

*Chlamydomonas reinhardtii*の葉緑体でのコラーゲンタンパク発現系の構築
Construction of the collagen protein expression system in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast

物質・環境システム工学コース 1075018 大濱 真

要旨

植物細胞を有用タンパク質発現の場として使用する利点として、①培地のコストが安い、②ヒトに感染するウィルスが無く安全性の確保が容易、などが上げられる。本研究では、陸上植物よりも増殖速度が速く培養が容易な藻類をタンパク質発現の場として利用する為の系の構築を目標とする。一般的には、外来遺伝子は核ゲノムに導入されるが、より大量のタンパク質発現を実現するため、葉緑体への外来遺伝子の導入を行った。葉緑体を用いることの優位性として、①ゲノムのコピー数が多い、②RNAiなどの外来遺伝子の発現を阻害する機構がない、などがある。

単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は、古くから遺伝子研究に用いられ、これまでに、核ゲノム、葉緑体、ミトコンドリアなどの全塩基配列が決定しているモデル生物である。また、藻類の中で唯一外来遺伝子の導入が可能な藻である。本研究では、藻類における機能性タンパク質発現のモデルケースとして、クラミドモナスの葉緑体において、ヒト由来コラーゲン $\alpha 2$ type 1 タンパクの発現を試みた。コラーゲン Type1 は細胞内で、皮膚、骨、腱の主成分として存在している。コラーゲンタンパクは分子量約 130 万のペプチド鎖 3 本で構成される。生体内でコラーゲンは、3 本鎖のうち 2 本は $\alpha 1$ 、残り 1 本を $\alpha 2$ という異なるペプチド鎖で構成されており、この 3 本鎖が 3 重螺旋の構造をとり存在することが知られている。しかし、これまでの研究で、 $\alpha 2$ 鎖だけでも 3 重螺旋構造をとることは可能であり、コラーゲンとしての機能を持つことが確認されている。発現用コンストラクトには強力な転写活性が期待できる内在遺伝子 *rbcl* の *rbcl3' UTR* 部位を利用した。また、遺伝子導入確認のマーカーとしてスペクチノマイシン耐性賦与遺伝子 (*aadA*) を付加した。作成したコンストラクトをボンバートメント法でクラミドモナスに導入し、相同組み換えによって葉緑体に遺伝子が導入されたと思われる株を、スペクチノマイシン耐性をマーカーとして選抜した。得られた株に対して、コンストラクト導入部位の確認、コラーゲン $\alpha 2$ type1 用ポリクローナル抗体 (Takara bio. 委託生産) を用いた抗原抗体反応によるコラーゲンタンパクの発現の解析を行った。その結果、*aadA* とコラーゲン遺伝子の存在は確認できたが、目的としていた葉緑体の *rbcl* へ導入されていないことが解った。また、タンパク質の解析では、ポリクローナル抗体に反応するタンパク質の存在は確認できたが、その分子量は目的産物の分子量よりも小さいものだった。発現されていると思われるタンパク質について、より確実な発現を検証するために、コラーゲンタンパクの単離を試みたが、コラーゲンタンパクのみを回収することができなかった。形質転換体のタンパク質発現の不安定さ、薬剤への耐性などから、今回得られた形質転換体では、コンストラクトが葉緑体ではなく偶然核に導入され、一度は核内のプロモーターを利用してコラーゲンタンパクが発現されたが、その後 PTGS などの外来遺伝子阻害機構の影響を受けて発現が停止したと考えられる。