

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月28日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560812

研究課題名（和文）シングルセル包摂技術を用いた酵母表層提示酵素の高速活性測定系の開発

研究課題名（英文）Development of novel screening system for enzyme-displaying yeasts using calcium-alginate based beads.

研究代表者

梶山 慎一郎 (KAJIYAMA SHINICHIRO)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20243496

研究成果の概要（和文）：我々は、これまでの研究で、アルギン酸カルシウムビーズ中に核酸、タンパク質、あるいは細胞を封入する技術開発を行ってきた。本技術を用いれば、ビーズ内に酵母細胞を包摂し、この内で個々に酵素反応を起こさせることにより、反応後の標識分子の溶液中への拡散を防ぎつつ、活性の高い表層提示酵母細胞をビーズごとセルソーティングにより取得できると考えられる。そこで本研究では、近年発展の著しい、コンビナトリアルバイオエンジニアリングの手法を用いた、変異体タンパク質ライブラリーの大量作製とその大規模なスクリーニングに資する新しい表層提示酵母細胞のスクリーニング方法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：In this study, a novel screening method for enzyme-displaying yeasts were investigated. Enzyme-displayed yeast cells were captured in the micro-sized calcium alginate beads each by each using newly developed reverse micelle method to prevent diffusion of hydrolyzed fluorescent substrates. Adopting flow sorting to these captured cells, active cells were successfully enriched. This system would be a useful method for high speed screening of yeast cells which display various hydrolyzing enzymes with high activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：シングルセル、酵母表層工学、活性スクリーニング、細胞包摂、ソーティング

1. 研究開始当初の背景

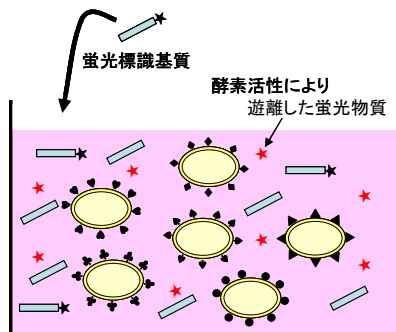
近年、目的タンパク質を酵母細胞の表層に提示する手法が注目を集めている。この酵母細胞表層工学を用いたタンパク質発現系は、①高分子の活性型タンパク質を提示可能。②活性測定に酵素を単離または精製する必要が

無い。③提示酵素にランダムな変異を簡単に導入できる。④酵母のクローン化と PCR により変異箇所を簡単に同定できるといった様々な利点を有する。一方、本手法を適用する上で最大の問題点は、それぞれの変異体タンパク質が提示された膨大な数の酵母の酵

素活性を如何に高速、正確かつ網羅的に検出し、有望な変異体の候補を得るかという点にある。これまでの手法は、プレートアッセイを第一次スクリーニングとして用い、有望株を単離した後さらに詳しい活性測定を行って有用変異体を取得する手法が一般的に用いられているが、多大な手間と時間を要するため、酵母表層工学を用いた有用変異体取得の利点を十分に発揮できていないと言わざるをえない。このことから、フローサイトメーターを用い、蛍光標識したターゲット分子と相互作用する酵母を高速に選択する手法が検討されてきている。しかしながら、この方法では単に標的分子とアフィニティーを有する酵母を選択するだけであれば問題ないが、酵素活性を指標に分離を行うことは、反応後の分子が酵母表層から溶液中へ拡散していくため困難である。近年 Olsen らのグループは、①蛍光色素部、②ポジティブチャージを持ち、細胞（ネガティブチャージ）とアフィニティーを持つ領域、③酵素分解を受けるサイト、④ FRET (fluorescence resonance energy transfer) を起こすパートナー残基の4つのコンポーネントを一つの分子の中に有する合成基質を用い、細胞表層から基質の溶液中への拡散を防ぎつつ、酵素分解による FRET の消失を FACS により検出・分離できる系を開発している¹⁾。この手法では、上記問題を克服し、セルソーターを用いた酵素活性検出と、高活性酵母の選択を可能としたが、目的の活性ごとに非常に複雑な基質を合成により調製しなくてはならず、広範な応用には至っていないのが現状である。

