から 酵素反応が注目されており、酵素反応を利用した合成反応が数多く報告されている(5,6,7,8,9,10,11)。これら酵素を触媒として用いる合成反応の特徴として、

1) 立体選択性が高いので光学活性体の調製が容易である、2) 穏やかな条件を採用できるので、不安定な物質の合成に応用できる、3) 位置選択的、官能基選択的の反応が可能であり、一分子中に複数の同じ官能基、または類似の官能基が存在していてもその中の特定の官能基のみを反応させることができる、4) 以上の総合的結果として保護基の着脱などすべてのプロセスが簡略化できる、などの利点が挙げられる。反応の種類としては、1) 酸化還元反応、2) 様々な加水分解反応、3) 加水分解の逆反応または転移反応を利用したエステル、アミド、グリコシド、およびリン酸エステル結合の生成反応、4) C-C、C-N、および C-S 結合生成反応、などが報告されている。とくに多い例はパン酵母を利用した種々のカルボニル化合物の不斉還元とリパーゼ、またはエステラーゼなどの加水分解酵素を利用した光学分割、あるいは不斉中心の導入である。リパーゼを用いた反応としては、不斉加水分解による光学活性合成原料の調製、温和な条件下における不安定物質の合成、および非水溶媒中でのエステル交換反応による光学活性エステル、アミドの合成、あるいは位置選択的アシル化などが知られている(12,13,14)。非水溶媒中でのエステル交換反応を利用する手法はこの 10 年間で急速に発展しており、リパーゼの応用範囲は拡大している。非水溶媒中でのエステル交換反応とは、



で表すことのできる反応であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 、のいずれかに不斉中心が存在すると、リパーゼはその不斉を識別して反応を触媒し、光学活性なエステル、またはアルコールが得られる場合が多い。近年当研究室において、牧田ら(15)は非水溶媒中で、エステル交換反応を分子間ではなく分子内で行わせることにより、リパーゼが大環状ラクトンと呼ばれる環状化合物の生成を触媒しうることを見いだした。すなわち、低含水量にしたリパーゼ粉末を無水ベン

ゼン、または無水ヘキサンに懸濁させた後、基質である ω -ヒドロキシ酸メチルエステルを添加し 40°C で反応させることにより、環状のエステルが生成されるものである(図 1-1)。また、基質 2 分子が環化したダイオライドと呼ばれる化合物も同時に検出される。

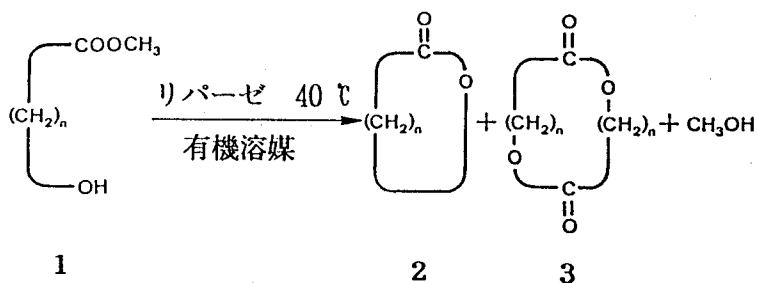


図 1-1. 大環状ラクトンのリパーゼによる合成

- 1, ω -ヒドロキシ酸メチルエステル; 2, モノマーラクトン;
3, ダイマーラクトン (ダイオライド)。

ラクトンとは分子内に水酸基をもつカルボン酸 (ヒドロキシ酸) がカルボキシル基と水酸基との間のエステル化によって環化した分子内エステルの総称であり、多くの天然化合物にラクトン構造を見いだすことができる(16)。中でも 12 員環以上の化合物は大環状ラクトンと呼ばれており、エリスロマイシンをはじめとするマクロライド系抗生物質、あるいはムスク様香料など数多くの有用物質が知られている。ラクトンを化学合成する際に、通常 5-7 員環ラクトンの合成は容易で、酸性条件下では自然にラクトン環が生成するほどであるが(17)、8-11 員環の中環状ラクトン環以上の大環状は炭素の結合角の関係で自然発生的には生成せず、さらに 12 員環以上の大環状ラクトンの合成となるとかなりの合成化学的工夫が必要とされている。大環状ラクトンの化学合成法は有用物質の合成法開発の必要性にともない、1970 年代より盛んに研究され、収率、立体選択的に優れたいくつかの方法が考案されてきており、これら化学的大環状ラクトン合成法の代表的な例を 図 1-2 に示した(18, 19,

20)。これらの方法はカルボキシル基を特殊な試薬で、チオエステル、あるいは酸無水物などに変換して弱く活性化しておき、さらに分子間反応を防ぐために高度希釈条件を保ちつつ、長時間、高温下で反応を行うものである。そのため、高収率、高立体選択性という優れた長所を有している反面、1) 複雑(高価)な試薬が必要である、2) 繁雑な操作を必要とする、3) 反応が長時間である、というような短所も持っており、より簡便な合成方法が望まれていた。それゆえ、牧田ら(15)のリパーゼを用いる合成方法は極めて容易に、かつ立体選択的に大環状ラクトンが合成できるという点で、より有用な方法であるといえる。

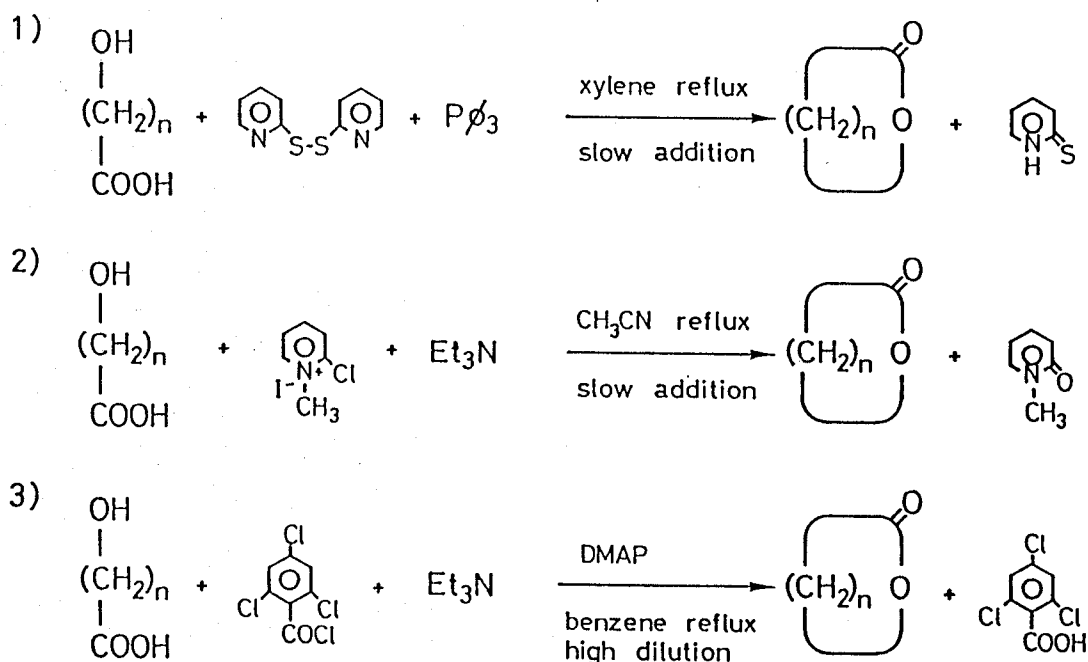


図 1-2. 大環状ラクトンの化学合成

しかしながら全てのリパーゼが大環状ラクトン合成能を有しているわけではない。牧田らの報告によると(15)、16-ヒドロキシヘキサデカン酸メチルエステルを基質とし、無水ベンゼン中で種々のリパーゼについて、大環状ラクトン合成能を調べたところ、ブタ腴臓

由来、および Pseudomonas 属由来のリパーゼにのみ、その活性が見いだされ、他の 14 種以上のリパーゼに活性はほとんど見られなかった(表 1-1)。大環状ラクトン合成能がある特定のリパーゼのみに認められることは、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼはそのラクトン合成活性のために特別な構造的特徴を有していることを示唆するものである。それゆえ、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼが持つ構造上の特徴について、知見を得ることを本研究の目的としている。

表 1-1. 種々リパーゼのラクトン合成活性^{a)}

リパーゼの由来	収率 (%) ^{b)}
<u>Pseudomonas</u> sp. (長瀬産業製リパーゼ P)	78
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	45
Porcine pancreas (Sigma 製 Typell)	73
<u>Rhizopus japonicus</u>	2
<u>Rhizopus delemer</u>	0
<u>Candida cylindracea</u>	0
Wheat germ	0

a) リパーゼをそれぞれ 500 mg と 1 mM ω -ヒドロキシヘキサ酸メチルエステルを含む無水ベンゼン 100 ml 中で 40 ℃, 72 時間反応させた。

b) 反応生成物に対しガスクロマトグラフィーを行い収率を求めた。

研究に用いたリパーゼは、最も高い大環状ラクトン合成活性を示した長瀬産業製の粗リパーゼ(リパーゼ P)、およびその生産株である Pseudomonas sp. 109 株を用いて解析を行った。以下に本論文の概要を述べる。

第2章では 長瀬産業製の粗リパーゼ（リパーゼP）の中に複数のリパーゼが存在していることが明らかになっているため、粗リパーゼから大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの単離、精製を行った。

第3章では 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの活性中心に関する知見を得るため、ラクトン合成活性における基質特異性、およびエステラーゼ活性における基質特異性を調べ、基質の炭素鎖長とリパーゼの反応性との関係を考察した。

第4章では Pseudomonas sp. 109 株から、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼをコードする遺伝子(lipL)を大腸菌にクローニングし、その塩基配列から大環状ラクトン合成能を有するリパーゼのアミノ酸1次構造を明らかにした。

第5章では リパーゼ遺伝子(lipL)のすぐ下流に、本リパーゼの活性発現に関与する遺伝子が存在することを見だし、その遺伝子のコードする蛋白質の1次構造を明らかにした。

第6章では 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子(lipL)と異なる3種類のリパーゼ遺伝子(lipA, lipB, lipC)を、Pseudomonas sp. 109 株から大腸菌にクローニングし、その存在を明らかにした。

第7章に 本研究の結果を総括した。

第2章 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの精製

第1節 緒言

Pseudomonas 属、およびブタ膵臓由来のリパーゼは、ベンゼン、あるいはヘキサンなどの有機溶媒中でその活性を安定に保持して、 ω -ヒドロキシ酸メチルエステルの分子内エステル交換反応を触媒しうるといふ、大環状ラクトン合成能を有していること、また他種由来のリパーゼにはその活性が認められなかったことは、すでに第1章で述べたとうりである。

大環状ラクトン合成活性が認められた Pseudomonas 属、およびブタ膵臓由来のリパーゼは市販の未精製酵素(Pseudomonas 属由来は長瀬産業製リパーゼP、ブタ膵臓由来は Sigma 社製リパーゼタイプII) であるが、長瀬産業製リパーゼPについて、エステラーゼ活性のみを指標として精製されたりパーゼでは、大環状ラクトン合成活性が失われたこと、また高度に精製されたブタ膵臓リパーゼ(Sigma 社製リパーゼタイプVI) にもその活性が認められなかったこと(未発表データ)、から市販のリパーゼ粉末の中には複数種のリパーゼが含まれており、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼは比較的マイナーな成分であると考えられる。あるいは粗リパーゼの中に含まれる別種の蛋白質、あるいは生体成分がリパーゼの反応中に何らかの機構で大環状ラクトン合成に関与、あるいはリパーゼ分子の安定化や反応の活性化に係わっている可能性も否定できない。それゆえ、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの存在を明らかにすることを目的として、Pseudomonas 属由来の長瀬産業製リパーゼPを初発原料とし、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ蛋白質の精製を行った。

第2節 実験材料および方法

1. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの精製

Pseudomonas 属由来の長瀬産業製リパーゼP粉末を初発原料として精製を行った。以下に示す精製段階では特記のないかぎり 4℃において行った。

- 1) 粗酵素溶液の調製 — リパーゼP粉末(5 g)を30 mlのリン酸カリウム緩衝液(0.05 M potassium phosphate (pH 6.5), 1 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol, 20% glycerol)に懸濁させ、約1時間スターラーにより攪拌した。100倍量の同上緩衝液を外液として透析(8時間、2回)を行った後、遠心分離(8,000×g)により沈殿を除いた上清を粗酵素溶液とした。
- 2) 等電点電気泳動 — 粗酵素溶液に最終濃度が2%になるように Ampholine (pH 3.5-10, Pharmacia LKB Biotechnology Inc.)を加えた後、Rotofor (Bio-Rad)にアプライし、12 W定電力で4時間泳動した。画分8-10 (pH 4-5.3に相当)を回収した後、リン酸緩衝液(50 mM potassium phosphate (pH 6.5), 1 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol)を外液として透析を行い、Ampholineを除いた。
- 3) Sepharose CL-6Bによるゲル濾過 — Sepharose CL-6B カラム(2.8×50 cm, Pharmacia LKB Biotechnology Inc.)を用いて、リン酸緩衝液(50 mM potassium phosphate (pH 6.5), 1 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol)で溶出させた。リパーゼの活性を含んだ画分(画分41-46, 30 ml)を回収した後、限外濾過(UP-20, Mr cut 20,000, 東ソー)により5.8 mlまで濃縮した。
- 3) ゲル濾過 HPLC — HPLCはJASCOモデルTri Rotor-Vを用い、UV detector (JASCO UVIDEC-100-V)と fluorescence detector (JASCO FP-20)を検出器として、TSK G2000SW_{xL} カラム(0.78×30 cm, 東ソー)によるゲル濾過を行った。溶出は

10% の CH_3CN を含む 0.05 M potassium phosphate (pH 6.5) を用いて 0.3 ml/min の速度で行った。蛋白質は、280 nm の UV と蛍光(excitation 280 nm, emission 340 nm)で検出した。6.8-7.2 ml 溶出したところにリパーゼの活性が認められたのでこの画分を分取した。

2. エステラーゼ活性、および大環状ラクトン合成活性

エステラーゼの活性は、p-nitrophenyl acetate (東京化成) を基質とし、生成する p-nitrophenol 量を測定することにより求めた。反応液には 0.01 M potassium phosphate (pH 6.5), 2.5 mM p-nitrophenyl acetate, 5% CH_3CN , および酵素が含まれる。反応はあらかじめ 37°C に加温している酵素を含む反応液に、無水 CH_3CN に溶解した p-nitrophenyl acetate を添加して行った。反応液の p-nitrophenol 量を 400 nm における吸光度 ($\epsilon_{400\text{nm}} = 14,200$) として測定した。エステラーゼ活性 1 単位は 1 分間に 1 μmol の p-nitrophenol を生成する酵素量と定義した。

大環状ラクトン合成活性は methyl 16-hydroxyhexadecanoate から合成される cyclohexadecanolide を測定することにより検出した。0.05 M triethanolamine-HCl (pH 6.5), 1 mM MgCl_2 に対して透析を行った後の酵素溶液をナスフラスコ中で凍結乾燥させた。この中に 無水ヘキサンに溶解した 1 mM methyl 16-hydroxyhexadecanoate を加え、激しく攪拌させながら 40°C に保ち反応を行った。経時的に反応液を 1 ml ずつ分取し、綿濾過した後、内部標準物質となる octacosan 溶液(0.2 mg/ml in hexane)、1 ml を加えた。反応生成物はガスクロマトグラフィーを用いて検出した。大環状ラクトン合成活性の 1 単位は、1 分間に 1 μmol のラクトンを生成する酵素量と定義した。

3. SDS-PAGE

SDS-PAGE は市販の 4-20% linear gradient gel (第一化学薬品)、および同社製専用電気泳動槽を用いて Laemmli の方法 (21) に従って行い、Coomassie Brilliant Blue G-250 で染色した。銀染色は 第一化学薬品社製 Ag stain を使用し、同社のマニュアルに従い行った。Native-PAGE によるリパーゼの活性染色は Gabriel らの方法 (22) に従い、 α -naphthyl lactate と fast blue RR salt を使用して行った。

第 3 節 結果および考察

大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの精製は粗酵素溶液から 1) 等電点電気泳動、2) Sepharose CL-6B を用いたゲル濾過、および 3) ゲル濾過 HPLC の 3 ステップにより達成した。大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの精製には、DEAE-Sephadex などのイオン交換クロマトグラフィーでは活性の回収率が 50% 以下であったため、精製過程に使用することはできなかった。また、C4, C8, および phenyl resin の疎水クロマトグラフィーではリパーゼは担体に強く結合し、50% ethylene glycol で溶出させても活性画分は回収できなかった。このことは大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの強い疎水的な性質によるものと考えられる。以下に各ステップにおける精製過程について述べる。

1. 等電点電気泳動

大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの粗酵素溶液に対し等電点電気泳動を行った結果を 図 2-1 に示した。pH 5.3 および pH 7.0 に相当するフラクションにエステラーゼの活性が認められたので、両画分に対して ω -hydroxyhexadecanoate を基質として大環状ラクトン合成能を調べたところ、pH 5.3

のフラクションにのみ大環状ラクトン合成能が検出された。このことから長瀬産業製 *Pseudomons* 由来のリパーゼ粉末は少なくとも等電点の異なる 2 種類のリパーゼを含んでおり、そのうちひとつのリパーゼは大環状ラクトン合成能を示さないことが明らかになった。またこの等電点電気泳動の結果から、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの等電点は 5.3 と決定した。pH 4-5.3 に相当する画分 8-10 を、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼとして回収した。

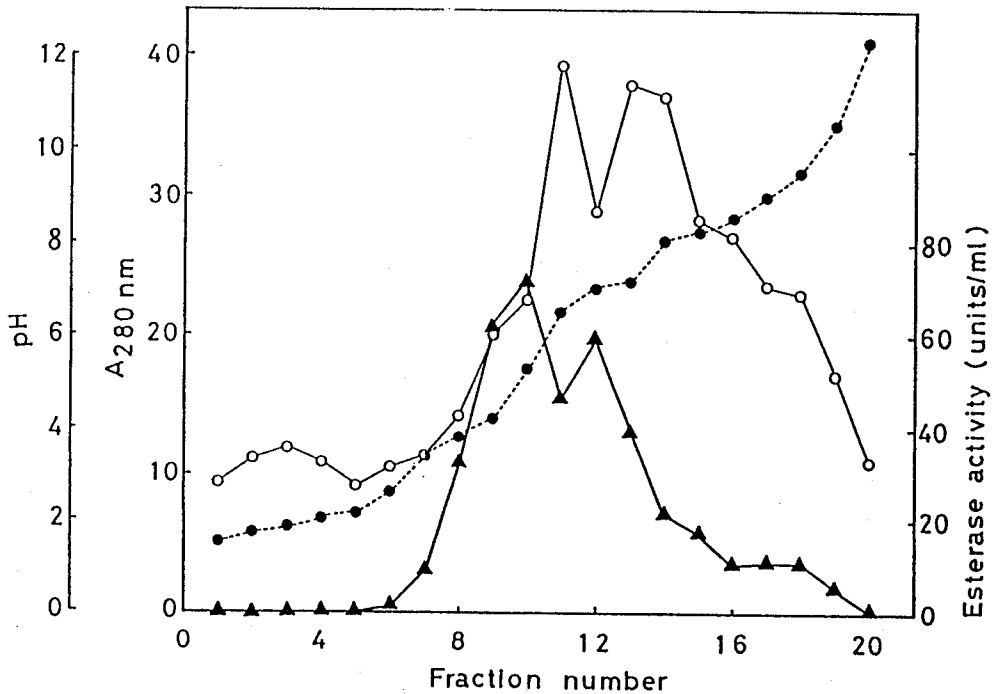


図 2-1. 等電点電気泳動によるリパーゼの分画。

Rotofor による電気泳動後のサンプルを 2 ml ずつ 20 のフラクションに分画し、pH を測定後、NaOH または HCl を用いて pH 6.5-7.0 の間に調整した。蛋白質量は 280 nm における吸光度として測定し、p-nitrophenyl acetate を基質としてエステラーゼ活性を測定した。●—●、pH; ○—○、A280nm; ▲—▲、エステラーゼ活性。

2. Sepharose CL-6B を用いたゲル濾過

等電点電気泳動で得られた活性画分に対してゲル濾過を行い各画分についてエステラーゼ活性を測定したところ、ただ一つのエステラーゼ活性のピークが得られた(図 2-2)。大環状ラクトン合成活性もエステラーゼのピークに対応したことから、画分 41-46、計 30 ml をプールした後、限外濾過により 5.8 ml にまで濃縮した。

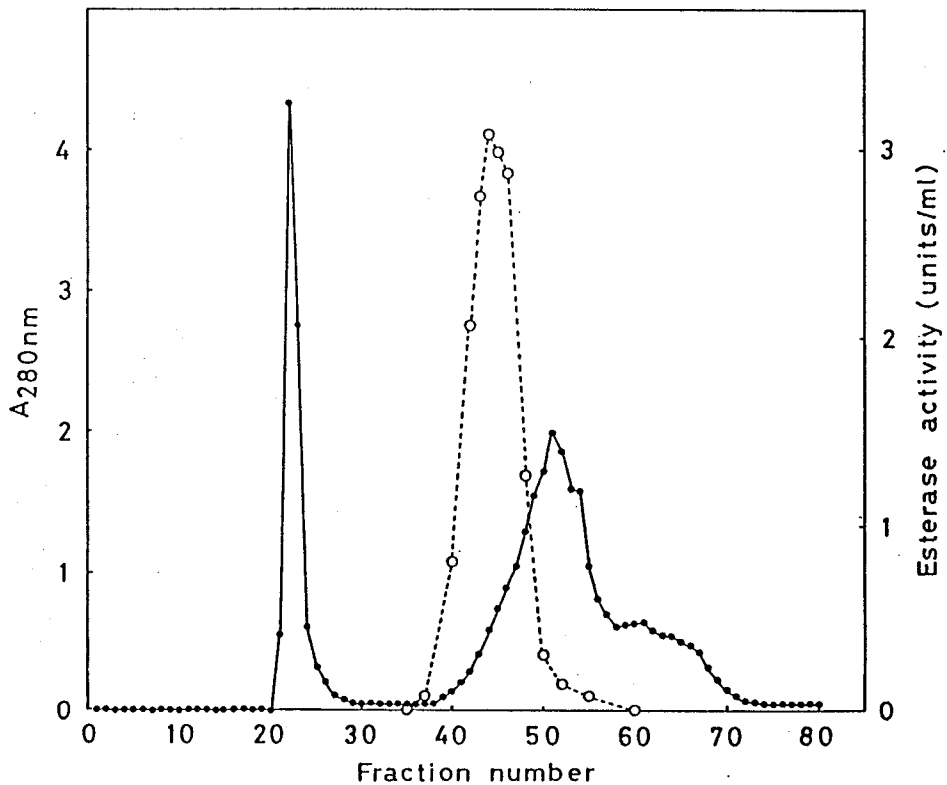


図 2-2. ゲル濾過クロマトグラフィーによるリパーゼの精製。

Sepharose CL-6B カラムから溶出し、5 ml ずつ分取した各フラクションについて、280 nm における吸光度、および *p*-nitrophenyl acetate を基質としたエステラーゼ活性を測定し、プロットした。●—●; A280nm; ○—○; エステラーゼ活性。

