

(様式 5) (Style5)

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 吉良 望
Name

学位論文題目： 複数遺伝子の共発現を可能とする海産珪藻の新規形質転換技術の開発
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

珪藻は、光合成を行う単細胞性の一大真核生物群であり、水産生物の初期餌料として価値が高い種や、バイオ燃料として有用な脂質やカロテノイド類をはじめとする有用物質を生産する能力を有する種を含むことから、本藻を用いたこれらの商業的生産が期待されている。しかし、その物質生産能は商業生産を実現するほど高くないのが現状である。このような状況のもと、珪藻の物質生産能を向上させるためには、その生産に関わる遺伝子を珪藻に形質転換させ、過剰発現させることが有効と考えられる。このためには、物質生産に関わる遺伝子と選択マーカー遺伝子を共発現させることが必要となる。これまでに、導入遺伝子と選択マーカー遺伝子を組み込んだ環状ベクターが作製され、それらが形質転換に用いられてきたが、環状ベクターに複数の遺伝子を組み込むためには手間と時間がかかり、これが珪藻の遺伝子改良の進展を阻む一因となっている。また、複数の遺伝子を共発現させるためには、複数のプロモーターを用いることが望ましく、とりわけ有用物質の生産に関わる遺伝子の発現には、遺伝子発現誘導活性の強いプロモーターを用いることが望ましいが、そのようなプロモーターは未だ開発されておらず、これも優良な形質転換体の作製を妨げている。

そこで、本研究は珪藻の有用物質生産能の向上に資する、迅速・簡便かつ導入遺伝子を高発現可能な新たな形質転換法を開発することを目的とする。まず、迅速かつ簡便に複数遺伝子の共発現が可能な形質転換法の確立を目指して、PCR 増幅させた目的遺伝子と選択マーカー遺伝子を含む直鎖状ベクターを用いて、パーティクルガンにより羽状類珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* を形質転換させる手法を開発しようとした。さらに、導入遺伝子を高発現させる珪藻内在性の新規プロモーターおよび珪藻感染性ウイルス由来の新規プロモーターを開発しようとした。

直鎖状ベクターを用いたパーティクルガンによる珪藻の形質転換

まず、抗生物質耐性遺伝子を含む環状ベクター pEx-nat/g5/ble を調製し(Figs. 1 and 2A)、これを鋳型として用いて、その全長を含む直鎖状ベクター +1000 linear vector を PCR 増幅させた(Fig. 2B)。これらを *P. tricornutum* に形質転換させ形質転換効率を求めたところ、前者の効率は後者の効率のおよそ 4 倍であったが、両者間に統計的な有意差は見られなかった(Fig. 3)。以上の結果により、直鎖状ベクターをパーティクルガンにより導入させた場合、環状ベクター導入時と比べて、やや形質転換効率は下がるものの、確実に形質転換体が取得可能であることが明らかになった。

様々な長さの直鎖状ベクターを用いたパーティクルガンによる珪藻の形質転換

(様式 5) (Style5)

様々な長さの配列を導入遺伝子の両端に付加した直鎖状ベクター+0, +50 および+500 linear vector を調製し、これらを用いて形質転換を行った結果、それらの形質転換効率は $4.6 \pm 3.5 \sim 11.7 \pm 11.9$ colonies/ 10^8 cells となり、これらの試験区間において統計的な有意差は認められなかった(Fig. 3)。よって、直鎖状ベクターにおける不要部分を短くしたベクターを用いた場合であっても、全長の直鎖状ベクターを用いた場合に得られた形質転換効率と同様の効率が得られることが明らかとなった。なお、本研究では直鎖状ベクターを調製には、環状ベクターを鋳型として用い PCR 増幅させたが、この直鎖状ベクターは環状ベクターを構築することなく連結 PCR により調製することも可能である。

導入遺伝子全長の組み込みに必要となる直鎖状ベクター両端の付加配列長の検討

直鎖状ベクター+0, +50, +500 および+1000 linear vector および環状ベクター pEx-nat/g5/ble を *P. tricornutum* に導入した場合、それぞれ、 36.9 ± 12.8 , 88.3 ± 5.2 , 94.4 ± 4.2 , 91.8 ± 6.2 および $89.9 \pm 8.2\%$ の形質転換体において導入遺伝子の全長が導入されていた(Fig. 4)。よって、導入を企図する遺伝子の両端に 50 bp 以上の長さの DNA 断片をそれぞれ付加することにより、効率良く完全長の遺伝子をゲノム内に導入することが出来ると考えられた。

