

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	河 合 総 一 郎
論文題目	Development of low-temperature protein production systems by using cold-adapted bacteria, <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 and <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> Sq02 (低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 と <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> Sq02 を用いた低温タンパク質生産システムの開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>組換えタンパク質生産システムは、タンパク質の構造・機能解析や有用物質生産などの応用分野で広く利用されている。しかし、常温で生育する生物を使用した従来のシステムでは、宿主の培養温度で変性するような熱安定性の低いタンパク質や、宿主に毒性を示す酵素活性を宿主の培養温度で保持するタンパク質の発現に困難が伴う場合が多い。低温で目的タンパク質を発現させることにより、熱安定性の低いタンパク質の変性を軽減し、酵素活性が宿主に毒性を示すタンパク質についてはその毒性を抑制できることが期待される。0℃付近で生育可能な低温菌は、そのような生産システムの宿主として有用と考えられるが、低温菌を宿主としたタンパク質生産システムについての報告例は少ない。本研究は、南極海水から分離された低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 および魚の腸管内容物から分離された低温菌 <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> Sq02 を宿主とする新たな低温タンパク質生産システムを開発したものであり、その内容は以下のように要約される。</p>			
1. 低温菌 <i>S. livingstonensis</i> Ac10 を宿主とした発現制御可能な低温タンパク質発現システムの開発			
<p>先行研究において開発された <i>S. livingstonensis</i> Ac10 を宿主とした異種タンパク質生産系が熱安定性の低いタンパク質の恒常的な生産に有用であることが示されている。しかし、従来利用されてきたプロモーターでは遺伝子の発現制御ができないため、低温下でも強い毒性を有するタンパク質などの高生産には利用が困難と考えられた。そこで、トリプトファン生合成に関与し、<i>trp</i> リプレッサーの制御を受けると考えられる <i>trp</i> オペロンのプロモーターを利用した、発現調節可能な低温タンパク質生産システムの開発を試みた。その結果、<i>trp</i> オペロン内の最も上流に位置する <i>trpE</i> の 5' 非翻訳領域から、L-Trp の添加による発現抑制が可能なプロモーター領域が得られ、これを利用した L-Trp 非含有培地における発現制御が可能な異種タンパク質低温生産系を構築することに成功した。大腸菌の <i>trp</i> リプレッサーに対して L-Trp の競合阻害剤として作用する 3-インドールアクリル酸の添加による L-Trp 含有培地における発現誘導が可能であることも示された。</p>			
2. タンパク質分泌生産能に優れた低温菌 <i>P. nigrifaciens</i> Sq02 の単離と特性解析			
タンパク質の分泌生産は、純度の高い組換えタンパク質を簡便に得る上で有効な手			

段である。分泌生産された目的タンパク質は遠心分離や濾過などの簡便な操作によって宿主細胞のタンパク質から分離可能であり、一般に細胞内生産と比べて容易に高純度の目的タンパク質を得ることができる。そこで、低温で利用可能なタンパク質分泌生産システムの開発を目的として、タンパク質分泌生産能に優れた低温菌の探索を行った。その結果、ハマチ (*Seriola quinqueradiata*) の腸管内容物から得られた菌株 (*Pseudoalteromonas nigrifaciens* Sq02) が、培養上清中に高純度の機能未知タンパク質 P320 を生産することが見出された。本菌を宿主とし、P320 の分泌システムを利用することで、高純度の異種タンパク質を低温で分泌生産するシステムの構築が可能になることが期待された。本菌の全ゲノム解析の結果、P320 遺伝子が、II 型タンパク質分泌装置 (T2SS) ホモログをコードする遺伝子クラスターに存在することが見出された。本クラスター中の T2SS ホモログをコードする遺伝子群を破壊すると P320 分泌能は失われた。本菌はこのクラスターとは別のゲノム領域に別の T2SS ホモログをコードする遺伝子クラスターを有するが、その遺伝子破壊は P320 の分泌能に影響しなかった。これらの結果から、P320 遺伝子含有遺伝子クラスターにコードされる T2SS 様輸送装置が、P320 の細胞外への輸送を担うことが示された。また、P320 遺伝子を破壊すると、本菌のバイオフィーム形成量が顕著に低下したことから、P320 は本菌のバイオフィーム形成に関与する細胞外タンパク質であることが示唆された。

