

氏 名 (本 籍)	い ち か わ き み ひ さ 市 川 公 久 (東 京 都)
学 位 の 種 類	学 術 博 士
学 位 記 番 号	博 甲 第 729 号
学位授与年月日	平成 2 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	Studies on the Improvement of Secretion Level of Human Lysozyme by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酵母 <i>S. cerevisiae</i> によるヒトリゾチームの分泌生産に関する研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 田 渕 武 士
副 査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男
副 査	筑波大学教授 農学博士 中 原 忠 篤
副 査	筑波大学助教授 農学博士 星 野 貴 行

論 文 の 要 旨

酵母 *S.cerevisiae* による活性型ヒトリゾチーム (HLY) の分泌生産は、地神らによりすでに報告されている。しかし、その分泌生産量は約 $0.2\text{mg}/\ell$ と他のヒト由来のタンパク質を酵母で分泌させた場合と同様、かなり低いものであった。そこで本研究では、酵母による HLY の分泌生産量の増大を目的として、転写レベル、培養条件、宿主等の改良を検討すると共に、HLY 高分泌変異株の解析を通して、異種蛋白質を酵母で分泌生産させる上での律速因子についても考察している。

まず、HLY 転写レベルを増大させた場合の効果について検討した。すなわち、*GAL10promoter* をより強いと考えられている解糖系の *ENO 1 promoter* に置き換え、*ENO 1 promoter* から $2\ \mu\text{mFLPterminator}$ までの HLY の転写に必要な部分 (HLY 転写ユニット) を同一 plasmid 上に二連結・三連結化させた。さらに解糖系全体を正に制御する調節タンパク質をコードすると推測されている *GCR1gene* を HLY 転写ユニットと同一 plasmid 上に共存させた。これらの改良によって HLY 転写レベルを増大させることを試みた。その結果、galactose より菌の増殖速度が増大する glucose を炭素源として用いることができ、従来の約半分の時間で HLY を培地中に分泌させることが可能になった。また、転写レベルの増大によって HLY 分泌量を約 2 倍にまで増大させることに成功した。次に、培地組成などの外部環境因子を変化させることによって *ENO 1 promoter* の発現及び HLY の分泌量の増大が可能か否かについて検討した。

まず初発 glucose 濃度の影響について調べたところ、従来の 2 % の培地では glucose が培地中から消失すると HLY の発現が停止し、それにつれて HLY 分泌量も頭打ちとなった。初発 glucose 濃度を

4, 6, 8, 10%と段階的に増大させることによって、菌体の増殖が定常期に達した24hr以降でも HLYの発現が持続し、HLY分泌量も増大することが明らかとなった。

従来の KK 4 株では、6 %まで初発 glucose 濃度を増大させると培地中の glucose は完全に消費されず、この残存 glucose が HLY 分泌に対して阻害的な効果を示した。そのため、6 %以上に glucose 濃度を増大させても分泌量の増大は認められなかったのに対し、A 2-1-1 A 株では10%の glucose をも完全に消費でき、HLY 分泌量も10%まで段階的に増大した。このことから HLY の分泌生産には KK 4 株よりむしろ A 2-1-1 A 株の方が適していることが明らかにされた。しかし、glucose 資化能の高い A 2-1-1 A 株においても、初発 glucose 濃度を 6 %以上にあげると HLY 分泌発現量の増大割合は徐々に低下しており、この原因として炭素源以外の他の培地成分が不足しているために、転写または翻訳が十分に持続しない可能性が考えられた。そこで、培地中の炭素源以外の窒素源や無機塩類、ビタミンなどをそれぞれ増量することを試みた。その結果、 K_2HPO_4 , $MgSO_4$, KCl , $FeSO_4 (NH_4)_2SO_4$ の増大により、HLY 分泌量はさらに約 2 倍増大し、8 %の初発 glucose 濃度まで HLY 分泌量を直線的に増大させることが可能となった。

次に、異種蛋白質の分泌生産で律速になっている段階や因子を明らかにすることを目的として、HLY 高分泌変異株の単離を試みた。KK 4 (pESH) 株を親株として 2 %EMS により変異処理した結果、約600コの EMS 処理株から、親株よりも有意に HLY 分泌量が増大した変異株を 4 株単離した。その中最も HLY 分泌量が高かった。(約10~13倍) E 91株について遺伝学的解析を行った結果、HLY 高分泌変異株は劣性の一遺伝子変異であることが判明した。また E 91株と親株とで HLY mRNA の量比に有意な差が認められなかったこと、及び他の promoter 下で HLY を発現させた場合でも E 91株において HLY 分泌量の増大がみられたことから、HLY 高分泌に関する変異は転写レベルにかかわる変異でないことが示唆された。また、分泌に必要なシグナル配列を有しない HLY 遺伝子を発現させた場合の細胞質に存在する HLY 量は、E 91株の方が親株よりも約18倍も多かった。さらに、E 91株で細胞内に著量の HLY が観察されたのは、HLY 蛋白質の合成量が増大しているためではなく、HLY 分解が抑制されているためであることが、 ^{35}S -Met で標識した HLY 蛋白質の分解パターンを親株と E 91株で比較することにより明らかとなった。以上の結果から、E 91株の HLY 高分泌という形質は、細胞質及び分泌系での HLY の分解を低下させる劣性の一遺伝子変異によって引き起こされているものと推定された。

異種蛋白質である HLY の酵母での分泌生産レベルの増大を試み、最終的に、宿主を改良し、転写ユニットを二連結化し、初発グルコース濃度を増大させ、効果的な無機塩類を増量することによって、培地 1 ℓ 当り約10mg (従来 [KK 4 (pESH)] の約84倍) もの活性型 HLY を酵母を用いて分泌生産させることを明らかにした。

審 査 の 要 旨

酵母を宿主とするヒトなどの高等動植物由来の有用遺伝子産物の生産は、安全性や蛋白質への糖

鎖の付加という点で、大腸菌の系よりも実用性が高いと考えられている。しかしながら、酵母の系では、異種遺伝子産物の生産量が著しく低いという問題点があった。

本論文は、ヒトリゾチーム（HLY）遺伝子を用いて、上記の問題点を克服するための様々な検討を行ったものである。まず、プロモーターの改変、転写ユニットの増幅、正の制御因子の導入によって HLY 分泌量を当初の約 2 倍に増大させることに成功した。ついで培地組成を改良し、HLY 分泌量をさらに約 2 倍増大させた。さらに、宿主から、HLY 高分泌変異株を分離し、前記の改良と組み合わせることにより、最終的に HLY 分泌量を当初の約 84 倍に当たる、培地 1 ℓ 当たり約 10mg にまで増大させることに成功した。

これらの改良は、遺伝子工学的手法、遺伝学的手法、培養工学的手法を適切に組み合わせた手順によって行われており、酵母を用いた異種遺伝子産物の分泌生産が、発酵工業として実用化し得ることを実証したものとして、その意義は極めて大である。

また、高分泌変異株の解析により、当該変異が蛋白質の細胞内での分解系に起こった全く新しい変異であることも示唆している。この結果も、酵母における蛋白質の分泌生産系の改良研究に新しい道筋を与えるものとして、基礎応用の両分野から注目される成果である。

よって、著者は学者博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。