

T-rich な領域が存在し、下流側に C-rich な領域が存在するという共通構造も認められた。両遺伝子は長鎖脂肪酸によって転写が誘導されるという共通点を持っていることから、この配列付近の構造が誘導発現に関与している可能性が示唆される。

真核生物で高発現する多くの遺伝子の転写開始点付近には pyrimidine-rich な領域が存在する。lip2 遺伝子の転写開始点上には pyrimidine-rich な領域が存在し、その上流には2つの逆方向反復配列が存在した。一方、lip1 遺伝子にはこれらの配列が存在しなかったことより、pyrimidine-rich な領域と逆方向反復配列は転写活性の増大に関係しているかもしれない。⁶⁾

4. おわりに

我々はこれまでに *G. candidum* リパーゼの構造—機能相関の解明および生産機構の解明をめざした研究を行ってきた。今後 *G. candidum* のセルフクローニング系を確立することができれば、上述した脂肪酸によるリパーゼの誘導生産の機構解明に大きな威力を発揮することが期待できるし、また lip2 の非転写領域に lip1 の転写領域を連結したハイブリッド遺伝子はこの発現

系でリパーゼを高生産すると考えられる。このような観点から、これからの研究課題としてセルフクローニング系を利用した発現系の確立をめざして努力したい。

文 献

- 1) Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Iizumi, T., Tsunasawa, S.: *J. Biochem.*, **106**, 383 (1989).
- 2) Shimada, Y., Sugihara, A., Iizumi, T., Tominaga, Y.: *J. Biochem.*, **107**, 703 (1990).
- 3) Sugihara, A., Shimada, Y., Tominaga, Y.: *J. Biochem.*, **107**, 426 (1990).
- 4) Sugihara, A., Shimada, Y., Tominaga, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 738 (1991).
- 5) Sugihara, A., Hata, S., Shimada, Y., Goto, K., Tominaga, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 279 (1993).
- 6) Schrag, J. D., Li, Y., Wu, S., Cygler, M.: *Nature*, **351**, 761 (1991).
- 7) Derewenda, Z. S., Derewenda, U., Dodson, G. G.: *J. Mol. Biol.*, **227**, 818 (1992).
- 8) Shimada, Y., Sugihara, Y., Nagao, T., Tominaga, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 77 (1992).
- 9) Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, Y., Tominaga, Y.: *J. Biochem.*, **113**, 776 (1990).

3. 大環状ラクトン合成リパーゼの構造

井原 史雄・岡本 巖夫・仁平 卓也・山田 靖宙 (大阪大学工学部応用生物工学科)

有機合成反応の分野において、リパーゼに対する期待は大きい。それはリパーゼが有機溶媒中でも活性が安定に保たれ、エステル合成あるいは交換反応を触媒しうることから、立体選択的かつ位置特異的な合成反応の触媒としてリパーゼの利用が可能であることによる。我々はリパーゼの分子内エステル交換反応を利用した大環状ラクトン合成法を初めて見いだした (Fig. 1)。¹⁾ 本方法は、基質である ω -ヒドロキノン酸メチルエステルを、ヘキサンなどの有機溶媒中でリパーゼと混合することによりラクトンを得るものであり、既存の方法と比較して、非常に簡便に大環状ラクトンを合成しうる点ですぐれた方法であるといえる。本項では大環状ラクトン合成反応を触媒しうるリパーゼについて我々が得た知見を述べる。

1. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼ

すべてのリパーゼがラクトン合成能を有しているわ

けではない。筆者らの研究室で調べた限り、本方法により大環状ラクトンを合成しうるのは、シュードモナス属あるいはブタすい臓由来のリパーゼのみであった。¹⁾ 有機溶媒中におけるエステル交換反応そのものは種々のリパーゼについて報告されており、²⁾ シュードモナス属由来などのラクトン合成リパーゼが特に有機溶媒に耐性であるとは考えにくい。それゆえ、ラクトン合成反応を触媒するリパーゼの活性中心付近の構造的特徴が本反応に必要であると考えた。

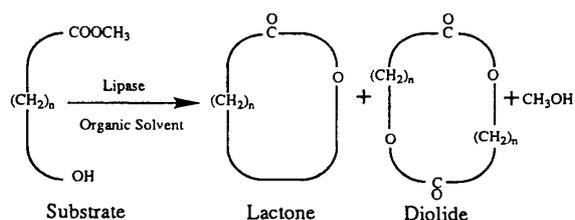


Fig. 1. Lactonizing reaction catalyzed by lipase.

