

論文要旨

学位論文題目 「膵リパーゼの大腸菌発現系の確立と糖鎖修飾の意義」

氏名 川口 奈奈美

【背景】

膵リパーゼは腸内で食餌由来の脂質を分解する主要な消化酵素であり、肥満や膵外分泌不全の治療にも利用される。これまでに、真核細胞を用いたリコンビナントヒト膵リパーゼ (Recombinant human pancreatic lipase; recHPL) の調製方法¹⁻³⁾が報告されているが、安価で操作が容易な大腸菌を用いた調製方法は報告が無い。当研究室では、大腸菌を用いたrecHPLの調製方法を検討し、封入体からの精製手順およびリフォールディング条件を最適化することで、脂質分解活性を有するrecHPLを調製した。しかしながら、当初得られたrecHPLの脂質分解活性は天然酵素の40%程度であり、脂質分解活性の向上が課題となった。また、ヒトとブタの天然膵リパーゼは86%のアミノ酸配列相同性を有し、共通してAsn¹⁶⁷に1ヶ所のN型糖鎖修飾を受けるが、その糖鎖の役割は未解明である。

【目的】

大腸菌を用いて天然と同等の脂質分解活性を有するrecHPLの調製方法を確立し、得られたrecHPLの特性を明らかにすること、ならびに調製したrecHPLを活用して、膵リパーゼを修飾する糖鎖の役割を解明することを本研究の目的とした。

【実験と結果】

1. リコンビナントヒト膵リパーゼの調製

C末端に Strep-tag II (ST-II) 標識を付加した recHPL の発現ベクターを大腸菌に導入し、recHPL-ST II の発現を誘導し、Strep-Tactin セファロースカラムにより精製し

た。尿素処理により変性、可溶化後、段階透析法によるリフォールディングにより、天然ブタ膵リパーゼ (Porcine pancreatic lipase; PPL) の 40 %程度の脂質分解活性を有する recHPL を得た。次に、リフォールディング後の recHPL の精製方法を検討した結果、L-Arg を含む溶出液を用いたゲルろ過 FPLC により、2 つの溶出ピークを得た。はじめに溶出するピークは脂質分解活性を示さず、非還元条件下での SDS-PAGE により、recHPL の凝集体であることが示された。2 番目に溶出するピークは天然 PPL と同等の脂質分解活性を有し、還元および非還元条件下の両方において、50 kDa 付近に単量体 recHPL として検出された。

2. 天然酵素と比較したリコンビナントヒト膵リパーゼの特性

大腸菌を用いて発現した recHPL の性質を天然 PPL と比較したところ、cDNA 配列から推定されるアミノ酸配列と糖鎖修飾⁴⁾の有無に相当する質量差が質量分析により示され、二次構造と分子内遊離チオール基の数は recHPL と PPL でほぼ一致した。また、両リパーゼは長鎖および短鎖脂肪酸を含むトリグリセリドに対して、それぞれ同等の脂質分解活性を有し、等しい反応速度定数、pH 依存性および膵リパーゼ阻害剤に対する感受性を示した。以上の結果、大腸菌を用いて、天然物と同等の特異性と酵素活性を有する recHPL の調製を達成できたことが示された。

3. 膵リパーゼが受ける糖鎖修飾の生物学的意義

recHPL と PPL の脂質分解活性に対する温度依存性を比較したところ、recHPL は 45 °C 以上において速やかに失活すると同時に、単量体の割合が顕著に低下し、多量体形成が認められた。一方、PPL は 45 °C においても、37 °C で測定した時の 7 割の活性を維持したことから、糖鎖修飾が熱安定性に寄与することが見出された。

糖鎖をもたないrecHPLと糖鎖を有する天然PPLについて、キモトリプシンに対する分解耐性を比較したところ、recHPLはPPLに比べて速やかに分解されたことから、糖鎖修飾がプロテアーゼ耐性にも寄与することが示唆された。さらに、膵リパーゼがもつ二本鎖複合型糖鎖と結合するタンパク質をブタ十二指腸刷子縁膜中に探索したところ、膵リパーゼの糖鎖と糖特異的に結合し得る小腸内リガンドの存在が見出された。

【まとめと考察】

本研究では、大腸菌発現系を用いて、天然物と同等の活性を有するrecHPLの調製に初めて成功した。調製したrecHPLは、脂質分解速度、基質特異性、pH依存性、阻害剤感受性において天然酵素と一致した。本研究により確立したrecHPL調製方法は、肥満治療薬候補となる新たな阻害剤の探索や、油脂加工や立体選択的な有機合成におけるバイオ触媒としての利用等、医療および産業分野での応用が期待される。また、膵リパーゼを修飾する糖鎖は、同酵素の活性構造の安定化のみならず、プロテアーゼによる分解からの保護にも寄与することを見出した。さらに、小腸内で膵リパーゼの糖鎖を認識する分子を見出したことから、糖鎖が腸内での膵リパーゼの局在や配向に影響し、脂質の効率的な消化吸収にも関与する可能性が示唆された。

- 1) Thirstrup, K., Carrière, F., Hjorth, S., Rasmussen, P. B., Wöldike, H., Nielsen, P. F., and Thim, L. (1993) *FEBS Lett* **327**, 79-84
- 2) Canalias, F., Visvikis, A., Thioudellet, C., and Siest, G. (1994) *Clin Chem* **40**, 1251-1257
- 3) Yang, Y., and Lowe, M. E. (1998) *Protein Expr Purif* **13**, 36-40
- 4) Fournet, B., Leroy, Y., Montreuil, J., Décaro, J., Rovey, M., van Kuik, J. A., and Vliegenthart, J. F. (1987) *Eur J Biochem* **170**, 369-371