3. ゲル濾過 HPLC

精製の最終ステップとして HPLC によるゲル濾過を行ったところ、280 nm における吸光度のピークの位置とエステラーゼ活性のピークとが一致しなかった。このことは、緩衝液中にリパーゼの凝集を防ぐため、可溶化剤として 0.1% ノイゲン HC が含まれていることに起因するものと考えられる。そこで、溶出時間毎に分取し、各画分に対してエステラーゼ活性を調べたところ、15-16 分の画分に高いエステラーゼの活性が現れた (図 2-3) ので、14 分 20 秒から 16 分 20 秒までの画分 (6.8-7.2 ml 溶出時) を分取した。

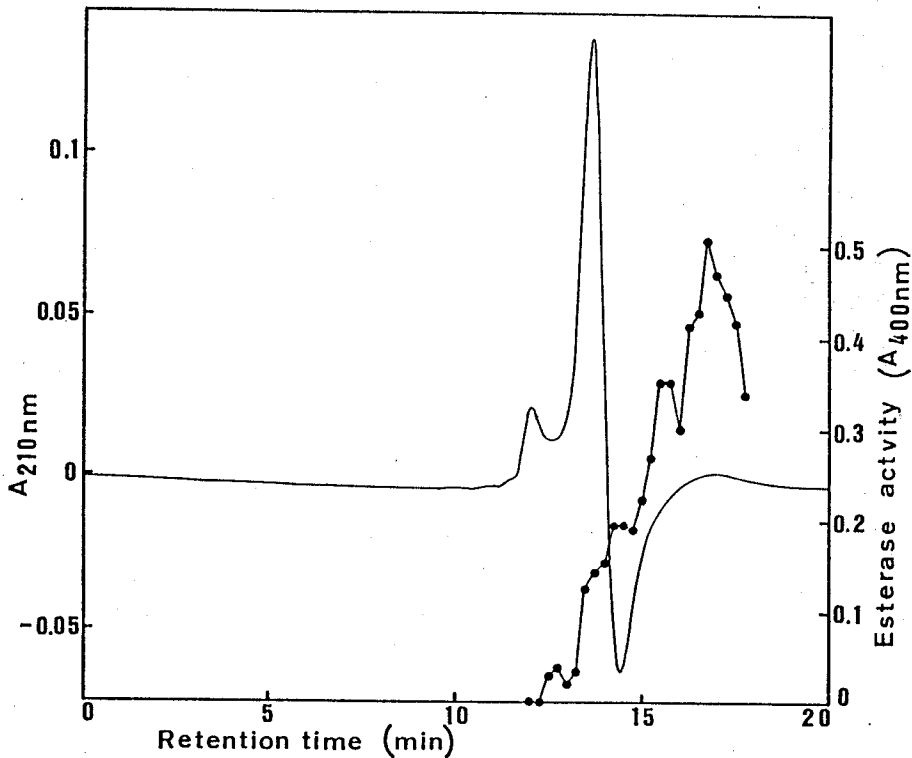


図 2-3. ゲル濾過 HPLC を用いたリパーゼの溶出様式。

TSK G2000SW_{xL} カラムを通ったリパーゼサンプルを、280 nm における吸光度で検出後、溶液を 0.1 ml ずつ (20 秒ごと) 分取し、*p*-nitrophenyl acetate を基質として反応を行い、エステラーゼ活性により生成した *p*-nitrophenol を、400 nm における吸光度として検出した。——, A_{280nm}; ●—●, エステラーゼ活性。

以上の精製過程を 表 2-1 にまとめた。この一連の操作で大環状ラクトン合成能を有するリパーゼは比活性で約 500 倍精製されたことになる。この表で、活性の回収率が 100% を上回っているが、これは粗酵素溶液のなかに含まれる不純物、あるいは等電点電気泳動時にキャリアとして用いる Ampholine などが大環状ラクトン合成活性を阻害することが原因であると考えられる。すなわち、大環状ラクトン合成反応において、反応系の水分はエステルの加水分解を招き合成反応を阻害すると考えられるが、粗酵素溶液中の不純物や Ampholine が酵素溶液に含まれると、一種の湿潤剤のように働き、凍結乾燥時水分を保持するためにラクトン合成活性が低く押さえられるためであろう。よって実質の精製度は約 300 倍位であると思われる。

表 2-1. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの各精製段階における大環状ラクトン合成活性。

5 g の粗酵素粉末(リパーゼ P) を初発原料とした大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの精製表を示した。大環状ラクトン合成活性は methyl 16-hydroxyhexadecanoate を基質に用いて測定した。

精製ステップ	溶液量	蛋白質量	大環状ラクトン合成活性		精製度	収率
	ml	mg	units	units/mg	-fold	%
粗酵素溶液	36.5	1717.7	108.6	0.063	1	100
等電点 電気泳動	3.6	107.5	47.6	0.442	7	44
Sepharose CL-6B	24.6	11.0	93.9	8.56	136	87
HPLC ゲル濾過	430.5	5.5	172.2	31.30	497	158

精製した大環状ラクトン合成能を有するリパーゼについて SDS-PAGE を行ったところ、Coomassie Brilliant Blue G-250 による染色により、単一のバンドを示すことが判明した(図 2-4)。また、銀

染色，活性染色を行っても一本のバンドのみが見られた(未発表データ)。これらのことから精製したリパーゼは 95% 以上の純度であると判断し、電気泳動の移動度から、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ蛋白質の分子量を $29,000 \pm 1,000$ であると計算した(図 2-4)。この分子量は還元剤を除いた電気泳動においても変化しなかったが(未発表データ)、ゲル濾過の結果から求めた分子量(Sephadex G-200 を使用すると分子量は 290,000、TSK gel G2000SW_{XL} を使用すると 133,000)とは大きく異なっていた。このことは、リパーゼはある程度凝集した状態で存在し、溶液組成の違いにより凝集の程度が異なることを示唆している。

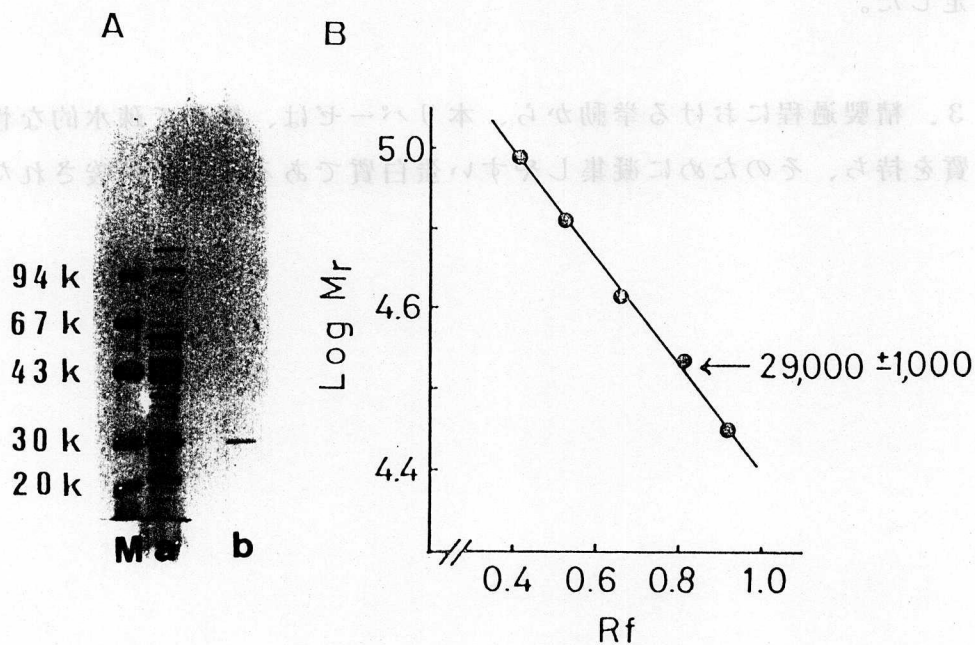


図 2-4. 精製した大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの SDS-PAGE。

A, 精製したリパーゼの SDS-PAGE には 4-20% の濃度勾配を持つアクリルアミドゲルを用いて行い、Coomassie Brilliant Blue G-250 で染色することにより、蛋白質を検出した。a, 2.0 μ g の精製前の粗酵素溶液; b, 0.5 μ g の HPLC で精製したリパーゼ; M, 分子量マーカー蛋白質(phosphorylase b, $M_r=94,000$; bovine serum albumin, $M_r=67,000$; ovalbumin, $M_r=43,000$; carbonic anhydrase, $M_r=30,000$; soybean trypsin inhibitor, $M_r=20,000$)。B, 各マーカー蛋白質の電気泳動における移動度から大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの分子量を求めた。●, マーカー蛋白質の泳動位置; ←, 精製したリパーゼの泳動位置。

第 4 節 要約

1. Pseudomonas 属由来、長瀬産業製リパーゼ粉末を初発原料として大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの精製を行った。精製は等電点電気泳動、Sepharose CL-6B を用いたゲル濾過、およびゲル濾過 HPLC の 3 段階で行い、電気泳動的に均一な酵素を得ることに成功した。

2. SDS-PAGE より精製したリパーゼの分子量を $29,000 \pm 1,000$ であると決定し、また等電点電気泳動の結果から等電点は 5.3 と決定した。

3. 精製過程における挙動から、本リパーゼは、極めて疎水的な性質を持ち、そのために凝集しやすい蛋白質であることが示唆された。

第3章 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ の基質特異性

第1節 緒言

リパーゼは“酵素”であり、酵素は生物の存在しうる穏やかな条件下で極めて高い触媒機能を示す。また、多成分の混合系においても目的成分のみをとらえて特定の反応のみを触媒するという反応特異性および基質特異性を示す。また、酵素は蛋白質であるがゆえに、同名の酵素であっても給源が異なればそれぞれの分子構造が微妙にあるいは大幅に異なり、基質特異性や反応特異性の多様性を示すようになる。リパーゼについても、給源の相違による基質特異性の多様性が明らかになっており(23)、リパーゼの基質特異性を調べることは個々のリパーゼの分子構造と機能との関係、あるいは生体内でのリパーゼの役割を論じる上での手がかりとなっている。また応用面では、個々の目的に応じたリパーゼの選択や、新規リパーゼの検索などの手がかりにもなる。

第1章ですでに述べたように、 ω -ヒドロキシ酸メチルエステルを基質とした大環状ラクトンの合成反応は、Pseudomonas 属、およびブタ膵臓由来のリパーゼのみに認められるものであり、本リパーゼの活性中心の構造は、他のリパーゼとは異なっていると考えられる。それゆえ、ラクトン合成を触媒するために必要な構造的特徴について知見を得るひとつの手段として、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの基質特異性を調べることは重要である。

本章では大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの基質特異性を調べる指標として、基質の構造、すなわち脂肪酸の炭素鎖長を認識する反応性(脂肪酸特異性)に注目し、エステラーゼ活性に対する基質特異性、および大環状ラクトン合成活性に対する基質特異性について検討した。またその結果から大環状ラクトン合成反応における基質と酵素との関係について考察した。

第2節 実験材料および方法

1. 実験材料

種々の炭素鎖長の直鎖脂肪酸よりなる *p*-nitrophenyl ester 類、および triglyceride 類をエステラーゼおよびリパーゼ活性測定のための基質として用いた。*p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl hexanoate, *p*-nitrophenyl octanoate, *p*-nitrophenyl dodecanoate, *p*-nitrophenyl tetradecanoate, *p*-nitrophenyl hexadecanoate, *p*-nitrophenyl octadecanoate, および trilaurin は ナカライテスクより購入した。tributylin, tricapylin, tricaprillin, tripalmitin, および tristearin は、和光純薬工業より購入した。tricaprillin は Fulka Chemie AG から、trimiristin は Sigma からそれぞれ購入した。*p*-nitrophenyldecanoate は、decanoyl chloride と *p*-nitrophenol とから合成した。ラクトン活性測定に用いた ω -ヒドロキシ酸メチルエステル(酸の鎖長 C_{11} - C_{21}) は、牧田らの方法(15)に従い合成した。

2. エステラーゼ活性、および大環状ラクトン合成活性測定法

p-nitrophenyl ester 類を基質として用いた場合には、各々の *p*-nitrophenyl ester を 0.5% Triton X-100 を含む、0.05 M potassium phosphate 緩衝液(pH 6.5) に溶解し 超音波により完全に乳化後、1.5 ml をあらかじめ 37°C に保温しておき、1.5 ml の上記緩衝液に溶解した酵素溶液を加え反応を開始した。10 分間反応させた後、3 ml のアセトンを加え反応を停止し、軽く遠心分離を行い不溶物を除いた上清に対して 400 nm における吸光度を測定した。

triglyceride を基質とする場合には、0.5% Triton X-100 に基質を溶解後、酵素を加え 37°C、60 min 強攪拌下で反応させた。反応液の 10 倍量の ether/ethanol (1:1) 溶液を加えて反応を停止させ、0.01 N KOH で滴定することにより、遊離した脂肪酸の量を求めた。

様々な炭素鎖長を持つ ω -ヒドロキシ酸メチルエステルを基質とした大環状ラクトン合成活性の測定法は、第 2 章、第 2 節に記載した方法と同様に行った。

第 3 節 結果および考察

大環状ラクトン合成能を有するリパーゼを用いて、種々の炭素鎖長の ω -ヒドロキシ酸メチルエステルを基質とし大環状ラクトンを合成させたところ、ラクトン合成反応は 表 3-1 に示したように基質の炭素鎖長に依存して、モノマーラクトンとダイマーラクトン(ダイオライド)との生成比が変化した。すなわち、18-hydroxy-octadecanoate を基質に用いたとき ($n=17$)、モノマーラクトンの生成は最大になった。炭素鎖長が短くなるにつれてモノマーラクトンの生成が減少し、代わってダイオライドの生成量が増加した。この現象をさらに解析するために、様々な炭素鎖長の *p*-nitro-phenylester、および triglyceride を基質に用いてエステルの加水分解活性を測定した(表 3-2)。注目すべきことに、どちらを基質に用いた場合でも、C8 のアシル基($n=6$)を持った基質に対して最大の活性を示した。このことから、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼは、オクタノイル基を最も強く結合する活性中心を持っていると推定される。

本リパーゼが大環状ラクトン合成活性を発揮する際、活性中心における基質の構造を考えると、モノマーラクトンが形成されるためには、 ω -ヒドロキシ酸メチルエステル中の ω -位に位置する水

酸基と、水酸基とは反対側の末端に位置する acyl carbonyl 基と
 がリパーゼの活性中心において極めて近接して存在することが必要
 となる。本リパーゼがオクタノイル基に対して強い親和性を持って
 いることを考慮すると大環状ラクトン合成経路中、酵素-acyl 複
 合体を形成した際に、acyl carbonyl 基からの 8 個の炭素鎖は酵
 素に強く保持されているが、C₉ 以上の部分の炭素鎖と酵素との相
 互作用は弱く、従って末端の水酸基を含む炭素鎖部分が自由に動い
 て acyl carbonyl 基と反応に近接すると考えられる。この場合、
 末端の水酸基がカルボニル基に近接しうするためには、余分に最低
 C₈ の炭素鎖長が必要となり、モノマーラクトン合成活性が炭素鎖

表 3-1. 種々の炭素鎖長の ω-ヒドロキシ酸メチルエステルに対する大環状
 ラクトン合成活性

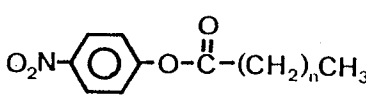
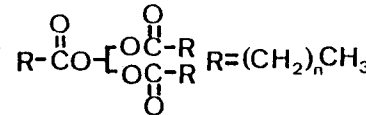
ラクトン合成活性はリパーゼ P 粗酵素粉末(200 mg) を用い、無水ヘキサン
 20 ml 中で 1 mM 濃度の基質と 40°C で反応し、行った。反応生成物はガスク
 ロマトグラフィーによりモノマーラクトンとダイオラオドとを検出した。反応
 速度は各反応時間ごとに分取した反応液中の反応生成物と内部標準物質
 (octacosane) との比の変化から求めた。

基質	ラクトン合成反応の速度			
	モノマーラクトン		ダイオラオド	
HO-(CH ₂) _n -COOCH ₃	nmol/min/mg	%	nmol/min/mg	%
n = 10	0	0	188	100
n = 11	ND ^a		150	80
n = 12	8	12	57	30
n = 13	13	20	20	11
n = 14	16	25	ND	
n = 15	16	25	7	4
n = 16	37	57	0.2	0.1
n = 17	65	100	0.1	0.05
n = 18	52	80	0	0
n = 20	25	38	0	0

^aND, not determined.

表 3-2. 種々の炭素鎖長の p-nitrophenyl ester および triglyceride に対する大環状ラクトン合成能を有するリパーゼのエステラーゼ活性

精製したリパーゼを使用して、種々の基質に対するエステラーゼ活性を測定した。Triton X-100 を含まない反応系で、triacetin を基質に用いたとき、リパーゼの加水分解活性はミセル形成の程度(ヨウ素を用いたミセル形成の測定法(24) による) に依存した。このことは大環状ラクトン合成能を有するリパーゼはミセルを形成した基質に対してより良く反応することを示しており、それゆえ、エステラーゼ反応に用いたすべての基質溶液には、0.5% Triton X-100 を加えミセルを形成した状態でリパーゼの活性測定を行った。

基質	p-nitrophenyl ester			triglyceride		
						
	反応速度(2.5 mM)		K _m	V _{max}	反応速度(25 mM)	
	μmol/min/mg	%	mM	μmol/min/mg	μmol/min/mg	%
n = 0	6.1	3.4	212	3.4 × 10 ³	1.6	49.2
n = 2	32.5	18.2	5.6	4.5 × 10 ³	3.0	92.9
n = 4	52.9	29.5	0.22	3.0 × 10 ³	3.1	96.0
n = 6	178.9	100	0.61	5.7 × 10 ³	3.2	100
n = 8	43.5	24.3	0.44	3.8 × 10 ³	1.5	46.4
n = 10	40.1	21.7	1.01	4.2 × 10 ³	0.41	12.7
n = 12	24.4	13.6	0.70	9.6 × 10 ³	0.14	4.3
n = 14	21.7	12.1	0.95	1.0 × 10 ³	0.24	7.4
n = 16	2.0	1.1	0.68	2.2 × 10 ³	0.33	10.2

長 18 個のとき最大になることがよく説明できる。炭素鎖長の短い基質では、水酸基は分子内にある acyl carbonyl 基を攻撃することが距離的に困難になり、逆に遊離基質の水酸基が acyl carbonyl 基と反応する確率が高くなるためダイオリドの生成比が増加すると考えられる。

18-hydroxyoctadecanoate を基質に、大環状ラクトン合成反応を行ったとき、粗酵素、および精製酵素のいずれの場合もモノマーラ

クトンとダイオリドとの生成比は変化しなかった(monomer/daiolide は粗酵素で 218、精製酵素で 215)。このことはモノマーラクトンの合成も、ダイオリドの合成も同一の酵素により触媒されていることを示している。

Pseudomonas 属由来の大環状ラクトン合成能を有するリパーゼによる大環状ラクトンの合成効率が、基質の炭素鎖長に依存するという事実は、このリパーゼによる反応も化学反応によるラクトン合成の場合と同様に、リングサイズを自由に選べないという問題が存在することを示している。さらに、基質濃度によってもモノマーラクトンとダイオリドとの生成比は変化し、モノマーラクトンのみを得ようとするときには高度に希釈(1 mM 以下)された基質を使用する必要があることも明らかになっている(25)。それゆえ、リパーゼによる大環状ラクトン合成法を種々の化合物の合成に応用する場合に、反応条件または方法の変更、新たに基質特異性の異なるリパーゼの検索、および現リパーゼの改変など、今後工夫を要すると思われる。

第4節 要約

1. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼについて、様々な炭素鎖長を持つ ω -ヒドロキシ酸メチルエステルを基質としてラクトン合成活性を調べた結果、モノマーラクトン形成には C_{18} が最適であること、およびより短鎖の基質では鎖長に依存してモノマーラクトン/ダイオリドの生成比が減少することを見いだした。

2. 種々の炭素鎖長を有する *p*-nitrophenyl ester、および triglyceride を基質として、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼのエステラーゼ活性における基質特異性を調べた結果、エステル加水分解反応においては、いずれの基質についてもオクタノイル基が最大活性を示すことを明らかにし、併せてラクトン合成活性における鎖長依存性を説明した。

第4章 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ 遺伝子のクローニング

第1節 緒言

リパーゼは3大消化酵素のひとつとして古くからその存在が知られていたにもかかわらず、その基質が水に不溶で、かつ常温で固体になるものが多いことなどから、速度論的解析が困難であったので、酵素本体に関する基礎的研究は他の加水分解酵素に比べて著しく遅れていた。しかしながら、近年における解析技術の飛躍的な進歩により、リパーゼ遺伝子のクローニング、その1次構造の決定、および結晶構造解析を行うことが可能になり、リパーゼの構造と機能との相関関係はしだいに明らかになりつつある。

動物組織から細菌に至るまで、各種生物由来のリパーゼ遺伝子がクローン化され、その1次構造が決定されている。動物組織由来のリパーゼとしては、膵臓からはイヌ由来(26) およびヒト由来(27) のリパーゼ、肝臓からラット由来(28) およびヒト由来(29) のリパーゼ、およびラット舌由来のリパーゼ(30) が cDNA よりクローン化され、アミノ酸の1次構造が決定されている。またブタ膵臓由来のリパーゼ(31) はエドマン分解法により、全アミノ酸配列が決定されている。アミノ酸配列をみると同一組織から由来するリパーゼには高い相同性が認められるものの、同一種であっても組織が異なるとアミノ酸配列の相同性は認められない。しかしながら上記のリパーゼの中に存在する8個のシステイン残基の位置は保存されており、高次構造は類似しているらしいことが示されている(26)。

カビや酵母からは Geotrichum candidum (32,33), Rhizomuchor miehei (34), および Candida cylindracea (35) のリパーゼ遺伝子が、cDNA からクローン化されている。細菌からは Staphylococcus hycus (36), Staphylococcus aureus (37) から、また、

