

氏 名	しら が せいざぶろう 白 神 清 三 郎
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2582 号
学位授与の日付	平 成 17 年 9 月 26 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 modification of functions of hydrolytic enzymes by yeast cell surface engineering (酵母細胞表層工学を用いた加水分解酵素の機能改変法に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 森 泰 生 教 授 今 中 忠 行 教 授 青 山 安 宏

論 文 内 容 の 要 旨

酵素を用いた物質変換は、穏やかな反応条件で反応が進む事、副生成物が少ない事などから環境への負荷の少ないプロセスとして有用である。望みの反応を進める酵素を手に入れるには、たんぱく質工学を用いた酵素の機能改変が必要である。本論文は、加水分解酵素の変異体ライブラリーを酵母細胞表層上で作成して迅速にその機能改変を行うことによる細胞表層工学のタンパク質工学への応用を目指したものであり、3編7章からなる。

第1編では、糸状菌 *Rhizopus oryzae* 由来のリパーゼ (ROL) の機能改変を行った。第1編第1章では、ROL のリド部位にコンビナトリアル変異を導入したライブラリーを構築した。トリブチリンや大豆油を基質としたハロアッセイにより2万個以上のROL変異体提示酵母群の一次スクリーニングを行い、得られた候補株に対し脂肪酸蛍光基質を用いて2次スクリーニングを行った結果、リド内部の(塩基性残基)-(極性残基)-(非極性残基)という並びが重要である事が示唆された。第1編第2章では、第1章で得られた知見を元にリド部位の3つのアミノ酸に網羅的に変異を導入したライブラリーを作成し、短鎖脂肪酸蛍光基質に対する分解活性が上昇した変異体を取得した。また、この変異体のモデリングをもとにリド部位周辺に更なる変異を導入した結果、鎖長特異性が大きく短鎖長側にシフトした変異体を取得した。スクリーニング過程で得られたデータを元にコンピューターモデリングを行った結果、短鎖長側にシフトした変異体のモデリングから野生型とは異なるオキシアニオンホール形成が示唆された。第1編第3章では、有機溶媒中でのエステル反応におけるROL提示酵母乾燥菌体の触媒能を評価したところ、固定化酵素として十分な高い活性を示した。またパルミチン酸メチルエステルに対する分解活性を指標としたROL変異体提示酵母のスクリーニングでは8000個の変異体の中から、野生型に比べて3～6倍高い活性を示す変異体を取得した。

第2編では、エステラーゼ活性を持つ抗体酵素6D9のFabドメインの酵母細胞表層への提示方法の検討と、機能改変を行った。第2編第1章では、6D9のFd断片を細胞外に分泌させ、Lc断片を表層提示させることにより細胞表層上でFdとLcが結合したFabを提示させることに成功した。第2編第2章では、Lc断片を提示し、Fd断片を分泌したFab1提示株と、Fd断片を提示し、Lc断片を分泌したFab2提示株を作成した。両者の蛍光基質に対する結合能力をセルソーターによってを比較したところ、Fab1の方が高い活性を示した。第2編第3章では、Fabの基質結合部位に変異を導入し、セルソーターを用いて遷移中間体アナログとの結合能力の高い酵母をスクリーニングした。得られた変異体は野生型に比べてエステラーゼ活性が上昇していた。

第3編第1章では糸状菌 *Rhizopus oryzae* 由来のグルコアミラーゼの変異体ライブラリーを酵母細胞表層上で構築し、ヨウ素-デンプン反応によるハロアッセイを用いて変異体提示酵母をスクリーニングすることにより、デンプン分解活性が野生型に比べて1.4倍高いグルコアミラーゼを提示した酵母を取得した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、細胞表層工学のタンパク質工学への応用に関する研究を、3編7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. 糸状菌 *Rhizopus oryzae* 由来のリパーゼ (ROL) のリド部位にコンビナトリアル変異を導入したライブラリーを酵母細胞表層上に作製した。提示株のスクリーニングからリド内部の (塩基性残基)-(極性残基)-(非極性残基) という並びが重要である事を示した。
2. リド部位に更に変異をかけ、短鎖長基質に対し高い活性を持つ ROL 変異体提示酵母を作製した。また変異体のモデリングから新規なオキシアニオンホールの形成を示した。
3. ROL 提示酵母を有機溶媒中で用いる事により、エステル反応において高い活性を示した。また ROL 変異体提示酵母のスクリーニングから野生型に比べて3～6倍高い活性を示す変異体を取得した。
4. 抗体酵素6D9のFd断片を細胞外に分泌させ、Lc断片を表層提示させることにより細胞表層上でFdとLcが結合したFabを提示させた酵母の創製に成功した。
5. Lc断片を提示し、Fd断片を分泌したFab1提示株と、Fd断片を提示し、Lc断片を分泌したFab2提示株を作製したところ、Fab1提示酵母が抗体酵素としてより高い活性を示した。
6. セルソーターを用いて基質との結合能力の高いFab変異体提示酵母をスクリーニングを行い、野生型に比べてエステラーゼ活性が上昇した変異体提示酵母を作製した。
7. 糸状菌 *Rhizopus oryzae* 由来のグルコアミラーゼの変異体ライブラリーを酵母細胞表層上で構築し、デンプン分解活性が野生型に比べて1.4倍高いグルコアミラーゼを提示した酵母を取得した。

以上、本論文は、酵母細胞表層上での加水分解酵素の変異体ライブラリーの作成と活性を指標とした迅速なスクリーニングがその機能改変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、実際に寄与するところが少ない。

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17年8月3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。