

酵母分子ディスプレイを用いた新しい物質変換系の創製

芝崎 誠司

Novel Bioconversion Systems Using a Yeast Molecular Display System

Seiji SHIBASAKI

Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences,
1-3-6 Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8530, Japan

(Received July 17, 2010)

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used for the process of fermentation as well as for studies in biochemistry and molecular biology as a eukaryotic model cell or tool for the analysis of gene functions. Thus, yeast is essential in industries and researches. Yeast cells have a cell wall, which is one characteristic that helps distinguish yeast cells from other eukaryotic cells such as mammalian cells. We have developed a molecular display system using the protein of the yeast cell wall as an anchor for foreign proteins. Yeast cells have been designed for use in sensing and metal adsorption, and have been used in vaccines and for screening novel proteins. Currently, yeast is used not only as a tool for analyzing gene or protein function but also in molecular display technology. The phage display system, which is at the forefront of molecular display technologies, is a powerful tool for screening ligands bound to a target molecule and for analyzing protein-protein interactions; however, in some cases, eukaryotic proteins are not easily expressed by this system. On the other hand, yeast cells have the ability to express eukaryotic proteins and proliferate; thus, these cells display various proteins. Yeast cells are more appropriate for white biotechnology. In this review, displays of enzymes that are important in bioconversion, such as lipases and β -glucosidases, are going to be introduced.

Key words—yeast; molecular display; β -glucosidase; isoflavone; lipase

1. 分子ディスプレイ技術の確立と適応分野

DNA 分子を人工的に再構築する遺伝子組換え技術と、外来遺伝子を細胞に組込むことによる形質転換法が確立され、いわゆる異種タンパク質の生産が可能となった。一般的に動植物細胞よりも増殖速度が速く、培地も比較的安価で調達できる微生物細胞には、有用タンパク質の生産系としては優れた宿主が多い。化学法に代わる物質生産、変換系にこれらの技術を導入するための挑戦が数多くなされている。中でも、ホワイトバイオテクノロジーが目指すところは、環境に調和した、生物機能を利用したもののづくり技術であるが、現在すべてのバイオテクノロジーがそれにはなっているとは言い難い。非常に高効率な物質生産方法を提案するものもある一方、

例えば、酵素を培地中に分泌あるいは細胞内に生産させる場合だと、まず細胞を回収して、破碎により目的成分を含む画分を取り出し、使用目的のグレードに合わせて精製する必要がある、相応のエネルギー投入量が必要となる。近年注目を集めている分子ディスプレイ法は、宿主を単なる組換え分子合成ツールとするだけでなく、宿主の持つ生理機能や、宿主を機能性担体とした、低コスト・省エネルギーな新しい物質変換系への応用が期待されている。

分子ディスプレイ法の中で、宿主が一番単純な構造を持つのがファージを用いるファージディスプレイ法である。ファージディスプレイ法は、コートタンパク質という最外殻層に局在している分子に標的タンパク質を融合させて提示する、分子ディスプレイの先駆けの存在であり、Smith らにより最初に 1980 年代後半に報告された。¹⁾ 現在でも相互作用タンパク質の探索、あるいは特定分子に対する親和性リガンドの選択法として、細胞内分子機能の理解と応用を目指した生命科学研究の場面で汎用されてい

兵庫医療大学薬学部医療薬学科 (〒650-8530 神戸市中央区港島 1-3-6)

e-mail: seiji@huhs.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S55 で発表したものを中心に記述したものである。

る。また、原核微生物である大腸菌や乳酸菌などのバクテリア等を用いた分子ディスプレイにおいては、ファージにはない自己増殖能という利点を生かし、様々な工夫を導入した分子ディスプレイ法が報告されている。乳酸菌²⁾ *Lactobacillus* や *Lactococcus* では表層タンパク質の Proteinase P、大腸菌 *Escherichia coli* の系では外膜タンパク質の LumO³⁾ や OmpA⁴⁾ をアンカーとして細胞最外殻層に目的タンパク質をディスプレイできる。また、無細胞抽出系を用いたリボソームディスプレイがあり、タンパク質とそれをコードする RNA を、リボソームを介して連結させる。これは、終止コドンに欠失させ、DNA スペースを付加した mRNA を用いてタンパク質合成を行わせることで、目的タンパク質分子をリボソーム上にディスプレイするという手法である。

