

論文の内容の要旨

論文題目 **Lipase activation for modification of fats and oils** (油脂の改質を目的としたリパーゼの高活性化)

氏名 丸山 達生

1. 緒言

長い間、酵素反応は水中でしか進行しないと考えられていたが、1980年代に有機溶媒中において酵素が有用な合成反応を触媒することが発見され、非水系における酵素反応に関して多くの研究がなされてきた。しかしながら、あらゆる酵素が有機溶媒中で合成活性を示すわけではなく、また酵素が有機溶媒に不溶であることから有機溶媒中における酵素反応の解析はそれほど進んでいない。そんな中、リパーゼは低極性溶媒の中で比較的安定であり、活性が低いながらも合成反応を行うことから注目を集めている。

一方、リパーゼが最も得意とする基質は天然油脂中に含まれるトリグリセリドである。この再生可能な天然油脂の有効利用は、資源の枯渇問題、食糧問題の解決に少なからず貢献するものと思われる。トリグリセリドの物性および機能性はグリセロール基にエステル結合しているアシル基の種類およびその結合位置に起因する。従って工業的応用を考えると、安全性・反応部位選択性の面から酵素法としてリパーゼを用いた油脂の改質が期待されている。工業的に価値のあるエステル交換反応やエステル合成反応は非水系、つまり有機溶媒中か無溶媒系で行わせる必要があるが、酵素が高価なこと、非水系で反応性が低いことなどから実用例は少ない。これまでリパーゼを固定化あるいは脂質修飾することにより有機溶媒中における酵素活性を向上できることが報告されてきた。しかし固定化および脂質修飾操作によるリパーゼの活性化機構については不明のままである。

そこで本研究では、エステル交換反応(図1)を用いた油脂の改質を念頭に、高活性を有する脂肪酸-リパーゼ複合体の基礎特性を検討し、その構造解析を行った。また、これらの活性化に

界面の存在が深く関わっていると考え、界面を利用したリパーゼの活性化現象についての検討を行い、リパーゼによる合成反応の活性化に本質的に関わる要因を明らかにすることを旨とした。

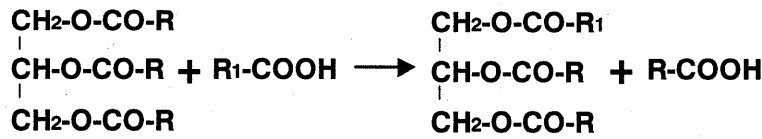


図1 トリグリセリドと脂肪酸との間のエステル交換反応

2. 脂肪酸修飾によるリパーゼの高活性化

背景と目的：リパーゼの脂肪酸修飾は、人体に有害な物質を含まず、食品産業への応用の点からきわめて望ましい酵素の活性化方法である。これまでカビ由来のリパーゼのエステル交換活性を飛躍的に高めることが報告されている。そこで、この脂肪酸修飾方法の汎用性を確かめるべく、動物、カビ、細菌由来のリパーゼについて、数種の脂肪酸を用いて修飾を施し、そのエステル交換活性を検討した。

実験：リパーゼ水溶液と脂肪酸を溶解させたエタノール溶液とを混合し、遠心分離の後、沈殿物を凍結乾燥して脂肪酸修飾リパーゼを調製した。この脂肪酸修飾リパーゼを用いて、トリオレインとパルミチン酸との間でエステル交換反応（図2）をヘキサン中で行い、その活性を評価した。

結果と考察：由来の異なる3種のリパーゼを検討した結果、それぞれエステル交換活性が飛躍的に向上した。また、どのリパーゼも、修飾に用いる脂肪酸にエステル交換活性は大きく依存した（図3）。

