HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the overexpression of antimicrobial peptides in E. coli [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	冨澤, 聡
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12009号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59933
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Tomisawa_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏　名　　冨　澤　　聡

	主　査	准教授	相　沢　智　康
審査担当者	副　査	教　授	姚　　閔
	副　査	教　授	出　村　誠
	副　査	助　教	神　谷　昌　克

学 位 論 文 題 名

Studies on the overexpression of antimicrobial peptides in *E. coli*
（大腸菌を用いた抗菌ペプチドの大量生産に関する研究）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

抗菌ペプチドは、生体内で自然免疫の一部を担っており、多様な生物から発見されている。その多くが幅広い抗菌スペクトラムを保持しており、グラム陰性菌、陽性菌、真菌等の微生物に活性を示す。抗菌ペプチドの立体構造や活性発現メカニズム、抗菌ペプチドのターゲットである微生物膜との相互作用が注目され、研究が進められている。また、これらの研究や産業応用には、大量の抗菌ペプチドが必要になるため、その生産技術に注目が集まっている。

本論文では、生産技術として、遺伝子組換え法による大腸菌を宿主とした手法を選択し、抗菌ペプチドの大量発現法に関する研究を進めている。

遺伝子組換え法により抗菌ペプチドを単独で発現させた際には、その宿主に対する毒性や、宿主由来のプロテアーゼによる分解という問題が生じる例が多く知られる。そのため、抗菌ペプチドを不活性で安定な封入体として発現させる方法がしばしば用いられる。しかし、抗菌ペプチドは凝集傾向が低いため、封入体を形成しにくく、その形成を制御することは困難である。そこで、本論文では、抗菌ペプチドと同時に封入体形成能の高いタンパク質をパートナータンパク質として共発現させることにより、抗菌ペプチドの封入体化を促進し、その毒性や分解といった問題を回避する手法について研究を進めている。

まず本論文では、モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* 由来の抗菌ペプチド ABF-2（antibacterial factor-2）をターゲットとし、パートナータンパク質との共発現により、ABF-2

の発現量増強の効果について検討を行っている。また、電荷の異なる相同性の高いタンパク質をパートナーとして選択し、パートナータンパク質の電荷がターゲットの封入体形成に与える影響の詳細な検討を行っている。その結果、塩基性ターゲットである ABF-2 の発現量は酸性のパートナーによって最も増強され、中性のパートナーでは若干増強されるが、塩基性のパートナーではほとんど効果がないことを見出している。この結果は、ターゲットとパートナーの間に働く相互作用の一つを解明したという点で意義深い。さらに、発現量の増強が確認されたパートナーを用いて効率的に ABF-2 を精製する手法について検討を進め、活性を有する ABF-2 の生産に加え、NMR 法での解析に有用な安定同位体標識試料の調製にも成功している。

次にこの共発現による抗菌ペプチドの生産法をマウス由来の α-defensin である Crp4（cryptdin-4）にも応用し、その大量生産を試みている。Crp4 においても、封入体形成能の高いタンパク質の共発現により、効率的な生産が可能となることを見出している。また、さらなる収量の増加を目指して Crp4 のリフォールディング時の変性剤濃度の検討や変異導入によるパートナータンパク質の改変を行い、封入体の可溶化時に効率よく Crp4 をリフォールディングさせることで、従来法の 2 倍以上の収量を得て、安定同位体標識した Crp4 の調製にも成功している。これらの成果により、共発現により封入体化を促進する手法が、抗菌ペプチドの生産に汎用的に応用可能であることを証明している。

さらに本論文では、ペプチドの検出技術についても検討をおこなっている。Western blotting 法による検出の際に抗菌ペプチドのような低分子量のペプチドでは、検出に用いる膜からの剥離が問題となることが知られているが、この回避に吸引式反応システムを利用することが有用であることを見出し、抗菌ペプチド等の検出への応用が効果的であることを明らかにしている。

以上のように著者は、遺伝子組換え法を用いた抗菌ペプチドの生産技術とその関連の研究において、十分に深い知見を得ることに成功し、該当分野での研究発展に寄与したと言える。よって著者は，北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。