



Development of yeast cell-surface display system and it' s application for bioconversion process

谷野, 孝徳

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Date of Publication)

2009-07-15

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3949

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003949>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 3 4 2 】

氏 名・（本 籍） 谷野 孝徳 （ 岡山県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（工学）

学 位 記 番 号 博い第433号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

Development of yeast cell-surface display system and it's
application for bioconversion process
(酵母細胞表層提示技術の開発ならびにバイオコンバージョン
プロセスへの応用)

審 査 委 員

主 査 教 授 近藤 昭彦
教 授 福田 秀樹
教 授 上田 裕清

本論文では、酵母細胞表層提示技術の機能性・多様性の向上を目的とした新規技術の開発と、酵母細胞表層提示技術のバイオコンバージョンプロセスへの応用を行った。環境・エネルギー問題に直面した近年、生体触媒である酵素剤を用いたバイオコンバージョンプロセスは、その穏和な反応条件から持続的發展を可能とする環境調和型プロセスの開発に適しており、その重要性を増している。さらに酵素剤の反応特異性や、微生物細胞の生体内代謝を利用した複雑な化合物の合成への応用も増加している。将来のバイオコンバージョンプロセスの發展を視野に入れた新規の酵素剤供給法の開発は重要な事項であり、この点から酵素をはじめとした種々の機能性タンパク質を酵母の細胞表層に局在提示・固定化する技術である酵母細胞表層提示技術は非常に有益な技術である。このような背景から、本研究では以下の点を目的とした。

- (1) 新規酵母細胞表層提示技術の開発
- (2) 有用酵素表層提示酵母のバイオコンバージョンプロセスへの応用

第一章にて、酵母細胞表層提示技術の機能性・多様性の向上を目的とし、新規アンカータンパク質の開発ならびに酵母細胞表層提示技術の新規酵母細胞への応用を試みた。第一部では新規表層提示系の開発を目的とし、インペルターゼをアンカータンパク質としたペリプラズム局在型システムの開発を行った。機能性タンパク質の局在提示・固定化において、我々は細胞壁のみならず細胞壁と細胞膜の間のスペースであるペリプラズムも有用タンパク質を局在化するには有益なスペースであると考え、ペリプラズム局在型システムの開発を行った。ペリプラズムに酵素を遊離状態で局在化させるためのアンカータンパク質として、ペリプラズムに局在化している酵素インペルターゼに着目した。モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質(enhanced green fluorescence protein : EGFP)にインペルターゼを遺伝的に融合したモデルシステムを構築した。モデルシステムを導入した酵母では蛍光顕微鏡観察により EGFP の緑色蛍光を酵母細胞表層に確認することができた。また、酵母をスフェロプラスト化することでペリプラズムに存在するタンパク質を分画し、ウェスタンブロット解析を行うことで融合タンパク質が目的とするペリプラズムに局在化していることを確認した。これらの結果からインペルターゼをアンカータンパク質としたペリプラズム局在型システムの開発に成功したといえる。

第一章・第二部では宿主細胞の多様性の拡大を図ることを目的とし、FLO1 由来アンカーを用いた *Pichia pastoris* を宿主細胞とした酵母細胞表層提示技術の開発を試みた。*P. pastoris* はメタノールにより強力に誘導される AOX1 プロモーターを使用でき、高密度培養法が確立されているなど多くの利点を有し、酵母細胞表層提示技術の魅力的な宿主細胞となり得る。*Rhizopus oryzae* IF04697 由来リパーゼ(ROL)の Pro 配列領域を含む ProROL

