

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		持続可能な化学プロセス構築のための有機溶媒耐性エステル分解・合成酵素の創製			
研究テーマ (欧文) AZ		The organic solvent-stable ester hydrolysis and synthesis enzymes for development of the sustainable chemical processes			
研究氏 代表 者	カナ CC	姓) 枝ノ	名) ヒロヤス	研究期間 B	2013 ~ 2015 年
	漢字 CB	荻野	博康	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	OGINO	Hiroyasu	研究機関名	大阪府立大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		大阪府立大学 大学院 工学研究科 ・ 教授			
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)					
<p>日本の化学産業ではファインケミカル製品製造の重要性が高まっている。ファインケミカル製品の製造の触媒として基質特異性や反応選択性が高い酵素を用いると、常温・常圧といった穏和な条件下で操作でき、副生成物を生じず、反応の効率や収率が高くなる。すなわち、化学製品の製造プロセスの触媒として酵素を用いると、省資源・省エネルギーでしかも環境負荷の低い環境調和型持続可能な化学プロセスの構築が可能となる。本研究では、難水溶性のファインケミカル製品などの製造の反応溶媒として用いられる有機溶媒存在下でも安定な有機溶媒耐性リパーゼの有機溶媒耐性の原因を解明すると共に、異種宿主における高発現系の構築について検討した。</p> <p>酵素の有機溶媒耐性はその酵素の構造に依存するものであり、進化分子工学的手法による有機溶媒耐性が異なるリパーゼの取得を試みた。ランダム変異を誘発した LST-03 リパーゼ遺伝子と分子シャペロン遺伝子を共発現する形質転換体の中のうち、リパーゼの有機溶媒耐性をハイスループットに判断できる方法を用い、有機溶媒耐性が更に向上した変異 LST-03 リパーゼを取得した。酵素の有機溶媒耐性に寄与するアミノ酸を特定し、変異 LST-03 リパーゼの構造を分子力学計算により推測したところ、酵素表面のアミノ酸の置換、疎水的コアの安定化、塩橋や水素結合の形成が酵素の有機溶媒耐性向上に寄与できること明らかにした。</p> <p>また、大腸菌を宿主として LST-03 リパーゼ遺伝子を高発現し、インクルージョンボディを形成させた後、細胞破碎液から遠心分離することで、85%以上の純度で LST-03 リパーゼを回収した。インクルージョンボディを可溶化し、分子シャペロンで活性化した後、さらにカルシウムイオンを添加することにより、高純度の LST-03 リパーゼの生産性を約 1000 倍以上に向上することに成功した。</p>					
キーワード FA	有機溶媒耐性	リパーゼ	進化分子工学	高発現	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Enhanced activity and stability of an organic solvent-stable lipase							
	著者名 <sup>GA</sup>	Hiroyasu OGINO	雑誌名 <sup>GC</sup>	Proc. of the 13th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering					
	ページ <sup>GF</sup>	78	発行年 <sup>GE</sup>	2	0	1	4	巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

欧文概要 EZ

Commercially important organic compounds are sometimes water-unstable and/or water-insoluble. Such organic compounds must be synthesized in organic solvents. Especially, reactions with lipase are desirable to carry out in the presence of organic solvents or in an organic solvent, because the substrates of lipase are water-insoluble lipids. And reaction rates are markedly increased by solubilizing the substrates in the presence of organic solvents. Furthermore, lipase can also catalyze synthetic reactions, which are the reverse reactions of hydrolyses, and transesterification reactions in the presence of organic solvents. Therefore, organic solvent-stable lipase is very useful. The objects of this research are understandings of organic solvent-stability of a lipase and increasing of productivity of an organic solvent-stable lipase.

To understand organic solvent-stability of a lipase, directed evolution of LST-03 lipase was performed. By random mutagenesis of LST-03 lipase and high-throughput screening, mutated LST-03 lipases with high organic solvent-stability were obtained. By sequencing of mutated lipase genes, site-directed mutagenesis, and structure analysis of mutated lipases by molecular mechanics calculation, it was found that the formation of a salt bridge, hydrogen bonds, lead to an improved packing of the hydrophobic core, and pI shift of side chain play a very important role in increasing stability of the lipase in the presence of organic solvents.

The LST-03 lipase requires lipase-specific foldase for activation. Abundant expression of the active lipase was successfully accomplished with individual expression of the lipase and foldase in a heterologous host and subsequent *in vitro* activation. And a hyper-activated lipase was obtained by *in vitro* engineering of the foldase and the addition of calcium ions.