Pseudomonas 属からは 5 つのクローン(38, 39, 40, 41, 42) が報告されている。Pseudomonas 属からのリパーゼ遺伝子の持つアミノ酸配列は、熱安定性リパーゼ(42) を除いて相同性が認められている。

全ての種由来のリパーゼについてアミノ酸配列を比較すると、種の比較的近いものには相同性が認められるが、種が遠くなるに従い相同性は見られなくなる。しかしながら、全てのリパーゼの配列中に、Gly-X-Ser-X-Gly (X は任意のアミノ酸) の配列が存在している。近年 Rhizomuchor miehei (43, 44) およびヒト膵臓(29) 由来のリパーゼにおける X 線構造解析により、この配列中の セリン残基が catalytic triad (Ser, His, Asp) のひとつであり活性中心であることが明らかになっている。

大環状ラクトン合成能を有するリパーゼのクローニングを行い、その 1 次構造を決定することは、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの特徴を明らかにするうえで重要なステップになると考えられる。現在までにクローニングされた Pseudomonas 属由来のリパーゼ遺伝子は全て、大腸菌内におけるリパーゼ活性を指標に単離されており、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの遺伝子も大腸菌に活性のある形でクローン化することが可能であると考えた。また、大腸菌内でリパーゼ蛋白質を高度に発現させることが可能ならば、比較的容易に、1) 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの精製、2) 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの構造や機能に関する知見を得ること、3) その知見を基に部位特異的突然変異などによりリパーゼを改変すること、が可能になると思われる。

本章では大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子の大腸菌へのクローニングを行い、そこにコードされるリパーゼ遺伝子の 1 次構造を明らかにし、本リパーゼの有するアミノ酸配列の特徴について考察した。

第2節 実験材料および方法

1. 使用した菌株, ファージ, およびプラスミド

大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの生産菌である、Pseudomonas sp. 109 株(長瀬産業製のリパーゼ P 粉末はこの株の培養液から生産されている)は長瀬産業から譲渡いただいた。本菌株は Fermentation Research Institute, Agency of Industrial, Science and Technology, Tsukuba の保存菌株、FERM-P No. 3025 である。

Escherichia coli JM105 (Δ (lac-proAB) thi rpsL endA sbcB15 hsdR4/F' traD36 proAB laqI⁺ZAM15) は大腸菌における遺伝子組換えの宿主として使用した。

M13mp18 および M13mp19 ファージを用いて塩基配列を決定した。pUC19 プラスミドは大腸菌へリパーゼ遺伝子をクローニングするために使用した。

2. アミノ酸配列の解析

精製した大環状ラクトン合成能を有するリパーゼを、0.1% ノイゲン HC を含む 0.01 M ammonium acetate (pH 6.5) を溶出緩衝液として、TSK G2000SW_{xL} カラムによるゲル濾過 HPLC を行った。蛋白質画分を回収し、凍結乾燥した後、pulsed-liquid protein sequenator 477A (Applied Biosystems)、および on-line phenylthiohydantoin-derivative analyzer 120A (Applied Biosystems) を用いて、アミノ末端のアミノ酸配列を決定した。尚、この操作には、東京大学農学部農芸化学科の片岡宏誌 博士に協力していただいた。

3. 遺伝子操作

Pseudomonas sp. 109 株からの染色体 DNA の調製は Coleman らの示した Marmur の方法(45)に従った。

プラスミドの調製はアルカリ抽出法(46)で行った。

制限酵素処理、ライゲーション、DNAの末端修復、およびエクソヌクレアーゼ処理は宝酒造、および東洋紡社製の酵素を使用して、添付のプロトコールに従い行った(46)。

E. coli JM105の形質転換にはCaCl₂によるコンピテント形質転換法(47)を用いた。

4. サザンハイブリダイゼーション

Pseudomonas sp. 109株の染色体DNAをそれぞれ *Pst*I, *Sal*I, および *Sma*I で完全に切断し、0.1% アガロースによる電気泳動を行った。キャピラリートランスファー(48)によりDNA断片を nylon membrane (Hybond-N, Amersham Corp.) に移し、UV照射により固定化した。[γ -³²P]ATP (>3000 Ci/mmol, ICN Biomedicals Inc.)、および T4 polynucleotide kinase とを用いてオリゴヌクレオチドを末端ラベルした。ハイブリダイゼーションの溶液には、5×SSPE, 0.5% SDS, 5×Denhardt's solution, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA を用い、45°C で20時間ハイブリダイズさせた。0.1% SDSを含む0.1×SSCで45°C 10分間洗浄後、X線フィルムに感光させた(46)。

5. 塩基配列の決定と解析

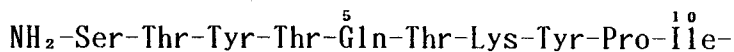
塩基配列の決定はM13ファージの1本鎖DNAと [α -³²P]dCTP (>3000 Ci/mmol, ICN Biomedicals Inc.) とを用いてダイデオキシ法(49)により行った。方法はSequenase (United States Biochemical Corp.) の説明書に従った。塩基配列は両方の配列について、互いに重複させた欠失DNAを読むことにより決定した(46)。

塩基配列の解析はパーソナルコンピューターを用いて、GENETYX (Software DEvelopment Co. Ltd., Tokyo) のソフトウェアで行った。塩基配列およびアミノ酸配列の相同性は、EMBL, Gen Bank, NBRF, および SWISSPROT の配列と比較した。

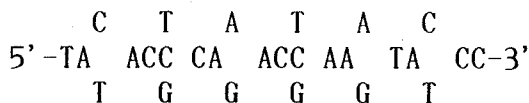
第3節 結果および考察

1. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ蛋白質のアミノ末端配列の決定

精製した大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ(第3章)を用いてアミノ末端のアミノ酸配列決定を行った。アミノ酸配列の分析装置で自動的に解析したところ、各段階ごとにひとつずつのアミノ酸が検出された。このことは、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼが単一のポリペプチドからなる蛋白質であり、高度に精製が行われていたことを示すものである。この操作によりアミノ末端からの19個のアミノ酸配列を以下のように決定した。



また、上記下線部から、予想される20-merの混合オリゴヌクレオチドを以下のように合成し、



クローニングのためのプローブとした。

2. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子のクローニングおよびその塩基配列

合成したプローブを用いて *Pseudomonas* sp. 109 株の染色体DNA に対し、サザンハイブリダイゼーションを行った(図 4-1)。

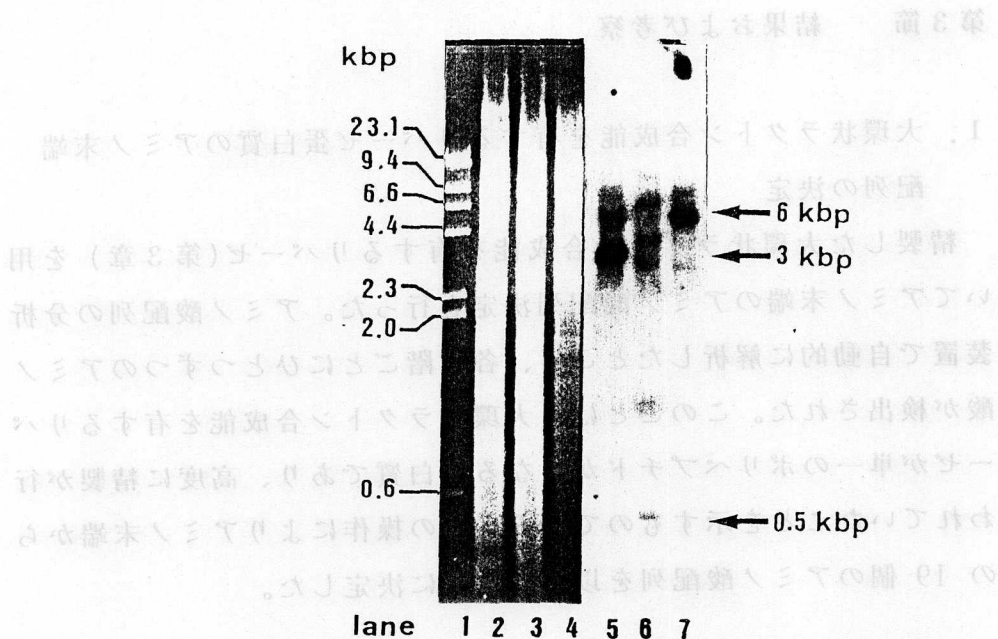


図 4-1. *Pseudomonas* sp. 109 株染色体のサザンハイブリダイゼーション。

Pseudomonas sp. 109 染色体、5 μ g を *Pst*I (lane 2, 5)、*Sal*I (lane 3, 6) および *Sma*I (lane 4, 7) により完全に切断し、分子量マーカーである λ -*Hind*III (lane 1) とともに 1.0 % アガロースによる電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した (lane 1-4)。ナイロンメンブランに DNA を固定した後、³²P で末端標識した合成オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせた。非特異的に結合したプローブを洗浄し除いた後、X線フィルムに感光させた (-80°C, 4 時間, lane 5-7)。

その結果、*Pst*I で染色体を切断したときに 3 kbp、*Sal*I では 0.5 kbp、*Sma*I では 6 kbp に相当する位置にハイブリダイズするバンドが現れた。*Sma*I の 6 kbp に相当する DNA 断片をアガロース電気泳動により回収し、*Sma*I で切断した pUC19 プラスミドに連結した後、*E. coli* JM105 を形質転換した。得られた約 300 個の組換え体について、0.5% トリブチリンを含む LB 培地上で培養しトリブチリンの分解により、コロニーの周辺に透明な領域が形成されることをリパーゼ活性の指標として(38) 検索した。その結果、2 株にトリブチリンの分解能が認められ、その菌株からプラスミドを回収し、挿入断片の大きさを調べたところ、共に 6.0 kbp の挿

入が認められた。制限酵素による切断様式が両者とも同じであったことから、同一の断片であると判断し、この遺伝子を lipL 遺伝子と命名した。6.0 kbp の断片は、BAL31 ヌクレアーゼ、および ExonucleaseIII を用いたサブクローニングにより、lipL 遺伝子は 2.2 kbp の断片中に含まれることを見いだした(図 4-2)。

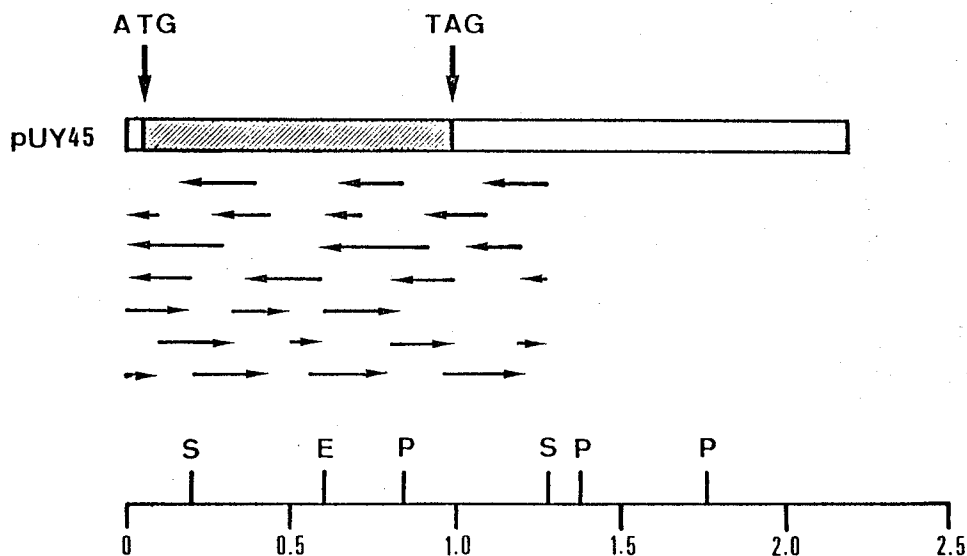


図 4-2. リパーゼ遺伝子(lipL)を含むプラスミド、pUY45、における制限酵素地図、および塩基配列決定の方法。

lipL 遺伝子を含む pUY45 プラスミド DNA 断片から、M13 フェージを用いて塩基配列を読んだ長さや方向を示した。塩基配列から得られた ORF (斜線で示した部分) の開始コドン(ATG)、および終止コドン(TAG) の位置を示した。また下部の図には pUY45, 2.2 kbp の制限酵素地図を示した。制限酵素地図中の数字は塩基の長さ(kbp)を示す。E, EcoRI; S, SalI; P, PstI。

サブクローニング後の断片について、ダイデオキシ法による塩基配列の決定を行った。上流から SalI の制限酵素認識部位まで塩基配列を決定したとき(図 4-2)、この中にひとつのオープンリーディングフレーム(以下 ORF)を見いだした(図 4-3)。この ORF は 311 個のアミノ酸をコードしており、そのアミノ酸配列の特徴を以下に示す。

GGGCGATGGCTGGCAGGACGCGCCCCTCGGCCCCATCAACCTGAGATGAGAACAAC 56
ATGAAGAAGAAGTCTCTGCTCCCCCTCGGCCCTGGCCATCGGCCCTCGCCTCTCTCGCTGCC 116
M K K K S L L P L G L A I G L A S L A A -20-
AGCCCTCTGATCCAGGCCAGCACCTACACCCAGACCAAATACCCCATCGTGTGGCCAC 176
S P L I Q A S T Y T Q T K Y P I V L A H -40-
GGCATGCTCGGCTTCGACAATATCCTCGGGTFCGACTACTGGTTCGGCATTCCCAGCGCC 236
G M L G F D N I L G V D Y W F G I P S A -60-
TTGCGCCGTGACGGTGCCAGGTCTACGTCACCGAAGTCAGCCAGTTGGACACCTCGGAA 296
L R R D G A Q V Y V T E V S Q L D T S E -80-
GTCCGCGGCGAGCAGTTGCTGCAACAGGTGGAGGAAATCGTCGCCCTCAGCGGCCAGCCC 356
V R G E Q L L Q Q V E E I V A L S G Q P -100-
AAGGTCAACCTGATCGGCCACAGCCACGGCGGGCGGCCATCCGCTACGTCGCCGCGGTA 416
K V N L I G H S H G G P T I R Y V A A V -120-
CGTCCCACCTGATGCCCTTCGGCCACCAGCGTGGGCGCCCGCACAAAGGGTTCCGGACACC 476
R P D L M P S A T S V G A P H K G S D T -140-
GCCGACTTCCTGCGCCAGATCCCACCGGGTTCGGCCGGCGAGGCAGTCCCTCTCCGGGCTG 536
A D F L R Q I P P G S A G E A V L S G L -160-
GTCAACAGCCTCGGCGGCTGATCAGCTTCCTTTCAGCGGCAGCGCGGTACGCAGAAT 596
V N S L G A L I S F L S S G S A G T Q N -180-
TCACTGGGCTCGCTGGAGTCGCTGAACAGCGAGGGGGCCGCGCTTCAACGCCAAGTAC 656
S L G S L E S L N S E G A A R F N A K Y -200-
CCGAGGGCATCCCCACCTCGGCCTCGGCGAAGGCGCCTACAAGGTCAACGGCGTGAGC 716
P Q G I P T S A C G E G A Y K V N G V S -220-
TATTACTTCCTGGAGCGGTTCCTCGCCGCTGACCAACTTCCTCGATCCGAGCGACGCCTTC 776
Y Y S W S G S S P L T N F L D P S D A F -240-
CTCGGCGCCTCGTTCGCTGACCTTCAAGAACGGCACCGCCAACGACGGCCTGGTTCGGCACC 836
L G A S S L T F K N G T A N D G L V G T -260-
TGCAGTTTCGCACCTGGGCATGGTGTATCCGCGACAACCTACCGGATGAACCACCTGGACGAG 896
C S S H L G M V I R D N Y R M N H L D E -280-

```

GTGAACCAGGTCCTCGGCCTCACCAGCCTGTTTCGAGACCAGCCCGGTCAGCGTCTACCGC 956
V N Q V F G L T S L F E T S P V S V Y R -300-
CAGCAGCCCAACCGCCTGAAGAAGCCAGCCTGTAGGACCCCCGGCCGGGGCCTCGGCCCC 1016
Q H A N R L K N A S L *** -311-

GGCCCTTTCCCGGAAGCCCCCTCGCGTGAAGAAAATCCTCCTGCTGATTCCACTGGCGTT 1076
CGCCGCCAGCCTGGCCTGGTTCGCTCGGCTGGAACCTTCCCCCGCACCCGAGACGGCGCC 1136
CCCGGCCAGCGCGCAGGCGGGCGCAGACCGCGCCCCGCCAGCAGCCTCCACGGGAGAAGC 1196
GGTGCCGGCCCCCAGGTCATGCCGGCCAAGGTGCGCGCGCTGCCAACCTCCTTCAGGGG 1256
CACCAGCGTCGATGGCAGTTCAGTGTGAC 1288

```

図 4-3. *Pseudomonas* sp. 109 株由来、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子(*lipI*) の塩基配列。

塩基配列から予想されるアミノ酸配列を塩基配列の下に 1 文字コードで示し、最初のメチオニンを 1 として番号を付した。▲ は精製した大環状ラクトン合成能を有するリパーゼから得られたアミノ末端を示し、以下に続く下線は精製したリパーゼから得たアミノ酸配列と一致した配列を示す。リパーゼに特異的な保存領域のアミノ酸を枠で囲んで示した。破線はリボゾーム結合位置と考えられる部分、星印(***) は終止コドンの位置を示す。

- (1) 精製した大環状ラクトン合成能を有するリパーゼから決定した 19 個のアミノ酸配列と全く同じ配列が存在していた。
- (2) それより前の 26 個のアミノ酸配列は典型的なシグナル配列の特徴(13-36 個のアミノ酸配列、アミノ末端には正に荷電したアミノ酸が存在、シグナル配列のカルボキシ末端はアラニンであることが多い、疎水性のアミノ酸に富む) を有していた。
- (3) シグナル配列を除いたアミノ酸配列から予想されるポリペプチドの分子量は 30,149 であり、精製したリパーゼの SDS-PAGE から求めた分子量、29,000±1,000 (図 2-4) とよく一致していた。
- (4) 精製したリパーゼのアミノ酸組成とこの配列の組成とはよく一致していた(未発表データ)。

(5) リパーゼに特異的な保存配列、Gly-X-Ser-X-Gly (X は任意のアミノ酸) が存在している。

これらのことから、この ORF にコードされている蛋白質は大環状ラクトン合成能を有するリパーゼであると結論した(LipL 蛋白質と命名)。

LipL 蛋白質のアミノ酸配列と、現在までにアミノ酸配列が決定されている他のリパーゼとの比較を行ったところ、リパーゼに特異的な配列、Gly-X-Ser-X-Gly の周辺に限っては、全てのリパーゼについてよく保存されていた(図 4-4)。すなわち、Gly-X-Ser-X-Gly の回りに疎水性のアミノ酸が存在し、グリシン残基とセリン残基との間には電荷を持ったアミノ酸が存在していた。

<u>Pseudomonas</u> sp. 109 (LipL)	- V - N - L - I - G - H - S - H - G - G -
<u>Pseudomonas fragi</u> IFO 3458	- V - N - L - I - G - H - S - Q - G - A -
<u>Pseudomonas fragi</u> IFO 12049	- V - N - L - I - G - H - S - Q - G - A -
<u>Pseudomonas cepacia</u>	- V - N - L - V - G - H - S - Q - G - Q -
<u>Pseudomonas</u> sp. KWI-56	- V - N - L - V - G - H - S - Q - G - G -
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	- V - L - V - S - G - H - S - L - G - G -
<u>Staphylococcus aureus</u>	- V - H - L - V - G - H - S - M - G - G -
<u>Staphylococcus carnosus</u>	- V - H - F - I - G - H - S - M - G - G -
<u>Geotrichum candidum</u>	- V - M - I - F - G - E - S - A - G - A -
<u>Candida cylindracea</u>	- V - T - L - F - G - E - S - A - G - S -
Porcine pancreatic	- V - H - V - I - G - H - S - L - G - S -
Rat lingual	- I - H - Y - V - G - H - S - Q - G - T -
Canine pancreatic	- V - N - L - I - G - H - S - L - G - A -
Human hepatic	- V - H - L - I - G - Y - S - L - G - A -
Human pancreatic	- V - H - V - I - G - H - S - L - G - A -
Consensus function	-Hyd- X -Hyd-Hyd- G -Cha- S - X - G -Hyd-

図 4-4. リパーゼに特異的な保存領域の特徴。

大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ、および種々のリパーゼに特異的な保存領域のアミノ酸配列とその特徴とを示した。Hyd, 疎水性のアミノ酸; Cha, 電荷を持ったアミノ酸; X, 不特定のアミノ酸をそれぞれ示す。

アミノ酸配列全体として比較した場合、Pseudomonas 属由来のリパーゼとのみ有意な相同性が認められた。図 4-5 に示したのは、Pseudomonas cepasia 由来(40) および Pseudomonas fragi 由来(38) のリパーゼとアミノ酸配列の比較を行った結果で、マキシマムマッチング法により 30-40% のアミノ酸が保存されており、性質の似ているアミノ酸まで考慮すると、Pseudomonas fragi では 50%、Pseudomonas cepasia では 59% の類似性が認められた。Pseudomonas 属由来のリパーゼ以外にはアミノ酸配列の相同性が認められないということより、Pseudomonas fragi 由来、および Pseudomonas cepasia 由来のリパーゼが大環状ラクトン合成能を有している可能性が示唆される。

大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの塩基配列については、EMBL, GenBank、およびアミノ酸配列については SWISSPROT, National Biomedical Research Foundation に登録されている配列との相同性を調べたが、Pseudomonas 属のリパーゼ以外に有意な相同性は認められなかった。

ヒト由来、カビ由来リパーゼの X線構造解析により(43,44)、リパーゼ保存領域(Gly-X-Ser-X-Gly)中のセリン残基は活性中心であり、catalytic triad を形成していることが明らかになっている。それゆえ、アミノ酸配列から大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの catalytic triad を形成すると思われるアスパラギン酸残基およびヒスチジン酸残基を特定できるのではと考え、その検索を行った。しかしながら、

- 1) ヒト由来のリパーゼとは分子量が 10,000 以上異なり、アミノ酸配列の相同性はない。
- 2) カビ由来のリパーゼは 285 個のアミノ酸から構成されており、分子量的には近いが、このリパーゼは糖蛋白質であり、LipL 蛋白質との相同性は見られない。なお、LipL 蛋白質が糖蛋白質ではないことは精製した本蛋白質の解析により明らかにされている(未発表データ)。

3) Pseudomonas 属由来のリパーゼとの比較で(図 4-5)、アスパラギン酸残基およびヒスチジン酸残基は数箇所て保存されている。

以上のことから catalytic triad の残基を特定することはできなかった。今後、点特異的突然変異の導入および X線構造解析により明らかにされるべき課題である。