形質転換に必要な直鎖状ベクターの DNA 量の検討

微量の直鎖状ベクター+50 linear vector (37.5 fmol/shot)を、*P. tricornutum* に形質転換させた場合であっても、形質転換効率はおよそ 10 colonies/ 10^8 cells となり(Fig. 5)、量を増やした場合(環状ベクター 1 μ g に相当する 300 fmol 使用時)と同程度の形質転換効率が得られることが判明した。本結果は、5 本立ての撃ち込み試験を行うために必要となる直鎖状ベクターが、一般的な PCR の 1 チューブ分である 50 μ l の反応液を用いることによって調製可能であることを意味している。以上の結果により、PCR 増幅させた直鎖状ベクターを用いることによって、珪藻のベクター調製に要する時間を大きく短縮可能であることを示した。

サザンブロットによる導入遺伝子のゲノムへの組み込みの確認

様々な長さの直鎖状ベクターを形質転換させることにより得られた形質転換体において、サザンブロットにより少なくとも 1 本のバンドが見られたことから、供試した全ての形質転換体において、導入を試みた遺伝子の断片がゲノムに組み込まれたことが明らかとなった(Fig. 6)。また、直鎖状ベクター+0 あるいは+50 の linear vector を導入して得られた形質転換体では、サザンブロットにより比較的少ないバンドが確認された一方で、+1000 linear vector あるいは環状ベクターを導入して得られた形質転換体では、サザンブロットにおいてより多くのバンドが見られた(Fig. 6)。この原因として、珪藻の細胞内における組換え酵素活性が高く、長い DNA を導入させると組換えがより起こりやすくなり、その結果として複数コピーが導入されたのではないかと考えられた。よって、より少ないコピー数の遺伝子を珪藻に導入させたい場合には、導入させたい遺伝子カセットに 50 bp の DNA 断片を付加させた直鎖状ベクターが有効であると考えられた。また、このような直鎖状ベクターを用いて形質転換させた場合、導入されるコピー数が少ないシンプルな形質転換体を得られることから、それらの遺伝的解析・評価もより容易となることも期待される。

珪藻感染性ウイルスに由来する高発現型新規ウイルスプロモーターの分離

(様式 5) (Style5)

珪藻感染性ウイルスのゲノム中に存在すると考えられるプロモーターに注目し、それらの活性を評価した。これらを求めるにあたり、本研究では導入遺伝子のゲノム上のコピー数の影響を抑えるため、抗生物質耐性遺伝子 *Sh ble* とレポーター遺伝子 *egfp* を含むダブルカセットを有するベクターを用いて形質転換を行い(Figs. 7)、前者の発現量に対する後者の相対発現量を求めることにより、これをプロモーター活性とした。さらに、導入遺伝子のゲノム上における位置効果の影響を考慮して、各プロモーターを用いることにより得られた形質転換体 10 コロニーを用い、それらのプロモーター活性の平均値を求めることで位置効果の影響を出来るだけ排除しようとした。これにより、本研究では出来るだけ真に近いプロモーターの活性を評価することが可能となり、その様な状況の下で各プロモーター活性を評価した結果、*Chaetoceros lorenzianus* に感染するウイルス (ClorDNAV) の複製関連タンパク質の遺伝子と推定される領域の上流領域の配列 CIP1 が、*P. tricornutum* の形質転換において頻用されている *Ptfcf pro* よりも約 5 倍高い遺伝子発現誘導活性を示した(Fig. 8)。このプロモーターは中心類珪藻を宿主とするウイルスに由来するものであり、それが羽状類珪藻の *P. tricornutum* において高い発現活性を示したことから、珪藻綱内において本プロモーターがユニバーサルに使用可能であることが示唆された。