をモデル酵素タンパク質とし、アンカーシステムとしては既存のアンカーシステムの中でも非常に有用であることが立証されているアンカータンパク質の一つである FLO1 アンカーシステムを用いた。蛍光抗体染色後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、*P. pastoris* 細胞表層に ProROL が提示されていることを確認した。種々のメタノール濃度による誘導時のリパーゼ活性の経時変化の測定を行った結果、リパーゼ活性は誘導とともに上昇し、誘導 120 時間まではメタノール濃度 0.5% で誘導を行ったものが最も高い活性を示した。誘導 120 時間以降はメタノール濃度 2% が最も高い活性(誘導 240h : 15.3 IU / g-dry cell)を示すことを確認した。また、ProROL 表層提示 *P. pastoris* 菌体は粉末酵素に比べ熱安定性が向上しているのみならず、60℃の熱処理で活性が向上することも見いだした。これらの結果から Flo1 由来アンカーを用いた *P. pastoris* を宿主細胞とした酵母細胞表層提示技術の開発に成功したといえる。

第二章では実用酵母である清酒酵母を宿主細胞とし、培養条件が FLO1 由来アンカーを用いた細胞表層提示システムに及ぼす影響を調査した。清酒酵母はその広く認知されている高い安全性と、二倍体細胞であることに起因する高い増殖性を有するため、酵母細胞表層提示技術における宿主細胞として非常に魅力的である。これら清酒酵母の利点を活かし様々な培地成分の検討を行った結果、FLO1 由来アンカーに影響を与える培地成分が存在することが明らかとなった。yeast extract ならびに peptone は FLO1 由来アンカーの細胞表層からの遊離を促進することが明らかとなり、これは代謝経路の変化に起因する細胞表層の構造変化のためであると考えられる。また、炭素源も FLO1 由来アンカーに影響を及ぼし、glucose や maltose に加え di- または tri-sacchride は FLO1 アンカーの細胞表層への結合を促進する一方、mannose や fructose は FLO1 由来アンカーの細胞表層からの遊離を促進することが明らかとなった。mannose は FLO1 に起因する凝集を阻害する作用があることが知られており、mannose による遊離の促進は同様の機構に起因していると推察される。これらの結果は今後の清酒酵母ならびに FLO1 由来アンカーを用いたシステムの開発に有益な情報となると考えられる。

第三章では、酵母細胞表層提示技術による有用酵素表層提示酵母菌体の創製とこれを用いた有機溶媒中でのバイオコンバージョンプロセスへの応用について記す。第一部では有機溶媒中で様々な有機合成反応や重合反応などを高活性に触媒することが知られており、様々な応用例・使用例が報告されている非常に有用な酵素の一つである *Candida antartica* 由来リパーゼ B(CALB)を細胞表層に提示した酵母菌体触媒の開発、ならびに重合反応への応用のモデル系としてジエステル合成反応についての検討を行った。FLO1 アンカーシステムを用い CALB を酵母細胞表層に提示することに成功し、プロテアーゼを用い

(氏名： 谷野 孝徳 NO. 3)

た解析によりおよそ 75%の CALB が細胞表層の中でもアクセシビリティの高い部位に局在していることが明らかとなった。凍結乾燥処理を施した CALB 細胞表層提示酵母を用い、アジピン酸と *n*-ブタノールを用いたジエステル合成試験を行った結果、モノエステルに比べ著量のジエステルが検出され、重合反応へ応用が可能であることが示された。これらの結果より CALB 表層提示酵母菌体触媒の開発に成功し、バイオコンバージョンプロセスへの応用の可能性が示唆されたと考えられる。

第三章・第二部では機能性リン脂質の効率的合成を目的とし、*Streptoverticillium cinnamoneum* 由来ホスホリパーゼ D(PLD)を細胞表層に提示した酵母菌体触媒の開発、ならびにこれを用いた二層系におけるホスファチジルコリン(PC)からのホスファチジルセリン(PC)の合成を行った。リン脂質は食品、医薬品・化粧品などへの応用が広く行われており、自然界に少量しか存在しない特定の機能性リン脂質の選択的合成において、酵素剤を利用したバイオコンバージョンプロセスは最も期待されている手法である。リン脂質の機能に大きく関与する塩基部分を効率的に変換するため、リン酸基転移反応を効率的に触媒する PLD を表層提示した PLD 細胞表層提示酵母を作成した。PLD 細胞表層提示酵母の PLD 活性は 0.372U/g-dry cell と低いものであったが、二層系での PC からの PS 合成を触媒可能であり初期反応条件下で 50%以上の収率が得られた。 PS 収率の向上を図るため反応系の有機溶媒組成、pH、温度、セリン濃度、二層比といった反応条件の最適化を行った。この結果、初期収率は 19.7%から 46.0%に、最終収率は 50.8%から 57.5%へとそれぞれ大きく向上が見られた。これらの結果よりリン脂質の塩基部分の改変に PLD 表層提示酵母菌体触媒は有効であり、ホスホリパーゼ A やリパーゼといったリン脂質中のアシル基転移反応を触媒する酵素への応用により、更なる効率的リン脂質の改変が可能となると考えられる。

