

2005年2月
修士論文

Chlamydomonas reinhardtii における外来遺伝子発現系の構築

: Collagen alpha 1 type 1 タンパクの発現

Transgenic gene expression system in *Chlamydomonas reinhardtii*

: Expression of collagen alpha 1 type 1

物質・環境システム工学コース

1075005 浅野 公人

要旨

工業や医療の分野において、各種の機能性タンパク質が注目されている。特にコラーゲンタンパク質は、化粧品等への保湿剤として添加されるほか人口骨や人工皮膚の原材料として利用される等、バイオマテリアルとしての需要が見込める素材として注目されている。しかしながら現在、これらのタンパク質の多くは、その生産源を動物に頼るほかに無く生産コストも非常に高価である。それに対し植物におけるタンパク質発現では、動物細胞に比べ培養コストが低いことや増殖の速度が速いこと、ヒトに感染する恐れのある動物性のウイルスが存在しないという利点がある。また本研究においては外来遺伝子導入の場合は、一般的な核ゲノムではなく葉緑体を選択した。葉緑体は、遺伝子発現の制御が原核生物に近ことから、真核生物に見られる PTGS といった外来遺伝子の抑制機構の報告が無く、陸上植物に見られるような RNA エディティングが無い。これまでに、タバコの葉緑体においてコラーゲンタンパク質の発現と蓄積は確認されており、全タンパク 1kg 中 0.1g のコラーゲンタンパク質が得られたという報告がある。本研究では、植物細胞の中でも、より増殖速度が速く培養の容易な藻類の細胞で、機能性タンパク質を発現させるための系の構築を目的としている。

単細胞緑藻である *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は、遺伝子導入法の確立された唯一の藻類として、古くから遺伝学的なモデル生物として用いられてきた。また、核のみでなく葉緑体、ミトコンドリアゲノムの全 DNA 塩基配列が決定されており、EST ライブラリーの整備や多くの突然変異株の蓄積もなされている。*C. reinhardtii* の葉緑体は、1 細胞あたり単一であり細胞の体積の大部分を占める。また、ゲノムが多重コピー(約 70 コピー)であり、そのうちの何割かが形質転換により重要な遺伝子のいくつかを欠損しても全ゲノム DNA が重要遺伝子を欠くことが無く、細胞が死に至ることは無い。

本研究では *C. reinhardtii* の葉緑体にコラーゲンの発現遺伝子である *COLIA(1)* 遺伝子を導入した。形質転換を行うにあたり、2 種類のコンストラクトを作成した。内在で転写活性の高いとされる *atpA* 遺伝子のプロモーターと、*rbcL* 遺伝子のターミネーターを持ち、遺伝子導入後の選択マーカーとしてスペクチノマイシン耐性賦与遺伝子である *aadA* を付加したコンストラクト。そして *aadA* 遺伝子を含み、*rbcL* 遺伝子と *rbcL* 遺伝子のターミネーターの間に、*COLIA(1)* 遺伝子が導入されるように設計したコンストラクトを作成した。以上 2 つのコンストラクトをパーティクルガンによるボンバートメント法によって導入し、相同組み換えによって葉緑体ゲノム内にコンストラクトが挿入されたと思われる株を得ることができた。得た株の中から、目的部位にコンストラクトが導入された株を PCR 法によって確認し、コラーゲンポリクローナル抗体を用いたイムノプロットング、ELISA 法によってコラーゲンタンパクの検出を試みた。しかしながら現在までにタンパクの蓄積は検出できなかった。コラーゲンタンパク質の検出は不可能であったが、*aadA* 遺伝子と *COLIA(1)* 遺伝子が同じ mRNA 上に存在する、*atpA* 導入用のコンストラクトを導入した形質転換体には、スペクチノマイシン耐性の形質が継続して発現している。*aadA* 遺伝子のコードするタンパク質であるスペクチノマイシン修飾酵素の量は形

質転換体が育成可能な薬剤限界値と比例関係であることが知られている。様々な濃度のスペクチノマイシン(100-10000 マイグ g/ml)を含む培地上で 15 日間育成を試みた結果、10000 マイグ g/ml という高濃度の培地で生育が可能であることから *aadA* 遺伝子は正常に転写、翻訳されている。コンストラクトの構造から *COL1A(1)* 遺伝子も転写段階までのプロセスに問題は無いと考えられる為、翻訳効率が低い、翻訳後のコラーゲンタンパクに通常動物細胞内で施されるヒドロキシル化酵素などによる修飾が起こらず、正常な立体構造を保つことができないために、細胞内において不安定で容易に分解されるものと考えられる。