

氏名 やましろ ようこ
山代 陽子

学位の種類 博 士 (理学)

学位記番号 富理工博乙第 26 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

専 攻 名 地球生命環境科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学位論文題目 低温性食用油分解菌 YY31 株の単離とそれが有する低温適応型リパーゼ LipYY31 のキャラクターゼーション

論文審査委員
(主査) 上田 晃
加賀谷 重浩
田中 大祐
中村 省吾

【学位論文内容の要旨】

リパーゼ (EC 3.1.1.3) は、脂肪酸とグリセリンからなる脂肪の、エステル部位の加水分解と合成を可逆的に触媒する酵素である。リパーゼを産生する生物種は多く、リパーゼの種類も多い。中でも、微生物由来のリパーゼは多様に富んでおり、触媒作用や基質特異性などに違いが見られる。30 °C以下で高い脂質分解活性を示す低温適応型のリパーゼは、寒冷地や産業の低温工程への適用が期待される魅力的な生体触媒である。こうした低温適応型リパーゼは、低温環境に生息し油脂分解能を有する低温性細菌によって産生される可能性が高い。そこで本研究では、新規の低温適応型リパーゼの獲得を目的として、食用油を分解する低温性の分解菌の単離と、それが産生するリパーゼのキャラクター化を試みた。

まず、食用油分解菌の単離にあたり富山・石川両県下で、河川水、池水、海水、下水、土壌などの試料を採取した。そして、それらを1% (w/v) キヤノーラ油を含む寒天培地に塗布して25°Cで培養した。培地に生育したコロニーで、その周縁に油分解を示す透明帯 (ハロー) を形成した株を、食用油分解菌として単離した。こうして得られた42株の分解菌の中から、5 °Cおよび25 °Cの培養条件下で、コロニーとハローの直径が最大であったYY31株を選択し、以後の実験に供した。YY31株は、石川県津幡町の森林公園内の池の水を単離源とする細菌で、採水時の池の水温は15°Cであった。光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察から、YY31株はグラム陰性の桿菌で、1本の極鞭毛を用いて運動を行い、キャノーラ油、オリーブ油、ラード (豚脂) の油滴に対し正の走化性を示すことが明らかになった。続いて、YY31株の増殖曲線と食用油の分解能を調べた。YY31株を1% (w/v) 食用油を含む液体培地に植菌し、5 °C-35 °Cで

培養しながら経時的に培養液の一部を回収した。そして、回収した各培養液に含まれる細菌数を細菌計算盤で計測して増殖曲線を作成した。また、各培養液中に分解されずに残存する油脂を n-ヘキサンで抽出し、その乾燥重量を秤量して油脂分解率を求めた。その結果、5 ° C で培養した場合も、25 ° C で培養した場合と時間的な遅延はあったものの、最終的にはほぼ同程度の細胞密度にまで増殖することが判り、油脂分解率もほぼ同じであった。この結果から、YY31 株は低温性食用油分解菌と考えられた。次に、細菌同定検査キット API20NE によって調べた YY31 株の生化学性状と、YY31 株の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長（約 1,500bp）の塩基配列とを解析した。得られた結果を各データベースと照合したところ、いずれも *Pseudomonas* sp. と高い相同性が示された。特に、YY31 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が、*P. fluorescens* A506 および *P. reactans* PSR2 と 100 % (1,492bp/1,492bp) の一致率が示されたことから、本株を *Pseudomonas* sp. YY31 株と命名した。

続いて、YY31 株が産生する油分解酵素であるリパーゼについて、菌体と培養上清を試料とした SDS-PAGE と、トリブチリンを基質とするザイモグラムを行なった。その結果、YY31 株の産生するリパーゼは 1 種類で、その分子量は約 50 kDa であることが示された。

