

氏 名	むら い とし ゆき 村 井 稔 幸
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 1776 号
学位授与の日付	平成 10 年 11 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 genetic display of hydrolytic enzymes on yeast cell surface (酵母細胞表面への加水分解酵素の遺伝子工学的提示に関する研究) (主査)
論文調査委員	教授 田中渥夫 教授 砂本順三 教授 今中忠行

論 文 内 容 の 要 旨

細胞表層に新たな機能を保持した酵母細胞を細胞触媒として用いることを目的として、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層に外来タンパクを安定に発現させるシステムの開発を行った。この手法による酵素の細胞壁へのアンカリングは一種の遺伝子工学的固定化法であり、生細胞を固定化酵素を自己再生する細胞触媒として利用できる道が開ける。一方、デンプン質あるいはセルロース性物質は天然に最も多く存在するバイオマス資源であり、これらの有効利用が求められている。本論文は、細胞表層にデンプン質あるいはセルロース性物質の加水分解酵素を遺伝子工学的に提示させた形質転換酵母を作製し、これら酵素の細胞表層における活性およびこれらの細胞のバイオマス資化能について検討したものであり、緒論、要約、結論および本論 2 編 5 章より成っている。

第 1 編では、*S. cerevisiae* の細胞表層にグルコアミラーゼと α -アミラーゼという 2 種のデンプン分解酵素を遺伝子工学的に提示させた細胞を構築し、それらの機能評価を行った。第 1 章では、酵母内で機能する分泌シグナル配列を含む *Rhizopus oryzae* 由来グルコアミラーゼ遺伝子と酵母の細胞表面接着分子 α -アグルチニンをコードする遺伝子 *AG α 1* の一部分との融合遺伝子を作製し、これを *GAPDH* プロモーターを用いて *S. cerevisiae* 内で発現させた。融合タンパクの細胞表層における局在性は蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法によって確認した。これらの細胞をデンプンを炭素源として好気培養し、生育度、グルコアミラーゼ活性、デンプン残存量およびエタノール生成量を経時的に測定した結果、細胞は安定して細胞表層にグルコアミラーゼ活性を保持しており、デンプンを効率良く分解・資化して生育し、エタノールを生産できることを明らかにした。第 2 章では、第 1 章で確立したグルコアミラーゼ提示細胞の工業的利用価値を評価するため、この系を元来発酵能力の高い酵母細胞に導入して生デンプン質原料からの直接発酵によるエタノールの生産能力を検討した。作製した形質転換体を生トウモロコシをデンプン質原料として 7 日間 27℃ で静置培養を行った結果、発酵によりエタノールを 2.34% (w/w) の濃度まで生産した。これは、醸造用の実用株にグルコアミラーゼを分泌型で発現させた形質転換体のおよそ 50% の生産能力であった。さらに、トウモロコシデンプンを α -アミラーゼ製剤で液化処理をしてから発酵試験をすると、5.32% (w/w) という分泌型株と同レベルの量のエタノールを生産した。これらの結果より、グルコアミラーゼ細胞表層発現酵母を用いてデンプンからエタノールを直接発酵生産できること、および α -アミラーゼの共発現により発酵能の向上が期待できることを示唆した。第 3 章では、デンプンを *exo* 型に分解するグルコアミラーゼと *endo* 型に分解する α -アミラーゼの共発現細胞について検討した。*Bacillus stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼ遺伝子に *S. cerevisiae* の *MF α 1* 分泌シグナルを付して *AG α 1* との融合遺伝子を作製し、これを *GAPDH* プロモーターを用いて *S. cerevisiae* 内で発現させ、グルコアミラーゼ・ α -アミラーゼ細胞表層共発現型酵母細胞がより高いデンプン資化能を有することを明らかにした。

第 2 編では、*S. cerevisiae* 細胞表層に CM-セルラーゼ (エンドグルカナナーゼ) および β -グルコシダーゼの細胞表層への発現提示を行い、それらの機能評価を行った。第 1 章では、CM-セルラーゼを細胞表層に提示した細胞の構築を試みた。*Aspergillus aculeatus* 由来の CM-セルラーゼ遺伝子を α -アグルチニン遺伝子 *AG α 1* の一部分との融合遺伝子とし、これを

*S.cerevisiae*内で発現させた。その結果、CM-セルラーゼの細胞壁への局在性とその酵素活性が確認できた。第2章では、セルロース性物質を資化できる細胞を創製するために、2種のセルラーゼを細胞表層に提示した細胞の構築とその機能評価を行った。*A.aculeatus*由来のCM-セルラーゼ遺伝子と β -グルコシダーゼ遺伝子をそれぞれ α -アグルチニン遺伝子AG α 1の一部分と融合し、GAPDHプロモーターを用いて*S.cerevisiae*内で発現させた。分泌シグナルとしてはそれ自身のシグナル配列、ならびに*R.oryzae*グルコアミラーゼ由来のシグナル配列をそれぞれ用いた。蛍光抗体染色法を用いた顕微鏡観察により、組換え体細胞の表面にCM-セルラーゼおよび β -グルコシダーゼタンパクが提示されていることが確認された。CM-セルラーゼおよび β -グルコシダーゼの共発現細胞は両者の酵素活性を獲得し、セロオリゴ糖を唯一の炭素源として生育した。これらの結果から、セルロース資化性酵母構築の可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、細胞表層に新たな機能を保持した酵母細胞を細胞触媒として用いることを目的として、酵母*Saccharomyces cerevisiae*の細胞表層に加水分解酵素を遺伝子工学的に提示させるシステムの開発を行ったものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. グルコアミラーゼ遺伝子と*S.cerevisiae*の細胞表面接着分子 α -アグルチニンをコードする遺伝子の一部分との融合遺伝子を作製して*S.cerevisiae*内で発現させ、グルコアミラーゼが活性型で細胞表層に存在する酵母細胞を開発することに成功した。この細胞をデンプンを炭素源として好気培養した結果、デンプンを効率良く分解・資化して生育することを明らかにした。

2. 1. で開発した系を元来発酵能力の高い酵母細胞に導入し、この形質転換体が生デンプン質原料から発酵によりエタノールを生産する能力があることを明らかにした。

3. デンプンをexo型に分解するグルコアミラーゼとendo型に分解する α -アミラーゼの共発現提示細胞を構築し、これにより高いデンプン資化能を有することを示した。

4. 細胞表層にCM-セルラーゼを活性型で提示した酵母細胞の構築に成功し、これがセルロース性物質を分解することを示した。

5. CM-セルラーゼと β -グルコシダーゼの共発現提示細胞を構築し、これが両者の酵素活性を有しておりセロオリゴ糖を唯一の炭素源として生育することを示した。

以上のように、本論文は細胞表層工学という新しい分野において重要な成果を挙げたものであり、学術上、実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10年10月26日、論文内容とそれに関連する事項について試問を行った結果、合格と認めた。