

Title	Chaperon Mediated Activation for Lactonizing Lipase from Pseudomonas sp. 109
Author(s)	田中, 純子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42054
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	田中純子
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 15412 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Chaperon Mediated Activation for Lactonizing Lipase from <i>Pseudomonas</i> sp. 109 (<i>Pseudomonas</i> sp. 109 由来大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ生産機構の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 山田 靖宙
	(副査) 教授 室岡 義勝 教授 塩谷 捨明 教授 原島 俊 教授 吉田 敏臣 教授 金谷 茂則 教授 卜部 格 教授 菅 健一 教授 小林 昭雄 教授 福井 希一 教授 関 達治

論文内容の要旨

本論文は大環状ラクトン合成能を有する *Pseudomonas* sp. 109由来のリパーゼ (LipL) 生産機能の解析を目的とした研究成果をまとめたものであり、緒論を含む5章よりなる。

第1章では、リパーゼに関する研究の現状および特異的シャペロンをもつグラム陰性細菌由来リパーゼに関する知見について記載している。

第2章では、*Pseudomonas* sp. 109における脂質と界面活性剤による LipL 生産誘導について述べている。さらに、これらの生産誘導が転写レベルで制御されており、LipL の高次構造形成に関与するシャペロン LimL タンパク質をコードする遺伝子の転写が *lipL* 遺伝子と比較して非常に弱く、転写物も不安定であることを示している。

第3章では、リパーゼ活性の抑制された LipL-LimL 複合体より更に一層の活性上昇が認められる条件を検討し、*Pseudomonas* sp. 109の菌体粗抽出液中に活性増加に関与する低分子性因子 (LAF) が存在することを明らかにしている。LAF の分子量はゲル濾過により約330と推定している。LipL-LimL 複合体に Ca^{2+} イオンを加えた場合においてもリパーゼ活性の増加を観察しており、その活性増加の経時的変化は LAF を加えた場合と明瞭に異なることを示している。また、活性化因子 LAF の添加は Ca^{2+} イオン共存下において相乗的に活性化をもたらすことを見出している。さらに、LAF の作用は LipL-LimL 複合体の解離を促して活性化を誘導するものであり、 Ca^{2+} 存在下での解離反応は促進されることを明らかにしている。

第4章では、LAF の構造解析について記載している。LB 培地10L中 *Pseudomonas* sp. 109を培養して得た50gの菌体より、2.15mgの誘導体化LAFを分離精製している。分光学的分析結果より、LAFはグルタチオンと同定している。更に、チオール基を有する物質も同様の活性を示すことを見出し、LipL分子中に1つ存在するジスルフィド結合の架け替えが活性遊離型 LipL の形成に必要であることを推定している。

第5章では、以下の結果を総括している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、*Pseudomonas* sp. 109由来の大環状ラクトン合成能を有する特殊なリパーゼ (LipL) の生産機構解析を

目的とする研究成果をまとめたものである。

主な研究成果を要約すると次のとおりである。

- (1) *Pseudomonas* sp. 109によるLipLの生産が油脂と界面活性剤により誘導されることを明らかにし、その機構が転写レベルで制御されていることを明らかにした。また、LipLの高次構造形成を促すLimLタンパク質をコードする遺伝子の転写が*lipL*遺伝子の転写と比較して著しく弱く、その転写産物も不安定であることを見出した。
- (2) リパーゼ活性化の過程で生成するLipL-LimL複合体はその活性が抑制されているが、その活性上昇の条件を検討し、*Pseudomonas* sp. 109菌体粗抽出液中に分子量約330の活性化因子(LAF)が存在することを見出した。Ca²⁺イオンも異なる機構で活性化に寄与することを明らかにした。
- (3) LAFは活性化に際して、LipL-LimL複合体の解離を促進し、Ca²⁺イオンはLAFと相乗的に作用することを明らかにした。
- (4) LAFの分離精製、誘導體化を行い、分光学的構造解析の結果、グルタチオンと同定した。
- (5) グルタチオン以外の低分子チオール化合物にも同様の活性があることを見出し、LipL分子中に1つ存在するジスルフィド結合の架け替えが活性遊離型LipL形成に必要なことを示唆した。

以上のように、本論文は近年有機合成上重要な酵素と考えられるリパーゼの生産機構の解析を詳細に押し進めたものであり、リパーゼの大量生産、タンパク質工学によるリパーゼの改良等の応用面、リパーゼの生産機構の解明、生理的意義等微生物学の基礎を拓くものであり、応用生物学に寄与する多くの知見を得ている。よって本論文は、博士論文として価値あるものと認める。