

氏 名	しば さき せい じ 芝 崎 誠 司
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2080 号
学位授与の日付	平 成 13 年 5 月 23 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 DISPLAY OF FLUORESCENT PROTEINS IN RESPONSE TO ENVIRONMENTAL CONDITIONS BY CELL SURFACE ENGINEERING (細胞表層工学を利用した環境応答性蛍光タンパク質細胞表層提示に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 渥 夫 教 授 今 中 忠 行 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

現在、バイオプロセスにおいて細胞内外の情報の非破壊的かつリアルタイムな計測に供することができる細胞の構築が不可欠となっている。本論文は、オワンクラゲ *Aequorea victoria* 由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) およびその変異体タンパク質を細胞表層レポーターとする酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の形質転換株の作製と、蛍光シグナルを用いた物質濃度のモニタリングについて検討したものであり、緒論、結論および本論2編5章よりなっている。

第1編は、GFPの酵母細胞表層提示の基礎的技術およびその評価方法の開発についての報告である。第1章では、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*GAPDH*) のプロモーターの制御下で GFPuv を細胞表層に提示する株を構築し、その評価を行った。GFPuv 遺伝子の 5' 末端に *Rhizopus oryzae* 由来グルコアミラーゼの分泌シグナル配列を、3' 末端に *S. cerevisiae* の細胞壁に局在する性凝集素タンパク質 α -アグルチニンの320アミノ酸をコードする遺伝子領域を融合し、*GAPDH* プロモーターの下流に配置して、*S. cerevisiae* MT8-1 株の染色体に導入した。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより、細胞表層で GFPuv の緑色蛍光が観察された。また、これらの蛍光像が提示された GFP タンパク質由来のものであることを、蛍光抗体染色法による間接蛍光によって確認した。第2章では、細胞表層工学の手法で提示できる分子数を明らかにした。EGFP (enhanced GFP) を *GAPDH* プロモーター制御下で細胞表層に提示する株を作製するため2種類のプラスミドを構築した。一つは 2 μ mDNA を持ち *S. cerevisiae* 細胞内で多コピーで増殖するプラスミド、もう一つは染色体組込み型のプラスミドである。これらの遺伝子による2種の形質転換体について、細胞表層から得られる蛍光強度を測定し、1細胞当たり 10^4 - 10^5 分子が細胞表層に存在していることを算出し、染色体組込み型に比べ多コピー型では3-4倍の提示量があることを確認した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像の蛍光シグナルの処理により、表層提示されている EGFP 分子を定量し、蛍光光度計による測定と同様の結果を得た。

第2編は、蛍光分子のプロモーター依存的細胞表層提示とその応用に関する研究についての報告である。第1章では、細胞内外のグルコース濃度をセンシングできる株を構築した。グルコース存在下で転写誘導を引き起こす *GAPDH* プロモーターと、グルコース非存在下で脱抑制により機能する *Candida tropicalis* 由来 UPR-ICL プロモーターのそれぞれの制御下で GFP と BFP (blue fluorescent protein) を細胞表層に提示できる遺伝子を作製し、*S. cerevisiae* の染色体に組込んだ。培養時間ごとの GFP および BFP の蛍光強度と細胞内外のグルコース濃度を測定し、この形質転換株はグルコース濃度に応答して異なる波長の蛍光を発することを確認した。GFP の蛍光増加速度は培養開始後7時間、BFP の場合は19時間後に最大値を示した。第2章では、リン酸イオンおよびアンモニウムイオン濃度をセンシングできる細胞を構築した。リン酸イオン枯渇下で機能する *PHO5* プロモーターとアンモニウムイオン枯渇下で機能する *MEP2* プロモーターを用いて、それぞれの条件下で ECFP (enhanced cyanblue fluorescent protein) ならびに EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) を細胞表層に提示できる株を作製し、フローサイトメーターにより細胞表層由来の蛍光シグナルを取得し、プロモーター依存

的な蛍光分子提示細胞が、実際の場面での非破壊測定に寄与しうることを示した。第3章では、ガラクトース誘導性である *GAL1* プロモーターの制御下で EGFP を細胞表層に提示できる *S. cerevisiae* 形質転換株を作製した後、同じプロモーターの制御下で細胞内に大腸菌 β -ガラクトシダーゼ、あるいは細胞外にヒトインターフェロン- ω (hIFN- ω) を産生できる遺伝子をそれぞれ導入した。細胞表層における EGFP の蛍光強度と各タンパク質の産生量の相関性を得ることができ、細胞表層蛍光シグナルをもって非破壊的に外来タンパク質の産生量をモニタリングできることを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、オワンクラゲ *Aequorea victoria* 由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 細胞表層における環境応答発現およびその応用に関する研究をまとめたものであり、得られた主な成果は以下のとおりである。

1. GFP の *S. cerevisiae* における表層提示システムを構築し、細胞壁結合領域として機能する α -agglutinin 融合型 GFP を、蛍光活性体として発現提示させることに成功した。
2. α -agglutinin を利用する細胞表層工学の手法で提示できる 1 細胞当たりの分子数を、染色体組み込み型プラスミド、多コピー型プラスミドで形質転換した株それぞれについて明らかにした。また、共焦点レーザー顕微鏡画像解析処理により、表層提示された蛍光タンパク質分子数を定量する手法を開発した。この手法と蛍光光度計による定量は極めて近い測定値を示すことも明らかにした。
3. グルコース存在下、非存在下で転写誘導を引き起こすプロモーターを用いて、GFP および青色変異体の BFP を *S. cerevisiae* に提示できるシステムを構築し、細胞内外のグルコース濃度に応答して、異なる波長の蛍光タンパク質を表層に発現させることに成功した。さらに、イオン濃度のセンシングの例として、リン酸イオンならびにアンモニウムイオンの濃度に応答するプロモーター依存的に、CFP (シアンブルー変異体) および YFP (黄色変異体) を細胞表層に提示する酵母を創製し、各イオンの細胞内外の濃度に応答して細胞表層から蛍光を発することを確認した。
4. 外来タンパク質の産生量を蛍光タンパク質の提示によりモニタリングしうるシステムを構築した。細胞内あるいは細胞外にタンパク質を産生するために用いたプロモーターと同一のプロモーターを用いて GFP を提示することで、非破壊的に外来タンパク質産生量をモニタリングできることが明かとなった。

以上のように、本論文は酵母細胞表層において、環境に応答して蛍光タンパク質を提示するシステムの研究に関して重要な成果を挙げたものであり、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13年4月20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。