シュードモナス属由来のリパーゼを用いた、ラクトン合成反応に対する基質特異性とエステラーゼ活性に対する基質特異性とを比較したところ、興味深い結果が得られた。³⁾すなわち、最大のラクトン合成能を示した基質の炭素鎖長(C 18)は、最適なエステラーゼ活性を示す基質炭素鎖長(C 8)の約2倍の長さであった。このことから、本リパーゼは基質のエステル基から数えて8個の炭素を認識し結合すると予想される。大環状ラクトン合成において、基質分子中の水酸基と活性中心にあるエステル基との間で交換反応が生じるためには、さらにそれとほぼ同じ長さの炭素鎖長を必要とすると考えられる。

ラクトン合成活性において、基質の炭素鎖長に依存して反応性が変化するという結果は、炭素の結合角の問題も無視はできないが、リパーゼの活性中心付近のポケットの大きさ、あるいは形状が大環状ラクトン合成反応のようなバルキーな遷移状態を支配することを示している。それゆえ、リパーゼを用いた合成反応においては、合成しようとする基質に適した構造(活性中心の大きさ、形状)を持ったリパーゼをその反応ごとに用意しなければならないと思われる。

2. ラクトン合成リパーゼの一次構造

大環状ラクトン合成能を有するリパーゼの一次構造について知見を得るために、*Pseudomonas* sp. 109株から本リパーゼ遺伝子(*lipL*)の大腸菌へのクローニングを行った。塩基配列の決定を行い、311個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を見いだした。³⁾このORFには、1)精製した大環状ラクトン合成リパーゼのアミノ酸配列とまったく同じ配列が存在していた、2)その前の配列は典型的なシグナル配列であった、3)シグナル配列を除いた配列の推定分子量は精製したリパーゼの分子量と一致した、4)リパーゼに特異的な配列-Gly-X-Ser-X-Gly-が存在した。以上のことから本遺伝子は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。

リパーゼに特異的な保存領域(-Gly-X-Ser-X-Gly-)付近の配列は多くの種由来のリパーゼについて保存されており、そのセリン残基は活性中心であることがX線構造解析により明らかにされている。^{4,5)}本リパーゼのアミノ酸配列中にもリパーゼに特異的な保存領域が認められ、その近傍の配列はよく保存されていたことから、³⁾本リパーゼはセリン残基を活性中心に持つと思われる。LipLタンパク質のアミノ酸配列と他の

リパーゼの配列とを比較したところ、アミノ酸配列全体としては同じシュードモナス属由来のリパーゼとの間にもみ有意な相同性が認められた。^{3,6)}

3. *Pseudomonas* sp. 109株リパーゼの多様性

本菌株は*lipL*遺伝子の他に少なくとも*lipA*、*lipB*、および*lipC*と命名した3種類のリパーゼあるいはエステラーゼ遺伝子を有していることを明らかにしたので、これらの遺伝子についても少しふれておく。

クローン化した*lipA*および*lipB*遺伝子は塩基配列から、それぞれ333および455個のアミノ酸よりなるタンパク質をコードしていた。大腸菌内で発現させ、精製したLipAおよびLipBタンパク質について大環状ラクトン合成能を調べたところ、いずれにもラクトン合成能は認められなかった。またLipAタンパク質についてエステラーゼ活性における基質特異性を調べたところ、炭素鎖長の短い基質のみに活性が認められた。LipBタンパク質についてはオリーブ油に対する分解能が認められなかったことなどより、これらのタンパク質はリパーゼというよりもむしろエステラーゼであると結論した。

3.3 kbpの*PstI*断片として得た*lipC*遺伝子はその配列中に*PstI*認識部位をもうひとつ有しており、まったくの偶然に得られたリパーゼ遺伝子である。現在、本遺伝子の解析は、塩基配列の決定のみにとどまっており、タンパク質からの情報はほとんどない。しかしながら、*lipC*遺伝子を含むプラスミドを持つ大腸菌にオリーブ油の資化性が認められたことから、本遺伝子もリパーゼをコードしていると思われる。

このように、*Pseudomonas* sp. 109株は少なくとも2種類のリパーゼ遺伝子と2種類のエステラーゼ遺伝子を有していた。これら4タンパク質間に配列上の相同性はまったく認められず、本菌株中におけるそれぞれのタンパク質の生理的役割についても興味もたれる。

4. リパーゼ活性化因子(LimL)の存在

最近、シュードモナス属のリパーゼ遺伝子の下流領域に、リパーゼ活性化に必須の因子が存在することが報告されている。⁷⁻¹⁰⁾*lipL*遺伝子においてもその下流領域にリパーゼ活性化因子、*limL*遺伝子が存在することを明らかにしている。¹¹⁾現在、リパーゼ活性化因子の機能解析が精力的に行われており、本タンパク質はシャペロン様の活性を有し、リパーゼの高次構造の形成に関与していることが示唆されている。¹²⁻¹⁴⁾筆者