以上のように、従来頻用されてきた環状ベクターを用いたパーティクルガンによる珪藻の形質転換法に比べて、今回報告した PCR 増幅させた直鎖状ベクターを用いたパーティクルガンによる形質転換法は数多くの優れた点を持つ。さらに、本研究において新たに取得した導入遺伝子を高発現させるウイルス由来新規プロモーターを用いることにより、有用物質の生産に関わる遺伝子の過剰発現への道が開かれた。さらに、これらのプロモーターは導入遺伝子の過剰発現にとどまらず、導入遺伝子の発現抑制にも大いに役立つと考えられる。例えば、有用物質生産に関わる枝分かれ経路における酵素遺伝子の発現抑制や、機能未知遺伝子の発現抑制による機能解明にも役立つことが期待される。今後は、これらのプロモーターを上記した直鎖状ベクターと組み合わせて用いて珪藻の形質転換を行うことにより、珪藻の有効活用が加速し、さらにその分子生物学的な理解が進展することが期待される。

(様式 5) (Style5)

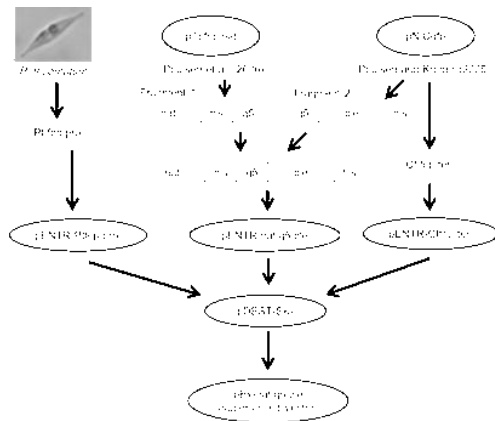


Fig. 1 Flowchart of constructing the circular expression vector pEx-nat/g5/ble.

A

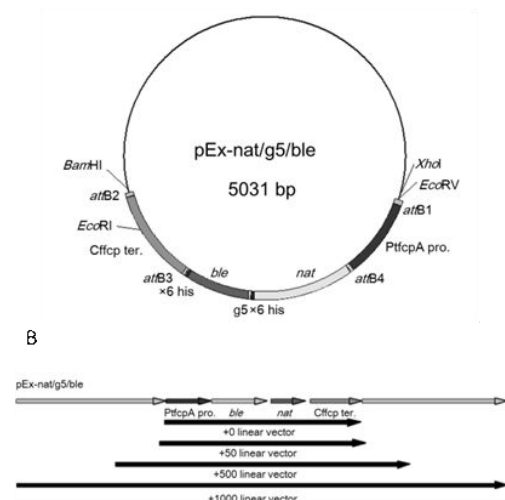


Fig. 2 Map of the circular transformation vector, pEx-nat/g5/ble (A) and map of the various linear vectors PCR-amplified from pEx-nat/g5/ble/ (B).

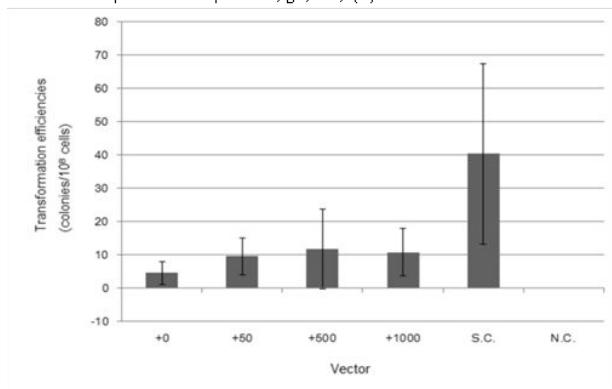


Fig. 3 Average transformation efficiencies of *P. tricornutum* transformed with various lengths of linear vectors and a circular plasmid. Error bars show SD, n = 5. No significant difference was found among transformation efficiencies tested using the Tukey-Kramer method. +0: +0 linear vector; +50: +50 linear vector; +500: +500 linear vector; +1000: +1000 linear vector; S.C.: supercoiled circular vector; N.C.: negative control (tungsten only).