本稿で取り扱う酵母分子ディスプレイでは、目的タンパク質のアンカーに細胞壁タンパク質がしばしば用いられ、例えば、 α -アグルチニン、Flo1 あるいは Cwp1 などによる表層ディスプレイが報告されている。また、バクテリアの系よりも多様なディスプレイ制御ツールも用意されている。酵母分子ディスプレイ系でも、これまでに様々な種類のタンパク質、ペプチドがディスプレイされて物質変換ツールや、バイオセンシングツールとしても応用され始めている。⁵⁾ 以下、簡単にその技術面での概略を記す。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の性凝集素タンパク質 α -アグルチニンを活用した酵母分子ディスプレイシステムの原理の要点は、元来細胞壁に局在している α -アグルチニンの、分泌シグナルと機能ドメインの組換えにより、目的とするタンパク質を細胞表層へディスプレイできることである。分泌シグナルの配置と、遺伝子発現におけるプロモーターの選択は分子ディスプレイの中で、極めて重要なファクターとなる。Figure 1 のように、目的タンパク質をコードする遺伝子の 5'末側に分泌シグナル、3'末側に α -アグルチニン細胞壁ドメインの遺伝子配列を融合させることで、分泌経路であるエキソサイトーシスにより融合タンパク質は細胞膜へ到達することになる。GPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカーは PI-PLC (Phosphatidyl inositol-specific phospholipase C) の作用で切断され、最終的に目的タンパク質は α -アグルチニンを介して、*S. cerevisiae*

細胞壁に固定化されることになる。分泌シグナルには、 α -アグルチニン由来のシグナル配列が利用可能であるが、酵母細胞内で機能するシグナルであれば異種タンパク質のシグナル配列でも適用することができる。実際、多くの酵母分子ディスプレイ系では、糸状菌由来のグルコアミラーゼの分泌シグナル配列が用いられている。また、プロモーター配列の選択に関しては、構成発現型、若しくは誘導発現型のいずれがディスプレイタンパク質の活性維持に適しているのか、という情報などを指標にして、目的に応じて判断する必要がある。また、マルチコピープラスミド、又は染色体組込み型ベクターを使用するのか、という遺伝子導入形式により提示量のコントロールが可能である。⁶⁾ これまで酵母分子ディスプレイシステムにより、酵母細胞の表層提示された分子の代表的なものを Table 1 にまとめた。酵母分子ディスプレイ法の最大の利点は、培養により細胞を繰り返し利用でき、遺伝子配列さえ入手できれば、ほとんどのタンパク質やペプチドのディスプレイが可能であるということであるが、さらに、酵素の熱あるいは pH に対する安定性向上にもつながることが明らかとなっている。⁷⁾

2. イソフラボンアグリコンの生産系

日本人の食生活における典型的な食品素材の 1 つである大豆は、その生理作用について世界中の多くの研究者の関心を集めている。良質なタンパク質を含むため、20 世紀に入り世界中で栽培されるようになったが、近年では特に、生理活性成分であるイソフラボンが注目されている。イソフラボンは、骨粗鬆症、心疾患やがんの予防に有効であるとして、基礎並びに臨床面から生理作用の詳細について検討がなされている。大豆中に含まれるイソフラボンは、配糖体として存在していることが知られており、ダイゼイン (Daidzein)、グリシテイン (Glycitein)、ゲニステイン (Genistein) という 3 種のアグリコ



芝崎誠司

兵庫医療大学薬学部・准教授。2001 年京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻博士後期課程終了。工学博士。同年神戸市立工業高等専門学校助手、2005 年同助教授。2004 年スウェーデン王立工科大学客員研究員。2007 年より現職。専門：応用生化学・バイオテクノロジー。医療、創薬に役立つバイオテクノロジーの展開を目指している。