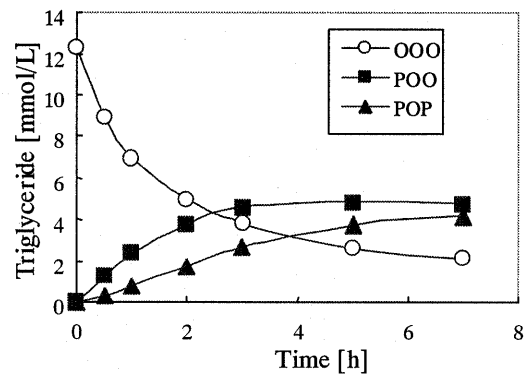


図2 脂肪酸修飾リパーゼによるトリオレイン(OOO)とパルミチン酸(P)との間のエステル交換反応

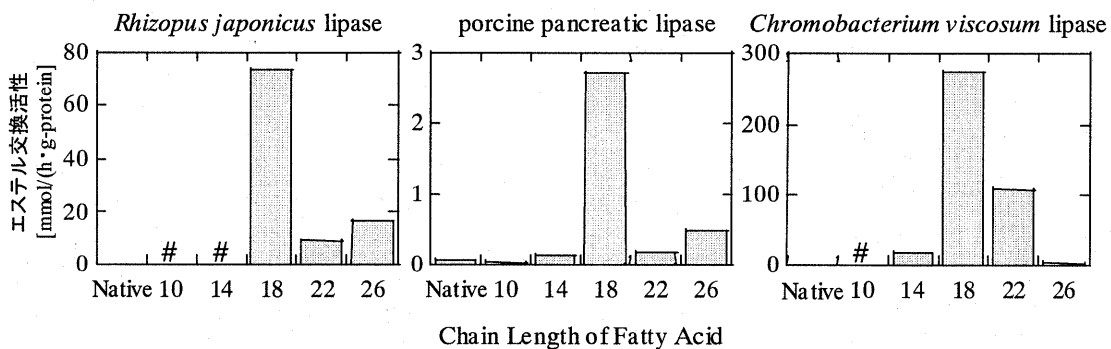


図3 脂肪酸修飾リパーゼのエステル交換活性
(#脂肪酸修飾リパーゼ調製時に沈殿物が得られなかった。)

3. 脂肪酸修飾リパーゼの構造解析

背景と目的：これまで上記の脂肪酸修飾リパーゼは、リパーゼ分子の周りに脂肪酸がミセル状に取り囲んでいるものと想像されており、反応溶媒に対するその溶解性あるいは分散性がエステル交換活性の向上に寄与していると考えられていた。しかしながら、脂肪酸修飾リパーゼのヘキサンに対する溶解性および分散性の予備検討を行った結果、ヘキサンにこの修飾リパーゼは全く溶解せず、分散性も低かった。そこで小角X線散乱法を用いて、この脂肪酸修飾リパーゼの構造解

析を行った。

実験：脂肪酸修飾リパーゼを緩衝液あるいはヘキサンに分散させ、小角X線散乱測定を高エネルギー物理学研究機構で行った。

結果と考察：測定の結果、緩衝液およびヘキサン中においてラメラ構造特有のX線散乱パターンが得られた(図4)。つまり脂肪酸修飾リパーゼでは脂肪酸のラメラ構造が存在することが判明し、ヘキサン中に分散させてもそのラメラ構造は保持されていることが明らかになった。この際、リパーゼ分子はそのラメラ構造に入り込んでいる、あるいは吸着しているものと考えられる(図5)。つまり脂肪酸修飾リパーゼの構造は想像されていたミセル状のものではなく、その活性化機構も別に存在することが示された。

