

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)	氏名	Mohamed Abdeltawab Abdallah Abdelhamid
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
Molecular studies on the formation of silica layer in bacterial spores and its application (細菌孢子におけるシリカ層の形成に関する分子生物学的研究とその応用)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	黒 田 章 夫	
審査委員	教 授	加 藤 純 一	
審査委員	教 授	秋 庸 裕	
〔論文審査の要旨〕			
<p>ケイ素(Si)は酸素に次いで豊富に存在する元素であり、半導体の材料として利用される。また、その酸化物であるシリカも様々な用途で産業利用されている。自然界では、ケイ素は主に鉱物として存在するが、生物との関わりも深い。一部の真核生物は環境中のケイ素を可溶性のケイ酸の形で取り込み、細胞内で重合してシリカとして蓄積することが知られており、その蓄積メカニズムの解析も進められている。一方、シリカを蓄積する原核生物は最近まで知られておらず、その蓄積メカニズムは未知である。本博士論文研究では、シリカ蓄積細菌よりシリカ蓄積に関与するタンパク質を探索し、それをシリカ材料技術や半導体技術とバイオテクノロジーを融合するための基盤技術として利用することを目的とした。</p> <p>第一章では、緒論として、真核生物と原核生物のシリカ蓄積についてこれまでの知見を述べた。第二章では、孢子表面にシリカを蓄積する <i>Bacillus</i> 属細菌のシリカ蓄積メカニズムの解析を行い、シリカ蓄積に関与するタンパク質を原核生物で初めて明らかにした。真核生物由来の既知のシリカ重合ペプチドとの類似性を指標として、シリカ蓄積に関与するタンパク質の候補を探索し、孢子殻に存在するタンパク質のひとつである CotB1 の C 末端中に珪藻のシラフィンと類似性を示す領域が存在することを発見した。さらに、その下流にはアルギニン残基が豊富な塩基性領域が存在した。遺伝子破壊や相補性試験による解析の結果、CotB1 がシリカ蓄積に関与していることを実証した。また、シリカ蓄積には、C 末端に存在するシラフィン様領域と塩基性領域が必須であることを明らかにした。</p>			

第三章では、CotB1 タンパク質の機能解析を行い、全長の CotB1 ならびに C 末端の 14 残基の塩基性領域がシリカに対して高い親和性を示すことを見出した。さらに、この性質を利用することで、簡便かつ低コストのタンパク質アフィニティー精製法を開発した。任意のタンパク質に CotB1 の塩基性領域を遺伝子工学的に融合することで、シリカ結合能を付与できる。換言すれば、CotB1 の塩基性領域はシリカに結合するタグ配列として機能するため、本領域を CotB1p タグと命名した。CotB1p タグを目的タンパク質の N 末端に付加する際に、タグの下流に SUMO プロテアーゼの認識配列を挿入したタンパク質を作製した。本融合タンパク質を発現した大腸菌の菌体破砕液と市販のシリカ粒子を混合することで、CotB1p を介して目的タンパク質をシリカ粒子に結合させた。そこに SUMO プロテアーゼを作用させることで、目的タンパク質のみを遊離させ、高純度・高収率で精製する手法を確立した。

第四章では、CotB1p タグをさらに発展させ、タグのサイズを 7 残基まで縮小化することに成功したとともに、より低コストのアフィニティー精製法を開発した。CotB1p タグ中のアミノ酸配列のうちシリカ結合に重要な残基の同定を行い、7 残基まで配列を縮小してもシリカへの親和性を維持できることを見出した。この 7 残基の配列を SB7 タグと命名した。SB7 タグは、現在アフィニティー精製に最も広く利用されている His-tag (6~10 残基) に匹敵するサイズである。さらに、シリカとの結合には SB7 タグ配列中に存在する 3 つのアルギニン残基が重要な役割を果たすことを明らかにした。この知見を基に、フリーの L-アルギニンを加えることで、シリカに結合した SB7 タグ融合タンパク質を競合的にシリカから解離させることが可能であることを見出した。結合・洗浄・解離の条件を最適化することで、目的タンパク質を高純度・高収率で精製する手法を確立した。さらに、合成された純粋なシリカ粒子だけでなく、天然のシリカ含有鉱物であるシラス粒子を担体として、目的タンパク質を精製できることを実証した。天然鉱物を担体として利用することで、既存技術に比べ非常に低コストのアフィニティー精製法を確立することができた。第五章では本論文の結論について述べた。

以上、本博士論文の著者は、細菌のシリカ蓄積メカニズムを明らかにするとともに、得られた知見を応用してシリカを担体とした新規のアフィニティー精製法を確立した。これらの技術は、従来のバイオテクノロジー分野に資するだけでなく、シリカ材料技術や半導体技術とバイオテクノロジーの融合領域の進展に大きく貢献すると期待される。よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに値するものと認める。