

Title	Novel Applications of Biomaterial Captured Beads (Bio-active Beads) in Biotechnology
Author(s)	周, 艶
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57494
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【12】	
氏 名	周 艶 ^{エン}
博士の専攻分野の名称	博 士（工 学）
学 位 記 番 号	第 2 3 3 5 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 21 年 9 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	Novel Applications of Biomaterial Captured Beads (Bio-active Beads) in Biotechnology(生物工学分野におけるバイオアク ティブビーズの新規な活用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福 井 希 一 (副査) 教 授 福 崎 英 一 郎 教 授 清 水 浩 教 授 金 谷 茂 則 教 授 原 島 俊 教 授 大 竹 久 夫 教 授 渡 邊 肇 教 授 紀 ノ 岡 正 博 教 授 仁 平 卓 也 教 授 藤 山 和 仁 教 授 四 方 哲 也 教 授 野 地 博 行

論 文 内 容 の 要 旨

In this thesis, a novel production method for bio-active beads and their applications in biotechnology were described.

In Chapter 1, general introduction of bio-active beads and their applications were described.

In Chapter 2, the novel bio-active beads production method and its application were introduced. Bio-active beads are micro-gels made of alginate and Ca²⁺ ion with various bio-materials. Alginate is a kind of hydrophilic

polysaccharide that gellates in the presence of Ca^{2+} ions. Alginate has been widely used for immobilizing DNA, proteins, or living cells for applications in a variety of fields. In our laboratory, bio-active beads have successfully been used for DNA transfection into microorganisms, plants, and animal cells. There are several previous bio-beads production methods, such as sonication method, high voltage method or reserve micelle method, etc. For different applications, a different producing method that is the most suitable for each purpose should be employed.

In Chapter 3, bio-active beads for a new enzyme-displayed yeast cells screening system were described. Recent reports on high-speed affinity screening systems for yeast cells using flow cytometry have not been adapted to screening yeast cells that display hydrolyzing enzymes. Because of the fluorescent molecules which are released from fluoresceinated substrate diffuse into a solution after enzymatic reaction. By capturing cells within small beads, the released fluorescent molecules could be held in the beads for certain duration, and the sorting of those beads showing elevated fluorescence was possible. Accordingly bio-active beads captured with β -glucosidase-displayed (βG^+) yeast cells were screened from the mixed suspension of βG^+ and negative beads by fluorescent-activated cell sorting.

In Chapter 4, the future applications of protein-immobilized bio-active beads and cells-captured bio-active beads were discussed. In this study, the protein-immobilized bio-active beads with small and uniform size were produced. The size and shape of the beads are suitable for applying them to flow cytometry. The uniform size makes it ascertain that the volume of immobilized proteins in every bead will be the same for the following reaction and insure the precision of the detection. Thus in the future applications, the protein-beads produced by using this new method would be useful for the detection of protein-protein interaction by using flow cytometry. The results of bio-active beads for screening of enzyme-displayed yeast cells suggest the possibility of their applications in the screening for certain enzymes with novel function and/or the higher performance.

In Chapter 5, the general summary of the study was described. In this research, the new applications of bio-active beads in biotechnology were explored. A new method for developing size- and shape-controlling protein-immobilized bio-active beads was also successfully developed. This method should be useful for detecting protein-protein interactions for the future applications. A new screening system for enzyme displayed yeast cells was developed by using bio-active beads. Bio-active beads will be a useful tool for screening efficient enzymes using yeast surface display method. Therefore I concluded that the bio-active beads are useful in various fields of biotechnology.

論文審査の結果の要旨

本論文は生物工学分野におけるバイオアクティブビーズの新規な活用について述べている。

まず、新規のバイオアクティブビーズの利用法について検討する前提として、均一な大きさを有しかつ一定の形状を有する種々のサイズのバイオアクティブビーズの新規な作製法を検討したのである。タンパク質を含むアルギン酸ナトリウム溶液をシリンジポンプにより一定流速にしてシリカキャピラリー先端より押し出し、キャピラリーの先端部をスピーカーによる正弦波振動によって振動させ小滴を形成させた後、有機溶媒をふくむカルシウムイオン溶液に滴下しバイオアクティブビーズを作製したのである。そしてこの正弦波振動法で作製したバイオアクティブビーズに抗原を包摂し、外から与えた抗体との反応をみたところ、抗原を有するバイオアクティブビーズのみが蛍光にて標識され、抗原抗体反応の検出に成功するのである。すなわち、新規なバイオアクティブビーズ作製法はタンパク質間相互作用の検出に有効と言える。

次に、バイオアクティブビーズに β -glucosidase 表層提示酵母を包摂し、フローソーティング法を用いて表層提示された β -glucosidase の酵素活性をスクリーニングを行うと、 β -glucosidase 表層提示した酵母を包摂したバイオアクティブビーズは生じた TokyoGreen をバイオアクティブビーズ中に維持されるのである。その結果、 β -glucosidase 表層提示酵母を包摂したバイオアクティブビーズのみが高頻度でスクリーニングできる事を示すのである。

以上のように、本論文はバイオアクティブビーズの新規な作製法およびその新しい利用法について述べたものであつて、バイオテクノロジーの発展に大きく寄与する研究成果を取りまとめたものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。