真核生物由来のリパーゼにおいてリパーゼの高次構造の維持にジスルフィド結合の関与が、1) ジスルフィド結合を解離させるとリパーゼの活性が失われること(26)、2) システイン残基の位置は種間を越えて保存されていること(26, 32)、より明らかにされている。LipL 蛋白質についてシステイン残基は 2 箇所しか存在しないが、その位置は Pseudomonas epasia 由来リパーゼについても保存されていた(図 4-5)。それゆえ、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼにおけるシステイン残基の関与を明らかにするために、精製したリパーゼを 5 mM iodoacetic acid、または 5 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) で 37°C、1 時間処理した後エステラーゼ活性を測定したところ、活性の低下はみられなかった(未発表データ)。また、本リパーゼを 2-mercaptoethanol または dithiothreitol などの還元剤で処理してもエステラーゼ活性に影響はみられなかったことから、本リパーゼの高次構造の維持にジスルフィド結合は関与しておらず、触媒反応にもシステイン残基は関与していないことが示唆された。

第4節 要約

1. 精製した大環状ラクトン合成能を有するリパーゼのアミノ末端のアミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列より推定し、合成したオリゴヌクレオチドをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、Pseudomonas sp. 109 株の保持するリパーゼ遺伝子を大腸菌にクローン化した。

2. リパーゼ遺伝子を含む DNA 断片についてサブクローニングの後、塩基配列を決定したところ、311 個のアミノ酸コード域 (Open Reading Frame ; ORF) を見いだした。アミノ酸配列を調べた結果、この ORF は大環状ラクトン合成能を有するリパーゼをコードしていると結論した。

3. 他のリパーゼとのアミノ酸配列の比較を行ったところ、有意な相同性は Pseudomonas 属由来のリパーゼとのみ認められ、他種由来のリパーゼとはリパーゼに特異的な領域を除き見られなかった。

第5章 リパーゼ遺伝子の下流に位置し リパーゼの活性化に関与する遺伝子

第1節 緒言

一般に酵素活性に影響を与える因子として、1) コファクター、または補因子と呼ばれ、酵素蛋白質の活性発現に必須の低分子化合物、すなわち各種の二価金属やビタミン、2) 酵素と相互作用し酵素の構造に変化を起こさせる生体成分、すなわちリポタンパク質、ペプチド、糖、脂質など、3) 基質に直接作用し基質の状態に変化を起こさせ酵素との接触を促進、または阻害する物質、さらには、4) 酵素と基質との間に介在し、両者の結合を助けて反応を促進させる物質、などが知られている。このように酵素活性に影響を与える機構は多様であり、それらの起因を追究することは酵素の反応機構の手がかりを得るうえにも重要である。

リパーゼでは、ブタ膵臓リパーゼのコリパーゼ(2)、ヒマリパーゼにおける、脂質と耐熱性蛋白質との共同作用(3,4)のように、不活性な酵素前駆体が特定の因子により活性化する機構が知られている。また、活性発現に必須ではないが、リパーゼ活性を促進させる因子の例として、Aspergillus niger あるいは Rhizopus delemere リパーゼに対する Ca^{2+} イオン(52,53)、および Rhizopus delemere リパーゼのカルジオリピンによる活性化(54)、が知られている。また、活性を阻害する因子としては、Aspergillus niger リパーゼにおける Fe^{2+} イオン(55)、ラット膵臓における n-アルコール(56)、およびブタ膵臓リパーゼにおける胆汁酸(57,58)、などが見いだされている。これらのリパーゼ活性に影響を及ぼす因子はいずれも、基質あるいは酵素に結合し、基質界面と酵素表面とが会合する状態を変化させることにより、リパーゼの活性に影響を与えることが明らかにされている。

本章では大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子の下流に

位置し、本リパーゼの活性化に関与する遺伝子(limL)の存在を明らかにした。塩基配列の決定を通じて、limL 遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列を明らかにし、また本リパーゼ活性化因子はリパーゼ遺伝子に対してトランスに働くことを見いだした。

第2節 実験材料および方法

1) 使用した菌株およびプラスミド

E. coli JM105 は大腸菌内における遺伝子操作の宿主として使用した。E. coli JM109 ($\Delta(\text{lac-proAB})$ recA1 ebdA1 gyrA1 thi-1 hsdR17 supE44 relA1/F' traD36 proAB laqI⁺Z Δ M15)、E. coli BMH71-18 mutS ($\Delta(\text{lac-proAB})$ thi supE mutS215::Tn10(Tet')/F' traD36 proAB laqI⁺Z Δ M15) および E. coli MV1184 ($\Delta(\text{lac-proAB})$ ara strA thi (ϕ 80 lacZ Δ M15) $\Delta(\text{srl-recA})306::\text{Tn10(Tet')}$ /F' traD36 proAB laqI⁺Z Δ M15) は点突然変異導入のために使用した。

M13mp18 および M13mp19 ファージは塩基配列決定に用いた。アンバー変異を持つ M13tv19 ファージは M13mp19 ファージの誘導体であり、点突然変異導入のために用いた。

pUC19 および pKK233-2 (Pharmacia LKB) プラスミドを大腸菌内でのベクターとして使用した。pMW119 (ニッポンジーン) および pHSG399 (宝酒造) プラスミドは和合性ベクターとして使用した。

2) 点突然変異の導入

点突然変異の導入には M13 ファージのアンバー変異株を用いる方法(59)で、MutanG KIT (宝酒造) を用い、添付の使用説明書に従って行った。

その他の実験操作は、第4章第2節に述べたとうりである。

1. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの活性発現に
必須な遺伝子(lipL)の存在

精製した大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの SDS-PAGE から求めた分子量は $29,000 \pm 1,000$ であり、その結果からリパーゼ蛋白質をコードする DNA は約 1 kbp であると予想される。大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子を 6.0 kbp の DNA 断片として大腸菌にクローニングし、サブクローニングにより 2.2 kbp の断片としたことは、第4章第3節ですでに述べた。ところが、2.2 kbp のリパーゼ遺伝子断片に対し、さらなる欠失を行うとリパーゼ活性は失われた。また、上流から SalI の制限酵素認識部位までの塩基配列を決定したとき、その中に大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの ORF を見いだすことができたので、この領域をプラスミドにサブクローニングし、大腸菌を形質転換したがリパーゼ活性は得られなかった(図 5-1)。これらのことは大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子の下流には、リパーゼの活性に必要な何らかの因子を含んでいることを示している。それゆえ、リパーゼ遺伝子の下流領域について塩基配列の決定を行った、結果、リパーゼ遺伝子の 49 bp 下流から、GTG で始まり、リパーゼ遺伝子と同じ方向に 340 個のアミノ酸をコードする ORF を見いだした(図 5-1, および 図 5-2)。

近年、Pseudomonas cepacia 由来リパーゼ遺伝子がクローニングされ(lipA*; 後述の Pseudomonas sp. 109 由来 lipA 遺伝子と区別するために、Pseudomonas cepacia 由来のリパーゼ遺伝子には星印(*)を付した)、その遺伝子解析により、リパーゼをコードする遺伝子のすぐ下流に、リパーゼ遺伝子と同一方向にコードされるリパーゼの活性発現のために必要な遺伝子の存在が明らかになってい

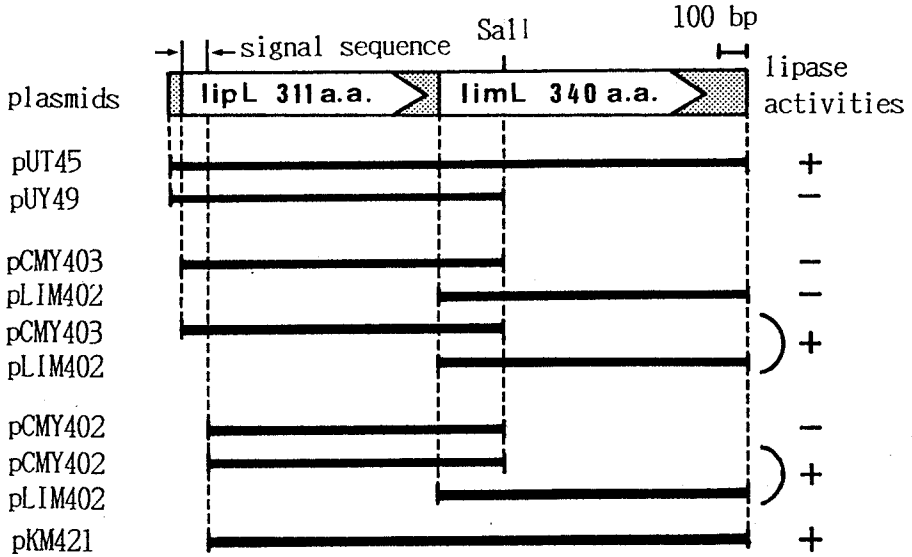


図 5-1. リパーゼ遺伝子(*lipL*) の下流に位置する遺伝子(*limL*)。

pUY45、2.2 kbp の DNA 断片中にコードされている遺伝子の位置関係を図の上部に示した。本文中に述べた方法で種々の DNA 断片を持つプラスミドを構築し、大腸菌 JM105 に形質転換した後、リパーゼ活性を調べた。プラスミドを保持する大腸菌を 0.5% トリブチリンを含む LB 培地上に植菌し、30°C、4 日間培養を行った。リパーゼにより、コロニーの周りのトリブチリンが分解することで得られる透明な領域が認められるものを“リパーゼ +”、認められないものを“リパーゼ -”と判断した。“)”は大腸菌が両方のプラスミドを保持していることを示す。全てのプラスミドにおいて挿入された遺伝子は、*lac* または *trc* プロモーターの支配下に置かれ、プロモーターと同じ方向に（この図で左から右に）転写されるように構築した。

る(40)。この遺伝子は *lipase modurator gene* (*limA*) と命名されていることから、これに習い本研究室で見いだした遺伝子を *limL* 遺伝子と命名した。また、*Pseudomonas* sp. KWI-56 由来のリパーゼ遺伝子の下流から、同様の作用をもつ *act* 遺伝子が報告されている(41)。この *act* 遺伝子はアミノ酸レベルで、*Pseudomonas cepacia* の *limA* 遺伝子と 93% の相同性があり、ほぼ同一の遺伝子と考えられる。

TGCAGTTCGCACCTGGGCATGGTGAATCCGCGACAACTACCGGATGAACCACCTGGACGAG 896
 C S S H L G M V I R D N Y R M N H L D E -280-
 GTGAACCAGGTCTTCGGCCTCACCAGCCTGTTCGAGACCAGCCGGTCAGCGTCTACCGC 956
 V N Q V F G L T S L F E T S P V S V Y R -300-
 CAGCACGCCAACCGCCTGAAGAACGCCAGCCTGTAGGACCCCGCCGGGGCTCGGCCCC 1016
 Q H A N R L K N A S L ***
 LIP L ←
 GGCCTTTCGGGAAGCCCCCTCGCGTGAAGAAAATCCTCCTGCTGATTCCTACTGGCGTT 1076
 M K K I L L L I P L A F -12-
 LIML →
 CGCCGCCAGCCTGGCCTGGTTCGTTCGGTGGAACTTCCCCCGCACCCGAGACGGCGCC 1136
 A A S L A W F V W L E P S P A P E T A P -32-
 CCCGGCCAGCGCGCAGCGGGCGCAGACCGCGCCCCGCCAGCAGCCTCCACGGGAGAAGC 1196
 P A S A Q A G A D R A P P A A S T G E A -52-
 GGTGCCGGCCCCCAGGTCAATGCCGGCAAGGTCCGCGCGCTGCCAACCTCCTTCAGGGG 1256
 V P A P Q V M P A K V A P L P T S F R G -72-
 CACCAGCGTCGATGGCAGTTTTCAGTGTTCGACGCCAGCGGCAACCTGCTGATCACCCGCGA 1316
 T S V D G S F S V D A S G N L L I T R D -92-
 CATCCGCAACCTGTTCGACTACTTCTCCTCAGCGCCGTCCGGGAAGAGCCCCCTGCAGCAAAG 1376
 I R N L F D Y F L S A V G E E P L Q Q S -112-
 CCTGGACCGCCTGCGCGCCTACATCGCCGCGGAACTCCAGGAGCCGGCGCGCGCCAGGC 1436
 L D R L R A Y I A A E L Q E P A R G Q A -132-
 GTTGGCGCTGATGCAGCAATACATCGACTACAAGAAGGAACTGGTCCCTGCTCGAACCGGA 1496
 L A L M Q Q Y I D Y K K E L V L L E R D -152-
 CCTGCCGCGCCTGGCCGACCTCGACGCCCTGCGCCAGCGGGAAGCCGGGTGAAAGCCCT 1556
 L P R L A D L D A L R Q R E A A V K A L -172-
 GCGCGCGGGATCTTCAGCAACGAAGCGCAGTGGCGTTCTTCGCGGACGAGGAAACCTA 1616
 R A R I F S N E A H V A F F A D E E T Y -192-
 CAACCAGTTCACCCCTGGAGCGCCTGGCGATCCGCCAGGACGGCAAGCTCAGCGCCGAGGA 1676
 N Q F T L E R L A I R Q D G K L S A E E -212-
 AAAGGCCGCCCATCGACCGCCTGCGCGCCAGCCTGCCGGAAGACCAGCAGGAAAGCGT 1736
 K A A A I D R L R A S L P E D Q Q E S V -232-
 GCTGCCGCAACTGCAAAGCGAATGCAAGCAGCAGACCGCCGCCCTCCAGGCCGCTGGCGC 1796
 L P Q L Q S E L Q Q Q T A A L Q A A G A -252-
 CGGCCCGGAAGCCATCCGCCAGATGCGTCAAGCAACTGGTGGGGCCCGAAGCCACCACCCG 1856
 G P E A I R Q M R Q Q L V G A E A T T R -272-
 CCTGGAGCAACTCGATCGGCAACGCTCGGCCTGGAAGGGCCGGCTGGACGACTATTTCGC 1916
 L E Q L D R Q R S A W K G R L D D Y F A -292-
 CGAGAAGAGCCGGATCGAAGGCAATACCGGGCTGAGCGAAGCCGACCGCCGCGCGGGT 1976
 E K S R I E G N T G L S E A D R R A A V -312-

CGAACGCCTGGCCGAGGAGCGCTTCAGCGAACAGGAACGCTTGCGCCTGGGCGCGCTGGA 2036
 E R L A E E R F S E Q E R L R L G A L E -332-

ACAGATGCGCCAGGCCGAGCAGCGCTGACCCGACACGGAAACGCCAAGAACGCGGCGAAGG 2096
 Q M R Q A E Q R *** -340-

GCGCTTCGGCGGATAACGCTACCCCTCAGGGGTGCAGCCCTGGCGTGGCCGGCGAGGCGGA 2156
 AACCTTGTGCTGCGCGCCGCAACGAAAAAGGCGGCCACCCGAAGGTGTCCGCCCTTTTTC 2216
 GTCGCCAGCCCGGTTTCAGCGGGACA 2241

図 5-2 リパーゼ遺伝子の下流に位置し、リパーゼ活性発現のために必須の遺伝子(limL)の塩基配列。

塩基配列の番号は lipL 遺伝子からの続き番号で付し、塩基配列から予想されるアミノ酸配列を塩基配列の下に 一文字コードで示し、最初のメチオニンを 1 として番号を付した。リボゾーム結合位置と考えられる部分は破線で、終止コドンの位置は星印(***) で示し、細い矢印は 16 塩基からなる二回転対称配列の位置を示した。

limL 遺伝子のコードする蛋白質(LimL) について Pseudomonas cepacia 由来の LimA 蛋白質とのアミノ酸配列の比較を行ったところ、約 29% と比較的低い相同性が認められた(図 5-3)。しかしながら、LimL のアミノ酸配列について、疎水性/親水性のプロットを調べた結果(図 5-4)、アミノ末端側は非常に疎水性が高くなっており、シグナル配列、あるいは細胞膜貫通部位と考えられ、逆にカルボキシ末端側は親水性に富むという特徴を示した。この傾向は、Pseudomonas cepacia 由来の LimA 蛋白質とよく一致しており、LimL 蛋白質と LimA 蛋白質とは、同じ機能でリパーゼを活性化していると考えられる。

LimL 蛋白質のアミノ酸配列と SWISSPROT および NBRF に登録されているアミノ酸配列との比較を行ったが、有意な相同性を示すアミノ酸配列は認められなかった。

LimL	MKKILLLIPLAFAASLAWFVWL--EPSPAPETAPPASAQAGADRAPPAAS--TGEAVPAP	56
	* .*** * . * * * * * * * * * * * *	
LimA	MTARGGRAPLARRAVVYGAVGLAAIAGVAMWSGAGRHHGGTGASGEPPDASAARGPAAAPP	60
LimL	QVMPAKVAPLPTSFRGTSVDGFSVDASGNLLITRDIRNLFDFLSAVGEEPLQQSLDRL	116
	* * * * * * . . * * * * * * * * * * * * * *	
LimA	QAAVPASTSLPPSLAGSS-APRLPLDAGGHLAKARAVRDFDFDYCLTAQSDLSAAGLDAFV	119
LimL	RAYIAAELQ-EPARGQALALMQQYIDYKKELVLLERDLPRLA--DLDALRQREAAVKALR	173
	*** . *	
LimA	MREIAAQLDGTVAQAEALDVWHRYRAYLDALAKL-RDAGAVDKSDLGAL-QLALDQRASI	177
LimL	ARIFSNEAHVAFFADEETYNQFTLERLAIRQDGKLSAEEKAAAIDRLRASLPEDQQESVL	233
	* * * * * * . . * * * * * * * * * * * * * *	
LimA	AYRWLGDWSQPFGEAQWRQRYDLARLKIADPALTDAQKAERLAALQQMPADERAAQQ	237
LimL	PQL-QSELQQQTAALQAAGAGPEAIRQMRQQLVGAEATTRLEQLDRQRSARKGRLLDDYFA	292
	* . *	
LimA	RVDRQRAAIDQIAQLKQSGATPDAMRAQLTQTLGPEAAARVAQMQQDDASWQRRYADYAA	297
LimL	EKSRIEGLTGLSEADRRAAVERLAERFSEQERLRLLGALQMRQAEQR	340
	* *	
LimA	QRAQIE-SAGLSPQDRDAQIAALRQRVFTKPGEAVRAASLDRGAGSAR	344

図 5-3. *limL* 遺伝子と、*Pseudomonas cepacia* 由来のリパーゼ活性化遺伝子 (*limA*) におけるアミノ酸配列の比較。

コンピューターを用いて GENETYX 中のマキシマムマッチング法により(50)、アミノ酸配列の相同性を調べた。*LimL* のアミノ酸配列に対し、同じアミノ酸は星印(*)、性質の似ているアミノ酸はドット(.)で示した。性質の似ているアミノ酸は Argos の方法(51)に従い、Pro, Gly; Ser, Thr; Lys, Arg; Glu, Gln, Asp, Asn; Phe, Trp, His, Tyr; Ala, Ile, Val, Leu, Met; Cys に分類した。

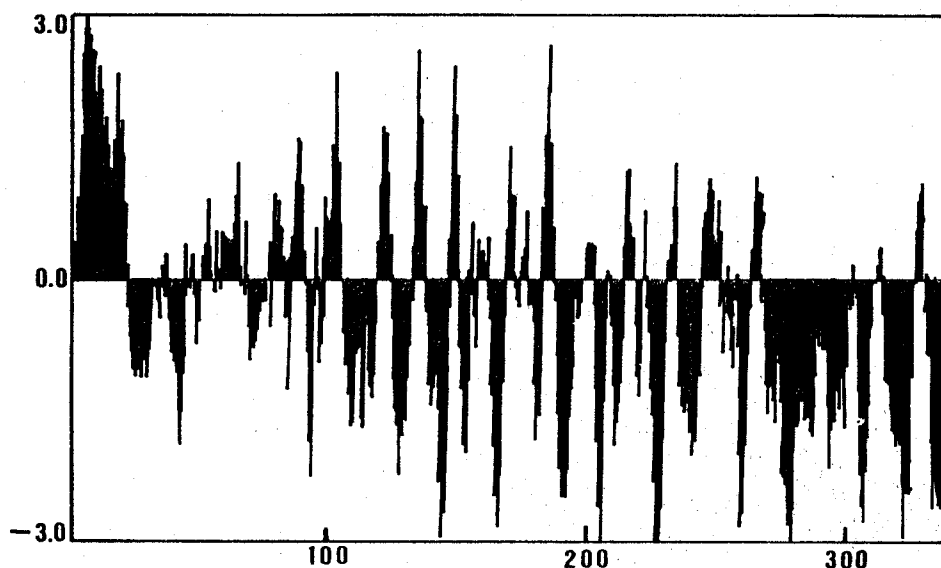


図 5 4. *LimL* 蛋白質の親水性/疎水性プロット。

Doolittle のパラメーター(60)を用いてコンピューターにより、*LimL* 蛋白質の親水性/疎水性を解析し、5 アミノ酸の平均をプロットした。

2. lipL 遺伝子に対しトランスに働く limL 遺伝子

limL 遺伝子の lipL 遺伝子に対する活性化の機能を調べるために、lipL 遺伝子と limL 遺伝子とを分離し、相合性を持つ異なるプラスミド内にそれぞれ保持させた。

以下にそのプラスミドの構築過程を示す。

1. lipL 遺伝子について — 点突然変異を用いて lipL 遺伝子 ORF のアミノ末端側に NcoI 認識部位を導入した(M-1 変異)。trc プロモターの支配下に in frame で遺伝子を挿入することのできるベクター(pKK233-2)に NcoI 部位を利用して連結した(pKM411, 図 5-5)。pKM411 から、trc プロモーターごとリパーゼ遺伝子を切り出し、クロラムフェニコール耐性を示すプラスミド(pHSG399)の中に連結した(pCMY403, 図 5-5)。

2. limL 遺伝子について — limL 遺伝子 ORF のアミノ末端近傍に存在する HinfI 認識部位で切断後、合成したオリゴヌクレオチドリンカーを用いて pKK233-2 に in frame となるよう連結した(pLIM401, 図 5-6)。pLIM401 から、trc プロモーターごと limL 遺伝子を切り出し、pSC101 の複製開始点を持つアンピシリン耐性プラスミド(pMW119)の中に連結した(pLIM402, 図 5-6)。

pCMY403 または pLIM402 を単独で大腸菌に保持させても、寒天培地上におけるトリブチリンの分解能(=リパーゼ活性)は認められなかったが、両方のプラスミドを同時に大腸菌に保持させると、その分解能が認められた(図 5-7)。このことは limL 遺伝子は lipL 遺伝子に対してトランスに働きリパーゼを活性化することを示している。Pseudomonas cepasia 由来 limA 遺伝子についても同様にリパーゼに対しトランスに働くことが明らかにされており(40)、limL 遺伝子と Pseudomonas cepasia 由来 limA 遺伝子とは同じ機能でリパーゼを活性化していることが示唆された。