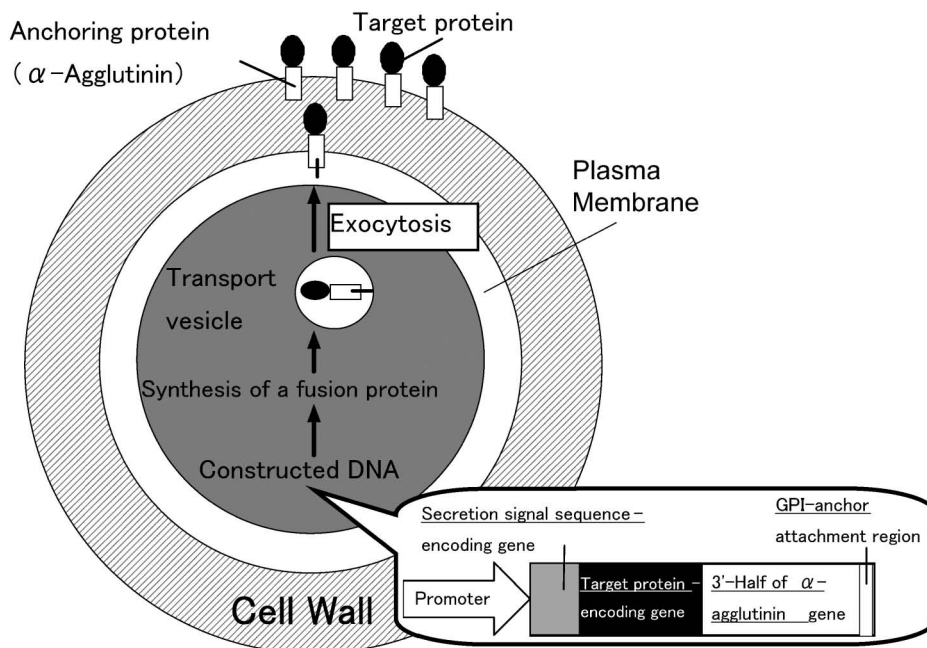


Fig. 1. General Principle of Molecular Display Using Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Table 1. Representative Proteins Displayed on *Saccharomyces cerevisiae*

Proteins or peptides	Origin	Secretion signal sequence	Molecular size (KDa)
α -Amylase	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	MF α 1 (A mating factor of <i>S. cerevisiae</i>)	59
Glucoamylase	<i>Rhizopus oryzae</i>	Glucoamylase	62
CM-Cellulase	<i>Aspergillus acleatus</i>	CM-Cellulase	24
β -Glucosidase	<i>Aspergillus acleatus</i>	Glucoamylase	136
Lipase	<i>Rhizopus oryzae</i>	MF α 1	30
Lipase	<i>Candida antarctica</i>	FLO1p	33
Apoaequorin	<i>Aequorea victoria</i>	Glucoamylase	21
Protein A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Glucoamylase	15
(His) ₆	Artificial	MF α 1	0.93
Antigen	IHNV or BFNNV	Glucoamylase	19 or 31

ンにグルコースが結合したダイズイン (Daidzin), グリシチン (Glycitin), ゲニスチン (Genistin) がある。さらにこれらの配糖体中のグルコースがマロニル化あるいはアセチル化された, マロニル化配糖体とアセチル化配糖体も知られており, 合計 12 種類のイソフラボンがある。ヒト体内では, これらの配糖体から腸内細菌によりアグリコンが切り出され, 腸管より吸収される。⁸⁾ また, 配糖体とアグリコンの吸収について血中濃度を比較すると, 配糖体では 1/10-1/20 であり,⁹⁾ アグリコンへの分解は大豆イソフラボンの生理活性を期待する際, 必要不可欠なプロセスであると理解できる。個人間の腸内細菌叢の違いにより, アグリコンへの変換率は異なっ

ていることも考えられるので, イソフラボンの機能を十分に発揮させるためには, 大豆成分中の配糖体からのアグリコンの生産方法の確立が望まれる。本項目では, β -グルコシダーゼを分子ディスプレイした酵母によるアグリコン生産について解説する。

大豆食品の発酵過程では, 微生物が生産する酵素である β -グルコシダーゼが配糖体の分解に関与していると考えられる。味噌などの製造で用いられる *Aspergillus oryzae* には 2 種類の β -グルコシダーゼが知られており, 製造後に含まれるアグリコンの生成に寄与していると推測できる。^{10,11)} そこで, *A. oryzae* から β -グルコシダーゼ遺伝子がクローニングされ, 酵母分子ディスプレイ法によるイソフラボ