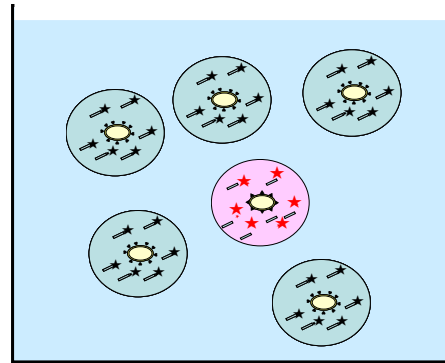
2. 研究の目的

我々は、これまでの研究で、アルギン酸カルシウムビーズ (バイオアクティブビーズ) 中に核酸、タンパク質、あるいは細胞を封入する技術開発を行ってきた。本技術を用いれば、ビーズ内に酵母細胞を包摂し、ビーズ内で酵素反応を起こさせることにより、反応後の標識分子の溶液中への拡散を防ぎつつ、活性の高い表層提示酵母細胞をビーズごとセルソーターにより取得できると考えられる。そこで本研究では、バイオアクティブビーズへの細胞包摂技術を基礎に、広範な応用を可能とする、酵素表層提示酵母の活性検出によるスクリーニング系を開発することを目的とした。

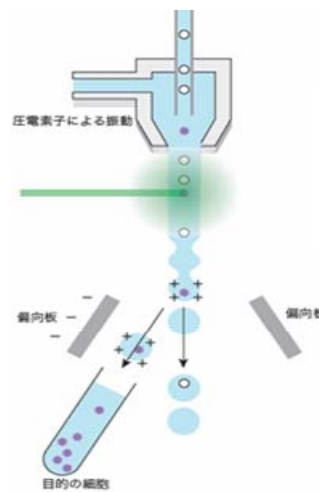


蛍光基質が拡散するため、どの酵母の活性が高いか判別不能

アルギン酸ビーズで個々の酵母を包摂すると、...



FACS



活性による細胞選別が可能！

3. 研究の方法

(1) バイオアクティブビーズへの酵母細胞の包摂方法の検討

研究目的を達成するには、できる限り均一で、かつ包摂される酵母数をコントロールできるバイオビーズの作成方法を確立する必要がある。そこで、これまでの研究で、サイズをコントロールしつつ、均一な形状のビーズを作成することに成功しているパイレーション法、および逆ミセル法を用いて酵母包摂ビーズの作成を試みた。また、以後の操作で高活性酵母の濃縮・再培養を行うことを考え、操作後の酵母の生存率に関する知見も合わせて得た。

(2) β グルコシダーゼ、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ表層提示酵母の作出

本手法の動作確認のため、題記酵素を表層提示した酵母を作成し、さらに、エ

ンドグルカナナーゼに関しては、ジーンシャッフリング法、XL1-RED コンピテントセル法、エラープローンPCR法を用いて配列をランダムイズした変異株を作出した。

(3) ビーズ内酵素反応の検出とソーティングへの応用

項目(1)(2)で開発した酵母包摂ビーズを用いて、酵素反応の検出ができるかどうか検討した。また、フローソーティングによる活性酵母の分別・濃縮が可能か検討し、スクリーニング系として応用するための検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) バイオアクティブビーズへの酵母細胞の包摂方法の検討

まず、ビーズサイズのコントロールが容易で、比較的均一なビーズを得ることができるバイブレーション法による酵母細胞の包摂を試みた。本方法では、イソアミルアルコール等の有機溶媒中にマイクロシリンジにて酵母細胞を懸濁したアルギン酸ナトリウムを滴下するが、その際滴下チップの先端に音波発生器を装着し、滴下チップを振動させることにより微小液滴を得る方法である。有機溶媒中に滴下された液滴は、有機溶媒に重層された塩化カルシウム溶液に触れることにより固化する。また、液滴のサイズは、滴下速度、振動周波数によってコントロールできる。さらに、ビーズあたりの酵母細胞数は、用いる酵母細胞懸濁アルギン酸ナトリウム溶液の細胞数を変えることによって調整できる。本手法を用いて、様々なパラメータ（用いる有機溶媒、振動周波数、液滴速度、才能濃度）を変化させ検討を行ったところ、ビーズ形状や細胞包摂数に関しては、イソアミルアルコールを用いた場合が最も良好であった。しかしながら、イソアミルアルコールを用いた場合、包摂後の酵母細胞の生存率が非常に低く、(~0%)本手法が目指す、ソーティングと培養を繰り返す活性濃縮には不適であることが判った。そこでより細胞毒性の少ない液滴の作成方法を検討した。具体的には、有機溶媒中に界面活性剤と酵母細胞懸濁アルギン酸ナトリウム溶液を加え、穏やかに攪拌することにより逆ミセルを作成し、これに塩化カルシウム溶液を加えて固化させる方法である。本手法はサイズのコントロールに難点があるが、酵母細胞へのダメージは少ない。様々な条件検討（用いる有機溶媒、界面活性剤、攪拌速度等）を行った結果、溶媒として