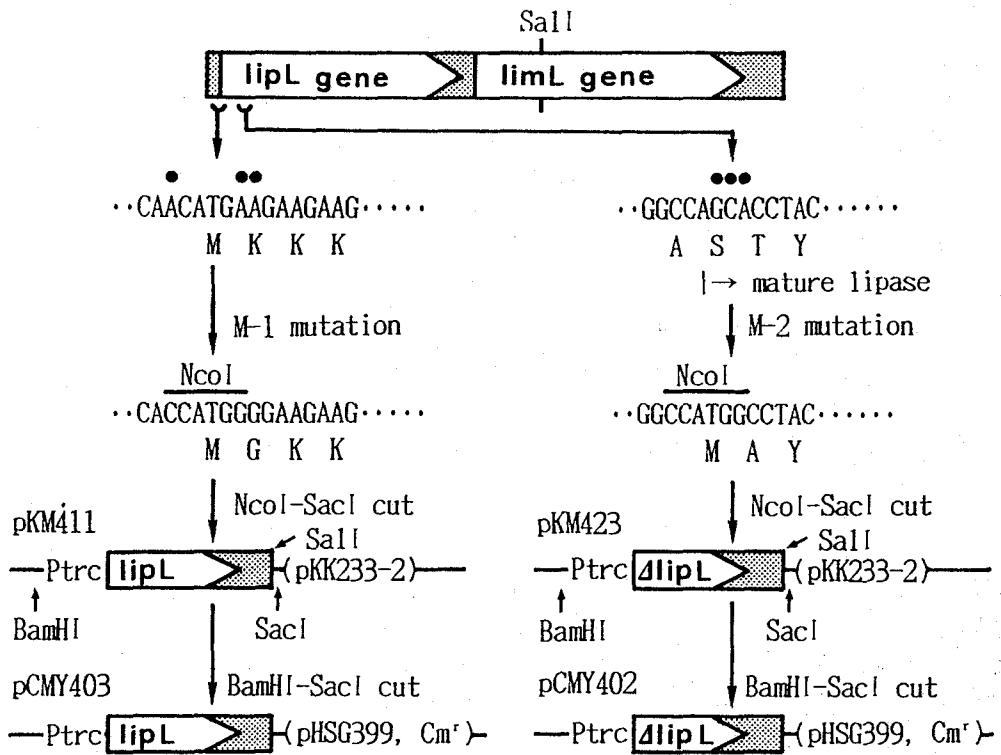


図 5-5. *lipL* 遺伝子を保持するプラスミドの構築。

LipL 蛋白質のアミノ末端、あるいはシグナルシーケンスのカルボキシ末端に相当する位置に *NcoI* 認識部位を導入するために、以下に示すオリゴヌクレオチドを合成した(●, 塩基配列の置換を行った位置)。



および



M13tv19 ファージにサブクローンした *lipL* 遺伝子の一本鎖 DNA に変異オリゴヌクレオチドを重ね合わせた後、二本鎖 DNA に還元し、変異を固定化した。点突然変異により造られた *NcoI* 認識部位を用いて、*trc* プロモーターの支配下に in frame となるように遺伝子を連結することのできるベクター-pKK233-2 にリパーゼ遺伝子を挿入した(pKM411 および pKM423)。 *BamHI* および *SacI* を用いて *trc* プロモーターごとリパーゼ遺伝子を切り出し、クロラムフェニコール耐性プラスミド、pHS399 に挿入した(pCMY403 および pCMY402)。

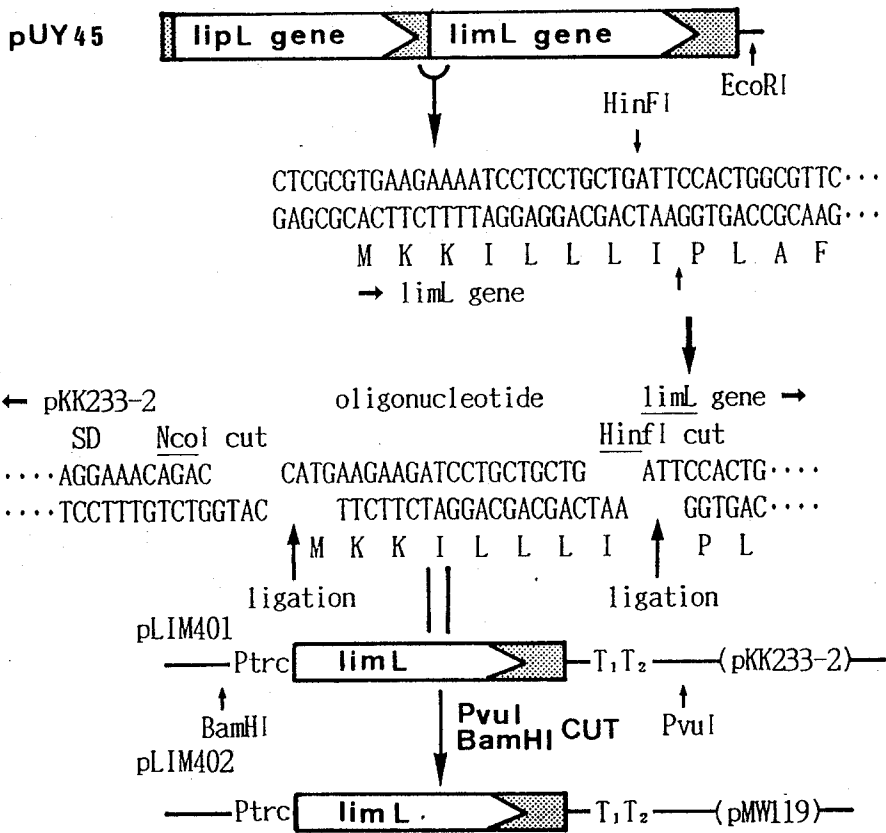
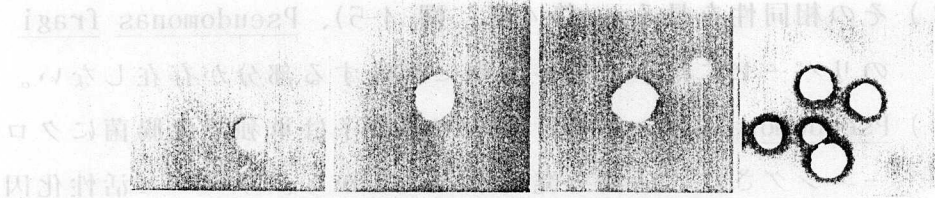


図 5-6. *limL* 遺伝子を保持するプラスミドの構築。

LimL 蛋白質のアミノ末端付近に存在する *HinFI* 認識部位を利用して *limL* 遺伝子を切り出し、合成したオリゴヌクレオチドを介して *NcoI* で切断した pKK233-2 プラスミドに in frame となるように連結した(pLIM401)。pKK233-2 プラスミド中に存在する *BamHI* および *PvuI* 部位で pLIM401 を切断し、*trc* プロモーターおよび T₁ T₂ ターミネーターごと *limL* 遺伝子を取り出し、pSC101 の複製開始点を持つプラスミド、pMW119 に挿入した(pLIM402)。



遺伝子

<u>lipL</u>	-	+	-	+
<u>limL</u>	-	-	+	+

図 5-7. lipL 遺伝子に対し、トランスに作用する limL 遺伝子。

lipL 遺伝子(pCMY403)と limL 遺伝子(pLIM402)とを保持する大腸菌について、0.5% トリブチリンを含む寒天培地に植菌し、30℃ で 4 日間培養し、リパーゼ活性によるトリブチリンの分解能を調べた。

3. LimL 蛋白質の機能

LimL 蛋白質の機能が動物の膵臓由来のリパーゼに見られるようなコリパーゼ(2) に関して、本蛋白質と次の点で異なっている。

(1) LimL 蛋白質とコリパーゼとは分子量が異なっている(LimL は約 37,000、コリパーゼは 10,000)

(2) リパーゼ P 粉末から大環状ラクトン合成能を有するリパーゼを精製した時、およびアミノ末端のアミノ酸配列を決定した時、LimL に相当する蛋白質は認められなかった。このことはコリパーゼと異なり、LimL は一度活性化したリパーゼには不必要であることを示している

それゆえ、LimL 蛋白質の機能は、コリパーゼのようにリパーゼと基質との相互作用に関与しているのではない、と思われる。

Pseudomonas fragi からも 2 つのリパーゼ遺伝子がクローニングされ、そのアミノ酸配列が明らかにされている(38,39)。両方の遺伝子はカルボキシ末端を除いてほとんど同じであり、以下に示す注目すべき特徴が見られた。

(1) Pseudomonas fragi 由来のリパーゼと、LipL を含む他の

Pseudomonas 属由来リパーゼとのアミノ酸配列は 38-48% の相同性が認められる(第 4 章、図 4-5)。

(2) その相同性を見ると(第4章、図4-5)、Pseudomonas fragiのリパーゼにはシグナル配列に相当する部分が存在しない。

(3) Pseudomonas fragiのリパーゼ遺伝子は単独で大腸菌にクローニングされ、活性を発現することから、リパーゼ活性化因子を必要としないと考えられる(37,39)。

これらのことから、リパーゼ活性化因子の機能はリパーゼの細胞膜透過に関与していることが考えられる。Pseudomonas cepasia由来のリパーゼ活性化蛋白質(LimA)についてもリパーゼの細胞膜透過への関与を示唆するデータが示されている(40)。それゆえ、リパーゼ蛋白質(LipL)のシグナル配列を除いてしまえばLimL蛋白質が存在しなくてもリパーゼは活性を持って発現するのではないかと考えた。LipL蛋白質のシグナル配列を除く(Δ LipL)のために、点突然変異によりlipL遺伝子のシグナル配列直後の場所にNcoI認識部位を導入した(図5-5)。次に、NcoI認識部位を用いてpKK233-2プラスミドにin frameとなるよう Δ lipL遺伝子を連結し(pKM423, 図5-5)、大腸菌内に保持させたところ、寒天培地上におけるトリブチリンの分解能は認められなかった(図5-1)。しかしながら、 Δ lipL遺伝子とlimL遺伝子とをシス(pKM423)またはトランス(pCMY402, pLIM402)に存在させることにより、リパーゼ活性が認められた(図5-1)。この結果は、LimL蛋白質による活性化機構において、リパーゼのシグナルシークエンス部分は無関係であることを示すものであり、LimLは大腸菌における蛋白質膜透過システムにおけるSecA蛋白質(61)のような機能は有していないと思われる。SecB蛋白質(62,63)のようないわゆるシャペロン蛋白質である可能性は否定できないが、LimLの機能はリパーゼの細胞膜透過にあるのではなく、リパーゼを何らかの方法で修飾するという可能性も考えられ、LimLの機能を解析する上で重要な指針になるものと思われる。

Pseudomonas由来リパーゼと相同性を示さず、リパーゼ活性化遺伝子を持たないPseudomonas fluorescens由来の耐熱性リパーゼ

(42) は、大腸菌内で封入体を形成するほど高度に発現している (64)。しかし、大腸菌内での大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの発現は、lipL 遺伝子 ($\Delta lipL$ も含めて)、limL 遺伝子ともに強力な tac プロモーターの支配下でありながら、IPTG 誘導後のリパーゼを p-nitrophenyl acetate の加水分解活性として、あるいは SDS-PAGE でリパーゼに相当するバンドとして検出できなかった (未発表データ)。従って、本リパーゼにおける活性化因子 (limL) の存在が大腸菌内におけるリパーゼの大量発現に対しても大きな影響を及ぼしていると考えられ、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼを大腸菌内で活性のある蛋白質として大量発現させるためには、LimL の機能を解明するとともに、発現系の変更および宿主菌株の変更などの工夫が必要となると考えられる。

第 4 節 要約

1. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子の下流に位置しリパーゼ活性発現のために必須の遺伝子 (limL) の存在を見だし、その塩基配列からそこにコードされている蛋白質 (LimL) を明らかにした。

2. リパーゼ活性化蛋白質は 340 個のアミノ酸からなり、そのアミノ酸配列は Pseudomonas cepasia の LimA と 29% の相同性が認められ、疎水性／親水性の性質は全体を通して似ていた。

3. limL 遺伝子は lipL 遺伝子に対して大腸菌内でトランスに働くことを明らかにし、他の Pseudomonas 属由来リパーゼ活性化因子と同様の機構でリパーゼを活性化していることが示唆された。

第 1 節 緒言

近年の蛋白質分離技術の進歩により、微生物の生産するリパーゼに関して、同一菌株が複数種のリパーゼを生産しているという、いわゆるリパーゼの多形性と呼ばれる現象が明らかになってきた。

Rhizopus delemer の産生するリパーゼが A, B, C, 3 種類のリパーゼよりなることが 1966 年に報告されて以来(65)、現在までに 13 種類の微生物からリパーゼの多形性についての報告がなされている。同一微生物によるリパーゼの多形性発現の機構は様々であり 1) Rhizopus delemer リパーゼ B, C に見られる、リン脂質結合の有無によるもの(2)、2) Rhizopus arrhizus リパーゼ I, II のようにプロテアーゼに分解され変化するもの(66)、3) Rhizopus microsporus リパーゼのように 2 種類のサブユニット(A, B) の組み合わせによるもの(67)、4) Mucor miehei リパーゼ A, B のように結合する糖鎖の違いによるもの(34)、5) Geotrichum candidum リパーゼのように遺伝子そのものが異なるもの(32, 33)、などの例が知られている。このような同一微生物におけるリパーゼの多形性は、微生物の生理学上の観点から、および酵素の構造とその機能の観点からも興味深い現象である。

Pseudomonas 属由来のリパーゼではまだ多形性の報告はされていない。しかしながら、本論文、第 2 章の大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ蛋白質の精製過程において、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼとは異なるリパーゼの存在が明かとなっている。

本章では、ラクトン化リパーゼ遺伝子をクローニングする過程において単離した 3 種類のリパーゼ遺伝子について述べ、

Pseudomonas sp. 109 株もまたリパーゼの多形性発現株であることを明らかにした。

第2節 実験材料および方法

1. 使用菌株およびプラスミド

第4章第2節に示したと同じものを用いた。

2. 遺伝子操作

第4章第2節に示した通り行った。

サザンハイブリダイゼーションに用いた ^{32}P -ラベルプローブは Random Primer DNA Labeling Kit (宝酒造) を用い、添付の使用説明書に従って作成した。

3. エステラーゼ活性およびラクトン合成活性の測定

エステラーゼ活性の測定には *p*-nitrophenyl acetate を、ラクトン合成活性測定には methyl ω -hydroxyhexadecanoate を基質として用いた。他は第3章第2節の通り行った。

4. リパーゼ蛋白質の大腸菌内での発現

リパーゼ遺伝子を含むプラスミドを保持する大腸菌 JM105 株を 1.0% グルコースを含む LB 培地、1 ℓ を用いて振盪培養した(37 $^{\circ}\text{C}$)。対数増殖期後期に、遠心分離(3,000 \times *g*, 10 min)により菌体を集めた後、グルコースを含まない LB 培地 1 ℓ に懸濁した。最終濃度 0.5 mM となるように IPTG を添加後、28 $^{\circ}\text{C}$ 、5 時間振盪培養を行った。遠心分離(3,000 \times *g*, 10 min)により、菌体を回収し、10 ml の 10 mM potassium phosphate (pH 6.5) に懸濁した。超音波処理により菌体を破碎し、遠心分離(8,000 \times *g*, 20 min)で得られた上清を粗酵素溶液とした。以上の操作により 1 ℓ の培養液(約 4 g の菌体)から、*p*-nitrophenyl acetate を基質としたエステラーゼ活性で、2,000–4,000 単位のリパーゼが得られた。

5. リパーゼの精製

Sepharose CL-6B によるゲル濾過は第2章第2節に示した方法で行った。TSK DEAE-5PW カラム(東ソー)を用いた、HPLC イオン交換クロマトグラフィーでは、溶出緩衝液として 10 mM TEA·HCl (pH 6.5), 1 mM MgCl₂ を用い、NaCl 0-0.5 M の濃度勾配により蛋白質を溶出させた。蛋白質の溶出様式は UV (280 nm) および蛍光 (Ex. 280nm, Em. 340nm) で検出した。

第3節 結果および考察

1. lipA 遺伝子

(1) lipA 遺伝子のクローニング

Pseudomonas sp. 109 株より抽出した全染色体 DNA を PstI で切断し pUC19 プラスミドの PstI 部位に挿入後、大腸菌 JM105 を形質転換した。得られた組換え体について、0.5% トリブチリンを含む寒天培地におけるトリブチリンの分解能をリパーゼ活性の指標として検索する、いわゆるショットガンクローニングを行ったところ、約 1,000 株の組換え体の内、2 株にトリブチリンの分解能が認められた。プラスミドを抽出し、挿入断片の長さを調べたところ 2 株とも約 3.5 kbp の挿入が認められ(図 6-1)、制限酵素による切断様式が同一であったことから、同一断片であると判断し、lipA 遺伝子と命名した。

(2) lipA 遺伝子の塩基配列

lipA 遺伝子を含む 3.5 kbp の DNA 断片についてサブクローニングを行い 1.5 kbp の断片とした(図 6-1)。この断片についてダ

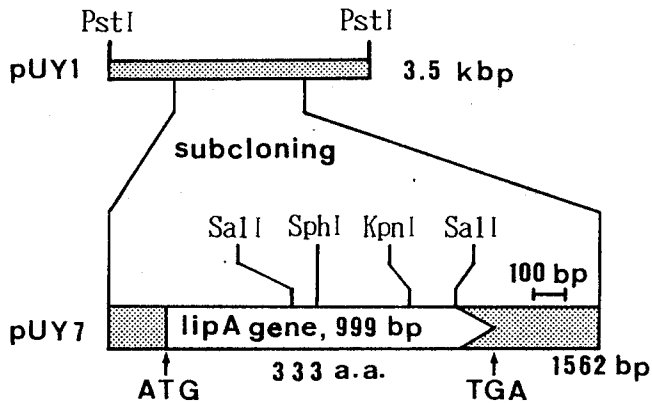


図 6-1. *lipA* 遺伝子の制限酵素地図。

lipA 遺伝子をクローン化して得られた 3.5 kbp の PstI 断片を上部に、サブクローニングにより 1.5 kbp とした DNA 断片の制限酵素地図、および塩基配列から決定した ORF の位置を下部の図に示した。

イデオキシ法により塩基配列の決定を行ったところ、333 個のアミノ酸をコードしているひとつの ORF を見いだした(図 6-1、および図 6-2)。この ORF から予想されるアミノ酸配列(LipA) について大環状ラクトン合成能を有するリパーゼとの比較を行ったが有意な相同性は認められなかった。他の *Pseudomonas* 属由来、および他種由来のリパーゼとの比較も行ったが相同性を示さなかった。また LipA 蛋白質の配列はその中にリパーゼに特異的な配列、Gly-X-Ser-X-Gly、を持っているにもかかわらず、その周辺の配列は他のリパーゼとは大きく異なっていた。このことは、LipA 蛋白質は他のリパーゼとは異なる反応性、あるいは基質特異性を有している可能性を示唆するものであり興味深い。

CCGGCATGTCAGTTCGAAACGAGAGCC 29
 AGGCTGGGGCTGGCGAACMTGTGATCAGGTGATCGAGGGGGCATTCGCGGACCAAGCGCTGGTGGGGGGCGT 104
 GGTGCTGGTGGCACAAGGGGGCAGTGGCTCTATGAGACGGCTGGCGGACCGGAAAGCCGGCGGATA 179
 ATGGGGGAGGACAGCCGTGTCGGCCGCGCTGGGTGAGCAAGCCGATCGTCAAGCGTGGCGGCCCTGAGCGCTGGTG 254
 M G E D S L F R L A S V S K P T V S V A A L S L V -25-
 GACGAGGGCGGGCTGGCCCTCGATGAGCCGATCGCCGACGGTTCGCCGGGTTCCGTCGCGGCCGCGCGACCGC 329
 D E G R L A L D E P I A D W L P A F R P R L A D G -50-
 CGGAGCGCGCCGATCAAGCCGGCAGTTCGCTGAGCCACAGCGCGGCCCTCGGCTATCGCTTCCTCGAAGCCGAC 404
 R E R G I T P R Q L L S H S A G L G Y R F L E A D -75-
 GCAGACGGCCCTATGCGCCGCGCGGATTCGCGATGGCATGGAACCTGCGCGGTTTCGACCTGGCCGAGAACTCTC 479
 A D G P Y A R A G I S D G M D L P G F D L A E N L -100-
 CGTGGCCGGCCCTCGTGGCCCTGCTCTACGAACCGCGCGCCCTGGGGCTATTCGCTGGCCACCGACGTCCTC 554
 R R L A S V P L L Y E P G R A W G Y S L A T D V L -125-
 GCGCGCTGGTGGAGCGGGTGGACGGCGCGCCCTGGCGGAGTGGTGGCGGACGGGTCGGGATTCAGCGCGC 629
 G A L V E R V D G R P L A E V L R Q R V G I P A G -150-
 ATGGCGGACAGCGGCTTCCTCTGCGCGGACCGGTGGCGACTGGCGGGCGGCTTCAGCTCAGCGACCGGCCACGCGC 704
 M R D S G F L C A D A C R L A A V Y V S D R P R P -175-
 CGCCGATGGCGGGCGGGAGACCGTGGCGCGGTCGAGGACAGCGTGGCCATTCGCTTCGAGCCGAGTGGGGCT 779
 R R M A G R E T V A P F E D S V G I R F E P S R A -200-
 TPCGAAACCGTCTGCTATGGGTTCGGCGGGGGGGGATGATGGCCAGCGCGCGGACCGTCTGGCCCTTTTGGAA 854
 F E P S A Y A S G G A G M I G S A G D V L R L L E -225-
 ATCCPTCGCCAGGGCGGGCGCGGCTGCTGAGCGCCGCGGCGGGAGAGATGGGTGGCGACCGAGGTAACCGCC 929
 I L R Q G G A P L L T P G L V E E M G R D Q V P G -250-
 CTGAACTGCGGCCAATCCCGGTTTCGGCTTCGGCCGGGTTCCTCGTGGTGGCGGACCGCGGCTATCGCGCAA 1004
 L E L P A N P G F G F G L G F S V L R D P A I A Q -275-
 TCGCGGAGGCTCCCGGACCTGGCGCTGGGGTGGCGCCPACGGGCATTCCTGGTTCGTCGACCGGGCCCGGAA 1079
 S P E A P G T W R W G G A Y G H S W F V D R A R E -300-
 CTGTGGTGGTGGCGCTTACCAACACCCCTGTTCGAGGGAAATGTGGGACCGCTTCGTCACGACCTGGCGGAGCC 1154
 L S V V A L T N T L F E G M S G R F V N D L R D A -325-
 GCTACCGTTCGCGGAGCTGGCGTATGAGGAGCGCCGGAACGATTCGGGAGAACCGCGGGGCGCGCTGGGTGG 1229
 V Y R S A E L R *** -333-
 CCGTGGCGCGCGCTGGCGCTGAGTGGCTGCTGGGATGGCGATGTCGGGCTTCGTCGCGCATCTCAGCGAAA 1304
 CCGTGGCGCGCGCTGGCTGGCGCAATGGCGCGGGCTGGCGGTTCAGCGAGCGCTGGCGGGCACTGGTCA 1379
 GGTCTACCGCTTGGGTTCGCTACGGCGCGCTGGCGCGGCGGAGCTGACCCAGGGCTGGCGGGCGCGCGG 1454
 TGTGCTGCTGGCGCTGGCTGATCTCTTCGTCGCAACAGCCPACCGCGGTTTCCTCGGATPACCGCGTACCC 1529
 TGTGGCGCGCTGGCGAGGTGGCGCGCTGGC 1564