そこで、この YY31 株由来リパーゼ (LipYY31 と命名) 遺伝子を含む DNA 断片を、PCR とインバース PCR により増幅し、その塩基配列を解析した。その結果、LipYY31 遺伝子は 1,410 bp の Open Reading Frame から成り、アミノ酸 470 残基、分子量 49,584 Da のタンパク質に相当する新規リパーゼをコードすると推定された。この LipYY31 の推定アミノ酸配列は、サブファミリー I.3 に属するリパーゼと高い相同性をもち、触媒作用を持つ Ser 残基周辺にリパーゼ固有の保存領域 GXSXG (X: 任意のアミノ酸) モチーフを持っていた。次に、LipYY31

遺伝子の塩基配列に基づいて設計された特異的プライマーを用いて PCR を行ない、得られた LipYY31 遺伝子を発現用ベクター pET47b に組みこみ、大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。この遺伝子組み換え大腸菌を培養し、過剰発現された LipYY31 を大腸菌の破碎菌体から回収・精製した。こうして得られた LipYY31 を用いてリパーゼ活性の特性を調べた。その結果、LipYY31 の活性至適温度は 25-30 ° C であったが、0-5 ° C でも至適温度下で示された活性の約 20-40 % に当たる活性を持つことが示された。また、LipYY31 のリパーゼ活性は、0-15°C の低温域では 5 日間以上安定であったが、25°C 以上では 6 時間で 50 % 以下にまで活性が低下した。これらの結果から、LipYY31 は典型的な低温適応型のリパーゼであることが考えられた。なお、リパーゼ活性の至適 pH は 8.0 であった。さらに、LipYY31 のリパーゼ活性は、Cd²⁺、Zn²⁺、EDTA により強く阻害される一方、Ca²⁺ によって促進されることが判った。また、LipYY31 は、トリグリセリド類と p-ニトロフェノール類の中では、それぞれトリカプリン (C10:0) と p-ニトロフェニルカプレート (C10) に対して高い基質特異性が示された。さらに、LipYY31 は、植物性食用油や動物性油脂のような天然基質に対しても高い分解活性を持つことも示された。そして、LipYY31 は、非イオン系の界面活性剤である Triton X-100 や Tween の存在下では活性が促進されることや、メタノール、エタノール、イソプロパノールなどの有機溶剤の存在下でも高い安定性を保持できることが判った。

このように、LipYY31 が、中低温において安定した活性を示すことや、金属イオン、界面活性剤、有機溶剤との共用が可能であることなどから、食品加工、化学、バイオ医薬などの産業分野や、油脂汚染地における廃水処理やバイオレメディエーションなどの環境分野への、広汎な応用が期待できる可能性が示唆された。

【論文審査の結果の要旨】

当学位審査委員会は当該学位論文を詳細に査読し、かつ平成 26 年 1 月 22 日（水）に博士論文研究の公聴会を実施し、同日、論文内容の最終審査と最終試験を実施した。以下に、審査結果を要約する。

リパーゼ（EC 3.1.1.3）は脂肪酸とグリセリンからなる脂肪のエステル部位の加水分解と合成を可逆的に触媒する酵素であり、これまでも数多くのリパーゼが報告され、利用されている。なかでも、30 °C 以下の中温域から低温域において高い脂質分解活性を示す低温適応型のリパーゼは、低温環境での産業や環境浄化などへの活用が期待されている。しかし、この低温適応型のリパーゼについての報告は少なく、新規なリパーゼの発見とキャラクターゼーションが求められている。そこで、申請者は、こうした低温適応型リパーゼを産生する可能性が高い、低温性食用油分解菌の単離と、その産生リパーゼのキャラクターゼーションを試みた。

まず、富山・石川両県の河川水、池水、海水、下水、土壌などから、1% (w/v) キヤノーラ油を含む寒天培地上で、コロニーの周縁に油分解を示す透明帯（ハロー）を形成する菌株を、食用油分解菌として 42 株も単離した。そして、これらの中から、25 °C 以下の培養条件下でコロニーとハローの直径が最大となった YY31 株を選択し、本研究を進めた。透過型電子顕微鏡および光学顕微鏡による観察から、YY31 株はグラム陰性の桿菌で、1 本の極鞭毛を用いて運動を行い、油滴に対し正の走化性を示すことを明らかにした。そして、YY31 株の増殖と食用油の分解能を調べたところ、5°C で培養した際に 25°C と比較して時間的な増殖の遅延が認められたものの、増殖が平衡に達した際にはほぼ同程度の菌体密度と油脂分解率を示したことから、YY31 株は低温性細菌と考えられた。次に、YY31

