

氏 名	くろ だ こう いち 黒 田 浩 一
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2445 号
学位授与の日付	平 成 17 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON CELL-SURFACE-ENGINEERED YEASTS FOR BIOREMEDIATION AND THEIR APPLICATIONS (細胞表層工学による環境浄化酵母の創製とその応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 森 泰 生 教 授 青 山 安 宏 教 授 村 上 正 浩

論 文 内 容 の 要 旨

地球環境に対する意識が高まりつつあり、重金属などの汚染物質をいかに環境中に出さないかということだけでなく、環境汚染物質をどのように排除して、生態系を浄化していくかという観点が環境保全には必要となっている。本論文は、細胞表層工学を用いた環境浄化酵母の創製と、その応用に関する研究を3編6章にまとめたものである。

第1編においては、ペプチド配列の細胞表層提示により、重金属イオン吸着能を賦与した酵母細胞の作製を行った。第1編第1章では、重金属イオン吸着能をもつペプチドであるヒスチジンオリゴマー (His)₆ を α -アグルチニンとの融合タンパク質として発現・提示した (His)₆ 提示酵母を作製した。本提示株の、細胞表層における重金属イオンの吸着・回収能の検討を行ったところ、野生株と比べて細胞表層で約8倍の銅イオンを吸着・回収できた。また、野生株では生育できない2 mM の硫酸銅存在下でもこの酵母は非常に良い生育を示した。第1編第2章では、酵母細胞内で重金属イオン恒常性維持に関与するタンパク質であるメタロチオネインの提示を行った。メタロチオネイン提示酵母の重金属イオン吸着能を測定した結果、(His)₆ 提示酵母株とは異なりカドミウムに対して高い吸着能を示した。本メタロチオネイン提示株の場合は、カドミウム含有培地における生育を確認した。

第2編においては、上記機能を高める酵母の作製に挑んだ。第2編第1章では、細胞凝集に関係する *GTS1* 遺伝子の過剰発現により、環境中の数 μ M 程度のわずかな銅イオンを検知して自己凝集・沈降できる性質を賦与したインテリジェント酵母を作製した。即ち、環境浄化酵母株の有用性をさらに高めることができた。第2編第2章では、重金属イオン吸着能をさらに向上させるため、4及び8つのメタロチオネインを並べて吸着サイトを増加させたタンデムリピートを構築し、これを酵母の細胞表層に提示した。タンデムリピート化によりリピート数に応じて、メタロチオネイン提示株の細胞表層での吸着能力が向上することが明らかになった。第2編第3章では、*GTS1* 遺伝子を過剰発現させた際に酵母の細胞凝集へと至る分子機構の解明を目的とし、DNA チップを用いた転写レベルでの網羅的解析を行った。その結果、*GTS1* 遺伝子の過剰発現により19個の遺伝子が2.5倍以上の増加を示した。遺伝子破壊による解析により、Flo1 タンパク質が誘導合成されることで凝集することを明らかにした。また、*FLO1* 遺伝子の発現抑制解除には染色体の再編成(クロマチンリモデリング)に関与する Swi/Snf 複合体が必要であることが明らかになった。さらに、相互作用を解析する実験法の一つである酵母 two-hybrid 法により、核タンパク質である Sin1 タンパク質の C 末端領域が Gts1 タンパク質と相互作用していることも確かめられた。以上の結果から、Gts1 タンパク質が核の中で Sin1 タンパク質と相互作用し、クロマチンリモデリングを誘起した結果、*FLO1* 遺伝子を含む様々な遺伝子の転写抑制を解除している可能性が示唆された。

第3編では、一転して、近年注目を集めている環境ホルモン除去に焦点をあて、ラット由来エストロゲン受容体のリガンド結合領域を提示し、内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)除去能を酵母に賦与した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、細胞表層工学を用いた環境浄化酵母の創製に関する研究を、3編6章にまとめたものである。得られた研究成果は以下のとおりである。

1. 重金属イオン吸着能をもつヒスチジンオリゴマー (His)₆ を発現・提示した酵母株を作製し、本株の銅イオンの吸着・回収能、及び野生株では生育できない硫酸銅存在下での生育能を示した。
2. 重金属イオン恒常性維持に関与するタンパク質であるメタロチオネインの提示酵母株を作製し、本株のカドミウムに対する高い吸着能を示した。
3. 細胞凝集に関係する *GTS1* 遺伝子を過剰発現させることにより、環境中の数 μM 程度の微量銅イオンを検知して自己凝集・沈降するインテリジェント酵母を作製した。
4. 細胞表層に提示したメタロチオネインのタンデムリピート化により、酵母株のカドミウムイオン吸着能力の向上に成功した。
5. *GTS1* 遺伝子過剰発現により細胞凝集へと至る分子機構の解析により、Gts1 タンパク質が核の中で Sin1 タンパク質と相互作用し、クロマチンリモデリングを誘起した結果、*FLO1* 遺伝子等、細胞凝集に関係する様々な遺伝子の転写抑制が解除される可能性を示した。
6. ラット由来エストロゲン受容体のリガンド結合領域を提示させ、内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）除去能を賦与した酵母株の作製に成功した。

以上、本論文は、酵母細胞表層における機能の創製が、重金属イオンや環境ホルモンなどの汚染物質の除去による環境浄化において有用であることを示した研究成果である。得られた成果は、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成16年12月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。