図 6-2. *lipA* 遺伝子の塩基配列。

サブクローニングにより得た *lipA* 遺伝子を含む 1,562 bp の塩基配列を示し、塩基配列から予想されるアミノ酸配列を塩基配列の下に 1 文字コードで示した。最初のメチオニンを 1 として番号を付している。リパーゼに特異的な保存領域のアミノ酸を棒で囲んで示し、リボソーム結合位置と考えられる部分を破線で、終止コドンの位置を星印(***) で示した。

(3) LipA 蛋白質の精製

lipA 遺伝子産物を明らかにするために、lipA 遺伝子を保持する大腸菌 JM105 を培養し、IPTG により遺伝子の発現を誘導して得られた菌体抽出液から、LipA 蛋白質の精製を行った。はじめ、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ蛋白質と同様に、等電点電気泳動による分離を試みたが、Ampholine が LipA 蛋白質を不可逆的に阻害したことから(未発表データ)、粗酵素溶液に対しそのまま Sepharose CL-6B によるゲル濾過を行った(図 6-3)。この時点で、

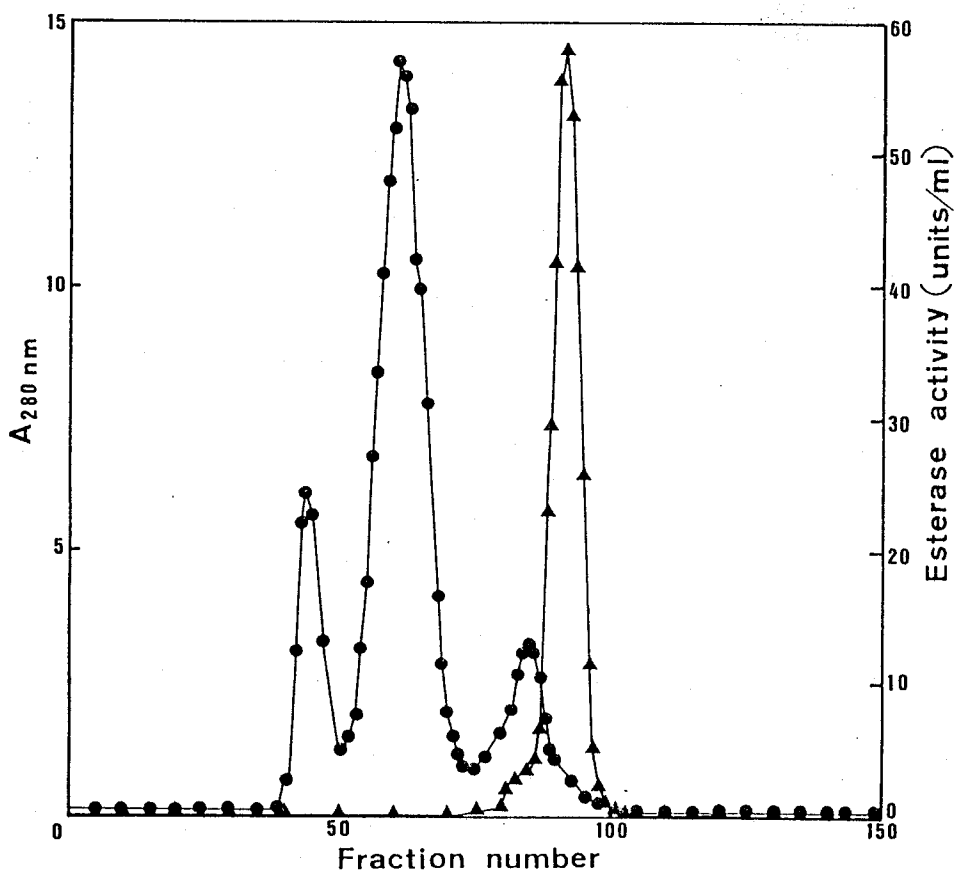


図 6-3. LipA 蛋白質のゲル濾過クロマトグラフィー。

Sepharose CL-6B カラムから溶出し、10 ml ずつ分取した各フラクションについて、280 nm における吸光度、および p-nitrophenyl acetate を基質としたエステラーゼ活性を測定した。●—●, A_{280 nm}; ▲—▲, エステラーゼ活性。

エステラーゼ活性画分に対して SDS-PAGE を行ったところ、LipA 蛋白質と思われるバンドが得られた(図 6-4) が、まだ多くの蛋白質を含んでいた。次に、DEAE-5PW カラムを用いた、HPLC イオン交換クロマトグラフィーを行い(図 6-5)、得られた各ピークについてエステラーゼ活性を測定した。活性の認められたピークを分取し、SDS-PAGE を行ったところ(図 6-3)、明らかに一本、主要なバンドが認められた。このバンドから蛋白質の分子量を求めたところ、約 38,000 となり、塩基配列から求めた分子量、36,000 とほぼ一致した。よって精製した蛋白質は、LipA であると結論した。

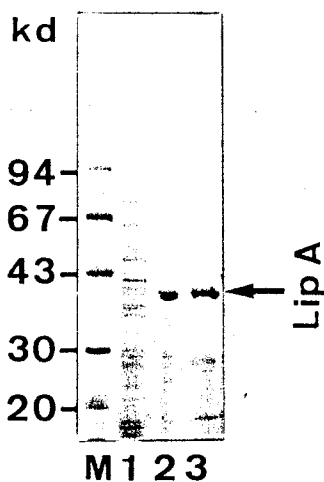


図 6-4. LipA 蛋白質の SDS-PAGE。

各精製段階における LipA 蛋白質について、濃度勾配 4-20% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、Coomassie Brilliant Blue G-250 で染色し、蛋白質を検出した。lane 1, 精製前の粗酵素溶液; lane 2, Sepharose CL-6B 後のリパーゼ溶液; lane 3 DEAE 5PW HPLC で精製したリパーゼ; M, 分子量マーカー蛋白質(phosphorylase b, $M_r=94,000$; bovine serum albumin, $M_r=67,000$; ovalbumin, $M_r=43,000$; carbonic anhydrase, $M_r=30,000$; soybean trypsin inhibitor, $M_r=20,000$).

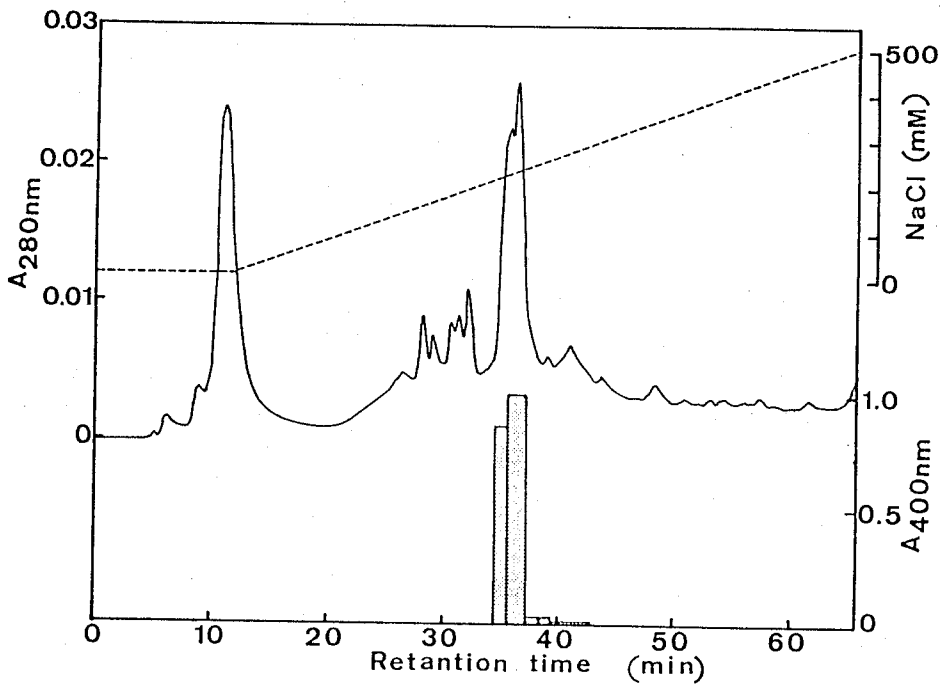


図 6-5. DEAE 5PW HPLC を用いた lipA 蛋白質の精製。

ゲル濾過後のリパーゼサンプルについて DEAE 5PW カラムを用いた HPLC イオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出された蛋白質は、280 nm における吸光度で検出し、各ピークごとに分取した。各画分 100 μ l に対して、p-nitrophenyl acetate を基質としてエステラーゼ活性を測定し、反応によって得られた p-nitrophenol の量を 400 nm における吸光度として、図中に棒グラフで示した。図中の実線は 280 nm における吸光度を、破線は NaCl の濃度勾配の様式を示す。

(5) LipA 蛋白質の大環状ラクトン合成能

Sepharose CL-6B によるゲル濾過後の粗精製リパーゼ(エステラーゼ活性で 1,000 単位)を用いて大環状ラクトン合成能を調べたところ、methyl ω -hydroxyhexadecanoate を基質とした検出系ではラクトン合成活性は認められなかった。従って、LipA 蛋白質は短鎖エステルの加水分解能を有するが、大環状ラクトン合成能を持たないリパーゼであることが明らかとなった。

2. lipB 遺伝子

(1) lipB 遺伝子のクローニング

lipB 遺伝子のクローニングには、EcoRI 処理した全染色体 DNA を用いた点を除き、lipA 遺伝子の場合と同様のショットガンクローニングを行ったところ、約 2,000 株の組換え体のうち、寒天培地上でトリブチリンを分解しうる 2 株の組換え体を見いだした。この 2 株についてプラスミドを抽出し、挿入断片の大きさを調べたところ、ひとつの株には 2.2 kbp (図 6-6)、もう一方の株には

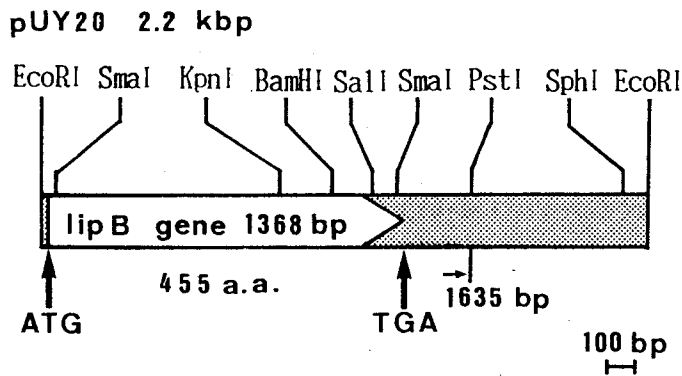


図 6-6. lipB 遺伝子の制限酵素地図。

クローニングにより得られた 2.2 kbp の EcoRI 断片の制限酵素地図、および塩基配列から決定した lipB 遺伝子をコードする ORF の位置を示した。

9.0 kbp の挿入が認められた(未発表データ)。9.0 kbp の DNA 断片中には、3.5 kbp の PstI 断片が含まれており、その制限酵素地図が lipA 遺伝子と同じであったことから(未発表データ)、lipA 遺伝子であると判断した。一方、2.2 kbp の断片は、大きさおよび制限酵素切断パターンが lipA 遺伝子とは明らかに異なっていたので、lipB 遺伝子と命名した(図 6-6)。

(2) lipB 遺伝子の塩基配列

lipB 遺伝子の 2.2 kbp、DNA 断片について PstI で切断し、1.6 kbp の断片(図 6-6)としてもリパーゼ活性は失われなかったため、この 1.6 kbp 断片について塩基配列の決定を行った。その結果、図 6-7 に示すように 455 個のアミノ酸をコードする ORF を見いだした(LipB 蛋白質)。他のリパーゼのアミノ酸配列と比較を行ったが、LipL、LipA 蛋白質を含めて有意な相同性は全く認められなかったこと、および LipB 蛋白質のアミノ酸配列中にはリパーゼに特異的な配列は存在しなかった(図 6-7)ことから、本 LipB 蛋白質は、従来アミノ酸配列が明らかにされているリパーゼとは全く異なるリパーゼであると考えられる。

(3) LipB 蛋白質の精製

LipA 蛋白質を大腸菌内で発現させた際と同一の方法により、1 ℓ の培養液(約 4 g の菌体)から、2,000-4,000 単位のエステラーゼ活性を持つ LipB 蛋白質を発現させることができた。但し、宿主菌株としては E. coli JM105 よりも、E. coli c600 (F⁻ thi-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 λ ⁻ McrA⁻ McrB⁺) のほうが常に 20-30% 高いリパーゼ活性を示したことから(未発表データ)、LipB 蛋白質の発現については E. coli c600 を使用した。

GANTTUAACGAC 12

ATGAAACGACCCNTTCGAAACAGITCCCGCCCGGACCTCCAGCGCAACCCGGGCTTCGGCTTCGGACCGAGCCITG 87
 M K R P I E T V P A A T S S A T R A F A L A T S L -25-
 TTGTACGGCTTCGGCCGCGCCGGCCGCTTCCTGGACCGCCAGITGGCAGGCCAGCCCGCAGCCGGTCTGGGCTGAG 162
 L Y A C A A P A A S W T A S W Q A S P Q P V W A E -50-
 GACTTCCTGTITTCOCAGCAACGITGCCGGCCGAACTGCACGACCCAGCCGTTGCCGCAACTGGCGCGAATCAGCCITG 237
 D F L F P S N V P A E L H D Q T V R Q L A R I S L -75-
 GGAGGAACCGCGCTGGCCATCGTCCCTGGCAAAITACCITATGGAAAGCGCCCGATCCGGATCGCCCGGCCACCCITG 312
 G G T R V R I V L A N T Y G K R P I R I G R A T L -100-
 GCCAAACCCGGITTCGAGCGCGCCGGITCGCCACCGCCAGCCITGCNIGACGIGACCITITGGCGGACCGCGGACG 387
 A K P G S E R A A V A T G S L H D V T F G G R R T -125-
 GCGACCATTCGGCCCGCCGCCACGCFACTCAGCGATCCGGITGGCGATGCCGGITGGCCCGCTCTCCGAGGTGCTG 462
 A T I A P G A T L L S D P V A M P V A A L S Q V L -150-
 GTGAGTCTCTACCTTCGGCCCGCCACGCCCCAATGGAAACCTTCOCACTGGGACCGCCCGCAGACGGGCTGGATCGTC 537
 V S L Y L P A A T P M E T F H W D G R Q T G W I V -175-
 GCGGGGAGCAGACCCAAAGCCACGCATTCGACCTGGACCGGGCGGACAGCCAGAGCACCACCGCGCGCCITGCITG 612
 A G E Q T Q S H A L Q L D A A D S Q S T T A R L L -200-
 TTGACAGGTATCCITGGTITGAAACCGAAGCGGCAACCGGACCGCTGGTIGACCGCTCGGGGACTTCGATCAACCGACCGA 687
 L T G I L V E T E A A T R T L V T L G D S I T D G -225-
 GCCAGCCACAGCCTCGACCGGAAACAGCCGITGGCCGGACTTCCTTCGGCAACCGCTGGCCCGCGCATGGGCTTCGCC 762
 A S A S L D R N S R W P D F L A E R L A P H G V A -250-
 GTGGTCAATTCGGGGATITTCGGCGCCCGCTCTGCTGAGCGACCGGCATGGGCGGAGCCCGCTGGCACGTCITGGAC 837
 V V N A G I S G A R L L S D G M G A S A L A R L D -275-
 CCGGACGTACTGGCCAGCCAGGCGCAAGCAGCATGGITGGTIGATGCTCGGCATCAACGACATITGGCTGGCCCGGT 912
 R D V L A Q P G A S S M V V M L G I N D I A W P G -300-

ACGGCTTTGGCCCGGAATGCCGCAACGCCACCCCTGGGAAGGCTGATGGCCGGCTACCGGCAMTGTATCGAACGG 987
 T A F A R N A A P P T L E A L I A G Y R Q L I E R -325-
 GCGCACAAACCGGGTATTCGGGGTCTGGGGCGGACCCCTCACGCCGTTCGAGGGCGCACATGCCCGGCACGCCGTTCG 1062
 A H N R G I R V V G A T L T P F E G A L P G T P L -350-
 AGCGATTTATTAACCATCCCGCAAGGAAGCCCTGGCGAGGCAGGTTAACGAGTGGATCCGTTCATGCCGGGGCCCTTC 1137
 S D Y Y H P A K E A L R R Q V N E W I R H A G A F -375-
 GATGGGGTGTATCGACTTCGACCGCGGCATTCGGCGGATCCGGAGCAGCCGTTCGCGGCTTCGCGCGCGCTACGACTCC 1212
 D A V I D F D A A L R D P E Q P S R L A A R Y D S -400-
 GCGACCATTCCTGACCCACAGCGAGGAAGCCATCCCGGGGATGGCGGGGCGGTCGACCTTCGAGCTTCCTTCCTGGAC 1287
 G D H L H P S D E G N R A M A A A V D L D V L L D -425-
 GAGGTGCCCGACGGCCCTACCGGGCGAGCCCGGGCGGATAGCGCAACGAAATGAAAAAAGGCGCCCGAAGGGCGCT 1362
 E V P D G L P A E P G P I A Q R N E K R R P K A P -450-
 TTTTCGATTCACCGCTGAGCGTTCACITGGTGTGTCAGTTCGCGGGGCTTCGGCCATTCATGGGATATACGCTTCGGCTT 1437
 F F D H R *** -455-
 GGCCTTCCTCCGGAAACAGCCGACAGGTCGATGTTCAGCAGGCGGTTCGGCCAGCGAAGCCGCCCTTCACCTCGAT 1512
 ATGGTCGGCGAGGGCGGAACGACAGCTTCGAAGGGCGGCTTCGGCATGCCCTGGTGCAGGTAGGTCACGTTGTTCGGTTCG 1587
 GACTTCCTCGGCTTCGCGCCACTGACGGTCAGCAGCGCGCGCTTCGACCTTCG 1637

図 6-7. lipB 遺伝子の塩基配列。

サブクローニングにより得た lipB 遺伝子を含む 1,637 bp の PstI 断片について塩基配列を示し、塩基配列から予想されるアミノ酸配列を塩基配列の下に 1 文字コードで示した。最初のメチオニンを 1 として番号を付し、終止コドンの位置を星印(***) で示した。

LipB 蛋白質にも LipA 蛋白質と同様に Ampholine による不可逆的な失活が認められたので、精製の第一段階として Sepharose CL-6B によるゲル濾過を行った(図 6-8)。エステラーゼ活性の認められた画分を SDS-PAGE により調べたところ、まだ多数のバンドが認められた(図 6-9)。DEAE-5PW カラムを用いた、HPLC イオン交換クロマ

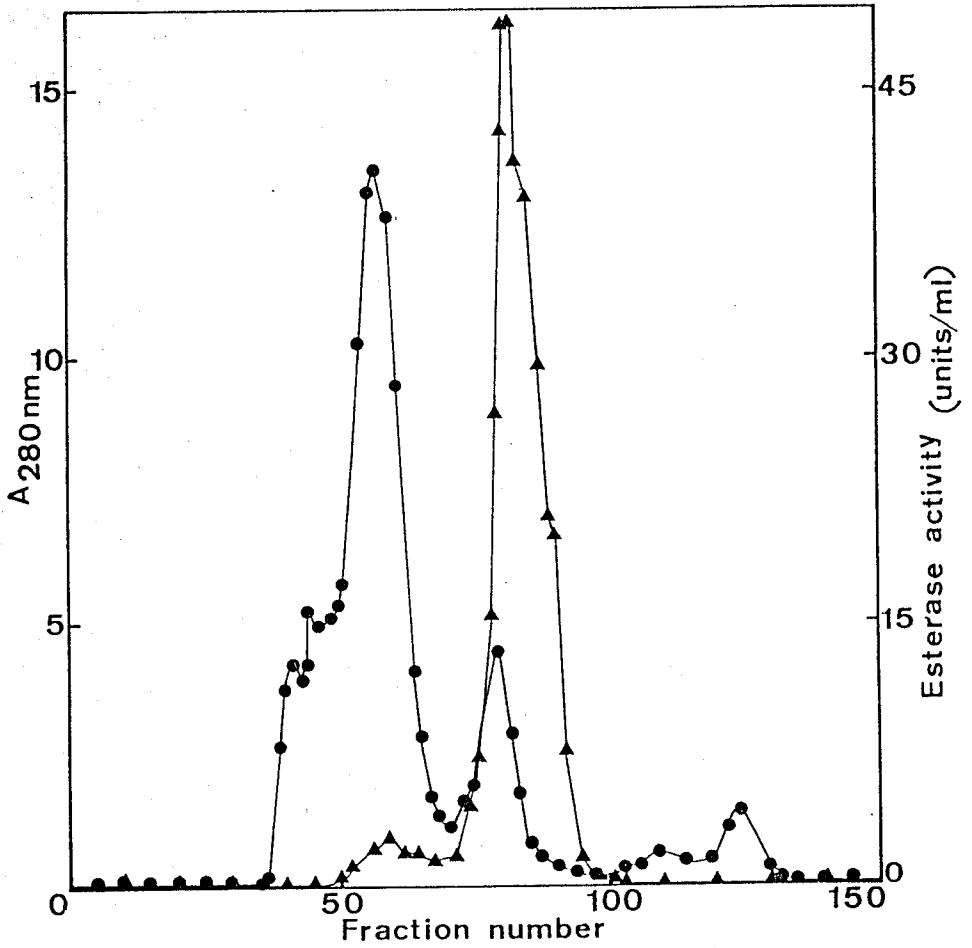


図 6-8. LipB 蛋白質のゲル濾過クロマトグラフィー。

Sepharose CL-6B カラムから溶出し、10 ml ずつ分取した各画分について、280 nm における吸光度、および p-nitrophenyl acetate を基質としたエステラーゼ活性を測定した。●—●—, A280 nm; ▲—▲—, エステラーゼ活性。

