

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石田 真巳

ゲノム DNA の GC 含量が偏っている生物には、好熱菌、放線菌、古細菌、根粒菌などの有用微生物や、結核菌やハンセン病菌などの病原微生物が含まれている。これらの微生物由来の遺伝子は組換え体大腸菌での発現効率がしばしば低い。従来、低発現の原因はコードン使用頻度の違いや mRNA の二次構造形成のためとされていたが反例は多い。しかし他の原因が報告されている訳ではなく一般的な原因は不明である。申請者は、この低発現の原因を解明し、一般的な改善方法を得ることを目的として研究を行った。

第 1 章（序論）では、GC 含量が偏っている生物や大腸菌における遺伝子発現についてこれまでの知見をまとめ、本研究の目的を述べている。第 2 章では、ゲノムが GC-リッチな高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の *leuB* 遺伝子を主な実験材料として、大腸菌内発現効率に影響する遺伝子構造を検討している。発現効率が良い組換えプラスミド上の *leuB* 遺伝子には、5' 非コード領域に leader open reading frame (leader ORF) と名付けた別の ORF を生じていることを発見した。leader ORF の開始コドンを破壊したり、leader ORF の終点を *leuB*-開始コドンより下流に置いたり、leader ORF を *leuB* の下流に配置したりすると *leuB* 遺伝子は発現しなくなった。翻訳開始に阻害的に働く mRNA の二次構造を破壊するよりも leader ORF を導入する方が *leuB* 遺伝子の発現向上には遙かに効果的だった。また、クローン化した *T. thermophilus trpBA* 遺伝子の発現も leader ORF によって向上した。さらに、*cat* 遺伝子をレポーターとする分析や、リアルタイム定量 PCR による mRNA の直接定量を行った結果、*leuB* 遺伝子の転写量は翻訳産物の量に直接反映されないことが判明した。これらの結果から、好熱菌遺伝子は大腸菌での翻訳開始効率が低く、leader ORF には好熱菌 ORF の翻訳開始効率を上げる作用があると判断された。

第 3 章では、*T. thermophilus* 由来 *polA* 遺伝子、及び天然の遺伝子クラスターである同菌由来 *trpBA* 遺伝子を試料として、発現効率を上げる leader ORF の詳細な構造を検討している。leader ORF と *polA*-ORF の間隔を数塩基以上開けることよりも、1 塩基重複または 4 塩基重複させる方が好熱菌遺伝子の発現効率が増加したことから、これらの重複が翻訳カップリング効率を向上させると推定した。*trpBA* 遺伝子領域に重複型 leader ORF を導入した場合、*trpB* 遺伝子は高効率で発現したが *trpA* 遺伝子はその数%しか発現しなかった。そこで、leader ORF と *trpA* の重複部周辺の塩基配列を様々に変異させて *trpA* 遺伝子の発現効率への影響を調べた。それらの結果から、好熱菌 ORF の翻訳効率を上げる効果が大きい leader ORF として、(1) 前半部分を *lacZ* 等大腸菌での翻訳開始効率が高い遺伝子と同じ配列にし、(2) 内部に AGG を含むリボソーム結合配列を置き、(3) 後半部分の AT 含量を高くし、(4) 終点を下流 ORF と 1 塩基または 4 塩基重複させる、という設計を提案した。

第4章及び第5章では、第3章で得られた設計の重複型 leader ORF を好熱菌タンパク質の大量生産に適用している。*T. thermophilus* 由来の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素、ホスホフルクトキナーゼ1、V₁-ATPase A サブユニット、及び、V₁-ATPase B サブユニットの大腸菌での生産を試みた。その結果、この4種とも本方法によって効率よく生産されることが実証された。続いて、ゲノムがAT-リッチな超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の *trpBA* 遺伝子がコードするトリプトファン合成酵素サブユニットに同方法を適用した。その結果、両遺伝子からの生産量が上がり、特に *trpB* 遺伝子からの生産量は leader ORF の導入により12倍以上に上がった。このことから、GCリッチ遺伝子のみでなく広範な遺伝子において大腸菌内の翻訳開始効率の低いものがあり、そのような遺伝子の発現効率は、重複型 leader ORF の導入によって改善されうると推定された。また、これらの適用例を通じて、pUC系などの汎用ベクターを用いる簡便な重複型 leader ORF の導入方法を提案し、さらに適用範囲を広げるための発現ベクタープラスミドを試作した。第6章（総括）では、本研究で得られた新知見をまとめ、研究の展望を述べている。

以上本論文は、これまで発現効率の低い原因が分からなかったGCリッチあるいはATリッチ遺伝子の大腸菌内発現では、翻訳開始効率が重要なネックになっていることを示し、その改善方法として重複型 leader ORF の有効性を実証し、さらに必要な構造を導入する簡便法の提案や発現ベクター作製に及んだもので、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あるものと認めた。