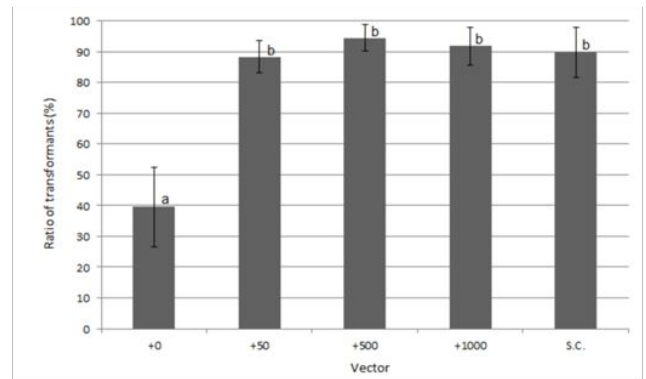


Fig. 4 Average proportions of transformants containing the whole region of the gene cassette of the transformants transfected with each vector. +0 (+0 linear vector), +50 (+50 linear vector), +500 (+500 linear vector), +1000 (+1000 linear vector) and S.C. (supercoiled circular vector) derived from the first experiment to the third experiment. Error bars show SD. Different alphabet shows a statistically significant difference ($p < 0.01$).

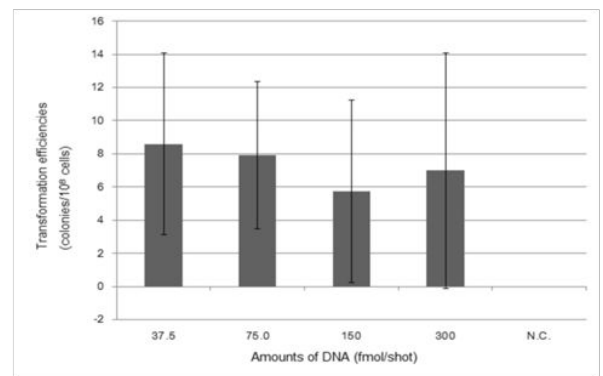


Fig. 5 Average of transformation efficiencies of *P. tricornutum* that were transformed in triplicate with the various amounts of +50 linear vector. Error bars show SD, n = 5. No significant difference was found among all the results using the Tukey-Kramer method. N.C.: negative control (tungsten coated with the amplified DNA (1,500 fmol) from pEx-nat/g5/ble that contained a region of the plasmid excluding the region gene cassette).

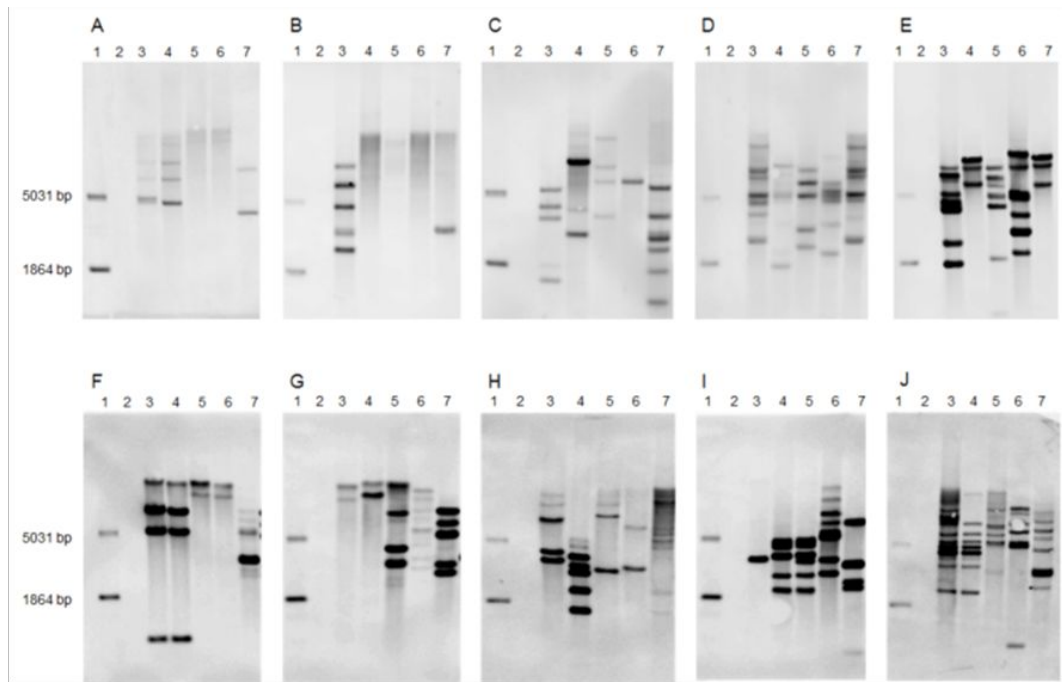


Fig. 6 Results of Southern blotting.