トグラフィーによる分画を行い、各ピークについてエステラーゼ活性を測定し、LipB 蛋白質を特定した。図 6-10 に示したエステラーゼ活性を有するピークを分取し、SDS-PAGE を行ったところ、(図 6-9) 一本の主要なバンドが現れた。

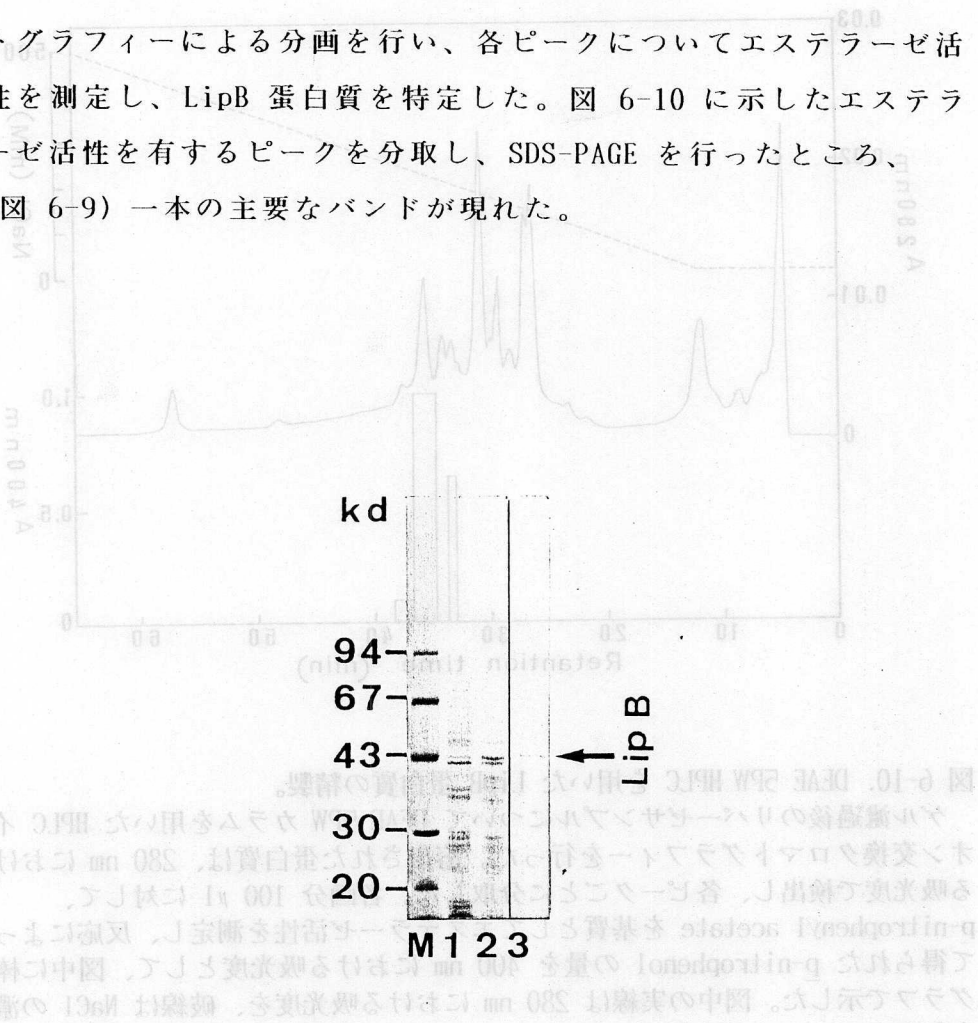


図 6-9. LipB 蛋白質の SDS-PAGE.

各精製段階における LipB 蛋白質について、濃度勾配 4-20% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、Coomassie Brilliant Blue G-250 で染色し、蛋白質を検出した。lane 1, 精製前の粗酵素溶液; lane 2, Sepharose CL-6B 後のリパーゼ溶液; lane 3 DEAE 5PW HPLC で精製したリパーゼ; M, 分子量マーカー蛋白質 (phosphorylase b, $M_r=94,000$; bovine serum albumin, $M_r=67,000$; ovalbumin, $M_r=43,000$; carbonic anhydrase, $M_r=30,000$; soybean trypsin inhibitor, $M_r=20,000$).

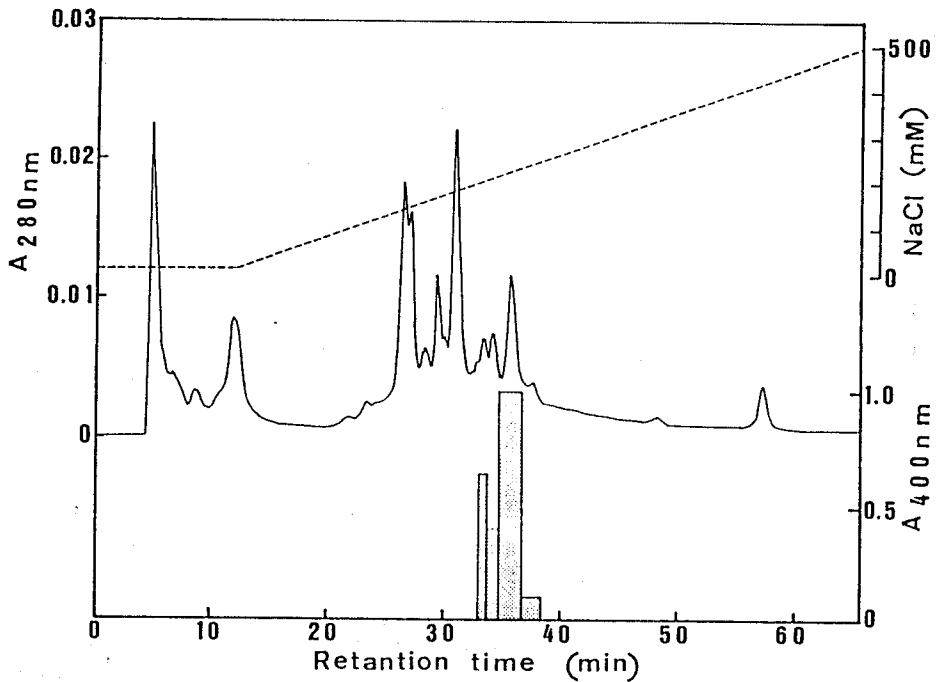


図 6-10. DEAE 5PW HPLC を用いた LipB 蛋白質の精製。

ゲル濾過後のリパーゼサンプルについて DEAE 5PW カラムを用いた HPLC イオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出された蛋白質は、280 nm における吸光度で検出し、各ピークごとに分取した。各画分 100 μ l に対して、p-nitrophenyl acetate を基質としてエステラーゼ活性を測定し、反応によって得られた p-nitrophenol の量を 400 nm における吸光度として、図中に棒グラフで示した。図中の実線は 280 nm における吸光度を、破線は NaCl の濃度勾配のパターンを示す。

(4) LipB 蛋白質の大環状ラクトン合成能

Sepharose CL-6B ゲル濾過後の粗精製リパーゼ、エステラーゼ活性で 1000 単位について methyl ω -hydroxyhexadecanoate を基質とし、大環状ラクトン合成能を調べたが、ラクトン合成活性は認められなかった。従って、LipB 蛋白質は、LipA 蛋白質と同様に短鎖エステル加水分解能を有するが、大環状ラクトン合成能を持たないリパーゼであることが明らかとなった。

3. lipC 遺伝子

(1) lipC 遺伝子のクローニング

lipL 遺伝子のクローニングの過程に際して、Pseudomonas sp. 109 株染色体 DNA では約 3 kbp の位置に合成プローブがハイブリダイズすることはすでに述べた。この 3 Kbp の PstI 断片(第 4 章 図4-1) に相当する DNA を、pUC19 プラスミドに連結後、大腸菌 JM105 を形質転換して得られたのが lipC 遺伝子である。

約 2,000 個の組換え体のなかで、1 株にだけ、トリブチリンを含んだ寒天培地におけるトリブチリンの分解能が認められたので、この株からプラスミドを抽出し、挿入断片について調べた(図 6-11)

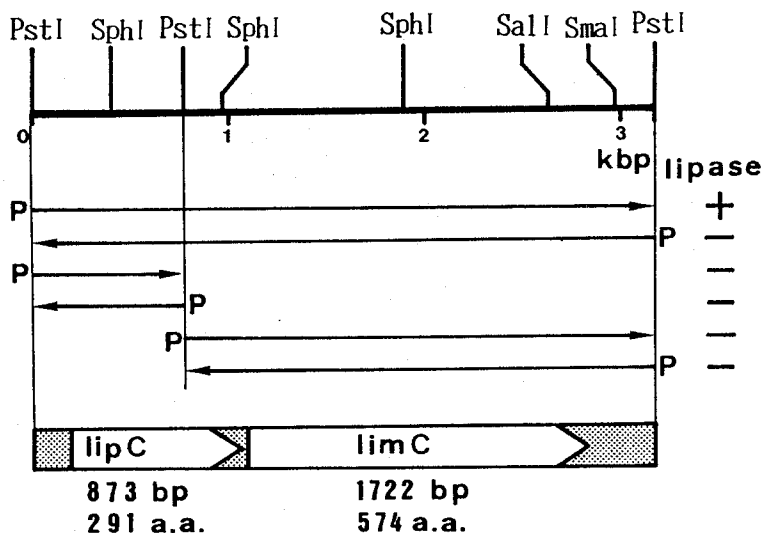


図 6-11. lipC 遺伝子の制限酵素地図。

クローニングにより得られた 3.1 kbp DNA 断片の制限酵素地図、および塩基配列から決定した lipC 遺伝子、および limC 遺伝子をコードする ORF の位置関係を図示した。3.1 kbp の断片を PstI で切断し、得られたそれぞれの断片を持つプラスミドを構築し、大腸菌 JM105 に形質転換しリパーゼ活性を調べた。図中の P は lac プロモーターの位置を示す。プラスミドを保持する大腸菌を 0.5% トリブチリンを含む LB 培地上に植菌し、30°C、4 日間培養を行い、コロニーの周りのトリブチリンの分解が認められるものを“リパーゼ +”、認められないものを“リパーゼ -”と判断した。

ところ、3.1 kbp の挿入断片は PstI により、0.8 kbp と 2.3 kbp の断片に別れたが(図 6-11)、どちらの断片もリパーゼ活性のためには必要であることが判明した。本 3.1 kbp の制限酵素地図は、lipA、lipB、および lipL 遺伝子と異なっていたことから本遺伝子を lipC 遺伝子と命名した。本 lipC 遺伝子は、PstI 部分分解物の大きさが、たまたま 3 kbp であったために取得できたもので、全くの副産物としてクローンされた遺伝子であり、lipC 遺伝子は合成オリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズしなかった(図 6-12)。

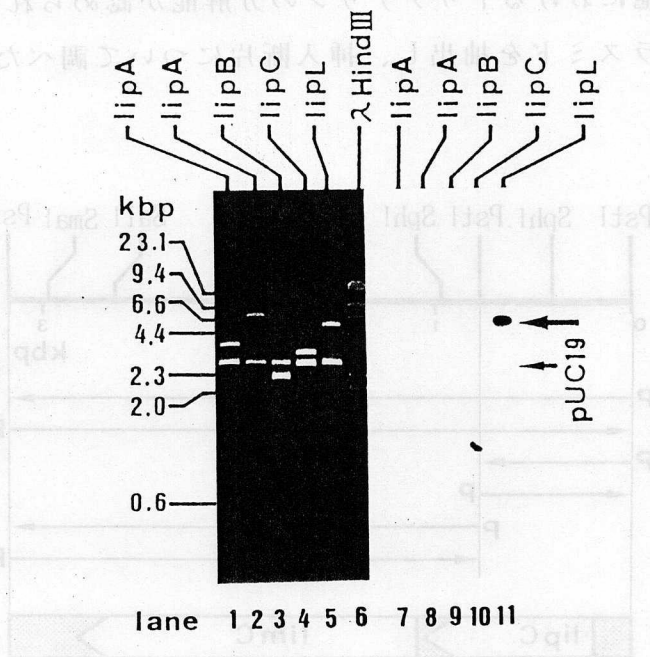


図 6-12. 各リパーゼ遺伝子のサザンハイブリダイゼーション。

lipA 遺伝子を保持する pUY1 (3.5 kbp) および pUY50 (9.0 kbp) プラスミドを PstI (lane 1, 7) および EcoRI (lane 2, 8) でそれぞれ切断し、lipB 遺伝子を保持する pUY20 (2.2 kbp) プラスミドを EcoRI で切断(lane 3, 9)、lipC 遺伝子を保持する pUY30 (3.1 kbp) プラスミドを EcoRI と HindIII で切断(lane 4, 10)、lipL 遺伝子を保持する pUY40 (6.0 Kbp) プラスミドを SmaI で切断し(lane 5, 11)、分子量マーカーの λ -HindIII (lane 6) とともに 1.0% アガロースによる電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した (lane 1-6)。ナイロンメンブランに DNA を固定した後、³²P で末端ラベルした合成オリゴヌクレオチドプローブ(第4章第3節)とハイブリダイズさせた。非特異的に結合したプローブを洗浄し除いた後、X線フィルムに感光させた (-80°C, 1 時間, lane 7-11)。

(2) lipC 遺伝子の塩基配列

lipC 遺伝子の 3.1 kbp の DNA 断片について、Exonuclease III により欠失させることは、どちらの方向からもほとんど行うことができなかったため、3.1 kbp 全長について塩基配列を決定したところ、図 6-11、および 図 6-13 に示したように、2 つの ORF を見いだした。上流の ORF は 291 個のアミノ酸を、下流の ORF は最大で 574 個のアミノ酸をそれぞれコードしていた。それぞれ単独ではリパーゼ活性を示さず、2 つの ORF が必要という点から、lipL-limL、および Pseudomonas cepasia の lipA*-limA (40) と類似していた。lipC 遺伝子のアミノ酸配列の中にはリパーゼ特異的保存配列が存在せず、他のリパーゼとの比較では有意な相同性を全く示さなかった。limC 遺伝子のアミノ酸配列についても、limL、Pseudomonas cepasia 由来の LimA (40)、および Pseudomonas sp. KWI-56 由来の Act (41) とはまったく相同性は認められなかった。

4. Pseudomonas sp. 109 株由来リパーゼの多形性

Pseudomonas sp. 109 株は少なくとも 4 種類のリパーゼ遺伝子を保持し、少なくとも 2 種類のリパーゼを生産している(第 2 章)という点で、リパーゼの多形性を示した。4 種類のリパーゼ遺伝子(lipL、lipA、lipB、および lipC) 相互間に相同性が認められないことは、1) 4 種類のリパーゼ遺伝子をそれぞれプローブとして、Pseudomonas sp. 109 株染色体に対し、ハイブリダイゼーションを行うと、それぞれ異なった位置でのみハイブリダイズすること(図 6-14)、2) 塩基配列、およびアミノ酸配列をコンピューターにより解析してもリパーゼ遺伝子相互間の相同性は全く認められないこと、から明らかである。従って、Pseudomonas sp. 109 リパーゼの多形性は、異なる遺伝子によりコードされているという点では、Geotrichum candidum リパーゼの多形性(32, 33) と同じであるが、遺伝子間に相同性が認められないという点で異なっている。

CGCTGGTTCGAGAGCATTCGCCA 23
CGTCCGGCGACGCAACCGCCCTATCGT'TGG'TGGAGCGCATCAATCCGCCGAGTAGCG 83
GGTCCCGAGCCGGCCTGCGGACGTCCTCGCGGACGATCGCAGCGGAGCTTGCAGCCCC 143
TGGCTCCTCAC'AAAGTAGCGCCTCTCGACGCGACCACTCCCGCAGGAGCCCCACCC 203
ATGGCCTCGCCAGCCTTCATGCG'TTTCAACCCCGTTGCGGGCGCCGCCGGCCTTCGGC 263
M A S P A F M R F Q P R C G A A A A F G -20-

ACCCTCTGGGCC'TGGCCGGT'TGCCAGTCC'TGGCTCGACGATCGCTACGCCGACAGCCTG 323
T L L G L A G C Q S W L D D R Y A D S L -40-

CCGCCGACCTCCGGCGTGAACCGATCAAGGGCCTGGCGCAAAACGTATCGATCCGGCGC 383
P P T S G V Q P I K G L A Q N V S I R R -60-

AACGCGCTGGGCATGCCACTGATCGAAACCGGCACCTTCCATGACGCGT'TGTTCCGCCCTG 443
N A L G M P L I E T G T F H D A L F A L -80-

GGCTACGTACACGCCCTCCGACCGCCTGAGCCAGATGGTCAGCCTGCGCCTGCTGGCCAG 503
G Y V H A S D R L S Q M V S L R L L A Q -100-

GGACGGCTGGCCGAGATGGTCGGCCCCGGCGCCTGGAGATCGACCGT'TTCATGCGTACC 563
G R L A E M V G P G A L E I D R F M R T -120-

GTGAACCTGCGCCAGGCCGGGAGATGGAGTACAGGAACGCC'TCGCCGCGCCTGCAACGC 623
V N L R Q A A E M E Y R N A S P R L Q R -140-

TTC'TTCGAGG'TCTACGCGCGGGGTCAACGCCCTACCTGTATCGCTATCGCGACAAGCTG 683
F F E V Y A R G V N A Y L Y R Y R D K L -160-

CCGATGGACCTGGCCAGTCCGGCTACCGTCCGGAATACTGGAAGCCCGAGGACTCGGGC 743
P M D L A Q S G Y R P E Y W K P E D S A -180-

CTGGTCTTCGCCCTGCTCAACTTCGGCCTGGCGGTGAACCTGCAGGAAGAAATCGCCTCG 803
L V F A L L N F G L A V N L Q E E I A S -200-

CTGACGCTCGGCATAAGGTGGCAGCGACAAGCTGGCCTGGCTGACGCCGACCTATCCC 863
L T L A H K V G S D K L A W L T P T Y P -220-

GACGAAAACCTGCCGTTTCGACGAGGCGGAAAAGCTCAAGGGCCTGCGCCTGGACGGGCAG 923
D E N L P F D E A E K L K G L R L D G Q -240-

GT'FCCCGCCCTCGCGGGCGTCGAGGGCGCGCGGCAGGTCGACGCGCTGAGCATGCTC 983
V P G L A G V E G A A R Q V A A L S M L -260-

GGGGTCGCCGCTCGAACAACTGGGCTATCGCGCCGCAACGCAGCCGACGGCAAGAGC 1043
G V A A S N N W A I A P Q R S R S G K S -280-

CTGATGGCCAAACGACACCCACCTGCCGCTGAGCTAGCCGTCGGTGTGGAACCTACGTGCAG 1103
L M A N D T H L P L S *** -291-

← Lip-3 M E L R A →
→ Lim-3
ATCCGCTCGCCCAAGTACCAGGCCGCGGGCGT'TCCATCGCCGCTGCGGGCGTGTG 1163
D P L A Q V P G R G R F H R R S A G R G -25-

