

論文内容の要旨

申請者氏名 Yong Han Tek

遺伝的ネットワークを同定するための合成致死解析の歴史は古い。一つの変異に対して、別の変異を組合せることによる致死性あるいは生育の回復を見せる遺伝子の組合せを調べ、遺伝子間の生理的相互関係を解析する手法である。ポストゲノム研究開発の成果で、多くのモデル生物におけるリソースの開発が進み、大腸菌においても全遺伝子欠失株ライブラリーの整備が、申請者の所属する研究室を中心に行われた。酵母においても、国際協力の基、多くの網羅的実験リソースが確立されている。これらのリソースを活用し、酵母および大腸菌において、2種類の遺伝子欠失を接合により組合せ、網羅的な遺伝的ネットワーク解析が進んでいる。しかし、それらの必須遺伝子は、そもそも欠失株を取ることが不可能なため、その解析は非必須遺伝子に限られているのが現状である。

そこで、申請者は、必須遺伝子を対象とした網羅的な遺伝的ネットワーク解析を可能にする方法論とリソースの開発を行い、その実証研究を進めた。

まず、必須遺伝子の相補下で、染色体上の同遺伝子を完全に欠失するためのベクターの開発を行った。相補を行うツールとして、F plasmid の複製起点、接合による移動起点、発現誘導可能なプロモーターを組合せたベクター(pFE604T)の開発を行った。本ベクターは、F plasmid の複製起点による複製制御がかかるため、細胞あたり1コピーと非常に低コピーである。もともとの安定分配に関わる遺伝子を保持するため、低コピーであるにも関わらず非常に安定である性質を持つ。接合時に受容菌側へ移動させるために、F plasmid 由来の *oriT* 領域を持たせた。これにより、Hfr 株に本プラスミドを持たせることで、接合時に移動することを可能にした。2種類の欠失株は、Km および Cm 耐性を持たせていることから、ベクターには Tc および Gentamycin 耐性を持たせている。このベクターに、*dnaN*(DNA複製)、*ftsW*(細胞分裂)、*trmD*(tRNA修飾)、そして機能未知遺伝子の *yjgP* と *yrfF* の5必須遺伝子をクローン化し、IPTGによる発現誘導能の解析を行った。IPTG存在下で、Wanner法と呼ばれる、lambda RED組換え酵素を利用した方法で、対象の必須遺伝子の染色体上からの欠失を行った。その後、欠失株がIPTG濃度に依存した生育を示すことを確認している。

得られた必須遺伝子欠失株を、すでに公開をしているCIPというHfr化ツールを用いて、必須遺伝子欠失株のHfr化を行い、非必須遺伝子欠失株ライブラリーと接合により、2重化を行う。相補プラスミドの受容菌側への移動の条件検討、接合による2重欠失化の条件検討を行った。

評価実験は、上記5必須遺伝子をテストケースとして、全非必須遺伝子欠失株ライブラリー(約3800株)とを接合により2重欠失化を行い、必須遺伝子と非必須遺伝子とのシステムティックな相互作用解析を進めた。その結果、予想外の機能間での相互作用も観察され、今後の実験的確認も必要であるが、モデル生物である大腸菌を用いた必須遺伝子生理機能ネットワーク解析に新たな道を開いた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Yong Han Tek

大腸菌は、モデル生物として、過去 60 年以上にわたる研究の蓄積があり、地球上でもっとも解析の進んだ生物の 1 種である。ゲノム研究が進み、システム生物学が進展する中、再びシステムとして生命を理解しようとする新しい生物学においても、その知識の蓄積量の多さ、多様な解析手法、網羅的な実験リソースの充実から、非常に重要なモデル生物となってきている。一方、必須遺伝子は、生命にとって非常に重要な遺伝子群であるが、その必須性から、網羅的なリソース開発が遅れていた。

そこで、申請者は、必須遺伝子群を網羅的にクローン化し、その相補下で染色体上の必須遺伝子を欠失する方法の開発を行った。申請者の所属する研究室では、システムティックな 2 重欠失株作製を用いた遺伝的ネットワーク解析を進めており、生理学的に非常に重要な知見の蓄積が進んでいる。申請者は、必須遺伝子欠失株においても、全非必須遺伝子欠失株ライブラリーとの接合による 2 重欠失株作製方法の確立を行い、必須遺伝子群の生理機能ネットワーク解析への道筋をつけた。申請者が開発を行った方法を用いて、実際に 5 必須遺伝子を用いた評価実験を行った結果、予想外の機能相互作用も観察され、今後の実験検証は必要ではあるものの、これまで不可能であった全必須遺伝子欠失株を用いた大規模細胞内機能ネットワーク解析への道を切り開いた功績は大きい。

以上のように、本論文は、大腸菌必須遺伝子の細胞内生理機能ネットワーク解明を目的に、必須遺伝子を網羅的に破壊する方法論の開発を行い、接合による全非必須遺伝子との高効率 2 重欠失株作製方法の確立を行った物である。大腸菌は、現在においても非常に重要な生産菌であるだけでなく、システム生物学においても非常に重要なモデル生物であり、網羅的な必須遺伝子機能ネットワーク解析方法の開発は、学術的にも、また工業生産、医療等への応用にも大きなインパクトを与える物である。以上のように、本論文はこれまで不可能であった必須遺伝子群の網羅的な遺伝的ネットワーク解析を可能にする方法論の開発であり、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（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。