氏名	谷野 孝徳		
論文 題目	Development of yeast cell-surface display system and it's application for bioconversion process 酵母細胞表層提示技術の開発ならびにバイオコンバージョンプロセスへの応用		
審 査 委 員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	近藤 昭彦
	副 査	教 授	福田 秀樹
	副 査	教 授	上田 裕清*
	副 査		
	副 査		
要 旨			
本論文では、酵母細胞表層提示技術の機能性・多様性の向上を目的とした新規技術の開発と、酵母細胞表層提示技術のバイオコンバージョンプロセスへの応用を行った。生体触媒である酵素剤を用いたバイオコンバージョンプロセスは、持続的発展が可能な社会を実現するため環境調和型プロセスの開発が急務となっている近年さらにその重要性を増している。微生物菌体内に目的酵素を保持させた微生物菌体触媒は、バイオコンバージョンプロセスの実現に際し最も大きな障壁となる酵素剤の生産コストの大幅な削減を可能とするが、生体膜に起因した酵素の反応性の低下を引き起こしてしまう。この点を克服するための手法として、酵素をはじめとした種々の機能性タンパク質を酵母の細胞表層に局在提示・固定化する技術である酵母細胞表層提示技術は非常に有益な技術である。このような背景から、本研究では以下の点を目的として研究を行った。 (1) 新規酵母細胞表層提示技術の開発 (2) 有用酵素表層提示酵母のバイオコンバージョンプロセスへの応用 第一章にて、酵母細胞表層提示技術の機能性・多様性の向上を目的とし、新規アンカータンパク質の開発ならびに酵母細胞表層提示技術の新規酵母細胞への応用を試みた。第一部では新規表層提示系の開発を目的とし、インペルターゼをアンカータンパク質としたペリプラズム局在型システムの開発を行った。機能性タンパク質の局在提示・固定化において、我々は細胞壁のみならず細胞壁と細胞膜の間のスペースであるペリプラズムも有用タンパク質を局在化するには有益なスペースであると考え、ペリプラズム局在型システムの開発を行った。ペリプラズムに酵素を遊離状態で局在化させるためのアンカータンパク質として、ペリプラズムに局在化している酵素インペルターゼに着目した。モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質(enhanced green fluorescence protein：EGFP)にインペルターゼを遺伝子的に融合したモデルシステムを構築した。モデルシステムを導入した酵母では蛍光顕微鏡観察により EGFP の緑色蛍光を酵母細胞表層に確認することができた。また、酵母をスフェロプラスト化することでペリプラズムに存在するタンパク質を分離し、ウエスタンブロット解析を行うことで融合タンパク質が目的とするペリプラズムに局在化していることを確認した。これらの結果からインペルターゼをアンカータンパク質としたペリプラズム局在型システムの開発に成功したといえる。 第一章・第二部では宿主細胞の多様性の拡大を図ることを目的とし、FLO1由来アンカーを用いた <i>Pichia pastoris</i> を宿主細胞とした酵母細胞表層提示技術の開発を試みた。<i>P. pastoris</i> はメタノールにより強力に誘導される AOX1 プロモーターを使用でき、高密度培養法が確立されているなど多くの利点を有し、酵母細胞表層提示技術の魅力的な宿主細胞となり得る。<i>Rhizopus oryzae</i> IFO4697 由来リパーゼ(ROL)の Pro 配列領域を含む ProROL をモデル酵素タンパク質とし、アンカーシステムとしては既存のアンカーシステムの中でも非常に有用であることが立証されているアンカータンパク質の一つである FLO1 アンカーシステムを用いた。蛍光抗体染色後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、<i>P. pastoris</i> 細胞表層に ProROL が提示されていることを確認した。種々のメタノール濃度による誘導時のリパーゼ活性の経時変化の測定を行った結果、リパーゼ活性は誘導とともに上昇し、誘導 120 時間まではメタノール濃度 0.5%で誘導を行ったものが最も高い活性を示した。誘導 120 時間以降はメタノール濃度 2%が最も高い活性(誘導 240h：15.3 IU / g-dry cell)を示すことを確認した。また、ProROL 表層提示 <i>P. pastoris</i> 菌体は粉末酵素に比べ熱安定性が向上しているのみならず、60℃の熱処理で活性が向上することも見いだした。これらの結果から Flo1 由来アンカーを用いた <i>P. pastoris</i> を宿主細胞とした酵母細胞表層提示技術の開発に成功したといえる。			

