

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 農 学 ）	氏名	石 田 洋 二 郎
学位授与の要件	学位規則第4条第1・②項該当		
論 文 題 目			
Genetic engineering of <i>Escherichia coli</i> for protein production for functional and NMR structural study (タンパク質の機能解析, NMR 構造解析への遺伝子改変を用いた大腸菌発現系の構築)			
論文審査担当者			
主 査	教授	島本 整	
審査委員	教授	中野 宏幸	
審査委員	教授	三本木 至宏	
審査委員	准教授	矢中 規之	
審査委員	准教授	成谷 宏文	
審査委員	准教授	玉井 栄治 (松山大学)	
〔論文審査の要旨〕			
<p>大腸菌やさまざまな細菌においてトキシン-アンチトキシン (TA) システムが発見され、解析されている。トキシンは通常対応するアンチトキシンによってその活性が抑えられているが、細胞内の環境変化によってアンチトキシンが減少するとトキシンが活性化する。その結果、細菌の増殖を抑制し、場合によっては死に至らしめる。大腸菌の MazF は、トキシンの1つとして知られており、ACA 特異的エンドリボヌクレアーゼの活性を有する。</p> <p>本論文は序論、本編3章、総括の5章で構成されている。序論では、トキシン-アンチトキシンシステム、SPP システム、タンパク質のタグなど、本研究の背景と目的が述べられている。トキシンである MazF タンパク質が発現すると大腸菌の mRNA に含まれる ACA 配列が切断されるため、タンパク質の合成が停止し、大腸菌の増殖が抑制される。しかし、標的タンパク質の mRNA が ACA を含まないようにデザインすることによって、MazF を発現する大腸菌内で標的タンパク質のみを特異的に合成することが可能となる。このタンパク質発現系を Single-Protein Production (SPP) システムと命名し、さまざまなタンパク質の合成に利用してきた。SPP システムを利用すれば、通常大量合成が困難な膜タンパク質や抗菌性ペプチドなどの合成も可能である。</p> <p>また、総括では本論文で明らかにした結果についてさまざまな文献を引用しながら総合的な考察を加え、将来の展望をまとめている。</p>			

第1章では Protein S タグ (PST) と SPP システムを利用した抗菌性ペプチドの大腸菌内での生成についてまとめている。抗菌性ペプチドは抗生物質と異なり、耐性菌が生まれにくいことが知られていることから、薬剤耐性菌への応用などが期待されている。しかし、遺伝子組換えによる細菌内での合成は困難であるため、通常は化学合成で生産されることが多いが、コストがかかってしまう欠点があった。そこで、本研究では SPP システムと生成のためのタグである *Myxococcus xanthus* の Protein S を利用してウシの抗菌性ペプチドである Bac7 の大腸菌内での発現と精製を試みた。その結果、大腸菌内で PST-Bac7 の大量発現に成功し、得られた Bac7 を含む融合タンパク質は抗菌ペプチドとしての活性を有していることを明らかにした。

第2章では SPP システムを利用して、有毒なアルギニンアナログであるカナバニンをタンパク質に取り込ませ、酵素タンパク質の基質特異性を変化させる研究についてまとめている。本研究では、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) における MazF のホモログである MazFbs のアルギニン残基をカナバニンで置換し、エンドリボヌクレアーゼ活性の変化を調べた。その結果、有毒なアルギニンアナログであるカナバニンは、通常細菌内でタンパク質合成に利用されることはないが、SPP システムを利用することによって MazFbs に取り込ませることができた。また、通常 MazFbs では UACAU を認識して切断するが、得られたタンパク質 MazFbs(can)は、認識配列が UACAUA に変化していることが明らかになった。この結果は、有毒なアミノ酸アナログを取り込ませることによる RNA 制限酵素の認識配列を変化させることに成功した最初の例である。

第3章では大腸菌の栄養要求株を利用して効率的にタンパク質を標識し、NMR による構造解析に応用する研究についてまとめている。通常、NMR によってタンパク質の構造解析を行う場合、分子量が大きくなると (> 20 kDa), ^2H によるラベリングが必要となる。さらに分子量が大きくなると (> 80 kDa), タンパク質を立体特異的に標識可能な Stereo Array Isotope Labeling (SAIL) アミノ酸を用いる必要が生じる。しかし、SAIL アミノ酸は極めて高価であるため、NMR 解析の目的では普及していない。そこで、本研究では、大腸菌のさまざまな栄養要求株を構築し、SAIL アミノ酸を効率的にタンパク質に取り込ませ、SAIL アミノ酸の使用量を 10%まで低下させることに成功した。また、その他の標識化合物についても使用量を 10%程度にまで低下させることができた。

本研究において、SPP システムを利用することによって、これまで大腸菌における生産と精製が困難であった抗菌性ペプチドの精製に成功し、エンドリボヌクレアーゼの機能改変に成功した。また、大腸菌の変異株を効率的に利用することによって、NMR で解析可能な標識化合物の効率的な取り込みに成功し、従来法と比較してコストの低減と解析精度の向上を行うことができた。以上の結果は、これからのタンパク質工学や高分子タンパク質の構造解析の分野に大いに貢献することが期待される。以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (農学) の学位を授与される十分な資格があると認められる。