

Title	合成遺伝子の発現に関する研究
Author(s)	徳永, 知子
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34713
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【4】

氏名・(本籍)	とく 徳	なが 永	とも 知	こ 子
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	6847	号	
学位授与の日付	昭和60年3月25日			
学位授与の要件	薬学研究科 薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	合成遺伝子の発現に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 池原 森男 (副査) 教授 北川 勲 教授 富田 研一 教授 田村 恭光			

論文内容の要旨

固相phosphotriester法によるdeoxyoligonucleotideの迅速化学合成技術を応用して、ヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子の合成とその発現に関する研究を行なった。目的は、DNA化学合成の立場からdeoxyoligomerを用いて遺伝子を合成し、分子量2万程度のタンパク質を微生物を用いて大量発現させる系を確立すること、また、生物学的な意味からhGHの作用機作、構造活性相関に関する知見を得ること、hGHの供給は世界的に不足しており、このような社会的要求に応えること等である。

I. hGH遺伝子の合成とE.coliにおける発現

hGHは191残基のアミノ酸から成り、合成を計画したhGH遺伝子はそれらに対応する584 b.p.である。E.coliのcodon usageを基にしてそれらのcodonを選択した。また、5'側にClaI site, 3'側にSalI siteを付加し、遺伝子内には変換に利用する目的で、5'側からHinfI, AluI, BamHI, BglIIのuniqueな各siteを設けた。便宜的に、5'側のClaI siteからAluI siteまでをA part (133 b.p.), AluI siteからBglII siteまでをB part (282 b.p.), BglII siteからSalI siteまでをC part (165 b.p.)と名付けた。

遺伝子の合成は、7~14本のoligomerを結合して60~120 b.p.程度のsubfragmentを合成し、さらにそれらを結合してAB part遺伝子とC part遺伝子を得、それらを結合してhGH遺伝子を得るという方法で行なった。

発現にはE.coliのtryptophan promoterを用い、trpEのS.D.sequenceとhGH遺伝子の開始codonの間が7塩基あるplasmid (pGH-1)とtrpLのS.D.sequenceと開始codonの間が、8, 9, 11, 13塩基あるplasmid (pGH-L8, pGH-L9, pGH-L11, pGH-L13)を作成した。作成したplasmidをE.coli HB-101に導入し、各strainをM9 mediumで培養し、indoleacrylic acidで誘導して発現を行なわせた。

R I A で調べると culture 1 ml 当たり 100 ~ 170 μ g, cell 当たり 10^6 分子を越える高い level で発現しており, SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動からも, 分子量約 21,000 のタンパク質が全タンパク質の 15 ~ 25% を占める major protein として発現していることがわかった。また, S.D. sequence から開始 codon までの距離が 9 塩基の場合が最もよく発現した。さらに cell 断片の電子顕微鏡写真によって, 発現した hGH が cell 内で凝集沈澱して存在していることを見出した。

II. 変換体 (hGH-165) 遺伝子の合成と発現

hGH 遺伝子内の Bgl II, Sal I site と新たに合成した deoxyoligomer を利用して, Cys-165 の codon (T G T) が Ala の codon (G C A) に変換している遺伝子を合成し E. coli において発現させた。この変換によって, 本来 hGH 分子内に存在している Cys-53 と Cys-165 の間の disulfide bond が欠損するため, この変換体の種々の生物活性を調べることにより, hGH の作用機作や構造活性相関に関する知見が得られるものと期待される。

この変換体は hGH と同様に E. coli において高発現され, その精製も容易であった。R I A においては hGH と同様な抗原比活性を示し, human plasmin による分解においても hGH と同様な領域に優先的に切断を受ける site を持っていた。

III. 合成 hGH 遺伝子の Yeast における発現

生物種により, 同義語 codon の使用頻度には片寄りがあることが報告されているが, 異種遺伝子を E. coli や yeast を用いて発現させたい場合に, この事実がどのように影響してくるかを調べるため, yeast にとっては使用頻度の低い codon を多用している合成 hGH 遺伝子が yeast でどの程度発現されるかを調べた。

発現には, yeast *Saccharomyces cerevisiae* の repressible acid phosphatase の promoter を用いた。この下流に合成 hGH 遺伝子を組み込んだ plasmid を作成して yeast に導入し, 無機リン酸濃度が低い培地で誘導し発現を行なわせた。R I A で発現 level を調べると, culture 10 ml 当たり 83 μ g, cell 当たり 10^6 分子を越える高い level で発現していることがわかった。

IV. 合成 hGH 遺伝子の融合系への応用

合成した hGH 遺伝子は E. coli で高発現し, しかも hGH は cell 内で凝集沈澱して存在するため proteolysis から守られ, R I A で検索できる利点を持っている。これらのことを利用して, E. coli 中で direct expression されない RNase T₁ 遺伝子をこの hGH 遺伝子の AB part の下流の Bgl II site に fuse して発現させた。また, fused protein から RNase T₁ をきり出すために, hGH の AB part と RNase T₁ の間に, Met, Arg-Arg, Ile-Glu-Gly-Arg の 3 種類の配列を挿入した遺伝子を合成した。いずれの場合も E. coli で全タンパク質の数%程度発現し, cell 内で凝集沈澱して存在し, R I A においても活性を示した。また, fused protein から RNase T₁ のきり出しは, coagulation factor Xa で切断される Ile-Glu-Gly-Arg を挿入した場合が最もよい結果を与えた。

以上をまとめると,

1. deoxyoligomer を用いてヒト成長ホルモン遺伝子を合成し, E. coli において高発現させた。このものは, 天然の hGH と同様な成長ホルモン活性を有していた。

2. disulfide bondを1つ欠損したhGHの変換体をE.coliで発現させた。RIAやplasmin分解の結果から、このものは高次構造上、hGHと大きく変わらないと考えられる。
3. 合成hGH遺伝子がyeastにおいて高発現したことから、yeastにおいて使用頻度が低いcodonを多用した遺伝子であっても、その発現levelは必ずしも低くならないと考えられる。
4. RNaseT₁をhGHのAB partとのfused proteinとしてE.coliで発現させた。また、fused proteinからRNaseT₁のきり出しは、coagulation factor Xaがよい結果を与えた。
5. Deoxyoligomerを用いて種々の変換を行ない、deoxyoligomerの迅速化学合成技術が分子生物学の適確な応用を可能にしていることを示した。

論文の審査結果の要旨

徳永君は当教室で行はれて来たDNAの化学合成技術を用いて、人生長ホルモンに対応する584塩基対の二重鎖DNAを、化学合成オリゴマーのDNAリガーゼによる結合で達成し、これを新たに構築したプラスミッドに組み込み、大腸菌体中にて発現せしめ、人生長ホルモンを非常に高い効率で生成させた。このホルモンの活性をも検し、天然のそれと同一の有効性を確めた。

次にこのホルモンの165位のシステインをアラニンに変換する為、新しいDNAを合成し、このものを発現せしめて、Ala¹⁶⁵-人生長ホルモンを得た。

更に如上の遺伝子をシャトルベクターに組み込み酵母に於ても高能率で発現させることに成功した。これらの成果は学位請求に値するものとする。