

学位論文要旨

Dissertation Abstract

氏名：
Name 吉良 望

学位論文題目：
Title of Dissertation 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

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

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。この様な状況のもと、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、その様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の1種である *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。

1) 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、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+1,000 linear vector を PCR 増幅させた。これらの環状ベクターおよび線状ベクターを *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。次に、様々な長さの配列を導入遺伝子の両端の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において、統計的な有意差は認められなかった。また、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 ± 6.0 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。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。次に、37.5 fmol/shot の直鎖状ベクター+50 linear vector を、*P. tricornutum* に形質転換させた場合、環状ベクター1 μg 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。さらに、+0 あるいは+50 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た形質転換体では、より多くのバンドが見られた。

2) 珪藻内在性の高発現型新規プロモーターの探索

従来、珪藻の形質転換に供されてきた内在性プロモーター-fcpA pro.と同程度、あるいはそれ以上に遺伝子の発現を高効率に誘導する内在性の新規なプロモーターを獲得するため、まず様々な培養条件で培養した *P. tricornutum* 藻体から RNA を抽出し、これを用いて本藻において構成的かつ高発現している遺伝子を探索した。その結果、clumping factor A precursor (ClfA(P1)), V-type ATPase subunit C (V-ATPase C1) および fcpC 等の遺伝子を選抜した。さらに、これらの遺伝子の上流に位置する推定プロモーター領域を組み込んだ形質転換用ベクターを作成し、これらを用いた形質転換を行った。その結果、V-ATPase C1 や ClfA(P1) のプロモーターが、fcpA pro. と同等の形質転換効率をもたらすことが明らかとなった。

3) 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

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。その結果、珪藻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、珪藻の形質転換において頻用されている内在性プロモーター(fcp pro.)よりも約5倍高い遺伝子発現誘導活性を示した。

本研究により、新規に開発したプロモーターを組み込んだ直鎖ベクターによる形質転換を行うことにより、迅速かつ簡便に導入遺伝子を高発現させることが可能となった。今後は、本法を用いることにより、珪藻による有用物質の商用的生産の実現ならびに珪藻の分子生物学的理解の進展が期待される。