



Title	Saccharomyces cerevisiaeによるカルボキシペプチダーゼYの分泌生産に関する研究
Author(s)	柴, 陽一郎
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42810
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	柴 陽 一 郎 しば よう いち ろう
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 8 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 1 月 29 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> によるカルボキシペプチダーゼ Y の分泌生産に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 菅 健一
	(副査) 教 授 卜 部 格 教 授 吉 田 敏 臣 教 授 室 岡 義 勝 教 授 塩 谷 捨 明 教 授 関 達 治 教 授 原 島 俊 教 授 金 谷 茂 則

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、工業規模での出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の分泌生産を目的として、遺伝子工学的な見地から検討を行った結果をまとめたもので、緒論、本文の 5 章および総括より構成されている。

緒論では、産業分野や研究分野での出芽酵母の重要性、および酵母菌体内酵素である CPY の機能とその有用性を述べ、さらに CPY 生産研究の状況と問題点について述べている。

第 1 章では、CPY 分泌生産株を決定し、さらに CPY 分泌生産に適した培地成分の検討を行い、チアミンおよびヒスチジンに生産促進効果があることを明らかにしている。

第 2 章では、通気攪拌培養における培養条件、培養方法を検討し、工業規模の培養槽を用いた培養法を確立し、工業生産規模の精製工程のコストダウンに貢献することを示している。

第 3 章では、CPY のプロセッシングについて検討し、前駆体として分泌された CPY が培地中でのプロセッシングにより成熟体となることを明らかにしている。さらに、用いた菌株が CPY やそのプロセッシングに関与する酵素を分泌する変異株であることを明らかにし、そのため活性な CPY の分泌生産が行えたことを示している。

第 4 章では、CPY 分泌生産システムを異種蛋白質の生産に適用し、麹菌由来ホスホリパーゼ A₁ が分泌生産されることを明らかにしている。

第 5 章では、チアミンによる CPY 生産促進機構について検討し、チアミン誘導性発現に関与すると考えられる遺伝子をクローン化している。

総括では、本研究の成果、意義を要約し、今後の課題と展望について述べている。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の生産においては、生産物が菌体内液胞に局在化することより、精製工程の煩雑化、収率の低下等を招いている。本研究は、工業規模での *S. cerevisiae* による CPY の分泌生産の達成を目的として、遺伝子工学的側面から検討を行ったもので、得られた主な成果は次の

通りである。

- (1) *GAL10* プロモーター制御下で CPY をコードする *PRC1* 遺伝子の発現を行うプラスミド pCY303 を保持する *S.cerevisiae* KS58-2D/pCY303 株を生産株とし、本菌株による CPY 分泌生産培養においてチアミンおよびヒスチジンに生産促進効果があることを明らかにし、CPY 分泌生産に適した培地組成を見出している。
- (2) *GAL10* プロモーターの構成的発現を引き起こす *gal80* 変異を有する KS58-2D 株や *GAL10* プロモーターの特性を考慮したエタノール連続流加培養により、培地中に 500 mg/l 以上の活性な CPY が分泌されることを示し、さらに、工業規模の培養槽を用いた培養法を確立し、工業生産規模での精製工程のコストダウンに大きく貢献することを示している。
- (3) KS58-2D/pCY303 株により合成された CPY が前駆体として分泌され、培地中でのプロセッシングにより成熟体となることを明らかにしている。さらに、KS58-2D 株が CPY やそのプロセッシングに関与する液胞内プロテアーゼのソーティングに異常をきたしており、そのため活性な CPY の分泌生産が可能であったことを実験的に示している。
- (4) KS58-2D 株による CPY 分泌生産システムが、異種蛋白質である麹菌由来ホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) の分泌生産にも適用可能であることを示している。さらに、培地成分の検討、エタノール流加方策の適用により、PLA₁ 分泌生産量が増大することを実験的に示している。
- (5) チアミン非存在下でも CPY を生産する変異株を単離し、これを用いチアミン誘導性発現に関与すると考えられる遺伝子をクローン化している。

以上のように、*Saccharomyces cerevisiae* による蛋白質生産系の培養において新規なエタノール連続流加培養を採用していることや、*S.cerevisiae* においてのチアミン誘導性発現に関して新しい知見を含んでおり、培養工学の発展や、高等真核生物の細胞機能の理解に寄与するところが大きい。よって、本論文は、博士論文として価値あるものと認める。