GCGGGCTTCAACGGCAAGCTGGCCTGGGGCATGACCATGGTCTGGGCGACACCAGGAT 1223
G G L Q R Q A G L G H D H G P G R Q P G -45-

CTCTACCTGGAACAGT'TGCGACGCCAGGGCAACCGGCTCTATTACCTGGCCGACGGCAAG 1283
S L P G T V A T P G Q P A L L P G R R Q -65-

TGGCAGCCAACCCGGAACGCCAGGAAACCTTCTTCATCAAGGGCCAGCGGCCGATCCGC 1343
V A A N P R T P G N L L H Q G P A A D P -85-

GAGGTCATCCACGAAACCCGCCATGGCCCGCTGC'CAACAGCGCCCTGGGCGAGCGCAAG 1403
 R G H P R N P P W P A A Q Q R P G R A Q -105-
 AACATCCTCCAGCCGCTGCCGCTGAAGAGCGGCTACGGA'CTGGCC'ATCCGGAGCATCCAG 1463
 E H P P A A A A E E R L R T G L P E H P -125-
 CAGGAAGCCGACAAGACCCTGGACGGCTTCTTCTTCGACCTGTTCGGGGCCAAGACCATC 1523
 A G S R Q D P G R L L L R P V A G Q D H -145-
 GAGCAGGCCTTCGACGCCACCCGCGAGATTTCGCGCGATGCCGCTGAACATCGTGTTCGCC 1583
 R A G L R R H P R D S R D A A E H R V R -165-
 GACGAAAAGCACATCGGCTGGCAGGTCACCGGACGCTATCCGAACCCGAAGGAAGGTCGT 1643
 R R K A H R L A G H R T L S E P Q G R S -185-
 GGCCTGCTGCCCTCCCTGGCTGGGACGGCCGCTACGACTGGGA'GGCTATGCCGACCCG 1703
 W P A A L P W L G R P L R L G W L C R P -205-
 ATCC'CCACCCGTC'CCGACCGAAGCCCGCAGCGGGCTGGC'GGG'ACC'GCCAACCACCCG 1763
 D P P P V R P K P A A G L A G Y R Q P P -225-
 ACCGTGCAGCCCGGC'TACGGCGCCAGT'TGTCCA'ACTCCTGGTACTACCCGGAGCGCGCC 1823
 H R A A R L R R P V V Q L L V L P G A R -245-
 GAGCGCATCGCCAGCTCGCCGGTCCAGCAAGAGCCACGACACCCAGAGCATGATCCGC 1883
 R A H R P A R R C Q Q E P R H P E H D P -265-
 ATGCA'GTACGAC'AGACCTCGCTGTTCGTTCGCGCAAGTTGCAAGCCATGTTTCGACAATCCC 1943
 H A V R P D L A V R R Q V A S H V R Q S -285-
 GGCATGGCGCTGCCGCTGCGCCAGGCCATCGACGCCTTGCCGGAGGCGCAACGAGCCGG 2003
 R H G A A A A P G H R R L A G G A T Q P -305-
 GCGCGGAGGCGCTACGACCGGCTGATGGCGTTCGACGGCAAGCTGACAGCCAGCTCCAGC 2063
 G A G G L R P A D G V R R Q A D S Q L Q -325-
 GACGCCGCGCTGTACGGCGCCTTCCTCCACGAGAGCGCCAGGAGATATTCCTCGACGAG 2123
 R R R A V R R L P P R E R Q A D I P R R -345-
 CTAGGACCGGAGGACGGCCCTGCCTGGAAAGCCTTCGTTCGAGACCGCCAACCTCTCCTAC 2183
 A R T G G R P C L E S L R R D R Q P L L -365-
 TCGGCGCAAGCCGACCACCTGCTCGGGCGGACGACAGTCCGTTCTGGGACGATACCCGC 2243
 L G A S R P P A R A R R Q S V L G R Y P -385-
 ACTCCGAGAAGGAGGACAAGCCGGCAATCCTCGCGCGACCTCGCCGCCCGCTGGAG 2303
 H S A E G G Q A G N P R A Q P R R R R G -405-
 TTCTGCGAACAGCGACTGGGGAGCGAGCGCAAGGCCTGGCAATGGGGCAAGCTGCACACC 2363
 V L R T A T G E R A Q G L A M G Q A A H -425-
 TACGAATGGCAGAGCGACAGCTCGAAAATGGCCCCCTACCTGGGCGCCGGGAGCCGGCC 2423
 L R M A E R Q L E N G P L P G R R R A G -445-
 GGACTCGGCGGATCAAGGGCTATCTCGATCGCGGACCCTCGACGCCCGGAGGCCGGGA 2483
 R T R R D Q G L S R S R T L D A R E A G -465-
 ACCTGCCCGTCCAGGCGCAGGCCCTTGAGCTTTTTCGCCTCGTCGAACGGCAGGTTTTCG 2543
 N L P V Q A Q A L E L F R L V E R Q V F -485-
 TCGGATAGGTTCGGCTCAGCCAGGCCAGCTTGTTCGCTGCCGACCTTATGCGCGAGCGTC 2603
 V G I G R R Q P G Q L V A A D I M R E R -505-
 AGCGAGGCGATTTCTTCGTTCGACTTCGGCCAGAGCGAACC'GATGATCGGCGTGAACAGCA 2663
 Q R G D F F V D F G Q S E P M I G V N S -525-

```

GCGGCCAATCCGGCAATCCGGCCAGCCCGACTACGCCGACGGTATCGACGCCTGGCTCA 2723
S G Q S G N P A S P H Y A D G I D A W L -545-

AGGGGCGCTACGTCAGCTTCCCGTTCCAGCCACAGAACCTCGATCGCGTTTACGGCAACA 2783
K G R Y V S F P F Q P Q N L D R V Y G N -565-

AGCGGCTGACGCTCACTCCCCTCGCTGAACGGACGGCGCGGAACCTTTCCTCCGCGCCGT 2843
K R L T L T P A R *** -574-

GGCTCTGAACAGCCGACTTACTCCATGATCATCTTCAGGGCGTCTTCCGGACGCCCTTC 2903
TTTTATCCCCCTCCCGGAAAGCCTCCGTTTTCTCGAAAGCCCGGGCACGGGATCGAACC 2963
ATCTCACTCCTCTCCGGCCTCTTCCACGGGCGCCACCAGCGCCGGACCAGCCAGTCCGTC 3023
GGCAGGCTCTTGCTGGCGCGGGCACCGAGCAGTTGAGTTGCTCGCTGCGACTGATCAG 3083
TTGCCACGTCCCTCGGTGAGCTTGTGTGCGCGCCGCGGCATAGGCCCTTGTCCAGTTGCTGC 3143
AG 3145

```

図 6-13. *lipC* 遺伝子および *limC* 遺伝子の塩基配列。

lipC 遺伝子および *limC* 遺伝子を含む 3.1 kbp の DNA 断片について塩基配列を示し、塩基配列から予想されるアミノ酸配列を塩基配列の下に 1 文字コードで示した。どちらの遺伝子についても最初のメチオニンを 1 として番号を付し、終止コドンの位置を星印(***) で示した。

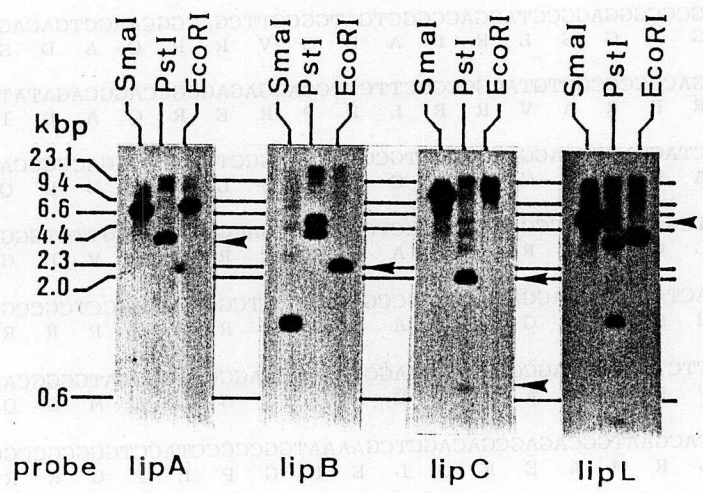


図 6-14. 各リパーゼ遺伝子をプローブに用いた *Pseudomonas* sp. 109 株染色体に対するサザンハイブリダイゼーション。

Pseudomonas sp. 109 染色体 5 μ g を *Pst*I, *Sal*I および *Sma*I により完全に切断し、1.0% アガロースによる電気泳動を行った後、ナイロンメンブレンに DNA を固定した。*lipA* 遺伝子の 1.5 kbp 断片、*lipB* 遺伝子の 1.6 kbp 断片、*lipC* 遺伝子の 3.1 kbp 断片、および *lipL* 遺伝子の 2.2 Kbp 断片を、ランダムプライマーを用いて 32 P でラベルしたものをそれぞれプローブとし、染色体 DNA とハイブリダイズさせた。メンブレンから非特異的に結合したプローブを洗浄により除いた後、X線フィルムに感光させた(-80°C, 1 時間)。

Pseudomonas sp. 109 株がリパーゼを多形生産する生理学的意味、およびそれぞれのリパーゼが持つる基質特異性あるいは反応特異性は興味を持たれる問題である。現在、広い意味でのリパーゼは、触媒する基質の違いにより、EC3.1.1.3 triacylglycerol lipase (系統名、triacylglycerol acylhydrolase)、EC3.1.1.34 lipoprotein lipase (triacylglyceroprotein acylhydrolase)、EC3.1.1.23 monoacylglycerol lipase (glycerolmonoester acylhydrolase)、および EC3.1.1.26 galactolipase (2,3-di-O-acyl-1-O-(β -D-galactosyl)-D-glycerol acylhydrolase)、に分類されている(65)。これらにエステラーゼである EC3.1.1.1 carboxylesterase (carboxylic-esterhydrolase)、および EC3.1.1.2 aryl-esterase (arylester hydrolase) を加えた内のどれに LipL、LipA、LipB、および LipC 蛋白質が属するかを決定することは、これらのリパーゼを解析し、それぞれのリパーゼの特徴を明らかにする上で重要であり、今後解析すべき点である。また、大環状ラクトン合成能を有する LipL と同活性を持たない LipA と LipB とを比較することで大環状ラクトン合成を触媒するために必要なリパーゼの特徴が明らかになるものと思われる。4 種類のリパーゼは、1) リパーゼ遺伝子の下流にリパーゼ活性化に必要な活性化遺伝子が存在するかどうか、2) 大腸菌でリパーゼ遺伝子を発現させたとき、p-nitro-phenyl acetate を基質としたエステラーゼの検出系で活性が認められるほど発現するかどうか、の点から lipL と lipC、および lipA と lipB、の 2 つのグループに分けることができる。このことから、LipC 蛋白質について大環状ラクトン合成能を有しているかどうか興味を持たれる点である。

大腸菌でのリパーゼ発現において、蛋白質を精製することができる程度の発現量が認められたのは、lipA 遺伝子および lipB 遺伝子からのみであり、これらのリパーゼが活性化因子を必要としないことは明らかである。Pseudomonas 属由来のリパーゼにおいて、大腸菌内で大量発現させたという報告は Pseudomonas fluorescens 由

来の耐熱性リパーゼ(64)のみであり、このリパーゼも活性化因子を必要としないと考えられる。LipL 蛋白質と相同性が認められた他のリパーゼにおいて大量発現の報告はまだなく、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの大腸菌における大量発現系の構築は困難であり、今後一層の工夫を要するものと思われる。

第4節 要約

1. Pseudomonas sp. 109 株から大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子(lipL) のほかに 3 種類のリパーゼ遺伝子(lipA, lipB, および lipC) を大腸菌にクローニングし、その塩基配列を決定し、Pseudomonas sp. 109 株はリパーゼの多形性発現株であることを明らかにした。

2. lipL, lipA, lipB, および lipC 遺伝子相互間には塩基配列、およびアミノ酸配列の相同性は全く認められなかった。また、lipA, lipB, および lipC 遺伝子は Pseudomonas 属をはじめとして、他種由来のリパーゼとの塩基配列、およびアミノ酸配列の相同性も認められず、これまでのリパーゼにない反応性あるいは基質特異性をもったリパーゼである可能性が示唆された。

3. LipA、LipB 蛋白質を大腸菌内で発現させ、精製を行い、リパーゼ蛋白質を明らかにした。粗精製後の LipA、LipB 蛋白質を用いて大環状ラクトン合成能を調べたが、これらのリパーゼはラクトン合成活性を示さなかった。

4. lipC 遺伝子の塩基配列から、lipL 遺伝子と同様にリパーゼの活性発現に関与していると考えられるリパーゼ活性化遺伝子(limC) の存在を明らかにした。しかしながら、LimL 蛋白質を含め、他のリパーゼ活性化蛋白質とは相同性を示さなかった。

Pseudomonas 属由来、およびブタ膵臓由来のリパーゼは、ベンゼンやヘキサンなどの有機溶媒中で ω -ヒドロキシ酸メチルエステルの分子内エステル交換反応を触媒し、大環状ラクトンと呼ばれる環状の化合物を簡便に合成しうることが見いだされている。大環状ラクトン合成活性はすべてのリパーゼに見られる性質ではなく、ブタ膵臓由来、および Pseudomonas 属由来の未精製リパーゼ標品にのみ見いだされた特徴である。また、これらのリパーゼについても精製標品をラクトン合成反応に用いたわけではなく、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの本態は明らかにされていなかった。

本研究は大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの本態を明らかにし、大環状ラクトン合成反応を触媒しうるリパーゼの反応機構および構造的特徴を明らかにするための一環として行われたものである。本論文では、Pseudomonas sp. 109 株由来の大環状ラクトン合成能を有するリパーゼについて、リパーゼ蛋白質の精製をおこなった後、蛋白学的諸性質や基質特異性を決定した、更に大環状ラクトン合成能を有するリパーゼをコードする遺伝子、および本リパーゼの活性化遺伝子を取得し、塩基配列の決定を通じて解析を行った。

第2章では、Pseudomonas sp. 109 株の培養液から調製されたりパーゼ粉末(リパーゼP)を出発原料として用い、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの精製を行った。等電点電気泳動、ゲル濾過、およびゲル濾過 HPLC の3段階により、電気泳動的に単一にまで精製し、SDS-PAGE から本リパーゼの分子量は $29,000 \pm 1,000$ 、等電点電気泳動から等電点は 5.3 であると決定した。

第3章では大環状ラクトン合成能を有するリパーゼのラクトン合成反応における基質特異性を調べ、本リパーゼのラクトン合成反応は基質の炭素鎖長に依存してモノマーラクトンとダイマーラクトンとの生成比が変化することを見いだした。また、本リパーゼのエステラーゼ活性における基質特異性を調べて得られた知見を考慮し、

大環状ラクトン合成反応における炭素鎖長依存性の機構について考察した。

第4章では *Pseudomonas* sp. 109 株由来の大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子(*lipL*) を大腸菌にクローン化後、塩基配列の決定を行い、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ蛋白質のアミノ酸配列を明らかにした。他種由来リパーゼとアミノ酸配列を比較し、リパーゼ特異的保存領域を除いて *Pseudomonas* 属由来のリパーゼとのみ有意な相同性が認められたことから、本リパーゼは *Pseudomonas* 属のリパーゼに特異的なアミノ酸配列を有していることが明らかになった。

第5章では大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの活性化に関する遺伝子が、*lipL* 遺伝子の下流に位置することを見いだし、その遺伝子(*limL*) の塩基配列を決定した。*limL* 遺伝子がコードする蛋白質は、*Pseudomonas cepacia* 由来リパーゼのリパーゼ活性化因子と有意な相同性を示すことを見いだし、また、大腸菌内でトランスに働き、リパーゼを活性化させることを明らかにした。

第6章では *Pseudomonas* sp. 109 株から、大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ遺伝子(*lipL*) 以外に、3種類のリパーゼ遺伝子(*lipA*、*lipB*、および *lipC*) を取得し、本菌株はリパーゼの多形性発現株であることを明らかにした。それぞれの遺伝子について塩基配列の決定により、コードされているリパーゼのアミノ酸配列を明らかにし、4種類のリパーゼ相互間には相同性が認められず、それぞれ全く異なったりパーゼであることを見いだした。また、*lipA*、および *lipB* 遺伝子については大腸菌内で発現させた後、蛋白質の精製を行い、リパーゼの存在を明らかにした。これらの、LipA、LipB、および LipC 蛋白質の解析を行い、大環状ラクトン合成能を有する LipL 蛋白質と比較することは、大環状ラクトン合成反応を触媒するために必要なリパーゼの特徴を知る上で重要な指針になるものと思われる。

参考文献

1. 福本, 岩井, 辻阪 (1962) “酵素化学シンポジウム” 南江堂 第18集
2. Borgstrom, B., and Erlanson-Albertsson, C. (1984) “Lipases”(eds Borgstrom, B., and Brockman, H. L.) Elsevier, Amsterdam, N. Y.
3. Ory, R. L., Barker, R. H., and Boudreaux, G. J. (1964) *Biochemistry*, 3, 2013
4. Ory, R. L., Kircher, H. W., and Altschul, A. M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, 147, 200
5. 太田博道 (1988) “有機合成協誌” 46, 762
6. 森謙治 (1988) “バイオサイエンスとバイオインダストリー” 46, 3262
7. 藤沢, 佐藤, 伊藤 (1986) “有機合成協誌” 44, 516
8. Servi, S. (1990) *Synthesis*, 1
9. 山田靖宙 (1988) “化学と生物” 26, 706
10. Klivanov, A. M. (1990) *Acc. Chem. Rec.*, 23, 114
11. Crout, d. H. G., and Christen, M. (1989) “Modern Synthetic Methods” Springer-Verlag
12. Zaks, A., and Klivanov, A. M. (1984) *Science*, 224, 1249
13. Zaks, A., and Klivanov, A. M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A.*, 82, 3192
14. Kirchner, G., Scollar, M. P., and Klivanov, A. M. (1985) *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 7072
15. Makita, A., Nihira, T., and Yamada, Y. (1987) *Tetrahedron Lett.*, 28, 805
16. Keller-Schierlein, W. (1973) *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 30, 313
17. Sisido, M. (1974) *Biophysics*, 14, 135
18. Corey, E. J., and Nicolaou, K. C. (1974) *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 5614
19. Mukaiyama, T., Narasaka, K., and Kikuchi, K. (1977) *Chem. Lett.*, 441
20. Inanaga, J., Hirata, K., Saeki, H., Katsuki, T., and Yamaguchi, M. (1979) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52, 1989
21. Leammli, U. L. (1970) *Nature*, 227, 680
22. Gabriell, O. (1972) *Methods Enzymeol.*, 22, 578
23. 岩井, 辻阪, 奥村, 葛本 (1980) “油化学” 29, 58
24. Entressanglos, B., and Desnulle, P. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 159, 285
25. 山田靖宙, “ハイブリッドプロセスによる有用物質生産”(山田秀明, 土佐哲也, 上野民夫 共編), (1991) 73

26. Mickel, F. S., Weidenback, F., Swarkovsky, B., LaForge, S. K., and Scheele, G. A. (1988) *J. Biol. Chem.*, 264, 12895
27. Datta, S., Luo, C. C., Li, W. H., VanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Brown, M. A., Shen, S. H., Liu, S., and Chan, L. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 1107
28. Komaromy, M. C., and Schotz, M. C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.*, 84, 1526
29. Winkler, F. K., D'Arcy, A., and Hunziker, W. (1990) *Nature*, 343, 771
30. Docherty, A. J. P., Bodmer, M. W., Angal, S., Verger, R., Riviere, C., Lowe, P. A., Lyons, A., Emtage, J. S., and Harris, T. J. R. (1985) *Nucleic Acids Res.*, 13, 1891
31. Decaro, J., Boudouard, M., Bonicel, J., Guidoni, A., Desnulle, P., and Rovey, M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 671, 129
32. Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Iizumi, T., and Tsunasawa, S. (1989) *J. Biochem. (Tokyo)*, 106, 129
33. Shimada, Y., Sugihara, A., Iizumi, T., and Tominaga, Y. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)*, 107, 703
34. Boel, E., Høge-Jensen, B., Christensen, M., Thim, L., and Fill, N. P. (1988) *Lipids*, 23, 701
35. Kawaguchi, Y., Honda, H., Molimura, T. J., and Iwasaki, S. (1989) *Nature*, 341, 164
36. Gotz, F., Dopp, F., Korn, E., and Schleifer, K. H. (1985) *Nucleic Acids Res.*, 13, 5895
37. Lee, C. Y., and Iandolo, J. J. (1986) *J. Bacteriol.*, 166, 385
38. Kugimoya, W. Otani, Y., Hashimoto, Y., and Takagi, Y. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141, 185
39. Aoyama, S., Yoshida, N., and Inouye, S. (1988) *FEBS Lett.*, 242, 36
40. Jørgensen, S., Skov, K. W., and Diderichsen, B. (1991) *J. Bacteriol.*, 173, 559
41. Iizumi, T., Nakamura, K., Simada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., and Fukase, T. (1991) *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2349
42. Chung, G. H., Lee, Y. P., Jeohn, G. H., Yoo, O. J., and Rhee, J. S. (1991) *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2359
43. Brady, L., Brzozowsky, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., and Menge, U. (1990) *Nature*, 343, 767
44. Brzozowsky, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S. A., and Thim, L. (1991) *Nature*, 351, 491

45. Coleman, K., Dougan, G., and Arbuthnott, J. P. (1983) *J. Bacteriol.*, 153, 909
46. Maniatis, T., Fritsch, F. F., and Sanbrook, J. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
47. Mandel, M., and Higa, A. (1970) *J. Mol. Biol.*, 53, 154
48. Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.*, 98, 503
49. Sanger, F., Niclen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 5463
50. Lipman, D. J., and Pearson, W. R. (1985) *Science*, 227, 1435
51. Argos, P. (1987) *J. Mol. Biol.*, 193, 385
52. Iwai, M., Tsujisaka, Y., and Fukumoto, J. (1964) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9, 353
53. 福本, 岩井, 辻阪 (1964) “化学と工業” 30, 373
54. Iwai, M., Tsujisaka, Y., and Tomonaga, Y. (1974) *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1249
55. Iwai, M., Tsujisaka, Y., and Fukumoto, J. (1970) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 16, 81
56. Mattson, F. H., Volpenhein, R. A., and Benjamin, L. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 5335
57. Borgstrom, B., and Erlanson, C. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 37, 60
58. Momsen, W. E., and Brockman, H. L. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 384
59. Kramer, W., and Frits, H. J. (1987) *Methods Enzymol.*, 154, 350
60. Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.*, 157, 105
61. Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 8164
62. Kumamoto, C. A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 5320
63. Watnabe, M., and Blobel, G. (1989) *Cell*, 58, 675
64. Chung, G. H., Lee, Y. P., Yoo, O. J., and Rhee J. S. (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 237
65. 岩井美枝子 (1991) “リパーゼ” 幸書房,
66. Julien, R., Rathelot, J., Canioni, P., Sarda, L., Gregoire, J., and Rochat, H. (1978) *Biochimie.*, 60, 103
67. Sjöholm, I. (1976) *Biochemistry*, 10, 5413

本論文に関係のある報告

1. Purification, Characterization, and Molecular Cloning of Lactonizing Lipase from Pseudomonas Species.

Fumio Ihara, Yukari Kageyama, Mitsuyo Hirata, Takuya Nihira, and Yasuhiro Yamada : J. Biol. Chem., 266, 18135-18140 (1991).

2. Requirement in trans of downstream limL gene for activation of lactonizing lipase from Pseudomonas sp. 109.

Fumio Ihara, Iwao Okamoto, Takuya Nihira, and Yasuhiro Yamada : J. Ferment. Bioeng., in preparation.

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学工学部、山田靖宙 教授に深甚なる感謝の意を表します。本論文の作成にあたり、有益な御助言と御教示を賜りました、大阪大学工学部、大嶋康治 教授、高野光男 教授、菅 健一 教授、吉田敏臣 教授、今中忠行 教授、および大阪大学産業科学研究所、二井將光 教授に感謝の意を表します。本研究の間、終始御助言、御指導いただき、本論文をまとめるにあたり適切なご指示を賜りました大阪大学工学部、仁平卓也 博士に厚く感謝いたします。本研究を進めるにあたりまして有益な討論をしていただきました大阪大学工学部、作田庄平 博士に心より感謝いたします。

遺伝子操作を行うにあたり、有益な御指導を賜りました大阪大学工学部、新名淳彦 博士、東京工業大学理学部、森山英明 博士、大阪大学工学部、根来誠司 博士、および大和化成(株)、兎玉和久 氏に感謝の意を表します。リパーゼ蛋白質のアミノ末端配列決定に際し、尽力くださった東京大学農学部、片岡宏誌 博士に深く感謝いたします。塩基配列およびアミノ酸配列の相同性の検索に情報を提供していただきました大阪大学工学部、原島 俊 博士に感謝いたします。本研究に使用した *Pseudomonas* sp. 109 株は長瀬産業株式会社より譲渡いただきました、感謝いたします。リパーゼの精製(第2章)、および基質特異性の決定(第3章)は、影山由香里 氏(現菊正宗酒造(株))、および平田光代 氏(現 P & G(株)) の多大なる努力の成果であり、ここに厚く感謝します。

本大学の山田研究室で研究を行うことができるというすばらしい機会を与えていただきました熊本工業大学、赤松 隆 博士に心より感謝いたします。

1年間共にリパーゼについて研究を行った、岡本岩夫、小島智子 両氏の協力に感謝いたします。また、岡本 晋 氏をはじめとする山田研究室すべてのみなさんの協力により本研究は成し得たものであり、感謝いたします。また、皆様が益々発展し、各方面で活躍されることをお祈りしております。

最後に、私がここまで研究し、本論文をまとめることができたのは、故郷の両親の多大な経済的、精神的支えによるものであることを書き添えておきます。