

Title	低温菌 it Flavobacterium balustinum P104株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ様遺伝子の解析
Author(s)	及川, 一摩
Citation	
Issue Date	1999-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2598
Rights	
Description	Supervisor:横山 憲二, 材料科学研究科, 修士

低温菌 *Flavobacterium balustinum* P104 株のピルビン酸 デヒドロゲナーゼ様遺伝子の解析

及川 一摩 (横山研究室)

【目的】

本研究室で単離された低温菌 *Flavobacterium balustinum* P104 株の低温プロテアーゼ CP-70 の構造遺伝子の下流に、何らかのタンパク質をコードする遺伝子の開始コドンが見ついている。開始コドンから 801 塩基対までの塩基配列をアミノ酸配列に変換した後、ホモロジー検索プログラム:BLAST および FASTA で既知のアミノ酸配列との相同性を検索した。その結果、主にピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 複合体などの E1 サブユニットと約 30 % の相同性があった。そこで本研究では、CP-70 遺伝子の下流に存在する遺伝子の機能の予測を行なうことを目的とした。

【方法】

1. 塩基配列の決定と ORF の検索 *in vitro* パッケージングされた ファージを XL1-Blue MRA *E.coli* に感染・増殖させ、目的遺伝子が挿入されたファージベクター (FIX II) を単離した。これを PCR の鋳型として目的遺伝子の増幅を試みた。5' 3' 方向のプライマーは目的遺伝子の開始コドンから 3' 末端側に相補的な 20mer のオリゴヌクレオチドを用いた。3' 5' 方向のプライマーは、プロモーターに相補的な 20mer のオリゴヌクレオチドを用いた。PCR 終了後、PCR 産物を精製して、ダイターミネーターサイクルシーケンス反応を行い、DNA シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。また、決定された塩基配列に対してタンパク質のコード領域の検索を行なった。
2. ホモロジー検索 タンパク質のコード領域の機能を探る目的で、NCBI の BLAST および FASTA を使用して翻訳配列とデータベースのタンパク質との相同性を調べた。類似性の高いタンパク質と翻訳配列とのアミノ酸配列を比較し、高保存残基、補因子結合領域領域を検索した。

【結果】

CP-70 遺伝子の下流の塩基配列 3.5kbp の塩基配列を決定した。タンパク質のコード領域を検索したところ、3 つの読み枠が存在した。ホモロジー検索の結果、ORF1 (346 残基) は PDH 複合体を構成するピルビン酸デヒドロゲナーゼ (E1p) の サブユニットと約 30 % のホモロジーを、ORF2 は サブユニットと 35-40 % のホモロジーを有していた。ORF3 はこれまでに明らかにされていないタンパク質をコードしていることがわかった。また、アミノ酸配列の比較をしたところ、ORF1、ORF2 には高保存残基がそれぞれ 10ヶ所以上存在し、ORF1 の翻訳配列には、補因子チアミンニリン酸 (TPP) 結合領域であるモチーフが確認された。これより、ORF1、ORF2 は E1p の サブユニットをコードしていると予想された。これまで研究されたグラム陰性菌および陽性菌では、E1p と E2p (ジヒドロリポアミドトランスアセチラーゼ) の遺伝子がクラスター状になっているが、P104 株の E1p 遺伝子のすぐ下流には E2p 遺伝子はないことがわかった。

発表状況：日本化学会北陸地区発表会 (平成 10 年 11 月)、日本化学会第 76 春季年会 (平成 11 年 3 月発表予定)

keywords

低温菌、構造遺伝子、ホモロジー検索、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