

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 丸山 達生

本論文は、食用油脂の改質を行う酵素（リパーゼ）の高活性化方法の開発と高活性化に本質的に関わる因子の解明に関する研究を纏めたものである。具体的には、油脂の改質方法として非水系におけるエステル交換反応に注目し、この反応を触媒するリパーゼの脂肪酸修飾による高活性化、脂肪酸修飾を施したリパーゼ（リパーゼ-脂肪酸複合体）の構造解析、またリパーゼの性質を利用した新規な油水界面接触処理方法の開発などを含んでいる。特に本論文では、これまで未解明であった脂肪酸修飾リパーゼの構造解析を初めて行い、リパーゼの特質を生かした液-液界面を用いた可逆的な活性化方法（油水界面接触処理法）の開発を行ったところに特徴がある。

本論文は、全8章から構成されている。

第一章では、本論文の意義を明確にするために、研究の背景およびリパーゼの特徴・その応用について述べている。

第二章では、リパーゼによるエステル交換反応および脂肪酸修飾によるリパーゼの活性化現象に関して述べている。リパーゼによる油脂のエステル交換反応は、高い反応部位選択性、副産物の低減化、省エネルギー反応、食品グレードの安全性等多くの利点を有している。しかしながら、一般にリパーゼ単独では極めて低いエステル交換活性しか示さない。そこで本章では、このリパーゼの反応性を向上させる方法として脂肪酸による修飾法に注目し、その汎用性および反応特性に関する詳細な検討を行っている。リパーゼの脂肪酸修飾法は、極めて簡便な操作であり、かつ人体に対して安全性の高い活性化方法である。この方法が種々の由来のリパーゼに対して汎用性を有することを明らかにし、この脂肪酸修飾リパーゼの応用例として、機能性脂質である構造脂質の生産特性を評価している。これらの結果は、脂肪酸修飾リパーゼが食品産業において実用的に使用可能であることを示している。

第三章では、前章で取り上げた、高活性を有する脂肪酸修飾リパーゼの構造解析について述べている。ここでは、小角 X 線散乱法を用いて、脂肪酸修飾リパーゼの分析を行い、脂肪酸修飾リパーゼが脂肪酸のラメラ構造とリパーゼ分子の複合体であり、主にリパーゼ分子はそのラメラ構造表面に存在することを初めて明らかにしている。

第四章および第五章では、リパーゼの特性を利用した新規な活性の向上法（油水界面接触処理法）の開発について述べている。これまでリパーゼの活性を向上させるための様々な方法が提案されてきたが、それらのメカニズムについては、ほとんど明らかにされて来なかった。これに対して、本活性化方法は、推定されている、油水界面におけるリパーゼの構造変化を利用したものであり、極めて合理的な方法である。また本法は揮発性油を用いているため、活性化後、活性化に

関与した物質が残存しない。そのため、活性化したリパーゼを容易に不活性化、再活性化できるという、これまでにない特徴を有している。この特徴的な、リパーゼの活性化方法の開発は、非水系および水系におけるリパーゼ触媒反応に関して重要な知見を与えている。

第六章では、基質と油水界面を利用したリパーゼのインプリンティング効果について述べている。一般に、事前に、基質あるいは基質アナログと酵素の ES コМПレックスを形成させること（インプリンティング）により、非水系における酵素活性を向上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、効率的に基質と ES コМПレックスを形成させることが難しいため、基質等を用いたインプリンティングによるリパーゼエステル交換活性の向上に関する報告はなかった。そこで本章では、四章・五章で開発した油水界面接触処理に少量の基質を添加することにより、リパーゼのインプリンティングを検討している。種々の基質を用いてインプリンティングを行い、いずれの場合もリパーゼのエステル交換活性が向上することを初めて報告している。

第七章では、リパーゼによるペプチド分解・合成の可能性を述べている。これまで複数の研究グループが、粗リパーゼによるペプチド合成を報告しているが、ペプチド分解に関する報告は未だない。そこで本章では、13種のリパーゼに関して、ペプチド分解活性を検討し、市販の豚膵臓由来のリパーゼにペプチド分解活性を見出した。さらに、クロマトグラフィによる分画の結果、脂質分解活性とペプチド分解活性が分離可能であることを明らかにした。この結果から、これまで報告されているリパーゼのペプチド合成活性が混在するペプチダーゼに起因すると推定されることを示している。

第八章においては、本研究を総括し、今後の展望を述べている。

以上述べてきたように、本論文は、工業的な利用が期待されているリパーゼのエステル交換反応を念頭に、リパーゼの脂肪酸修飾による活性化および機能性油脂の生産を行い、その有用性を実証したものである。また、この高活性を有する脂肪酸修飾リパーゼの構造解析、油水界面接触処理による新規なリパーゼの高活性化法の開発等を通して、リパーゼが非水系で効率的に働く機構に関する重要な指針を提供している。これらの結果は、食品工学を含む生物化学工学の分野で重要な意味を持つとともに、新規な反応場における酵素の反応化学の分野にも意義深いものと考えられる。さらに、これら本論文の結果から、将来的に、油脂の改質のみならず、さまざまなファインケミカル合成へのリパーゼの応用が期待される。

よって、本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。