ンアグリコンの生産が試みられた。¹²⁾

まず、麹菌 RIB40 ゲノムデータベースから、38 種類の β -グルコシダーゼと予想される ORF (open reading frame) が抽出され、BLASTP 解析により、21 種類の β -グルコシダーゼ予測遺伝子が選択された。このうち、3 つの遺伝子 (AO090003001511, AO090001000544, AO090009000356) が Glycoside hydrolase family 3 に、1 つの遺伝子 (AO090003000497) が同 family 1 に属することが判明した。AO090009000356 については、セロビアーゼ遺伝子として既に同定されており、¹¹⁾ β -グルコシダーゼによるアグリコン生産の解析には、他の 3 つの遺伝子が選ばれた。それぞれ、BGL1 (AO090003001511), BGL3 (AO090003000497), BGL5 (AO090001000544) と命名された。

次に、これらの遺伝子産物の酵素活性を解析するにあたり、従来汎用されてきた方法の中では、タンパク質を分泌させハロアッセイによる評価が一般的である。しかし、単位細胞数あたりの提示量が定量的に評価できる分子ディスプレイ法では、より詳細な酵素活性の評価が可能となる。また、酵素タンパク質の回収は遠心分離のみで完結し、煩雑な精製過程が不必要であるから、自己増殖可能な菌体触媒として、大量培養系へ持ち込むことが可能である。各 β -グルコシダーゼ遺伝子は、 α -アグルチニンによって細胞表層にアンカリングされるよう設計されている。遺伝子発現に用いられた SED800 プロモーターは、全長 1063 塩基からなる SED1 プロモーターを 800 塩基までデリベーションすることで、転写活性が強化されている。このような遺伝子構造を持つプラスミドを、*S. cerevisiae* GRI-117-UK 株に導入し、 β -グルコシダーゼ候補タンパク質をディスプレイした酵母、Sc-BGL1, Sc-BGL-3 並びに Sc-BGL5 が作製された。宿主の *S. cerevisiae* GRI-117-UK 株は二倍体の清酒酵母である。これらの 3 つの β -グルコシダーゼ候補タンパク質ディスプレイ株について、*p*NPG (*p*-nitrophenyl- β -D-glucoside) を用いた活性評価 (50°C) を行ったところ、コントロールの GRI-117-UK を用いた場合は 2.33×10^{-2} U であるのに対し、 5.36×10^2 U (Sc-BGL1), 3.75×10^{-1} U (Sc-BGL3), 1.06×10 U (Sc-BGL5) という酵素活性値が得られている。これらのコントロールに対する倍率は、23000 倍、16 倍、454 倍と、細胞株同

士でバラツキがみられるが、いずれも候補遺伝子として選択した DNA 領域が適切であったと言える。また、コードされるタンパク質は、 β -グルコシダーゼ活性を有した形で分子ディスプレイできたと考えられる。次に、大豆抽出物の Fujiflavone P40 (Daidzein conjugate; 26%, Genistein conjugate; 5.8%, 他の isoflavone 成分; 13%) を基質とし、各 β -グルコシダーゼ (30°C) と反応させたところ、Fig. 2 のような結果となっている。120 時間まで反応が継続されたが、各酵素により沈殿すなわちアグリコンの生成量が大きく異なることが明らかとなった。さらに 120 時間反応終了後の各酵素によるアグリコン生成量と、イソフラボン配糖体の残存量が LC-MS により解析された (Table 2)。副反応産物かつ反応阻害剤であるグルコースが、酵母により資化さ

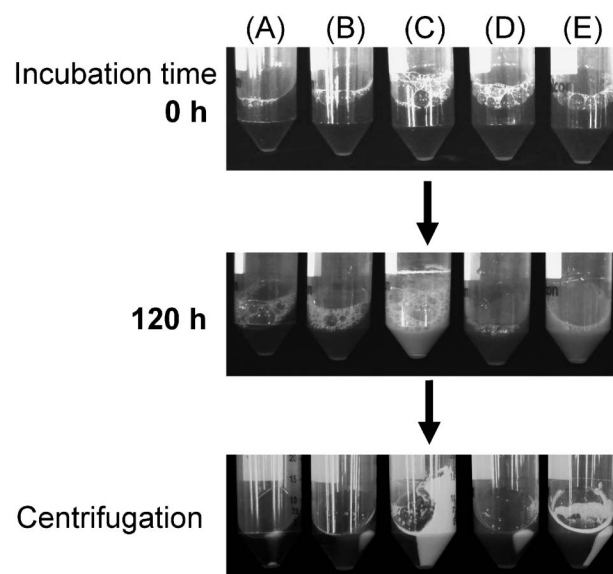


Fig. 2. Production of Isoflavone Aglycone by β -Glucosidase-displaying Yeasts

(A) No cells, (B) GR-117-UK (control), (C) Sc-BGL1, (D) Sc-BGL3 and (E) Sc-BGL5 were incubated with Fujiflavone P40.

