

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	吉良 望
審査委員	主査 足立 真佐雄 副査 福田 達哉 副査 鈴木 聡 副査 木場 章範 副査 一見 和彦

論文名

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

### 審査結果の要旨

珪藻は、バイオ燃料として有用な脂質等の有用物質を生産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、その生産能は商業生産を実現するほど高くはないことから、その生産能を向上させるためには、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等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いない。

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 *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。

本研究により得られた結果は、次のように要約される。

### 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、様々な長さの配列を導入遺伝子の両端に保有した直鎖状ベクター +0, +50, +500 および +1000 linear vector を PCR 増幅させた。これらに加えて、上記の環状ベクターを *P.*

*tricornutum* に導入させた場合、それぞれ  $36.9 \pm 12.8$ ,  $88.3 \pm 5.2$ ,  $94.4 \pm 4.2$ ,  $91.8 \pm 6.0$  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  $\mu\text{g}$  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。さらに、+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導入遺伝子がゲノムに組み込まれていることが判明した。

## 2) 珪藻内在性の新規プロモーターの探索

*P. tricornutum* の細胞内において、導入遺伝子を高発現可能な内在性の新規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本藻の藻体から RNA を抽出し、これを用いて本藻に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、V-type ATPase subunit C (V-ATPase C) 遺伝子をはじめとする 4 種の遺伝子を選抜した。さらに、これらの遺伝子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、これらを用いて形質転換を行った。その結果、V-ATPase C 遺伝子等のプロモーターが、従来から使用されている fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding protein A 遺伝子のプロモーター(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探索

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(fcpA 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。本研究により得られた一連の成果は、珪藻を用いた有用物質の商業生産あるいは珪藻の生命機構解明に向けた礎を築くものと考えられ、極めて高く評価できる。

学位論文公開審査会は平成 28 年 2 月 6 日、愛媛大学農学部において開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き学位論文審査会を開いて審査した結果、本論文が博士(農学)の学位を授与するに値するものと審査委員全員一致で判定した。