

氏名(本籍)	たか やま ごう 高山 剛 (千葉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第3539号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	<i>Thermus thermophilus</i> のベクターの改良と異種遺伝子の効率的発現

主査	筑波大学教授	農学博士	星野 貴行
副査	筑波大学教授	農学博士	内山 裕夫
副査	筑波大学助教授	農学博士	中村 顕
副査	筑波大学教授	農学博士	酒井 慎吾

論文の内容の要旨

好熱菌や超好熱菌の蛋白質は安定であり、室温での蛋白質精製が可能である。耐熱性蛋白質は多くの産業の効率化に貢献してくれるばかりか、蛋白質の安定化機構に対する情報を与えてくれる。また、安定性が高いために、結晶化も容易であり、蛋白質の立体構造解析にも役立っている。好熱菌や超好熱菌の遺伝子産物を大量に取得するためには、大腸菌を宿主とした発現系が主に利用されているが、好熱性の蛋白質は常温生物の大腸菌で発現させた際に、温度の関係でしばしば天然構造をとらないことがある。また、全く発現が見られない蛋白質も存在する。好熱菌や超好熱菌の生育温度と同じか、それに近い 80℃ 以上でも培養できる *Thermus thermophilus* の宿主・ベクター系を用いれば、従来の常温生物を宿主とした発現系で発現できないような蛋白質を効率的に発現できる可能性がある。

本研究は、上記の観点から、大腸菌などの常温生物では発現が困難な超好熱菌および好熱菌に由来する有用酵素の遺伝子を、高度好熱菌 *T. thermophilus* の宿主・ベクター系で効率的に発現させるために行われた。

最初に、超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 株由来の数種の遺伝子を、従来の発現ベクター pTEV131 に導入して *T. thermophilus* HB27 での発現を試みた。用いた PH0655, PH0835 と PH1593 遺伝子は、それぞれ、トレオニンデヒドロゲナーゼ、 α -マンノシダーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードしていると推定されていたものである。これらの遺伝子は、大腸菌の pET 系を用いて IPTG 誘導で発現が試みられ、PH0835 以外は、SDS-PAGE で発現が確認されていた。pTEV131 を用いて、*T. thermophilus* でこれら3種の遺伝子全ての発現が確認できた。大腸菌で発現が見られなかった PH0835 も微量ではあるが活性が確認できた。しかしながら、PH0655 と PH1593 の遺伝子の発現レベルは、大腸菌の pET 系で IPTG 誘導発現させた場合と比較して低い値であった。

そこでより発現量を増大させようとして、①プロモーターをより強力なものに置換する。②プラスミドのコピー数を上昇する。の2点を検討した。

発現ベクター pTEV131 のプロモーターを、より強力なもの (P214, P31, Pslp) に置換したベクターを作製して *P. horikoshii* OT3 由来の3種の遺伝子を発現させ、無細胞抽出液の活性値で発現の比較を行った。その結果、PH0655, PH1593 では P214 は P215 と比較してそれぞれ 0.5 倍と 0.8 倍と低い値となってしまっ

た。これに対して、P31 と Pslp を用いた場合には、1.7 ～ 4.0 倍とかなり高い値が得られた。PH0835 では、P214 支配下では微量な活性値しか得られていなかったが、P31 と Pslp 支配下では α - マンノシダーゼの活性が総蛋白質当たりの比活性値で 9.4mU/mg, 2.7mU/mg と、大腸菌では全く検出されなかった α - マンノシダーゼの活性が明らかに検出できた。

次に多コピー変異体プラスミド pPP442m を用いて、多コピー発現ベクター pTEV131m を作製した。この pTEV131m ベクターは、元の pTEV131 ベクターと比較してコピー数が 4 ～ 5 倍上昇している。*Bacillus stearo-thermophilus* 由来の α - amylase 遺伝子を導入して発現させたところ、pTEV131 で発現させたのに比べて 2 倍以上の発現量が得られた。更に、pTEVm - Pslp を作製し、PH0655 と PH1593 を発現させ、pTEV - Pslp で発現させたときと比較したところ、約 1.5 倍の発現量の上昇が見出された。

さらに、ベクタープラスミド及び多コピー型変異プラスミドの全塩基配列を決定し、プラスミドの複製機構およびコピー数制御機構についてのモデルも提唱した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、*T. thermophilus* での超好熱菌・好熱菌遺伝子の効率的発現のための発現ベクターの改良について述べられたものである。プロモーターの改良およびベクターのコピー数の増大の 2 つの視点から改良を試み、それぞれで外来超好熱菌遺伝子の効率的発現を実証した。とりわけ、大腸菌の遺伝子組み換え系では発現が困難であった遺伝子を *T. thermophilus* を宿主として発現できることを実証したことの意義は極めて大きい。また、ベクタープラスミドの全塩基配列を明らかにしたことにより、当該発現ベクターの汎用性が高まったことも、プラスミド複製機構・コピー数制御機構に関するモデルの提唱と言う基礎的側面とともに評価される。

以上のように、本研究は、好熱菌の分子生物学・分子育種に関して重要な結果をもたらしたといえる。従って、得られた成果の役割は大きいと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。