3. 低温菌 *P. nigrifaciens* Sq02 を宿主とした異種タンパク質分泌生産システムの構築  
P320 遺伝子のプロモーターと P320 分泌機構を活用した異種タンパク質分泌生産システムの構築を試みた。P320 遺伝子のプロモーター領域である 5' 非翻訳領域 375 bp の下流に  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子や低温菌 *Desulfotalea psychrophila* DSM12343 由来の PepF、LAP、PepQ、BglA の遺伝子をそれぞれ融合したプラスミドを構築し、*P. nigrifaciens* Sq02 に導入した。その結果、既存の *S. livingstonensis* Ac10 を宿主とした生産系と比較して、LAP、PepQ、BglA について高い生産性が認められた。さらに、本プロモーターの制御下で、上記 4 種の低温菌由来タンパク質を P320 との融合タンパク質として発現したところ、各融合タンパク質は培養液上清に分泌された。P320 遺伝子破壊株を宿主とすることで、融合タンパク質が培養上清中にほぼ単一のタンパク質として分泌生産されることも示された。以上のように、*P. nigrifaciens* Sq02 のタンパク質分泌生産能を活用して高純度の異種タンパク質を分泌生産するシステムの構築に成功した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 38 字×36 行で作成し、合わせて、3,000 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し  
審査結果の要旨は日本語 500～2,000 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

組換えタンパク質生産システムは、タンパク質の構造・機能解析や有用物質生産などの応用分野に大きく貢献している。しかし、熱安定性の低いタンパク質や、宿主に毒性を示すタンパク質の高生産には困難が伴う場合が多い。タンパク質の低温生産システムでは、熱安定性の低いタンパク質の変性抑制や、毒性酵素の活性低下による毒性緩和が期待され、低温菌はその宿主として有用と考えられる。本論文は、南極海水から分離された低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 およびハマチ腸管内容物から分離された低温菌 *P. nigrifaciens* Sq02 を宿主とする新しい低温タンパク質生産システムを開発したものであり、評価すべき点として以下の 3 点が挙げられる。

1. *S. livingstonensis* Ac10 の *trp* オペロンのプロモーターを利用し、培地への L-Trp や 3-インドールアクリル酸の添加による発現制御が可能な低温タンパク質生産システムを構築した。
2. *P. nigrifaciens* Sq02 が、培養上清中にほぼ単一の分泌タンパク質として、バイオフィーム形成への関与が示唆されるタンパク質 P320 を生産することを見いだした。また、P320 遺伝子近傍の遺伝子群がコードする T2SS 様タンパク質分泌装置が P320 の分泌を担うことを示唆する結果を得た。
3. *P. nigrifaciens* Sq02 を宿主とし、P320 遺伝子プロモーターの制御下で異種タンパク質を生産する低温タンパク質生産システムを構築した。本システムが、低温菌 *D. psychrophila* DSM12343 由来の LAP、PepQ、BglA の生産において、既存の生産系よりも高い生産性を発揮することを示した。さらに、P320 と融合させることで目的タンパク質を分泌生産できることを示した。この際、P320 欠損株を宿主として用いることで、ほぼ単一の分泌タンパク質として、高純度の融合タンパク質を培養上清中に生産することにも成功した。

以上のように、本論文は、低温菌を宿主とした異種タンパク質生産システムについて、発現制御可能な生産系を構築するとともに、タンパク質分泌能に優れた新奇低温菌を用いた分泌生産系を開発したものであり、分子微生物科学、応用微生物学、発酵生理学、制御発酵学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年4月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）