Table 2. Production of Isoflavone Aglycones (mM)

Strains	Isoflavone aglycones	Isoflavone glycosides	
		With glucose	With 6''-O-acetylglucose
Sc-BGL1	17.79	0.72	0.90
Sc-BGL3	7.24	11.52	5.99
Sc-BGL5	14.93	1.25	5.91
Without yeast	2.39	18.53	6.66
GRI-117-UK	4.33	14.35	6.00

れており、イソフラボンへの変換効率も高いことがわかる。

3. 脂質分解酵素ディスプレイによる物質変換系

酵母ディスプレイ系の開発当初は、糖質分解酵素(グルコアミラーゼ、セルラーゼなど)の提示が先行していた。これらの酵素のディスプレイにより、酵母自身が持つ糖代謝系、特に嫌気醗酵に連続させることで、デンプンやセルロースから直接、エタノールへの変換が可能となった。バイオエタノールを中心としたエネルギー変換における生体触媒として注目を集め、次に、脂質分解酵素リパーゼのディスプレイが試みられた。まず初めに、*Humicola lanuginosa* のリパーゼや、*Fusarium solani* f. sp. pisi が α -アグルチニンと融合され、細胞表層にディスプレイされ、その存在が免疫蛍光法を用いた顕微鏡観察で確認されたが、酵素活性は検出されなかった。

3-1. ROL の分子ディスプレイ 糸状菌 *Rhizopus oryzae* 由来のリパーゼ (*Rhizopus oryzae* lipase; ROL) のディスプレイが試みられている。¹³⁾ アミノ酸配列で、99%のホモロジーを持つ *R. niveus* のリパーゼでは、結晶構造解析から活性部位が C 末端近くにあることが明らかになっており、ROL が活性を有する形でディスプレイされるために、ROL と α -アグルチニンの間にスペーサーが挿入された。スペーサーは Table 3 のように、グリシンとセリンからなるペプチドである。リンカーの長さに応じて活性の上昇が確認されている。また、ROL を分子ディスプレイした酵母を用いた、植物油からバイオディーゼル燃料生産¹⁴⁾や光学分割反応による医薬中間体合成¹⁵⁾における有用性も示されて

いる。また、免疫グロブリンの Fc 領域と融合した ROL を、Fc と親和性のある Protein A 由来の Z ドメインディスプレイ酵母で吸着させる系が構築され、異種タンパク質の生産と回収を同じ培養系で行うシステムも、酵母分子ディスプレイ系を用いて考案されている。¹⁶⁾

3-2. CALB の分子ディスプレイ 次に、酵母分子ディスプレイにより創製された別の種類のリパーゼ提示酵母によるポリエステル合成について紹介したい。ポリエステルは世界で生産される全合成繊維の 80% 以上を占め、引き続きポリエステルの応用範囲の拡大と生産量の増加が予想される。これまで化学合成法により大量生産されてきたポリエステル生産においては、ホワイトバイオテクノロジーによる環境負荷の少ない合成技術が望まれる。酵母分子ディスプレイでは細胞表層にディスプレイすることで、遠心分離による酵素の回収が簡便で、製造のコストダウンが可能であることに加え、細胞壁に外界へ向かってディスプレイされた酵素分子は、基質の親水性/疎水性などの性質にかかわらず、高活性な触媒反応が期待できる。

Tanino らは、*Candida antarctica* 由来リパーゼ B (*Candida Antarctica* lipase B; CALB) を分子ディスプレイした酵母細胞を菌体触媒とした、ポリエステル合成法を報告している。¹⁷⁾ 汎用されているポリエステルの 1 つであるポリブチレンアジペートのモデルとして *n*-ブタノールとアジピン酸を用いたジエステル Dibutyl adipate (DBA) 合成反応が行われた。反応には培養後に凍結乾燥処理した ROL ディスプレイ酵母と CALB ディスプレイ酵母が用いら