株の生化学的性状と 16S rDNA の塩基配列 (約 1,500bp) から種の同定を試みた結果, *Pseudomonas* sp. と最も高い相同性が示されたことから, YY31 株を *Pseudomonas* sp. YY31 株と命名した。また, YY31 株が産生するリパーゼを調べるため, 菌体と培養液上清を試料として SDS-PAGE とトリブチリンを基質とするザイモグラムを行ない, YY31 株が, 分子量が約 50 kDa であるリパーゼを 1 種類のみ産生・分泌することを明らかにした。

さらに, PCR とインバース PCR により, YY31 株が持つリパーゼ遺伝子 (lipYY31 と命名) を含む DNA 断片を増幅し, その塩基配列を解読した。その結果から, lipYY31 は, 1,410 bp の Open Reading Frame からなる, アミノ酸 470 残基, 分子量 49,584 Da のリパーゼ (LipYY31 と命名) をコードすると推定された。そして, この LipYY31 リパーゼのアミノ酸配列が, リパーゼの分類群におけるサブファミリー I.3 に属するリパーゼと高い配列の相同性を持ち, 触媒作用を持つ Ser 残基周辺にリパーゼ固有の保存領域 GX SXG (X: 任意のアミノ酸) モチーフを持っていることを示した。また, LipYY31 のアミノ酸配列が, 近縁種が持つリパーゼのアミノ酸配列と 90-94% とやや低い相同性しか示さなかったことから, LipYY31 は新規性のあるリパーゼであると考えた。次に, LipYY31 の大量発現系を, lipYY31 を組み込んだ発現用ベクター pET47b を大腸菌 BL21 (DE3) に導入して構築した。この遺伝子組み換え大腸菌を培養することによって LipYY31 を過剰発現させ, それを回収・精製し, そのリパーゼ活性の特性を調べた。そして, p-ニトロフェニルエステル類あるいはトリグリセリド類を基質として測定した結果から, LipYY31 の活性至適温度は 25-30°C で, 0-5°C でもその 20-40 % にあたる活性を示すことを見出した。また, LipYY31 の活性は, 0-15°C の低温域では長期間安定であるが, 25°C 以上では 6 時間で 50 % 以下にまで活性が低下することを明らかにした。そして, これらの結果から, LipYY31 は典型的

な低温適応型のリパーゼであることを示唆した。さらに、LipYY31 の至適 pH 値が 8.0 であることも示した上で、LipYY31 のリパーゼ活性が、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、EDTA により強く阻害され、 Ca^{2+} によって 3 から 7 倍にも高められることも見出した。また、トリグリセリド類と p-ニトロフェノール類の中では、それぞれトリカプリン (C10:0) と p-ニトロフェノールカプレート (C10) に対して高い基質特性を持つことや、植物性油や動物性油脂のような天然基質に対しても高い活性を示すこと、さらには、非イオン系の界面活性剤である Triton X-100 や Tween の存在下で活性が促進されることや、メタノール、エタノール、イソプロパノールなどの有機溶剤中でも高い安定性を示すことなども見出した。このように、YY31 株とそれが産生する LipYY31 が、中低温において安定したリパーゼ活性を持つことや、重金属イオン、界面活性剤、有機溶剤などの存在下での保存や利用が可能であることを示した。

これらの結果から、申請者が単離し見出した *Pseudomonas* sp. YY31 株と LipYY31 が、リパーゼに関する研究だけでなく、食品・医薬・化学工業などの産業分野に加えて環境浄化などの分野にも活用されることが期待された。

以上により、当審査委員会は本申請論文が博士（理学）の学位を授与するに値するものと認め、合格とした。