らも LipL と LimL とが安定な複合体を形成することを確認するなどシャペロン様機能を支持する結果を得ている。しかしながら、LimL タンパク質を含むリパーゼ活性化因子がどのようにリパーゼの活性化に関与しているかは未知の部分が多く今後の解析が待たれる。

以上述べてきたようにシュードモナス属のリパーゼには詳細な高次構造、リパーゼ活性化因子の機能など未知の部分も多い。しかしながら他種のリパーゼと比較してヴァリエーションが多く、有機合成反応において、より広範な基質の利用あるいは異なった反応を行う可能性を秘めており、今後さらなる解析が期待される。

文 献

- 1) Makita, A., Nihira, T. and Yamada, Y.: *Tetrahedron Lett.*, **28**, 805 (1986).
- 2) 岩井美枝子: リパーゼ—その基礎と応用—, p. 245, 幸書房 (1991).
- 3) Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T. and Yamada, Y.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 18135 (1991).
- 4) Winkler, F. K., D'Arcy, A. and Hunziker, W.: *Nature*, **343**, 771 (1990).
- 5) Brady, L., Brzozowsky, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L. and Menge, U.: *Nature*, **343**, 767 (1990).
- 6) Gilbert, E. J.: *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 634 (1993).
- 7) Jorgensen, S., Kirsten, W. S. and Diderichsen, B.: *J. Bacteriol.*, **173**, 559 (1991).
- 8) Iizumi, T., Nakamura, K., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y. and Fukase, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2349 (1991).
- 9) Chihara, S. M., Yoshikawa, K., Oshima, H. N., Yamamoto, K., Sogabe, Y., Nakatani, T., Nishioka, T. and Oda, J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**, 505 (1992).
- 10) Frenken, L. G. J., Bos, J. W., Visser, C., Muller, W., Tommassen, J. and Verrips, C. T.: *Mol. Microbiol.*, **9**, 579 (1993).
- 11) Ihara, F., Okamoto, I., Nihira, T. and Yamada, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 337 (1992).
- 12) Hobson, A. H., Buckley, C. M., Aamand, J. L., Jorgensen, S. T., Diderichsen, B. and McConnell, D. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5682 (1993).
- 13) Oshima, H. N., Yoshikawa, K., Nishioka, T. and Oda, J.: *An. J. Biochem.*, **215**, 239 (1993).
- 14) Frenken, L. G. J., de Groot, A., Tommassen, J. and Verrips, C. T.: *Mol. Microbiol.*, **9**, 591 (1993).

4. *Pseudomonas aeruginosa* TE3285 リパーゼ活性化遺伝子 (*lipB*) 産物の機能

西岡 孝明・平山 則子・吉川 和宏・柴田 洋之・小田 順一 (京都大学化学研究所)

Pseudomonas aeruginosa TE3285 由来のリパーゼ (285 アミノ酸残基) は、トリグリセライドの2級アルコールエステル基も加水分解する、45-50°C で安定、ビナフトールのように反応中心がきわめてかさだかいアルコールをも基質として高い立体選択性および化学収率でアシル化反応を有機溶媒中において触媒する、¹⁻⁴⁾ セリンプロテアーゼの阻害剤である有機リン酸エステルによって水溶液中では失活しないものの、有機溶媒中では失活する、⁵⁾ など有機合成化学、構造生物学的にきわめて興味ある酵素である。この酵素の X 線結晶構造解析を目的として遺伝子クローニング、大腸菌での大量発現をおこなっていた過程で、活性化因子 (遺伝子) のクローニングを行うことができた。⁶⁾ この活性化因子とは、*Pseudomonas* 属リパーゼに付随する遺伝子 (ORF) のことであり、大腸菌など異種細胞のみならず宿主細胞におけるリパーゼ遺伝子の発現 (す

なわち、リパーゼ活性があらわれること) に必要とされているものである。これまでに5種類の *Pseudomonas* 属リパーゼについてその存在が確認されているものの、その活性化の機構はまったく不明であった。今回、*P. aeruginosa* TE3285 の活性化因子の機能の一端を明らかにすることができたので紹介する。⁷⁾

1. 活性化因子遺伝子 *lipB*

P. aeruginosa TE3285 リパーゼの遺伝子 (*lipA*: 933 bp) をクローニングしたところ、終止コドンから50塩基 3' 下流にもう一つ ORF (1017 bp) が存在していた。大腸菌でリパーゼ遺伝子 *lipA* の発現をこころみたところ、この ORF が完全に存在していないとリパーゼ活性が得られなかった。また、これまでに *Pseudomonas cepacia* DSM3959, sp. KWI-56, sp. 109, *aeruginosa*