

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 二井 一樹

進化分子工学的手法は、既存の分子デザインに囚われない蛋白質の新しい機能や構造を、デノボで創出する大きな潜在能力を持つが、ほとんどの場合は既存蛋白質の性質改良に留まっている。tRNA や rRNA を切断する大腸菌の RNase 型コリシンは、特異的阻害蛋白質をもつ生産菌によって作られ、それを持たない大腸菌に侵入し効率的にこれを殺す。このコリシンの殺菌活性の高さは、阻害蛋白質の性能と共進化することによって獲得されたものである。本研究はこの選択性の高さと共進化を利用して、コリシン E5 の作用を抑える蛋白質を、無関係な素材から進化分子工学的に創出するモデル実験系に挑戦したものである。

現在のコリシンは 1 分子で細胞を殺せるほど活性が高く、それを抑える阻害蛋白質にも高い特異性が要求されるので、それに匹敵する機能を無関係な蛋白質素材から直接得ることは確率的に不可能である。しかし現実の進化の初期段階では、限られた素材の中で、低い性能の RNase と低い性能の結合蛋白質の組合せから始まり、互いに一方の活性上昇が他方の活性上昇を招くことにより共進化的に性能を向上させていったと考えられる。本研究ではこの仕組みを進化分子工学に取り入れ、敢えて低活性コリシンを最初に用いることで、限られた遺伝子素材の中から、コリシン作用を抑えることのできる蛋白質遺伝子をスクリーニングし、次いでその性能を共進化的に段階的に向上させようと試みている。

第 1 章では、コリシン E5 の触媒中心を変異させた低活性型変異体 E5K60Q に対して、多コピーで耐性を与える *Sau*BAI DNA 断片を大腸菌ゲノムからスクリーニングし、6 種類の異なる DNA 領域を得ている。その中にはコリシン E5 の最適基質である tRNA^{Tyr} をコードする DNA が含まれており、標的を増やして致死を回避するものであった。これは野生型コリシンに対しては依然感受性を示したので、低活性型コリシンを使用することにより、コリシン耐性選択の閾値を実際に下げていたことが示唆された。

第 2 章では、低活性型 E5K60Q に対する耐性を与える原因が、DNA 断片のコードする蛋白質によると判断された 3 種類のクローンの性質を調べている。コリシン耐性の原因としては RNase 活性の阻害以外に、コリシンの細胞表層受容体への結合や膜透過を阻止している可能性が考えられる。その可能性を除くため、受容体結合と膜透過に必要なドメインを E5 と共有し RNase ドメインだけが E5 と異なる、コリシン E3 の低活性化型を用意してこれに対する感受性を調べ、3 クローンのうちの 1 つがコリシン E5 系に特異的に耐性であることを見出した。これは 2 つの *Sau*BAI 断片が繋がることで誕生した融合蛋白質 TatA-RecN が E5K60Q 耐性を与えていることが判ったが、野生型 E5 には耐性を示さないため、いまだ性能の低い E5 耐性蛋白質であることが推定された。

第 3 章では、この TatA-RecN を進化させて耐性機能を高める試みを行っている。まず、殺菌活性が E5K60Q より強く野生型よりは弱い中程度活性のコリシン変異体 E5I94M を用意し、TatA-RecN コード領域にランダム変異を導入して、E5I94M にも耐性を示すようになった TatA-RecN の変異体 (1) を得た。(1) は終止コドンの出現で 292 残基から 52 残基に短縮されていたほか、点変異を含んでいた。(1) は野生型 E5 には依然感受性を示したので、性能をさらに上げるべく、(1) のコード領域に再度ランダム変異を導入して、野生型 コリシン E5 にも耐性を示す (1) の点変異体、(2) と (3) を分離した。

第 4 章では、TatA-RecN とその 3 種の変異体の示す、E5K60Q、E5I94M、及び野生型 E5 に対する耐性を分析している。まず TatA-RecN の由来する、TatA とその N 末端領域、及び RecN とその C 末端領域の性質を調べ、E5K60Q 耐性には TatA-RecN 融合が必要であることを示した。更にその N 末端 52 残基の短縮形は、TatA-RecN と同様に E5K60Q 耐性を示したが、(1) のような E5I94M 耐性は示さなかった。従って、融合体の N 末端 52 残基が E5K60Q 耐性には必要十分で、さらに (1) ~ (3) の点変異がその機能を向上させたと推定された。これらは N 末端 20 残基が疎水性、残りが親水性で、いずれの領域も単独では耐性を与えなかったため、イオンチャンネル型コリシンの生産菌が作る耐性蛋白質のように、膜結合蛋白質としてコリシン E5 を選択的に阻害していると推定された。これらはコリシン E5 に備わる阻害蛋白質のような、化学量論的に結合する可溶性蛋白質ではなかったが、それと同等の特異的な E5 耐性機能を、まったく無関係の素材から創出することに成功した。

以上本論文は、共進化を模倣した段階的進化分子工学的手法によって、生理的に無関係な素材からコリシン E5 に対する耐性蛋白質を獲得することで、多様性の小さい蛋白質集団から希望の蛋白質機能を進化分子工学的に獲得する新しい方法の有用性を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値のあるものと認めた。