Table 3. Linker Sequences of ROL-anchoring Protein and Lipase Activity

Plasmid	Sequence of linker peptide	Lipase activity ^a (U/g dry cell)	Hydrolyzed triolein (%) ^b	
			100 h ^c	150 h ^c
pMW1		Not detected	0	0
pWGRL2 ^b		9.1±3.3	46.5	67.3
pWRSL0		2.0±1.2	41.3	56.0
pWRSL2	GS	3.0±1.7	42.9	54.1
pWRSL7	GSSGGGS	3.4±0.5	41.9	57.9
pWRSL9	GSSGGGSGS	3.9±2.1	41.0	56.7
pWRSL14	GSSGGSGGSGGSGS	4.1±1.8	44.8	63.3
pWRSL17	GSSGGSGGSGGSGGSGS	2.9±1.1	46.4	77.5

^a Lipase activity was measured by Lipase Kit S with BALB (2,3-dimercaptopropan-1-ol tributyl ester) as substrate. ^b The amount of hydrolyzed triolein was measured by gas chromatography. The initial amount of triolein was represented as 100%. ^c Cultivation time.

れ、適量の水分を添加した系において 60°C で行われた。リパーゼをディスプレイしていないコントロールを用いた場合と比較し、ROL, CALB いずれかのリパーゼをディスプレイした酵母はともにエステル合成活性が確認されている。DBA 合成能においては、CALB ディスプレイ酵母の方が ROL ディスプレイ酵母よりも約 3 倍高く、168 時間でアジピン酸を完全に消費し、80% の DBA への変換が達成された。しかし、合成反応の進行とともに系中の粘度が増加することから、反応効率を向上させるために、CALB ディスプレイ酵母の投入量を最小限に抑えることが試みられた。これには、CALB 遺伝子のコピー数を増やして、1 細胞あたりの発現量を増加させる方法がとられた。宿主細胞の a 型並びに α 型酵母細胞の染色体 DNA それぞれに、異なるマーカー遺伝子を用いて 4 コピーずつ導入したのち、酵母の性接合によりこれらを融合し、結果として 8 コピーを染色体上に有する改良型 CALB ディスプレイ酵母が創製された。¹⁸⁾ 改良型 CALB ディスプレイ酵母では、従来型に比べ 2 倍以上のリパーゼ活性を示し、培養系における細胞の収量も 5 倍以上に増加していた。この酵母細胞を用いてポリブチレンアジペート合成反応が検討された結果、金属触媒を用いた合成法と比較し、同等の物性値を有するポリマーが合成できることが明らかとなった。

リパーゼの分子ディスプレイについては、前節の ROL によるバイオマスの資源化や、上記 CALB による化成品の合成を志向した研究に加え、プラスチック化合物の生分解に関する研究も報告され始めている。¹⁹⁾ プラスチック化合物の酵素分子ディスプレイ酵母による分解の検討において、モデル化合物としては、Fig. 3 に示すズルシトール基を側鎖に持つポリウレタン (DPU) と、ズルシトール基を持たないポリウレタン (STPU) が合成された。上記の改良型 CALB ディスプレイ酵母の懸濁液に静置して、顕微鏡観察と重量測定により、表面提示 CALB による分解活性化が評価され、CALB によるガラスにフィルム上に伸ばした DPU は、顕微鏡で顕著に分解されていることが確認された。分解産物の同定とその再利用が達成されることで、酵素による生分解の利点がより高まるものと考えられる。今後のさらなる詳細な解析と、分解産物の再利用方法の検討が望まれる。

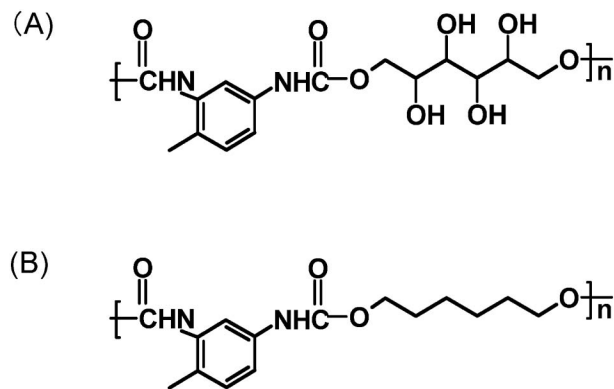


Fig. 3. The Chemical Structure of the Polyester Polyurethanes Synthesized and Evaluated in Biodegradability (A) Dulcitol-containing polyurethane (DPU) and (B) Standard polyurethane (STPU).