A, F: +0 linear vector, B, G: +50 linear vector, C, H: +500 linear vector, D, I: +1000 linear vector, E, J: supercoiled vector. Lane 1: a mixture of circular plasmid digested with *EcoRI* (100 pg/ well) and circular plasmid double-digested with *EcoRI* and *XhoI* (300 pg/ well) as a size marker and detection control). Lane 2: genomic DNA of the wild type *P. tricornutum* (10 μg/ well; negative control). Lanes 3–7: genomic DNA of five transformants. Genomic DNA of the wild type and the transformants was digested with *BamHI* (A-E) or digested with *EcoRV* (F-J).

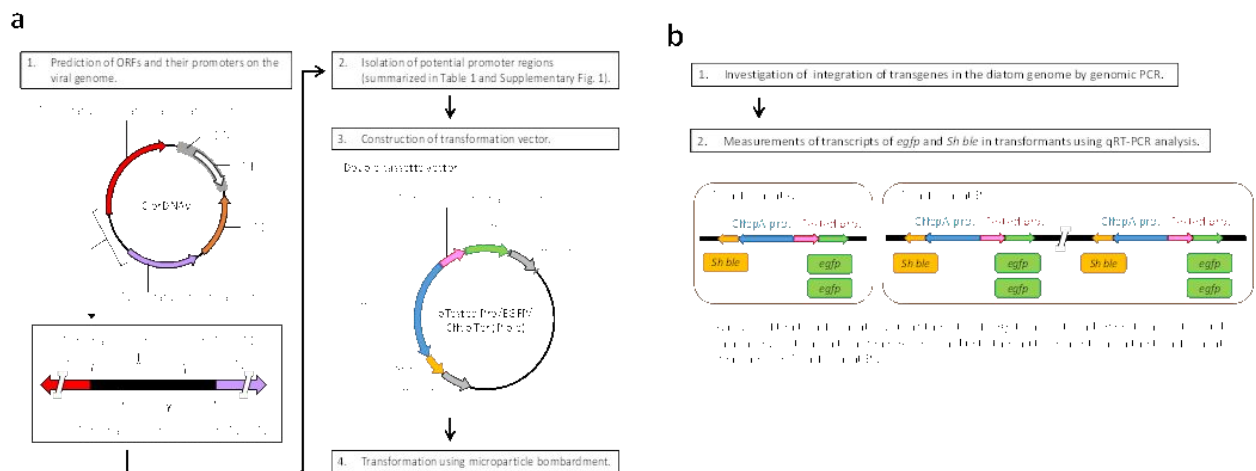


Fig. 7 Schematic diagram for evaluation of promoter activity. (a) Outline of construction of transformation vectors and transformation. After predicting putative ORF positions³⁷, the upstream regions of the ORFs were determined as their potential promoter regions. Potential promoter regions amplified by PCR were used to construct transformation vectors. The double cassette vector which contains the reporter gene *egfp* driven by each tested promoter and the antibiotic-resistant gene *Sh ble* driven by *CfcpA pro.* was constructed (b) Investigation of promoter activity. Promoter activity was determined by averaging the ratios of the level of *egfp* mRNA transcripts to that of *Sh ble* mRNA transcripts in ten transformants to minimize the effect of copy number on the expression of transgenes. These transformants were also used to investigate GFP protein expression. *CfcpA pro.*: promoter region of the fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein (FCP) A-1A gene derived from *Cylindrotheca fusiformis*. *CfcpA ter.*: terminator region of the FCP A-1A gene derived from *Cyl. fusiformis*. The structure of the ClorDNA genome is modified from Tomaru et al.(2011).

