

氏名(本籍)	め 米	ら 良	のぶ 信	あき 昭	(千葉県)
学位の種類	博士(農学)				
学位記番号	博甲第3366号				
学位授与年月日	平成16年3月25日				
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当				
審査研究科	農学研究科				
学位論文題目	プロトプラストの機能を高度に利用した新規な酵素生産システムの開発				

主査	筑波大学教授	工学博士	田中秀夫
副査	筑波大学教授	工学博士	向高祐邦
副査	筑波大学教授	農学博士	内山裕夫
副査	筑波大学教授	理学博士	藤村達人

論文の内容の要旨

【目的】

植物および微生物細胞による有用物質生産が盛んに試みられ、多くの生物細胞と関連する産業が生まれ繁栄してきた。しかしながら21世紀を迎えた現在、これら産業の多くは、生物細胞の有する種々の問題点に直面して頭打ちの状態にある。この最大の原因は、生産される有用代謝物質の大部分が細胞内に蓄積して細胞外へ分泌しない点にある。この問題点を解決するためには、細胞の生存および生産活性を高く維持しながら、細胞内に蓄積される有用代謝物質を効率的に細胞外に分泌させる方法が有効であるが、普遍的な方法は未だに確立されていない。そこで本研究では、有用代謝物質の移動の障壁となっている細胞壁に注目し、細胞から細胞壁を除去したプロトプラストの利用を考え、プロトプラストで活性化または顕在化された生物機能を積極的に利用し、(1) 植物プロトプラストの機能を高度に利用した細胞壁近傍に存在する酵素の新規な分泌生産システムの開発、(2) 微生物プロトプラストの機能を高度に利用した酵素の新規な分泌生産システムの開発、を試みた。

【方法および結果】

(1) 植物プロトプラストの機能を高度に利用した細胞壁近傍に存在する酵素の新規な分泌生産システムの開発
ニチニチソウのプロトプラストを人工細胞壁で包括固定して培養することにより、細胞壁近傍に存在する機能性物質のモデルとして peroxidase および α -galactosidase の効率的な分泌生産を試みた。細胞およびプロトプラストを培養したところ、細胞は peroxidase を培地中にほとんど分泌しなかったのに対し (0.17 U)、プロトプラストでは大量に分泌していた (2.54 U)。外部環境に対して脆弱なプロトプラストを培養するために、物理的強度を付加し、しかも細胞壁近傍に存在する機能性物質の分泌生産に適した人工細胞壁をスクリーニングした結果、3.0% (w/v) のアガロースゲルを選択した。人工細胞壁の物理的機能(特に浸透圧によるプロトプラストのバーストを保護する)に注目し、人工細胞壁を装着したプロトプラストを浸透圧を減少させた培地を用いて培養した。その結果、プロトプラストはバーストせずに、高い浸透圧の培地で培養した場合と比較して、peroxidase の分泌活性が増大した (5.16 U)。さらに連続的な peroxidase の分泌生産を試みたところ、固定化プロトプラストでは、4回の繰り返し回分培養が可能であり、得られた総 peroxidase

の分泌生産量は 11.8U に達した。また、本システムは α -galactosidase の生産にも有効であった。

(2) 微生物プロトプラストの機能を高度に利用した酵素の新規な分泌生産システムの開発

細胞から細胞壁を除去したプロトプラストを培養した場合の生物特性は、ほとんど解明されていない。そこで酵母 DNA マイクロアレイを用いて、酵母の細胞をプロトプラストにして培養することで変化した遺伝子を解析し、培養プロトプラストで顕在化されている生物特性の解明を試みた。細胞をプロトプラストにして 6 時間培養することにより、発現量の変化した遺伝子は全部で 416 個（全体の約 7.1%）あり、培養プロトプラストで活性化される種々の生物機能を推定した。特に培養プロトプラストでは炭水化物代謝が活性化されたのに対し、アミノ酸合成は逆に抑制されていた。また、タンパク質などの生産物質が能動的にプロトプラスト外へ分泌促進されることが示唆された。次に、DNA マイクロアレイにより初めて明らかとなった、培養酵母プロトプラストで活性化されている機能を積極的に利用して invertase および α -glucosidase の生産を試みた。その結果、培養細胞での低い分泌活性に対し、培養プロトプラストにおいて両酵素の分泌活性は増大した。脆弱なプロトプラストに人工細胞壁としてアガロースゲルを装着し、4 回の繰り返し回分培養による両酵素の連続的な分泌生産を試みた結果、得られた invertase および α -glucosidase の総分泌生産量は、それぞれ 1,574U および 739U に達した。さらに大量生産を目指し、本システムの 10 倍のスケールアップ（working volume : 1,000ml）を試みた結果、良好にスケールアップすることができ（invertase : 13,304U, α -glucosidase : 7,688U）、培養プロトプラストによる実的な大量生産への可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は細胞による有用物質生産の問題点の 1 つとして、細胞壁が細胞内から細胞外への物質の移動の障壁やフィードバック制御の原因になっていることに着目し、細胞から細胞壁を除去したプロトプラストの利用を考え、プロトプラストの生物機能を積極的に利用した新規な酵素生産システムを開発することを目的とした研究である。

まず初めに、植物（ニチニチソウ）のプロトプラストに、細胞壁近傍に存在する酵素（peroxidase および α -galactosidase）の分泌生産に適した人工細胞壁（アガロース）を装着して培養することで、両酵素を効率的に分泌させることに成功している。また、人工細胞壁により物理的強度を付加されたプロトプラストは、浸透圧を低下させた培地でもバーストすることなく培養することが可能となり、本システムに繰り返し回分培養を適用した結果、細胞を用いる従来のシステムに比べて peroxidase は約 70 倍、 α -galactosidase は約 45 倍に生産量を増大させることに成功している。

次に、プロトプラストの生物特性および機能を解明するために微生物の酵母プロトプラストを用いて、DNA マイクロアレイ解析を行い、プロトプラストの代謝特性（炭水化物代謝が活性化し、アミノ酸の生合成が抑制される）および生産物質の分泌特性（能動的な分泌経路の活性化）という興味深い特性を遺伝子レベルで初めて明らかにしている。また、得られた知見を基に酵母プロトプラストに人工細胞壁（アガロース）を装着し、繰り返し回分培養を行うことで、細胞を用いる従来のシステムに比べて invertase は約 15 倍、 α -glucosidase は約 70 倍以上に生産量を増大させることに成功している。

本研究の検討結果だけでは、プロトプラストの有する生物特性および機能を十分に明らかにするには至っておらず、プロテオーム解析などによる更なる検討が必要であるが、全般的には細胞に代わる新しい有用物質生産の担い手としてのプロトプラストの大きな可能性を示す先駆的で独創性の高い研究と言えよう。また、その利用に関しても細胞を用いる従来のシステムに比べて高い生産性を得ていることも評価に値する。プロトプラストの機能を積極的に利用する本システムは、他の多くの植物および微生物の細胞にも利用できる方法や考え方を提案するもので、現在、頭打ち状態にある生物細胞関連産業に新たな可能性を与えるものとし

て高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。