



# Analysis of Gene Expression in Yeast Protoplasts Using DNA Microarrays and Their Application for Efficient Production of Invertase and $\alpha$ -Glucosidase

DNA マイクロアレイを用いた酵母プロトプラストの包括的な遺伝子発現解析とインベルターゼおよび $\alpha$ -グルコシダーゼの効率的生産への応用

(JBB, Vol.97, No.3, 169-183, 2004)

米良 信昭・青柳 秀紀・中園 聡・岩崎 一弘・齊木 博・田中 秀夫\*

20世紀は微生物や植物などの細胞を用いた有用物質生産の時代であった。しかしながら、現在(単一)細胞を用いる従来の有用物質生産法は頭打ちの状態にある。この現状を打破するには、細胞を用いる従来法の問題点を排除した新たな方法論の確立が必須である。

著者らは細胞を用いる有用物質生産法の問題点の1つとして、微生物や植物の細胞の細胞膜の外側にある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注目した。そして、この問題点の解決策として、細胞壁を除去したプロトプラストの活用を提案し、プロトプラストが有するすぐれた機能(高い物質移動能やペリプラズムに蓄積する有用物質のフィードバック制御からの解放)の高度利用を実現した「人工細胞壁を装着したプロトプラストによる有用物質の高速度生産システム」を開発した<sup>1-3)</sup>。プロトプラストはこれまで細胞融合や遺伝子導入の素材として盛んに研究されてきたが、有用物質生産にはほとんど用いられてこなかった。

また現状では、プロトプラストで顕在化、活性化される機能の全貌について、ほとんど未解明である。そこで本論文では、モデル微生物として全ゲノムが解読されている酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用い、培養細胞と培養プロトプラストにおける遺伝子発現の違いを、酵母DNAマイクロアレイを用いて包括的に解析することで、プロトプラストで顕在化、活性化されている生物特性の解明を試みた。

DNAマイクロアレイ解析の結果、細胞をプロトプラストにして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%)存在した。得られた結果に基づいてプロトプラストの特性を推定したところ、プロトプラストでは特に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。

得られた結果を基盤に、プロトプラストの特性を高度に活用した酵素(invertaseおよび $\alpha$ -glucosidase)の新規分泌生産システムの開発を試みたところ、細胞での低い分泌活性に対し、プロトプラストでは両酵素の分泌活性

が著しく増大した。

次に、実際の生産を可能にするために種々の人工細胞壁をスクリーニングし、無電荷で高い物質移動能を有し、低温でゲル化するタイプのアガロースゲルを選択して、脆弱なプロトプラストに装着して培養した。その結果、プロトプラストの破壊や酵素の分泌阻害を生じることなく振盪培養や繰り返し回分培養が可能になり、長期間にわたって安定的に両酵素を連続的に分泌生産することができた(invertase:1574 U,  $\alpha$ -glucosidase: 739 U)。

さらに、本システムの10倍のスケールアップ(working volume: 1 l)を試みた結果、良好な結果を得ることができた(invertase: 13304 U,  $\alpha$ -glucosidase: 7688 U)。プロトプラストによる実際的な大量生産への可能性が示唆された。本論文は、DNAマイクロアレイ解析で得られた結果を有用物質生産に活用した初めての報告であり、現在、著者らは本システムを組換え酵母プロトプラストによる異種タンパクの生産系に適用中である<sup>4)</sup>。

化学的、生物学的および物理的なさまざまな機能を有する人工細胞壁(細胞壁の自由な着せ替え)とプロトプラストを組み合わせることにより、その利用性は大幅に拡大される。細胞が有する機能のうち顕在化されたものは全機能のわずか数%であり、その大部分は眠っていると考えられているが、“細胞壁の着せ替え”という特殊な環境は潜在的機能の発現に役立つと考えられる。今後は、プロトプラストのメタボロミクス(代謝産物総体)解析<sup>5)</sup>を行うことで、プロトプラスト独自の機能特性(新たな培養環境に接する時に示す適応反応、細胞壁を除去した場合の物質移動速度、生産物質の種類や量の変動、増殖能の消失によるエネルギー代謝の変動など)を明らかにし、新規な有用物質の高速度生産システムや新規有用物質の探索システムの開発に結びつけたい。

- 1) 青柳秀紀: 生物工学, **79**, 105 (2001).
- 2) Aoyagi, H. et al.: *Planta Med.*, **68**, 420 (2002).
- 3) Mera, N. et al.: *Biotech. Lett.*, **25**, 1687 (2003).
- 4) 片倉洋一ら: 日本生物工学会大会講演要旨集 p.158 (2004).
- 5) Fukusaki, E. and Kobayashi, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 347 (2005).

\* 著者紹介 筑波大学大学院生命環境研究科生物機能科学専攻(教授) E-mail: hitanaka@sakura.cc.tsukuba.ac.jp