

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (農学)	氏名	歌島 悠
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
微生物による臨床検査用酵素の生産に関わる研究			
論文審査担当者			
主 査	准教授	正 木 和 夫	
審査委員	教 授	江 坂 宗 春	
審査委員	教 授	三 本 木 至 宏	
審査委員	教 授	後 藤 奈 美	
〔論文審査の要旨〕			
<p>臨床検査における「生化学検査」では、血液や尿などの検体由来成分を酵素反応によって分析する方法が主流であり、臨床検査薬には酵素が広く利用されている。本研究では、担子菌酵母 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 を宿主として用い、各種分子生物学的手法による臨床検査用酵素の異種発現を目的として研究を行った。</p> <p>第 1 章においては、西洋ワサビペルオキシダーゼを対象として、<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 による異種タンパク質発現を検討した。その結果、「コドン最適化」が高発現に大きな効果を示した。コドン最適化と高発現の関係を調べると、コドンの最適化により、遺伝子配列中に潜在的に存在するポリ A 付加シグナルが除去されることが明らかとなった。また、分泌シグナル配列を宿主由来のキシラナーゼのものに置換し、HRP の C 末端に存在する液胞滞留シグナルを除去することで、HRP の分泌経路が最適化され、分泌生産効率が向上することを確認した。さらに HRP の生産性を向上させるため、キシロースを連続的に添加する流加培養によって、HRP の生産量はさらに向上し、その生産量はおよそ 110 mg/L に達した。本章で示した HRP の組換え発現量は、これまで報告されている大腸菌 <i>Escherichia coli</i> やメタノール資化性酵母 <i>Pichia pastoris</i> による発現量をはるかに超えるものであり、<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 が異種タンパク質の発現において非常に優れていることが示された。</p> <p>第 2 章では、FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)を対象として、実用性の高い変異酵素の取得と、FAD-GDH の組換え発現を検討した。自己血糖測定装置において利用される FAD-GDH には高い基質特異性と共に、高い安定性が求められている。麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> 由来の FAD-GDH をタンパク工学的に改変し、そのアミノ酸置換変異の耐熱性の向上を示した。さらに、FAD-GDH は <i>A. oryzae</i> を宿主として組換え発現させた場合、N 型糖鎖の修飾による耐熱性の向上も示した。耐熱性が向上した FAD-GDH を、<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 により発現させた。「コドン最適化」、「シグナル配列置換」、「キシロース流加培養」により、高レベルで FAD-GDH を組換え発現可能であることを示した。さらに、キシロースへの作用性が低いケカビ <i>Mucor hiemalis</i> 由来 FAD-GDH 「コドン最適化」、「シグナル配列置換」、「キシロース流加培養」によって <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 で組換</p>			

え発現可能であることを示した。

第3章では、産業利用の視点から *Cryptococcus* sp. S-2 を用いた宿主ベクター系の改良を行った。まず、Pop-in/Pop-out 法を用いて、ade1 遺伝子の破壊を行い、ツールとしての栄養要求性マーカーを追加した。さらに、TEF1a プロモーターの検討、ku70 破壊株による相同組換え効率の向上を示した。また、*Cryptococcus* sp. S-2 の細胞外多糖の生産を抑制した株を UV 変異により取得した。

以上、臨床検査用酵素の生産において、新たな発現系を検討し、その生産の向上と、その原因について明らかとした。さらに、将来的な課題の解決のため、宿主ベクターの発展についても検討を重ねた。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（農学）の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。