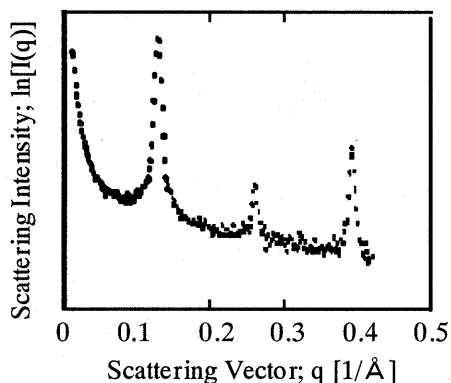


図4 ヘキサン中における脂肪酸修飾リパーゼの小角X線散乱パターン

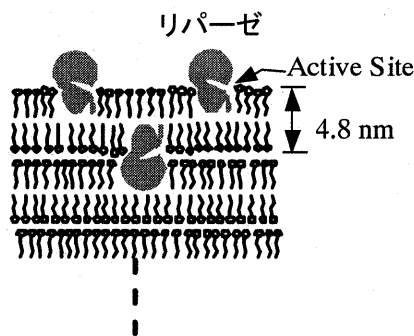


図5 脂肪酸修飾リパーゼの模式図

4. 油水界面によるリパーゼの高活性化

背景と目的：近年のX線結晶構造解析により、リパーゼは活性部位を覆う蓋(Lid)の様な構造を有していること、しかもこの蓋は開閉することが明らかになっている。また、油水界面により、リパーゼによる油脂の加水分解反応が著しく活性化されることが古くから知られており、この活性化は、リパーゼ特有の構造である蓋の開閉が関与しているものと考えられている。つまり油水界面において、この蓋が開き、基質が活性部位に到達しやすくなるため、加水分解反応が活性化されたものと考えられている(図6)。そこで有機溶媒中や無溶媒系におけるリパーゼの不活性化状態はこれらの系に油水界面が存在しないことが原因であると推察し、事前にリパーゼを油水界面との接触操作を行うことにより、有機溶媒中において高活性を有するリパーゼの調製ができるかどうかを検討した。

実験：リパーゼ水溶液にテトラデカン等の飽和炭化水素を少量加え、界面が存在する二相の状態であれば攪拌した。この状態から凍結乾燥により、飽和炭化水素と水を取り除き、油水界面接触リパーゼを乾燥粉末として調製した。ヘキサン中でトリパルミチンとステアリン酸との間でエステル交換反応を行い、エステル交換活性を評価した。なお、Cutinaseに関してはエステル交換活性を示さなかったため、ブチルラウレート合成活性を評価した。

結果と考察：種々のリパーゼを検討した結果、油水界面接触処理を施したリパーゼは、未処理リパーゼおよびコントロール(リパーゼ緩衝溶液を凍結乾燥したもの)に比して、顕著なエステル交換活性を示すことが分かった(図7)。また蓋を持たないリパーゼ(Cutinase)ではこの油水界面接触処理の効果が見られなかった。油相として種々の飽和炭化水素を用いて油水界面接触処理を行った結果、得られるエステル交換活性はその炭素数に大きく依存し、その依存の仕方はリパーゼの由来により違いが見られた。

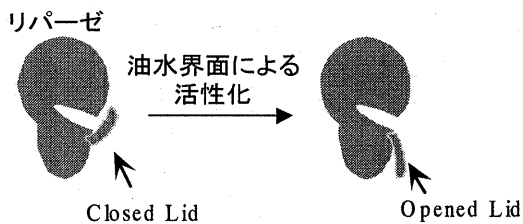


図6 油水界面によるリパーゼの活性化モデル

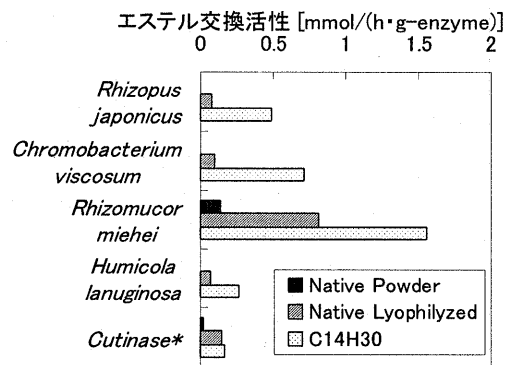


図7 油水界面接触処理がリパーゼのエステル交換活性に及ぼす影響
(*Cutinaseに関してはエステル合成活性を評価した。)

この油水界面接触処理を施したリパーゼ (*Rhizopus japonicus* 由来) に水を加え、水中に24時間再分散させ、凍結乾燥後、そのエステル交換活性を調べた。その結果、このリパーゼのエステル交換活性は油水界面接触処理後に比べ、その3%にまで活性が減少した。さらにこの不活性化したリパーゼに再度油水界面接触処理を施すと、そのエステル交換活性は約9倍に活性化された。つまりこの油水界面接触による活性化方法は、他の活性化方法と異なり、可逆であることが明らかになった。