532

氏名	谷野 孝徳
第一章・第三部では実用酵母である清酒酵母を宿主細胞とし、培養条件が FLO1 由来アンカーを用いた細胞表層提示システムに及ぼす影響を調査した。清酒酵母はその広く認知されている高い安全性と、二倍体細胞であることに起因する高い増殖性を有するため、酵母細胞表層提示技術における宿主細胞として非常に魅力的である。これら清酒酵母の利点を活かし様々な培地成分の検討を行った結果、FLO1 由来アンカーに影響を与える培地成分が存在することが明らかとなった。yeast extract ならびに peptone は FLO1 由来アンカーの細胞表層からの遊離を促進することが明らかとなり、これは代謝経路の変化に起因する細胞表層の構造変化のためであると考えられる。また、炭素源も FLO1 由来アンカーに影響を及ぼし、glucose や maltose に加え di-または tri-saccharide は FLO1 アンカーの細胞表層への結合を促進する一方、mannose や fructose は FLO1 由来アンカーの細胞表層からの遊離を促進することが明らかとなった。mannose は FLO1 に起因する凝集を阻害する作用があることが知られており、mannose による遊離の促進は同様の機構に起因していると推察される。これらの結果は今後の清酒酵母ならびに FLO1 由来アンカーを用いたシステムの開発に有益な情報となると考えられる。 第二章では、酵母細胞表層提示技術による有用酵素表層提示酵母菌体の創製とバイオコンバージョンプロセスへの応用について記す。有機溶媒中で様々な有機合成反応や重合反応などを高活性に触媒することが知られており、様々な応用例・使用例が報告されている非常に有用な酵素の一つである <i>Candida antarctica</i> 由来リパーゼ B(CALB)を細胞表層に提示した酵素菌体触媒の開発、ならびに重合反応への応用のモデル系としてジエステル合成反応についての検討を行った。FLO1 アンカーシステムを用い CALB を酵母細胞表層に提示することに成功し、プロテアーゼを用いた解析によりおよそ 75%の CALB が細胞表層の中でもアクセシビリティの高い部位に局在していることが明らかとなった。凍結乾燥処理を施した CALB 細胞表層提示酵母を用い、アジピン酸と n-ブタノールを用いたジエステル合成試験を行った結果、モノエステルに比べ著量のジエステルが検出され、重合反応へ応用が可能であることが示された。これらの結果より CALB 表層提示酵母菌体触媒の開発に成功し、バイオコンバージョンプロセスへの応用の可能性が示唆されたと考えられる。 本研究は酵母細胞表層提示技術の機能性・多様性の向上を目的とした新規技術について、その各種酵素提示酵母からのバイオコンバージョンプロセスを研究したものであり、酵母表層提示技術について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。 よって学位申請者の谷野 孝徳は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。	