イソオクタン、界面活性剤としてはTween85を10%添加する条件が、ビーズ形状、酵母生存率の両面で最も良好な結果を与えた。この方法により、平均1~1.2細胞を包摂したビーズを大量に調整することが可能となったので、以降の実験では、逆ミセル法を用いて酵母包摂バイオアクティブビーズを作成することとした。

(2) β グルコシダーゼ、エンドグルカナナーゼ、セロビオハイドロラーゼ表層提示酵母の作出

題記酵素を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の表層に提示した。提示するアンカーは α -アグルチニンを用いた。これらの遺伝子を酵母のゲノム状に組み込み、その発現を酵素活性で評価した。また、分泌発現系と比較するために *R. oryzae* 由来リパーゼの分泌シグナルを付加した酵素分泌発現系を同様に構築した。これらの3種類の酵素を発現する酵母の酵素活性、および酵母の生理活性（エタノール発酵）における影響を評価した。また、酵素の機能を向上させるプラットフォームとして表層提示系を用いるアプローチについて検討を行った。エンドグルカナナーゼをジーンシャッフリング法、XL1-RED コンピテントセル法、エラープローンPCR法を用いて配列をランダムイズした変異株を作出した。また、それぞれの選抜条件、とくに培地を検討することで高機能酵素を見出し、その酵素活性を評価した。その結果、ジーンシャッフリング、及びXL1-RED コンピテントセル法による変異導入では、それぞれ約1.4倍、2.3倍活性が向上した株を得ることに成功した。本手法は、遺伝子ライブラリを酵母に導入し、酵母の生育と酵素活性をリンクさせることで高活性な酵素を容易に選抜できることを示したものである。また、これらの株から得られた酵素の酵素活性を測地したところ、最大で1.7倍の酵素活性の向上がみられた。

(3) ビーズ内酵素反応の検出とソーティングへの応用

(2)により作成した酵素表層提示酵母、具体的には、*Aspergillus aculeatus* 由来の β -グルコシダーゼ表層提示酵母(211株)を(1)の方法により包摂したバイオアクティブビーズを用いて、酵素活性の検出が可能か検討した。次図は、基質としてTokyoGreen- β Gluを0.25%含む反応液中で10分間反応させ、ビーズを洗浄後蛍光顕微鏡で測光観察を行っ

たものである。左は明視野像、右は蛍光像である。明視野では、ビーズに包摂されていない酵母（黒矢印）も見えるが、蛍光像では、包摂されたもの（赤矢印）のみが光って見えている。これは、包摂されていない酵母では酵素反応の結果生じた蛍光色素が洗浄の際に洗い流されたことを意味する。一方包摂された酵母では、ビーズ内に蛍光色素が保持され、はっきりと区別できる。

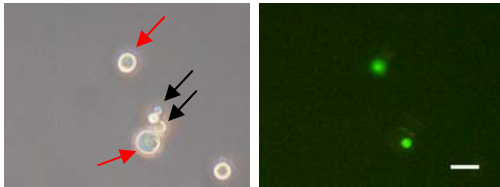


図 β -グルコシダーゼ表層提示酵母を包摂したバイオアクティブビーズ (左：明視野、右：蛍光像)
スケールバー：10 μ m

蛍光量測定の結果、表層提示した酵母を包摂したビーズは、表層提示していない酵母を包摂したビーズや、酵母をなにも包摂していないビーズと比べて、10倍以上の蛍光強度を有しており、ビーズ内で酵素反応を進行させることにより、ビーズに包摂された酵母の β -グルコシダーゼ活性を評価できることが判明した。次に、これらの包摂ビーズをセルソーターにより分離し、活性の違いによりソーティングできるかどうか調べた。

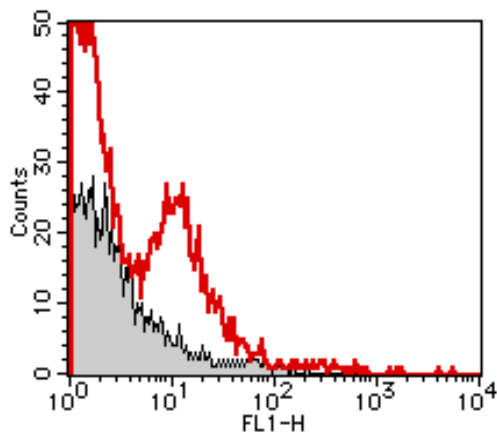


図 酵素反応後のビーズのフローサイトメトリーヒストグラム
(赤： β -グルコシダーゼ表層提示酵母 (211 株) 包摂ビーズ 黒：コントロール酵母 (423 株) 包摂ビーズ)

