

2002年1月

Group I イントロンがコードするホーミングエンザイムの
in vivo における認識 DNA 配列決定系の構築
:ミトコンドリア *cytb* 遺伝子内に突然変異を持つ
Chlamydomonas 株の作成

修士論文

環境システムコース 黒川 さゆり

[要旨]

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は、直鎖状で 15.8 kbp の藻類としては最小のミトコンドリアゲノムを持つ。*Chlamydomonas smithii* (*C. smithii*) は、ミトコンドリア上の apocytochrome b 遺伝子内に と名付けられた、大きさが 1075 bp の group I イントロンを持ち、 -イントロン部分を除くとミトコンドリアの塩基配列が 99.9 % 同じであるが、 -イントロンを持たない *C. reinhardtii* と接合が可能である。その -イントロン内にはホーミングエンザイムをコードする open reading frame が存在する。apocytochrome b mRNA がスプライシングをされる前の未成熟な状態で転写・翻訳されると、 -イントロン内 ORF がコードしているホーミングエンザイムが発現し、特異的な DNA 塩基配列を認識して、切断を行うものと考えられている。 -イントロンは、切断された遺伝子が修復される際に、イントロンを含む DNA 鎖が鋳型となる相同組み換えによって、自己増殖を行うと解釈できる現象が起こる。本研究では、ホーミングエンザイムの認識配列はどのようなもので、どの程度の曖昧さがあるのかを、*in vivo* で決定するための系を構築しようとするものである。現在 *in vitro* でホーミングエンザイムの認識配列を決定した報告はあるが *in vivo* においては 1 例も報告がない。また、*in vitro* における解析では、その反応条件が通常の細胞環境とは大きくずれたものであるため、生体内における認識配列とは異なる結果となる可能性がある。

これまでに多くの生物種についてミトコンドリアの形質転換が試みられてきた。その中で、*C. reinhardtii* の呼吸欠損株のみで、欠損している部分の DNA を外部から導入することで、呼吸能を回復させるという直接選択が可能である。本研究では、*C. reinhardtii* を用いて、*in vivo* におけるホーミングエンザイムの認識配列を以下のような方法で決定することを目指すものである。(1) -イントロン内ホーミングエンザイム認識配列は apocytochrome b 遺伝子内において、イントロン部位を中心とした 26 bp 以内の範囲だと予測されるので、認識配列と推定される領域に 1 箇所の突然変異を持ち、5' 末端から NADH dehydrogenase subunit 4 遺伝子の一部を含む DNA construct を作成する。(2) この DNA construct を *C. reinhardtii* 由来でミトコンドリア apocytochrome b 遺伝子のほぼ全域を欠損している呼吸欠損株である *dum-16* のオス株 (mt-) に対し導入を行うことにより、予測認識配列内に突

突然変異を持つ呼吸能回復株を得る事が可能であると考えられる。(3) このようにして作成した *C. reinhardtii* の突然変異を持つ呼吸能回復株のオス株 (mt-) を、*C. smithii* のメス株 (mt+) と接合させて得られる、2倍体の栄養増殖細胞のミトコンドリアを解析する。2倍体の細胞では、*C. smithii*、*C. reinhardtii* 双方のミトコンドリアゲノムが1つの細胞内に存在し、*C. smithii* -イントロンのホーミングエンザイムが発現すると、*C. reinhardtii* の apocytochrome b 遺伝子内の認識配列を切断し、自らのコピーを侵入させる。呼吸能回復株と *C. smithii* における2倍体細胞ミトコンドリアを解析したとき、突然変異の導入により認識不可能な配列に変化した場合、-イントロンの侵入が行われず、突然変異が導入されても認識可能な配列であれば、-イントロンの挿入が起こる。本研究ではこれまでに、-イントロンがコードするホーミングエンザイムの、認識部位の中央だと予測される位置に、突然変異を持つ *C. reinhardtii* 株の作出に成功した。また、突然変異を持つ *C. reinhardtii* 株と -イントロンを持つ野生型 *C. smithii* を接合させて得られた接合子のみを、効率よく単離する手法を確立すると同時に、PCR産物内の制限酵素多型を利用して、-イントロンの侵入の有無を判定する系を構築した。