

論文内容の要旨

申請者氏名 北川 正成

過去半世紀以上に渡って、大腸菌は遺伝学、生化学、分子生物学的な研究の好材料として研究され、膨大な意義深いデータの蓄積を我々に与えてくれた。

この大腸菌の代表的な実験株である K12 株のゲノムには、その全塩基配列から、約 4,300 個のタンパク質をコードする遺伝子が存在していると推定されている。

大腸菌はこれらの遺伝子群により単細胞原核生物としてこの地球上に生き続けているわけだが、「どのようにこれらの遺伝子を使って生き抜いているのか?」、「各遺伝子の役割は何か?」という疑問に対して、答にもっとも近いモデル生物の一種が大腸菌であり、ゲノム研究がポストゲノム解析の時代へと進んだ今、システムバイオロジーの分野においても、最適な材料を提供してくれる価値のある生物であり、ひとつの生命体としての総合理解にもっとも近い生物であることは間違いない。

本研究では、日本のグループがゲノム配列解析を行った大腸菌 K12 株の派生株 W3110 のゲノム配列をもとに予測された遺伝子のタンパク質コード領域 4,276 個の Open reading frame(ORF)をクローン作製の対象として、独自に工夫を施した発現ベクター pCA24N プラスミドを用いて、His タグと蛍光タンパク質 Green fluorescent protein(GFP)の両者に方向性と読み枠を考慮して各 ORF をクローニングしたセットを作製した。

また、これを材料にして、

- ・ DNA マイクロアレイの実用化に際し、鋳型調製の材料として活用されていること。
- ・ GFP との融合タンパク質の観察から、各タンパク質の細胞内での局在性解析の材料として実用可能であること。
- ・ His タグを利用して、網羅的にタンパク質の精製が可能であること。
- ・ レアな認識配列酵素である制限酵素 *Sfi*I によって方向性と読み枠を保持したままに容易にサブクローン化して、さまざまな目的の機能解析に供することができること。

を示した。

大腸菌では、いくつかの遺伝子についてマルチコピープラスミドへのクローン化が困難な遺伝子も知られているが、このベクターシステムは非常に厳しく発現の抑制ができていたため、対象とした 4,276 個の ORF のうち、4,267 個の ORF についてクローン化に成功した。中には、発現方向に対して正方向のクローンが得られず、逆向きのクローンしか得ることができなかったものが 3 個あった。なお、本研究の範囲で PCR による全長の増幅ができなかったものが 6 個あった。

また、各クローンプラスミドを持つ菌の Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside 存在下での増殖チェックによって、融合タンパク質の過剰発現が宿主菌の生育に与える影響を調べた

ところ、全体の 51%は GFP 融合タンパク質の発現によりコロニー形成の著しい阻害がみられ、28%の中にも若干の生育阻害が観察されるものがあった。特に膜タンパク質あるいは膜貫通領域を持つと推定された 1,158 個のうちの 1,032 個の ORF において、著しい生育阻害が見られたことは興味深いことである。

このクローンセットは、大腸菌の遺伝子機能の解析にとって格好の材料であり、すでに多くの研究者によって、さまざまな目的に活用されているが、今後もシステムバイオロジーにおけるきわめて有用な実験材料として、さらなる活用が期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 北川 正成

ポストゲノム研究およびシステム生物学における研究材料等のリソースの重要性は明らかである。特に出芽酵母における遺伝子クローンや遺伝子欠失株の作製が、ポストゲノム研究およびシステム生物学の急速な発展をうながした。

本論文は 1997 年 1 月に本学において 1 本につなげられた大腸菌 W3110 株の全予測遺伝子クローンライブラリーの作製、および同ライブラリーを利用した網羅的な解析をまとめたものである。現在、同ライブラリーは国内外のポストゲノム研究における極めて有用なリソースとなっている。

本研究では、ライブラリー構築に先立ち、ポストゲノム研究における研究の方向性を吟味し、その目的に活用可能なライブラリー構築のためのベクターを開発した。当面の研究目標として、1) DNA マイクロアレイ開発、2) 網羅的なタンパク質相互作用解析、3) 目的タンパク質の精製および抗体作製、4) タンパク質の細胞内局在性、への活用を想定し、開発を行った。pCA24N と名付けたベクターは、1) His タグの融合による簡便なタンパク質精製、2) GFP レポーター遺伝子融合による蛍光強度解析の可能性、3) クローン化断片の簡便な移動、4) 新規目的のための flexibility、等を目指して開発された。

次に、予測遺伝子の開始コドンと終止コドンを除いた領域を PCR で全て増幅し、pCA24N ベクターを用いてライブラリー構築を行った。さらに、ライブラリーに含まれる全クローンを対象に、各クローンが有する性質を IPTG による発現誘導、および GFP による蛍光強度で解析し、その情報と各遺伝子の機能分類との相関の解析を行った。その後、本ライブラリーを活用し、当初の予定通り、網羅的なタンパク質相互作用解析、DNA マイクロアレイ開発およびその解析、細胞内タンパク質局在性の解析が進められ、その一部も紹介されている。

以上の研究開発は、ポストゲノム研究およびシステム生物学において、大腸菌を用いることを可能にし、これまで出芽酵母で先行していたシステム生物学において、最も研究蓄積の多い生物の 1 種である大腸菌を重要な対象生物にできたことは、学術上の大きな貢献である。よって、審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。