

平成27年 8月28日

埼玉工業大学大学院工学研究科
萩原 時男 研究科長 殿

学位論文審査委員会

主 査	石川 正英	印
副 査	萩原 時男	印
副 査	熊澤 隆	印
副 査	長谷部 靖	印
副 査	巨 東英	印

学位（博士）論文及び最終試験の審査結果について（報告）

専 攻 名： 博士後期課程 応用化学専攻

学籍番号： 1 2 2 3 0 0 2

院生氏名： 郝 曉亮

論文題目： 大腸菌内での緑色蛍光タンパク質遺伝子の塩基配列が
発現効率に及ぼす影響に関する研究
(Study on the influence of sequence of green fluorescent
protein gene on expression efficiency in *Escherichia coli*)

上記の学位（博士）論文について、平成27年 8月24日に審査および最終試験を行い、その結果を下記のとおり報告します。

記

1 学位論文の内容の要旨

大腸菌を用いた遺伝子工学による有用タンパク質の生産は、今日でも重要な位置を占めており、大腸菌内で有用タンパク質の遺伝子を効率よく発現させることは、極めて重要である。本論文では、蛍光強度により簡便に発現量を定量できるオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子を用い、終止コドンの1つ手前のコドンであるラストセンスコドンの塩基配列が遺伝子の発現効率に及ぼす影響について詳細な検討をおこない、得られた知見をまとめたものである。また、研究中に得られた GFP 遺伝子の変異体を用いて、遺伝子の塩基配列が遺

伝子の発現効率に及ぼす影響についても検討をおこなった。本論文は5章で構成されている。

第1章は、序論として大腸菌を用いた遺伝子工学による有用タンパク質の生産の現状とこの研究で用いた GFP 分子とその利用法を紹介し、本論文の研究概要を述べた。第2章では、GFP 遺伝子の終止コドン UAA の 5' 側に 64 種類のラストセンスコドンを挿入し、発現ベクター pKK223-3 を用いて、大腸菌 JM109 内の GFP 遺伝子の発現量を、GFP の蛍光強度の測定により比較した結果をまとめた。ラストセンスコドンとして、CCG を挿入すると、蛍光強度は野生型に比べて 2.1 倍に増加した。また、CUA を挿入すると、0.33 倍に減少することがわかった。同義コドン間でも、蛍光強度に差があり、ラストセンスコドンは発現効率に影響することがわかった。その関係は大腸菌のコドンの使用頻度だけでは説明できないものであった。また、大腸菌から可溶性画分を分離し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により、GFP の発現量を比較したところ、蛍光強度が GFP の発現量と一致していることが確認された。第3章では、終止コドンを UAA から UAG および UGA に変えて、ラストセンスコドンの影響が変化するのか、検討した結果をまとめた。終止コドンが変わるとラストセンスコドンの発現効率への影響も若干変わることがわかった。また、発現ベクターを pKK223-3 から pET21(+)に変えて、ラストセンスコドンの発現効率への影響を調べた。その結果、発現ベクターによって影響が一部異なることがわかった。第4章では、第2章での検討中に得られた、GFP 遺伝子の変異体を用いて、遺伝子の塩基配列が遺伝子の発現効率に及ぼす影響について検討をおこなった。その結果、88 番目の A が G に変異した変異体 A88G および 443 番目の A が G に変異した変異体 A443G では、蛍光強度が 0.2 倍以下に減少した。SDS-PAGE による GFP の発現量の確認の結果、この減少はアミノ酸の置換によるものではなく、GFP 遺伝子の発現が著しく抑制された結果であることがわかった。その原因については、今後の検討課題である。第5章では、結論と課題について述べた。GFP 遺伝子の発現効率はラストセンスコドンの塩基配列によって、影響されることがわかった。その関係については、明確な規則性を見出すことはできなかったが、大腸菌を用いた遺伝子工学に対して、貴重な知見が得られたと言える。今後、GFP 遺伝子の発現効率がラストセンスコドンの塩基配列によって影響される原因についての解明がされれば、当該分野に多大の貢献が期待できると結論した。

2 審査意見：

本論文は GFP 遺伝子を用いて、遺伝子中のラストセンスコドンが遺伝子の発現効率に及ぼす影響について、64 通りのすべての組み合わせについて詳細に調べたものであり、ラストセンスコドンの塩基配列によって、発現効率が 2 倍以上に増加したり、3 分の 1 に減少したりする現象を見出した。その原因については解明するに至らなかったが、大腸菌を用いた遺伝子工学に対して、貴重な知見が得られたものと認められる。また、ラストセンスコドン以外の変異体についても、1 塩基の変異によって、GFP 遺伝子の発現効率が 5 分の 1 以下に減少すること

を見出しており，GFP を用いた研究にも，有益な知見を与えたものと評価できる。本審査委員会は，平成 27 年 8 月 24 日に論文の審査および最終試験を行った結果，論文については，修正を要する部分が見られるとの意見があり，修正の上，本論文を博士（工学）の学位論文として，合格と判定した。

3 学位に付記する専攻分野の名称（いずれかを○で囲む）

☒ 工 学 学術

4 学位を授与できるか否かの意見

1) 審査結果（いずれかを○で囲む）

① 学位論文及び最終試験の判定 ☒ 合 格 不合格

2) 意 見

本審査委員会は申請された学位論文について審査を行った結果，学位（博士）論文の審査および最終試験を合格と判定し，博士（工学）の学位を授与することが適当であるとの結論に達した。