3-3. クチナーゼの分子ディスプレイ 次に、バターからフレーバーへの変換に関する脂肪酸分解酵素のディスプレイと酵素の特性について紹介する。酪酸やカプロン酸などの短鎖脂肪酸は芳香を放ち、食品フレーバーとして有用であるが長鎖脂肪酸は適していない。リパーゼを用いた遊離脂肪酸の短鎖/長鎖の比率は、酵素の選択性と活性に依存し、動物由来のリパーゼは微生物由来のものと比較し、短鎖脂肪酸の遊離に適している。しかし、動物由来のリパーゼは微生物由来のものより高価であるので、微生物由来リパーゼを用いた効率のよい短鎖脂肪酸の生産系が望まれる。そこで、*A. oryzae* 由来のクチナーゼ (EC 3.1.1.74) を酵母分子ディスプレイ系に導入し、バターから短鎖脂肪酸への変換反応が試みられた。²⁰⁾ SED1 プロモーターの下流に、クチナーゼと α -アグルチニンの融合遺伝子を組込んだ pK113-CutL (Fig. 4) を導入したクチナーゼディスプレイ酵母と、分泌生産により得たクチナーゼをコントロールとして、バターからの遊離脂肪酸の組成について調べられた (Table 4)。クチナーゼを酵母表面にディスプレイした場合、分泌型よりも短鎖脂肪酸を遊離し易いことが明らかとなった。さらに、クチナーゼ発現遺伝子カセットをゲノム染色体へホモで組込んだ場合は、ヘテロで組込んだ場合より 2 倍のリパーゼ活性が得られることが示されている。このように、ディスプレイしたクチナーゼ酵素の選択性と反応性が、より理想的なフレーバー生産系へと改変された。

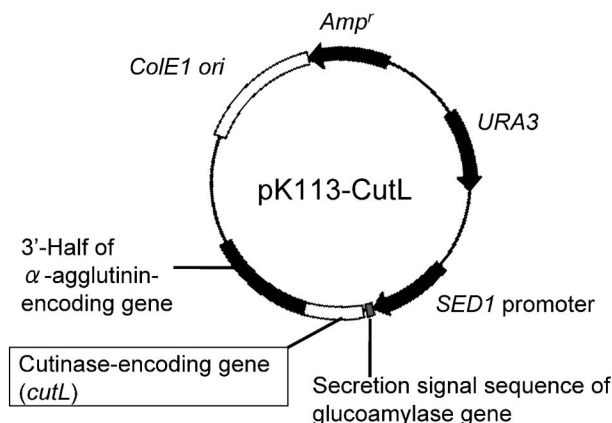


Fig. 4. Genetic Construction of the Plasmid for Display of Cutinase on Yeast Cell Surface

Table 4. The Substrate Specificity of Displayed and Secreted Forms of Cutinase

	<i>p</i> NPB (C4)	<i>p</i> NPL (C12)	Ratio C4/C12
Displayed form	115 U/g-dry cell	1.2 U/g-dry cell	95.8
Secreted form	617 U/ μ g-protein	252 U/ μ g-protein	2.5

*p*NPB; *p*-nitrophenyl butyrate, *p*NPL; *p*-nitrophenyl laurate.

