HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Construction of the over-expression system of cysteine-rich plant antimicrobial peptide snakin-1 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	KUDDUS, MD. RUHUL
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12885号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67408
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	MD.RUHUL_KUDDUS_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　　MD. RUHUL KUDDUS

	主　査	准教授	相　沢　智　康
審査担当者	副　査	教　授	出　村　誠
	副　査	教　授	芳　賀　永
	副　査	講　師	菊　川　峰　志

学 位 論 文 題 名

Construction of the over-expression system of cysteine-rich plant antimicrobial peptide snakin-1
（植物由来システインリッチ抗菌ペプチド snakin-1 の大量発現系の構築）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

生体内で自然免疫において重要な働きを担う抗菌ペプチドは、きわめて多様な生物から発見されており、その多くが幅広い抗菌スペクトラムを保持している。抗菌ペプチドの作用機構には未知の点が多く残されており、立体構造解析やそのターゲットである微生物膜との相互作用などの研究が精力的に進められている。また、これらの研究や種々の産業応用には、大量の抗菌ペプチドの生産が重要となるため、その生産技術に関する研究も盛んに進められている。

本論文では、植物由来でジスルフィド結合に富んでいることが特徴であるジャガイモ由来の抗菌ペプチド snakin-1 (SN-1)の生産技術として、遺伝子組換え法による大腸菌および酵母を宿主とした生産方法を検討している。

まず、大腸菌を宿主とした抗菌ペプチドの発現系において問題となる、宿主に対する毒性や、宿主由来のプロテアーゼによる発現ペプチドの分解に対する解決法として、近年報告された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、抗菌ペプチドの封入体化を促進する技術の利用を試みている。その結果、SN-1 遺伝子を単独で発現させた場合と比較して、封入体との共発現で発現量の増加が確認され、高収量の SN-1 を得ることに成功している。粗精製、巻き戻しの後、最終精製を行った試料に対して、質量分析、核磁気共鳴法による解析、活性測定などを行い、天然から得られた SN-1 と同等の試料を得たことを確認している。

次に、さらに効率的に SN-1 を生産する技術を検討するため、メタノール資化酵母を宿主とした、発現技術の検討に取り組んでいる。本論文で用いた酵母はメタノールで誘導される強力なプロモータを有していることを利用し、高効率での生産を試みている。加えて、分泌型で発現を行うことで、天然と同等の立体構造に巻き戻ったペプチドの生産に成功しており、その収量も培地 1L 当たり 40mg を超えるもので極めて効率的といえる。得られた大量のペプチド試料を用い、蛍光試薬を用いた膜作用メカニズムの解析実験や血球細胞に対する毒性の検討も進め、SN-1 が膜破壊型で抗菌作用を発揮することや血球細胞に対する毒性が低いことなど、新規の知見を得ることにも成功している。

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 SN-1 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。