The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Serratia marcescens におけるリパーゼの分泌機構に関する研究
Author(s)	赤塚, 浩之
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40970
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 81 】

氏　　名	赤　塚　浩　之（あか つか ひろ ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　　士（工　　学）
学 位 記 番 号	第　13480　号
学位授与年月日	平成 9 年 12 月 16 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	*Serratia marcescens* におけるリパーゼの分泌機構に関する研究
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　卜部　　格 （副査） 教 授　山田　靖宙　　教 授　室岡　義勝

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は，*Serratia marcescens* におけるリパーゼの分泌機構に関する研究成果をまとめたものである。

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

第 1 章では，リパーゼ遺伝子をクローニングし，その塩基配列を決定することにより，本酵素が613アミノ酸残基，分子量64951の蛋白質であることを明らかにしている。一方，本リパーゼにはN末端のシグナルペプチドが存在せず，C末端側にグラム陰性菌のN末端シグナルペプチド非依存的分泌機構で分泌される蛋白質と相同性のある領域が存在することを明らかにしている。また，*S. marcescens* のリパーゼは，*E. coli* において菌体内にのみ発現し，菌体外には分泌されない。これらのことから，*S. marcescens* のリパーゼはN末端シグナルペプチド非依存的にグラム陰性菌のABC トランスポーターを介して分泌されていることを示唆している。

第 2 章では，3 つの蛋白質から構成されるリパーゼの分泌装置をコードする遺伝子（*lipB*，*lipC*，*lipD*）をクローニングしている。ホモロジー検索の結果，*lipB*，*lipC*，*lipD* 遺伝子は，それぞれ ABC 蛋白質，MF 蛋白質，外膜蛋白質をコードしており，これらは *S. marcescens* の新たな ABC トランスポーター（Lip システム）であることを明らかにしている。また，*lipBCD* 遺伝子を保持する *E. coli* は，リパーゼを培地中へ分泌する。このことから，*S. marcescens* のリパーゼが ABC トランスポーターである Lip システムを介して分泌されることを初めて明らかにしている。

第 3 章では，ABC トランスポーターによる蛋白質の分泌機構を解析し，Lip システムによる分泌蛋白質の選択が，ABC 蛋白質である Lip B によってなされることを明らかにしている。また，ABC トランスポターが形成されるには，これまで報告されている MF 蛋白質と外膜蛋白質間の特異的な相互作用に加え，ABC 蛋白質と MF 蛋白質間にも特異的な相互作用が存在することを新たに明らかにしている。

第 4 章では，リパーゼ遺伝子（*lipA*）およびリパーゼのトランスポーターである Lip システム（*lipBCD*）を同時に保持した組換え菌株を作製し，野生株の20倍以上の菌体外リパーゼ活性（743,000 U/ml）を示す *S. marcescens* のリパーゼ高生産菌株の育種に成功している。これは ABC トランスポーターを利用して，有用蛋白質を菌体外へ高生産した初めての例である。

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

本論文は，グラム陰性菌である *S. marcescens* のリパーゼの分泌機構を解明し，工業的に有用なリパーゼの高生産に応用することを目的としたもので，主な成果を要約すると次の通りである。

(1) *S. marcescens* のリパーゼ遺伝子をクローニングし，その塩基配列を決定している。その結果，本リパーゼにはN末端のシグナルペプチドが存在せず，C末端側にグラム陰性菌のABCトランスポーターで分泌される蛋白質と相同性のある領域が存在することを明らかにしている。

(2) 本リパーゼの分泌装置を構成する3つの蛋白質の遺伝子(*lipB*，*lipC*，*lipD*)をクローニングし，その塩基配列を決定している。その結果，各遺伝子はそれぞれ，ABC蛋白質，MF蛋白質，外膜蛋白質をコードしており，これらが本菌株の新たなABCトランスポーター（Lipシステム）であることを明らかにしている。

(3) 本リパーゼは，大腸菌においては菌体内にのみ発現し，菌体外には分泌されないか，*lipBCD* 遺伝子を保持する大腸菌では，リパーゼが分泌されることを明らかにしている。この結果は，*S. marcescens* のリパーゼがABCトランスポーターであるLipシステムを介して分泌されることを初めて証明したものである。

(4) Lipシステムによる蛋白質の分泌機構を解析し，本システムにより分泌される蛋白質の選択が，ABC蛋白質であるLip Bによってなされていることを明らかにしている。さらに，ABCトランスポーターが形成されるには，これまでに報告されているMF蛋白質と外膜蛋白質との間の特異的な相互作用に加え，ABC蛋白質とMF蛋白質との間にも特異的な相互作用か存在することを，新たに明らかにしている。

(5) リパーゼ遺伝子およびリパーゼのトランスポーターであるLipシステムの遺伝子を同時に保持した組換え菌を作製し，野生株の20倍以上の菌体外リパーゼ活性を示す高生産菌株の育種に成功している。この結果は，ABCトランスポーターを利用して有用蛋白質を菌体外へ高生産した初めての例である。

以上のように，本論文は，*S. marcescens* のリパーゼおよびその分泌装置を構成する蛋白質の遺伝子を単離し，本リパーゼの分泌機構を明らかにすることにより，グラム陰性菌における重要な蛋白質分泌機構の一つであるABCトランスポーターの機能の解明に寄与するとともに，その知見を工業的に有用なリパーゼの高生産に応用したもので，これらの成果は酵素工学および応用生物工学の分野に貢献するところ大である。よって本論文は，博士論文として価値あるものと認める。