この油水界面接触処理による活性化を次のように考察した。テトラデカン-水界面によりリパーゼ特有の活性部位を覆う蓋が開き、基質がたどり着きやすい状態を形成したため、高いエステル交換活性を有機溶媒中で示したと思われる。また油水界面の存在しない緩衝液に再分散させるとそのエステル交換活性が顕著に減少し、さらにその不活性化したリパーゼを油水界面接触処理により再活性化できたことはこの仮説を強く支持する結果である。

5. 基質添加による活性化状態の安定化

背景と目的: 基質あるいは基質アナログと酵素の複合体を水溶液中で形成させ、これを凍結乾燥することにより、有機溶媒中で高活性を有する酵素を調製できることが知られている。しかしながら、リパーゼに関しては、その反応場が一般にエマルション状態のようなヘテロな環境であることから、基質を用いたリパーゼの活性化状態の安定化に関する報告は少ない。そこで、先に開発した油水界面接触処理に、基質を添加することにより、リパーゼのエステル交換活性のさらなる向上を図った。

実験: 前述の油水界面接触処理において、テトラデカン相に少量のトリカプリンを溶解させ、リパーゼの油水界面接触処理を行った。エステル交換活性は前述と同様に評価した。

結果と考察: トリカプリンを油相に添加し、油水界面接触処理を行った結果、トリカプリンなしの時に比べて、いずれのリパーゼも明らかにエステル交換活性が向上した (図8)。

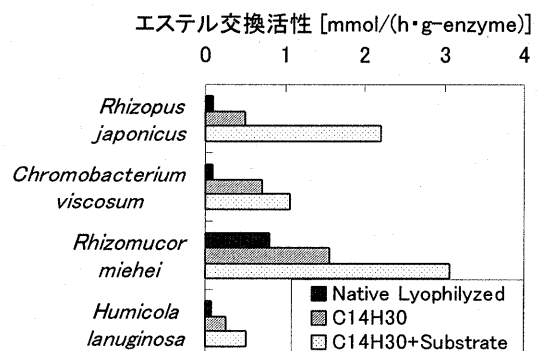


図8 油水界面接触処理における基質添加がリパーゼのエステル交換活性に及ぼす影響

この基質添加によるリパーゼの高活性化現象を次のように推察した。テトラデカン-水界面によりリパーゼの蓋が開き、そこで基質-酵素複合体を形成することにより活性化状態が安定的に保持され (図9)、高いエステル交換活性をヘキサン中で示したものと思われる。

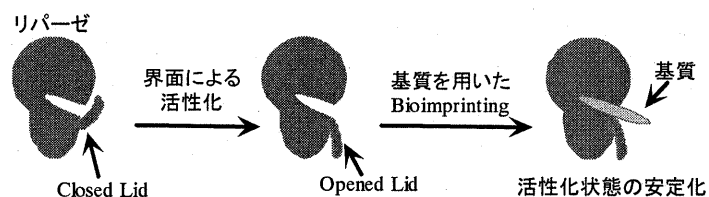


図9 油水界面における基質添加によるリパーゼの活性化状態の安定化モデル

6. 結論

本研究により脂肪酸修飾操作が種々のリパーゼに適用可能であり、高いエステル交換活性が得られることが判明した。この脂肪酸修飾リパーゼはリパーゼと脂肪酸ラメラ構造の複合体であることも明らかになった。

飽和炭化水素と水との界面接触によりリパーゼのエステル交換反応が活性化されることが初めて明らかになった。この油水界面接触処理は、他のリパーゼの活性化方法と違い、容易に不活性化し、さらに再活性化できることが判明した。この油水界面接触処理に基質を添加することで、エステル交換活性をさらに向上させることが可能になった。

以上の結果から、有機溶媒中におけるリパーゼの活性を高めるためには、事前に界面を提供すること、ならびに基質-酵素複合体を事前に形成させることが重要であることが判明した。脂肪酸修飾操作ではこの二つの要因がリパーゼの高活性化に寄与しているものと考えられる。