上図は、 β -グルコシダーゼを表層提示した酵母 (211 株) と、表層提示していない酵母 (423 株) のそれぞれを用いて作

製したビーズをもちいて酵素反応を行った後にフリーサイトメーターによって蛍光強度とビーズ数を測定したヒストグラムである。この結果から、ソーティングのゲートを適切に設定すれば、包摂された酵母の表層提示酵素の活性の違いによってビーズを分別することが可能であることが判った。そこで、表層提示酵母 (211 株) とコントロール酵母 (423 株) を用いて作製したビーズを任意の割合で混合し、ソーティングにより活性株の濃縮を行った結果、ゲートを最適化することにより、高活性の株を 90% 以上に濃縮できることが判った。このことから本手法は活性の高い酵素表層提示酵母を濃縮することができることが判ったが、1 回のソーティングでは、以後の解析 (活性増強に関与する共通した変異箇所の同定など) を行うには濃縮が十分ではないことも判明した。さらに、濃縮した株の再培養により、活性の低い株のポピュレーションが増え、活性が再分散してしまうことも判った。今後、ソーティングにおいてコンタミネーションを起こしていると考えられる、低活性の株をいかに除外していくかが課題である。方策として、ソーティングの際のスクリーン幅を狭くすると共に、回収したビーズからの再培養効率を高めること、ビーズ間の相互作用を減らし、コンタミネーションを極力少なくすることを考えている。これらのことに最も影響するファクターは、ビーズ作成の際添加する界面活性剤と考えられるので、今後、界面活性剤の種類や添加量の検討をさらに詳細に進めていくことにしている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Yamada, R., Taniguchi, N., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2011) Direct ethanol production from cellulosic materials using a cellulolytic enzymes expression optimized diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain., *Biotechnology for Fuels*, 査読有, 4: 8
DOI:10.1186/1754-6834-4-8

② Yanase, S., Yamada, R., Kaneko, S., Noda, H., Hasunuma, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2010) Ethanol production from cellulosic materials using cellulase expressing yeast., *Biotechnology*

Journal, 5, 査読有, 449-455.
DOI: 10.1002/biot.200900291

③ Yan Zhou, Shin'ichiro Kajiyama, Kouichi Itoh, Takanori Tanino, Nobuo Fukuda, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo and Kiichi Fukui, Development of an enzyme activity screening system for β -glucosidase-displaying yeasts using calcium alginate micro-beads and flow sorting., Appl Microbiol Biotechnol. 84(2) 査読有, pp. 375-82.

DOI: 10.1007/s00253-009-2091-8

④ Yan Zhou, Shin'ichiro Kajiyama, Hiroshi Masuhara, Yoichiro Hosokawa, Takahiro Kaji, Kiichi Fukui, A new size and shape controlling method for producing calcium alginate beads with immobilized proteins., J. Biomed. Sci. Eng. 査読有, Vol. 2 No. 5 pp. 287-293.

DOI: 10.4236/jbise.2009.25043

[学会発表] (計2件)

① 山田 亮祐, 田中 勉, 荻野 千秋, 近藤 昭彦, セルラーゼ発現バランス最適化酵母を用いたセルロースからのエタノール発酵平成22年度 日本生物工学会 2010年10月28日宮崎シーガイアワールドコンベンションセンター

② Suhei Yanase; Ryosuke Yamada; Tsutomu Tanaka; Chiaki Ogino; Hideki Fukuda; Akihiko Kondo, Direct fermentation of cellulosic materials to ethanol using yeast strains codisplaying three types of cellulolytic enzyme., APBioChEC' 09, 2009年9月24日神戸国際会議場

[図書] (計2件)

① Naruemon Khemkladngoen, Naoki Wada, Suguru Tsuchimoto, Joyce A. Cartagena, Shin-ichiro Kajiyama and Kiichi Fukui InTech, March, 2012. Transgenic Plants - Advances and Limitations.

(ISBN 978-953-51-0181-9)

Chapter 5 Bioactive Beads-Mediated Transformation of Rice with Large DNA Fragments Containing Aegilops tauschii Genes, with Special Reference to Bead-Production Methodology PP117-132.

② N. Wada, S. Kajiyama, N. Khemkladngoen, K. Fukui. Wiley-Blackwell Publishers 2011. Plant Transformation Technologies.

(ISBN-10: 0-8138-2195-9)

Chapter 4 A Novel Gene Delivery System in

Plants with Calcium Alginate Micro-Beads.
PP. 73-81.

[産業財産権]
該当なし

[その他]
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶山 慎一郎 (KAJIYAMA SHINICHIRO)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20243496

(2) 研究分担者

田中 勉 (TANAKA TSUTOMU)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点

研究部・准教授

研究者番号：90436551

(3) 連携研究者

該当なし。