

# エマチン耐性レベルを指標とした外来遺伝子に対する

## 転写抑制緩和変異クラミドモナス株の選抜

1205027 山根雅裕

## Isolation of gene silencing alleviated *Chlamydomonas*

Masahiro Yamane

## mutants using the emetine resistance levels as a selection marker

### 【序論】

様々な組み換えタンパクの質の生産工場として、増殖が極めて速く、遺伝的性質がよく研究されている真正細菌 (*Bacteria*) が用いられている。しかし、真正細菌では、真核生物の酵素が正常に機能するために必要な糖鎖付加が一般的に行われない。このため、原核生物である真正細菌において真核生物由来の酵素遺伝子を発現させても、正しいタンパク質の折り畳み構造が再現されないため正常な生理活性を持つタンパク質を生産できないことが多い。

それに対して、真核単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) による、真核生物由来のタンパク質生産系はいくつかの点で有望である。クラミドモナスは真正細菌と同様に増殖が速く、遺伝的性質がよく研究されているモデル生物である。また、無機塩類のみの安価な培地の利用が可能であり、細胞内には有害な物質は含まれておらず、生産させたタンパク質を細胞ごと利用できる面を有している。一方で、クラミドモナスは外来遺伝子を導入されると、外来遺伝子に対して特異的な強い転写抑制 (Transcriptional Gene Silencing :TGS) が働く。そのため、外来遺伝子由来の生産物を大量に得ることは困難である。またクラミドモナスでは、外来遺伝子の発現に対して寛容なゲノム内の領域はほぼ無いと考えられている。転写抑制は遺伝子のメチル化修飾と、それに対して、共役的に起こるヒストン修飾が主な機構であると考えられている。シトシンのメチル化に反応して、クロマチンが凝集構造をとる事で転写抑制が引き起こされる事が示唆されている。本研究では、すでに得られている転写抑制緩和株を用い、さらなる人為的な突然変異により、いっそう転写抑制が緩和された変異株の選抜を行った。

### 【材料・方法】

同研究室サリ一らの先行研究により得られた転写抑制が緩和された株 *met1(UVM)-47A*、*met1(UVM)-47B*、*met1(UVM)-57*の3株を用いた。

UV 照射後の外来遺伝子発現量を示す為、予め細胞に薬剤耐性(emetine 耐性)を賦与する遺伝子 (*cry-1* 遺伝子) を導入した。*cry-1* 形質転換体の中でも薬剤耐性が低い細胞を一次選抜細胞とし、UV 照射による突然変異を誘発して、二次クリーニングを行なった。この選抜により、強い転写抑制の働く位置に導入されていた *cry-1* 遺伝子に対する転写抑制機構が破壊、もしくは軽減した株の選抜が可能であると期待できる。これらの二次選抜細胞は *ble-GFP* 遺伝子が既に導入されており、GFP タンパク量を Western Blotting 法により測定することで、転写抑制がどの程度緩和されたかを推定した。

### 【結果・考察】

二次選抜株では、emetine 耐性は突然変異前よりも 1.5~3 倍上昇していた。また、外来遺伝子である *ble-GFP* のタンパク質増加量としては、最大でおおよそ 4 倍程度の増加した変異細胞を獲得した。外来遺伝子に対して転写抑制がさらに緩和された変異体であると期待される。*ble-GFP* 以外の外来遺伝子にも同様に転写抑制が緩和されるのかその可能性を追求していきたい。

