（ 続紙 １ ）

京都大学	博士（　　農　学　　）	氏名	Chen Chen
論文題目	Studies on Selective Protein Loading onto Extracellular Membrane Vesicles of a Novel Cold-Adapted Bacterium, *Shewanella vesiculosa* HM13 （新奇低温菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 の細胞外膜小胞への選択的タンパク質輸送に関する研究）		

（論文内容の要旨）

細菌が分泌する細胞外膜小胞は、リン脂質や糖脂質、タンパク質、核酸といった多様な生体分子を構成分子ならびに内包分子とし、宿主や他菌体とのコミュニケーション、病原性因子の輸送、遺伝子の水平伝播などにおいて多様な生理的役割を担うことが知られている。一方で、細胞外膜小胞を利用したワクチン開発やドラッグデリバリー、細胞外膜小胞の表層に任意の酵素を呈示したナノリアクター開発などの応用が期待されている。本研究は、細胞外膜小胞の主要な積荷としてほぼ単一のタンパク質を分泌する低温菌を魚類腸管内容物から分離し、本菌のタンパク質選択的な細胞外膜小胞への輸送機構の解明および応用に取り組んだものであり、その内容は以下のように要約される。

１．細胞外膜小胞生産性に優れた低温菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 の単離と積荷タンパク質輸送機構の解析

熱安定性の低いタンパク質などの分泌高生産に有用な宿主細菌の取得を目的としてタンパク質分泌能に秀でた低温菌のスクリーニングを行い、アジの腸管内容物より新奇低温菌 *S. vesiculosa* HM13 を単離した。本菌は単一の主要分泌タンパク質として、培養上清中に機能未知タンパク質 P49 を生産した。培養上清をショ糖密度勾配遠心分離などで解析した結果、菌体表層から生産される膜小胞の積荷として P49 が分泌されていることが明らかとなった。近縁種に比べて本菌の膜小胞生産量は有意に高かったことから、純度の高い異種タンパク質を膜小胞の積荷として分泌生産するための宿主として本菌は有用と考えられた。P49 をコードする遺伝子は、グラム陰性細菌に広く分布する II 型タンパク質分泌装置 (T2SS) のサブユニットホモログをコードする遺伝子群の近傍に存在した。これらの T2SS サブユニットホモログのうち、外膜チャネルを形成する GspD2 をコードする遺伝子を破壊したところ、膜小胞画分から P49 が消失した。これらの結果から、P49 遺伝子近傍の遺伝子群がコードする T2SS 様輸送装置により P49 が細胞表層に輸送され、膜小胞に組み込まれることが示唆された。

２．*S. vesiculosa* HM13 を宿主とした異種タンパク質菌体内生産系の開発

S. vesiculosa HM13 を宿主とした異種タンパク質菌体内生産系の構築を目的として、P49 遺伝子のプロモーター領域を導入した高発現用プラスミドの作製を試みた。P49 遺伝子の 5′ 非翻訳領域にはプロモーターと推定される領域が複数存在したこと

から、それぞれの予測プロモーター領域を含む遺伝子断片を高宿主域プラスミドpJRD215 に導入し、緑色蛍光タンパク質 (eGFP) をレポーターとした評価系によって、異種タンパク質発現に利用可能なプロモーター領域を探索した。その結果、P49 遺伝子の 5′ 非翻訳領域 1 kbp の断片を用いた場合に eGFP の収量が最大となった。レポーター遺伝子として β-ラクタマーゼ遺伝子を導入し、各生育段階における β-ラクタマーゼ活性を測定した結果、対数増殖期において最大の比活性が認められた。以上のように、P49 遺伝子の 5′ 非翻訳領域を用いることで *S. vesiculosa* HM13 を宿主とした異種タンパク質生産が可能であることが示された。

３．細胞外膜小胞の積荷として異種タンパク質を発現させる分泌生産系の構築と膜小胞への輸送機構の解析

P49 の C 末端に eGFP を融合した融合タンパク質を *S. vesiculosa* HM13 を宿主として発現させ、その局在性を解析した。その結果、融合タンパク質が膜小胞に検出されたことから、異種タンパク質を膜小胞の積荷として分泌生産するためのキャリアとして P49 を利用できることが示された。P49 の二次構造予測から、本タンパク質の C 末側領域には疎水性アミノ酸残基に富んだ 2 つの膜貫通へリックス（H1、H2）の存在が予測された。これらの構造と P49 選択的な膜小胞への輸送の関連を解析するために、P49 の C 末側領域を段階的に欠損させた C 末側領域欠損型 P49 と eGFP の融合タンパク質について、膜小胞への局在性を解析した。その結果、H2 領域を含む C 末側領域を欠いた P49 融合型 eGFP は膜小胞画分から検出されず、細胞中の外膜画分に見出された。以上の結果から、P49 の C 末側領域に存在する H2 領域は外膜への輸送には要求されないが、それ以降の膜小胞への輸送に重要であることが示唆された。

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、４００～１，１００words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）

細菌が分泌生産する膜小胞は脂質二重層で囲まれたナノ粒子であり、細胞外における膜タンパク質の貯蔵場などとしての応用が期待されている。膜小胞をプラットフォームとしたタンパク質生産系を構築するためには、膜小胞生産性に優れた菌株の取得や、膜小胞へのタンパク質移行機構を明らかにすることが重要である。本論文は、そのような目的に適した細菌の取得と、当該菌株におけるタンパク質の膜小胞移行機構の解析、さらには膜小胞の積荷として外来タンパク質を生産するシステムの開発を行ったものであり、評価すべき点として以下の 4 点が挙げられる。

１． 膜小胞高生産性の新奇細菌 *S. vesiculosa* HM13 をアジ腸管内容物から分離し、この菌が作る膜小胞が単一の主要積荷タンパク質 P49 を含むことを見出した。膜小胞形成機構の解明や応用に有用な菌株を取得した成果として意義深い。

２． *S. vesiculosa* HM13 における P49 の膜小胞への移行機構を解析し、T2SS 様タンパク質分泌装置の関与を示唆する結果を得た。膜小胞へのタンパク質輸送の新しいメカニズムの一端を解明した成果として評価される。

３． P49 遺伝子のプロモーターを利用して、*S. vesiculosa* HM13 を宿主とした外来タンパク質の生産系を構築した。熱安定性の低いタンパク質などに適した生産系として注目される。

４． 膜小胞に外来タンパク質を輸送するためのキャリアとして P49 が利用可能であることを示すとともに、膜小胞への輸送に必要な P49 の領域を見出した。膜小胞の積荷として外来タンパク質を分泌生産する系を構築した成果として意義深い。

以上のように、本論文は、細胞外膜小胞生産性に優れた新奇細菌を取得し、本菌における膜小胞への選択的なタンパク質輸送に関与する因子を同定するとともに、外来タンパク質を膜小胞の積荷として分泌生産する手法を開発したものであり、分子微生物科学、応用微生物学、細胞生化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2月7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）