4. おわりに

ファージディスプレイ法が、大腸菌のディスプレイ系と比較し、酵母細胞は真核生物由来のタンパク質発現に有利で、培養も極めて簡単であり、ホワイトバイオテクノロジーに応用可能な酵素のディスプレイ技術として、様々な酵素分子がディスプレイされてきた。本稿においては、リパーゼやグルコシダーゼなどの物質変換に重要な酵素分子をディスプレイした酵母細胞の特性について紹介し、酵素分子をディスプレイした酵母細胞は様々な発酵プロセスにおいて、物質変換に必須の代謝酵素群を包括する細胞触媒として活用されてきたことを示した。このように異種酵素をディスプレイすることで、本稿では詳述しなかったが、外部環境に応じて蛍光タンパク質をディスプレイする細胞センサー²¹⁾や、重金属捕捉ペプチドやホルモン受容体のディスプレイによるバイオレメディエーションの吸着担体として機能も見い出され、より付加価値の高い酵母細胞が生み出されている。²²⁾ さらに、分子ディスプレイにより進化した酵母自身がワクチンとなり、医薬としての

可能性を有していることを示す論文が既に報告され始めている。酵母細胞が単なる遺伝子解析、タンパク質機能解析のツールに留まらず、分子ディスプレイによる細胞の新しい機能創製に期待感が高まっており、今後の薬学研究や医薬品の製造プロセスに生かされることを期待したい。²³⁾

REFERENCES

- 1) Smith G. P., *Science*, **228**, 1315–1317 (1985).
- 2) Maassen C. B., Laman J. D., den Bak-Glashouwer M. J., Tielen F. J., van Holteneelen J. C., Hoogteijling L., Antonissen C., Leer R. J., Pouwels P. H., Boersma W. J., Shaw D. M., *Vaccine*, **17**, 2117–2128 (1999).
- 3) Hofnung M., *Methods Cell Biol.*, **34**, 77–105 (1991).
- 4) Stathopoulos C., Georgiou G., Earhart C. F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 112–119 (1996).
- 5) Ueda M., Tanaka A., *Biotechnol. Adv.*, **18**, 121–140 (2000).
- 6) Shibasaki S., Ueda M., Iizuka T., Hirayama M., Ikeda Y., Kamasawa N., Osumi M., Tanaka A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 471–475 (2001).
- 7) Ito J., Sahara H., Kaya M., Hata Y., Shibasaki S., Kawata K., Ishida S., Ogino C., Fukuda H., Kondo A., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **55**, 69–75 (2008).
- 8) Day A. J., DuPont M. S., Ridley S., Rhodes M., Rhodes M. J., Morgan M. R., Williamson G., *FEBS Lett.*, **436**, 71–74 (1998).
- 9) Izumi T., Piskula M. K., Osawa S., *J. Nutr.*, **130**, 1695–1699 (2000).
- 10) Riou C., Salmon J. M., Vallier M. J., Gunata Z., Barre P., *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3607–3614 (1998).
- 11) Langston J., Sheehy N., Xu F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 972–978 (2006).
- 12) Kaya M., Ito J., Kotaka A., Matsumura K., Bando H., Sahara H., Ogino C., Shibasaki S., Kuroda K., Ueda M., Kondo A., Hata Y., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 51–60 (2008).
- 13) Washida M., Takahashi S., Ueda M., Tanaka A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 681–686 (2001).

- 14) Matsumoto T., Fukuda H., Ueda M., Tanaka A., Kondo A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 4517–4522 (2002).
- 15) Matsumoto T., Ito M., Fukuda H., Kondo A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 481–485 (2004).
- 16) Shibasaki S., Kawabata A., Ishii J., Yagi S., Kadonosono T., Kato M., Fukuda N., Kondo A., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 821–828 (2007).
- 17) Tanino T., Ohno T., Aoki T., Fukuda H., Kondo A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1319–1325 (2007).
- 18) Tanino T., Aoki T., Chung W., Watanabe Y., Ogino C., Fukuda H., Kondo A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 59–66 (2009).
- 19) Shibasaki S., Kawabata A., Tanino T., Kondo A., Ueda M., Tanaka M., *Biocontrol Sci.*, **14**, 171–175 (2009).
- 20) Horii K., Adachi T., Tanino T., Tanaka T., Kotaka A., Sahara H., Hashimoto T., Kuratani N., Shibasaki S., Ogino C., Noda H., Hata Y., Ueda M., Kondo A., *Enzyme Microb. Technol.*, **46**, 194–199 (2010).
- 21) Shibasaki S., Tanaka A., Ueda M., *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 123–130 (2003).
- 22) Shibasaki S., Maeda H., Ueda M., *Anal. Sci.*, **25**, 41–49 (2009).
- 23) Shibasaki S., Ueda M., *Recent Pat. Biotechnol.*, **3**, 19–27 (2009).