

氏 名	シユウ 鄒 ウェン 文
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2087 号
学位授与の日付	平 成 13 年 7 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 THE NEW FUNCTIONAL YEAST STRAINS CONSTRUCTED AND SCREENED BY CELL SURFACE EN- GINEERING (細胞表層工学を用いて改変した新機能酵母に関する研究)
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

酵母の細胞表層工学技術の展開により、細胞の表層は従来考えられていたより、はるかに遺伝子工学的改変の標的になり易い興味深い領域となってきた。本論文は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層に細胞表層工学技術を適用し、すでに備わっているタンパク質の改変により、培地中のグルコース濃度の変化を感知して凝集する酵母細胞の創製と、有機溶媒に耐性な酵母の基礎研究を基にして、ランダムなタンパク質ライブラリーを表層に提示した酵母から有機溶媒に耐性を賦与する分子の単離と解析について検討したものであり、緒論、結論及び本論2編5章よりなっている。

第一編は、細胞表層タンパク質の改変とプロモータの選択により、性フェロモン誘導によってのみ起こる本来の細胞間凝集現象を、導入したプロモーターへの活性化因子（ここでは、グルコースの濃度変化）によって、人為的に制御したことについての報告である。第一章では、酵母の細胞間凝集にかかわる2つのタンパク質のうち、コアタンパク質 (Aga1p) と機能タンパク質 (Aga2p) からなる α -アグルチニンについて、Aga1p と Aga2p を人為的に融合させても凝集タンパク質として十分に活性があることを明らかにするとともに、 α -アグルチニンと α -アグルチニンのタンパク質同志の結合相互作用に、Aga1p と Aga2p の間の2本のジスルフィド結合が重要であることを、この融合タンパク質を用いた実験で証明した。さらに、この融合タンパク質を *UPR-ICL* というグルコース濃度の低い時に強力に働くプロモーターの支配下で誘導合成させることに成功し、同じプロモーターの支配下で誘導合成させた α -アグルチニンを持つ酵母との凝集相互作用を確認した。

第二章では、本来のプロモーターとは異なったプロモーターの制御下に置かれた2つの凝集誘導タンパク質、 α -アグルチニンと遺伝子工学的にサブユニット間を融合した α -アグルチニンが同じ酵母細胞内で性フェロモン非依存的に誘導合成され、細胞間での凝集がグルコース濃度変化で誘導できることを実証した。このような凝集システムは、酵母を用いた工業プロセスにおいて、酵母と上清（培地）を分離する新しい簡便な方法となりうる。

第二編は、従来有機溶媒に耐性のなかった酵母が有機溶媒への適応により耐性を獲得した理由を mRNA のディファレンシャルディスプレイ (DD) 法により予測するとともに、ランダムなコンビナトリアルタンパク質ライブラリーを細胞表層に提示した酵母から有機溶媒耐性株を得たことについての報告である。第一章では、有機溶媒耐性を持たない親株 DY-1 とイソオクタン耐性になった株 KK-211 について、それぞれの細胞から mRNA を単離し、これを用いて DD 法を行ったところ、少なくとも30個の遺伝子の発現に大きな差異があることがわかった。また、顕微鏡観察により、有機溶媒耐性化に伴い、酵母の細胞表層に変化が生じていることが確認された。

第二章では、酵母の細胞表層の特徴と有機溶媒耐性の間に何らかの関係が存在する可能性が出てきたので、「DNA ランダムプライミング法」を用いて作成した遺伝子より人為的なタンパク質のコンビナトリアルライブラリーを細胞表層に提示する方法を確立した。第三章では、このライブラリーから有機溶媒の1つである *n*-ノナンに耐性を示す細胞をスクリーニングし、その細胞表層に提示された分子の解析と細胞の生育についてまとめた。この細胞の有機溶媒耐性は導入した遺伝子

に依存しており、また培地にタンパク質分解酵素パパインを添加することにより、細胞表層に提示されたタンパク質がその耐性にかかわっていることを証明した。さらに、この細胞表層に提示された分子のアミノ酸配列を明らかにし、その性質が前述した顕微鏡観察による細胞表層の親水性の増加と一致することを見出した。このように、細胞表層工学技術を用いたランダムなタンパク質ライブラリーを用いて、新機能をもった細胞の創製や新しい分子の発見、創出が可能なことを示したが、今後各産業への応用と新しいサイエンスの基礎の発展へつながることが期待できる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、細胞表層タンパク質の遺伝子工学的改変による新機能細胞の創製と、細胞表層工学により作製したランダムなタンパク質ライブラリー提示細胞からの新機能細胞の取得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. 酵母の細胞間凝集にかかわる2つのタンパク質のうち、 α -アグルチニンについて、これを構成する2つのサブユニットを遺伝子工学的に融合させたタンパク質も α -アグルチニンとの結合活性が十分にあること、および2つのサブユニット間の2本のジスルフィド結合がその機能に重要であることを明らかにした。
2. α -アグルチニンと融合 α -アグルチニンを本来とは異なったプロモーター *UPR-ICL* の支配下に置き、同じ細胞内でこの2つのタンパク質を同時に発現させたところ、この細胞は、グルコースの濃度を感知して自己凝集しうる新しい機能を持った細胞となったことを明らかにした。
3. mRNA のディファレンシャルディスプレイ法により、有機溶媒耐性を獲得した酵母では30個の遺伝子に発現パターンの差異が検出され、耐性発現に複数の遺伝子が関与することを明らかにした。また、表現型としては、顕微鏡観察により、細胞表面の性質が大きく変化していることを示した。
4. 酵母の細胞表層工学技術により、タンパク質のコンビナトリアルライブラリーを細胞表層に提示する手法を確立するとともに、そのライブラリーから有機溶媒に耐性を示す新しい酵母を取得し、さらに、提示されたタンパク質の構造や性質を明らかにした。

以上のように、本論文は酵母細胞表層を遺伝子工学的に改変した、新しい応答を示す酵母を創製するとともに、有機溶媒耐性という工業的プロセスにとって重要な機能をもつ酵母を創製する手法と新機能を持つバイオ高分子を創製する手法を確立するという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6月22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。