

2002年2月

Chlamydomonas reinhardtii の葉緑体での外来遺伝子発現系の構築 :

コレラ毒素Bサブユニットタンパク質の発現

Transgenic gene expression system in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast:

Model case study for the expression of cholera toxin B subunit

修士論文

物質・環境システム工学コース 西村 俊祐

[要旨]

植物細胞をタンパク質生産の場として利用するメリットとして、(1)培養コストが安い、(2)培養規模を柔軟かつ迅速に変えられる。(3)ヒトに感染する危険性のあるウイルスが存在しないという点が上げられる。本研究では陸上植物に比べ増殖速度が速い藻を有用タンパク質生産の場として利用する為の系の構築を目標としている。単細胞緑藻クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)は、古くから遺伝学的な研究材料として用いられてきた。これまでに葉緑体、ミトコンドリア、核ゲノムの全DNA塩基配列の決定されており、多彩な突然変異株の蓄積やESTライブラリーも整備されている。また遺伝子導入法が確立されている唯一の藻類である。通常、外来遺伝子は核ゲノムに導入されるが、より高度な発現を実現させるために、外来タンパク質発現の場として今回選択したのが葉緑体である。緑藻の葉緑体の優位性としては、(1)ゲノムが多重コピー(約70コピー)からなり、(2)PTGSのような積極的な外来遺伝子発現の抑制機構の報告がなく、(3)陸上植物に見られるような、RNAエディティングがないなどの点がある。

本研究では、クラミドモナスの葉緑体において外来遺伝子発現系を構築するためのモデルケースとして、経口ワクチンや免疫応答の増強剤として使用されているコレラ毒素Bサブユニット遺伝子(*ctb*)の発現を試みた。

そのために、内在遺伝子であり、かつその産物量が多いことから強力な転写活性が期待できる *atpA* と *rbcL* 遺伝子由来のプロモーター配列を利用した葉緑体発現用コンストラクトを設計した。また、遺伝子導入確認のための選択マーカーとしてスペクチノマイシン(*spc*)耐性賦与遺伝子(*aadA*)を付加した。それらのコンストラクトをボンバートメント法により導入し、相同組み換えによって葉緑体ゲノム内の所定の位置に発現コンストラクトが挿入された株を得た。これらの株に対して、逆転写酵素を用いた mRNA の存在確認、Real Time PCR TaqMan systems を用いた mRNA の定量、CTB ポリクローナル抗体を用いたイムブロットングによる CTB タンパク質の解析を行った。その結果、ある程度の CTB mRNA は確認出来たが、全溶解質タンパク質(TSP)中 0.005%以上の CTB タンパク質の蓄積を確認することが出来なかった。

このため、我々は選択マーカーとして同一コンストラクト上に付加した *aadA* 遺伝子の発現についての解析を進めた。*aadA* 遺伝子も CTB 同様十分な mRNA の蓄積が確認された。スペクチノマイシン耐性という表現型により mRNA が翻訳され、タンパク質が生産されていることは明らかである。細胞内に蓄積されているスペクチノマイシン修飾酵素の量は形質転換体が生育可能な薬剤濃度の限界値と比例関係にあることが知られている。そこで、様々な濃度のスペクチノマイシン(50~10,000 μ g/ml)を含む培地上での生育状態により、各コンストラクトにおける *aadA* の発現タンパク質量を推定して比較した。その結果、最も mRNA 蓄積量が多かった株のスペクチノマイシン耐性が、他のコンストラクトの形質転換株に対して著しく低いことがわかった。これは、クラミドモナスの葉緑体においては、mRNA 量とその翻訳生産物の量が必ずしも比例しておらず、翻訳効率の違いが、mRNA 量の違いよりも、大きく最終産物量に影響を与えていることを示している。CTB mRNA が細胞内に存在するにもかかわらず、CTB タンパク質を検出できなかった原因として、(i)生産された CTB がすぐに細胞内で分解される。(ii)この mRNA の翻訳効率が何らかの原因で著しく低いことが挙げられるが、タバコの葉緑体においては既に CTB タンパク質の発現及び蓄積が確認されている(Daniell, H *et al.*, 2001)ので、後者が主因である可能性が高いと考えている。