

学位論文題名

海産紅藻スサビノリの Elongation factor-1 α 遺伝子の 構造解析とその遺伝子導入における 発現ベクターとしての応用

学位論文内容の要旨

アマノリ属は海産の多細胞藻類であるアサクサノリ, スサビノリなどの産業的に重要ないくつかの種を含んでいる。スサビノリの示す諸現象を分子遺伝学的に探求するために形質転換は必須の技術である。しかしながら, スサビノリでは安定した形質転換系が確立していないため, タグラインやノックアウトを利用した分子遺伝学的研究の報告例はない。本研究では, 既存の陸上植物用ベクターを利用することによってパーティクルガンによる遺伝子導入の基礎的知見を得た。次に発現ベクターの開発のため, スサビノリの配偶体と孢子体の両世代で構成的に発現している Elongation factor-1 α (EF-1 α) 遺伝子の cDNA の塩基配列をクローニング, 決定し, mRNA の発現を明らかにした。この情報を基に EF-1 α 遺伝子の上流領域を含むゲノム DNA 配列をクローニングし, その構造を cDNA 配列と比較し, RT-PCR による mRNA の発現を明らかにした。配列決定した上流領域を含むゲノム DNA 配列を利用し, 構築した発現ベクターをパーティクルガンでスサビノリ TU-1 株に導入し, 一過性発現が見られる細胞数から, 一過性発現効率を求めた。これらの結果について以下に述べる。

陸上植物用 pBI221 ベクターをパーティクルガンによってタマネギの表皮細胞とスサビノリ TU-1 株へ導入し, β -glucuronidase 遺伝子の一過性発現における GUS 活性を組織化学的アッセイによる手法で検出した。タマネギの表皮細胞の一過性発現効率〔 $2.5(\pm 1.1) \times 10^{-4}\%$ 〕を 1 とし, スサビノリ TU-1 株への一過性発現効率を相対的に比較した。その結果, 一過性発現効率はパーティクルガンの発射口と試料との距離が 8 cm の条件で約 5.5×10^{-3} 倍であり, 発射口と試料との距離が 9 cm の条件で約 1.1×10^{-2} 倍であった。

葉状の配偶体に由来する cDNA ライブラリーから EF-1 α 遺伝子の候補を単離し, その構造と発現を明らかにした。塩基配列を決定した cDNA の全長は 1,347 bp であり, その配列中に推定 449 個のアミノ酸に翻訳される読み取り枠が見つかった。インターネット

上のデータベースを利用した相同性検索やモチーフ検索を行った結果、他の生物の EF-1 α 遺伝子と相同の領域であることを確認した。ノーザンハイブリダイゼーションにより、本遺伝子の発現は葉状の配偶体と糸状の胞子体の両世代で認められ、発生段階によって発現量の顕著な変動は見られなかった。

葉状の配偶体に由来するゲノムライブラリーから EF-1 α 遺伝子の上流配列を含むゲノム DNA のクローンの候補を単離し、その構造と発現を明らかにした。EST クローンの情報から塩基配列を決定した cDNA の全長は 1,347 bp であり、その配列中に推定 449 個のアミノ酸に翻訳される読み取り枠が見つかった。ゲノム DNA のクローン中には約 1.3 kbp の上流配列が見つかった。また、本遺伝子は 5' 非翻訳領域に 1 個のイントロンを持つことが明らかとなった。インターネット上のデータベースを利用した相同性検索やモチーフ検索を行った結果、他の生物の EF-1 α 遺伝子と相同の領域であることが分かった。RT-PCR により、本遺伝子の発現は葉状の配偶体と糸状の胞子体の両世代で認められた。

イントロンを含む約 1.3 kbp の EF-1 α 遺伝子の上流配列を利用してスサビノリ用にプロモーター領域を改変した発現ベクター、p47GUS と p47GUS-IL を構築した。この 2 つのベクターをパーティクルガンによってスサビノリ TU-1 株へ導入し、 β -glucuronidase 遺伝子の一過性発現における β -glucuronidase の活性を組織化学的アッセイによる手法で検出した。pBI221 をタマネギの表皮細胞に導入した時の一過性発現効率を 1 とし、p47GUS をスサビノリ TU-1 株に導入した場合の一過性発現効率を算出した結果、パーティクルガンの発射口と試料との距離が 7 cm の条件で約 5.5×10^{-3} 倍、発射口と試料との距離が 8 cm の条件で約 1.7×10^{-2} 倍、発射口と試料との距離が 9 cm の条件で約 3.3×10^{-2} 倍であった。p47GUS-IL については、発射口と試料との距離が 8 cm の条件で約 5.5×10^{-3} 倍であり、発射口と試料との距離が 9 cm の条件で約 5.5×10^{-3} 倍であった。

以上の結果から、p47GUS をスサビノリ TU-1 株に導入した場合、発射口と試料間の距離が 9 cm の条件での一過性発現率は、pBI221 を同じ距離で導入した時の 3 倍であった。また、p47GUS-IL を試料との距離を 9 cm として一過性発現を行った時の効率は、pBI221 を同じ距離で試料に遺伝子を導入した時の 1/2 倍であった。これらの結果から、p47GUS に用いられたイントロンを含む約 1.3 kbp の EF-1 α 遺伝子の上流配列は、陸上植物で開発された発現ベクター pBI221 よりもプロモーター部分として機能していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 嵯 峨 直 恆
副 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 教 授 都 木 靖 彰
副 査 助 教 授 安 井 肇

学位論文題名

海産紅藻スサビノリの Elongation factor-1 α 遺伝子の 構造解析とその遺伝子導入における 発現ベクターとしての応用

アマノリ属は海産の多細胞藻類であるアサクサノリ、スサビノリなどの産業的に重要ないくつかの種を含んでいる。スサビノリの示す諸現象を分子遺伝学的に探求するために形質転換は必須の技術である。しかしながら、スサビノリでは安定した形質転換系が確立していないため、タグラインやノックアウトを利用した分子遺伝学的研究の報告例はない。

本論文は、6つの章より構成され、第1章では、全体における緒言を示し、第2章において、既存の陸上植物用ベクターを利用したパーティクルガンによる遺伝子導入法の基礎的知見を得るとともに、発現ベクター開発の重要性について論じた。第3章では、EF-1 α 遺伝子のクローニング法を示し、得られた cDNA の構造と mRNA の発現の特徴について論じた。第4章では、EF-1 α 遺伝子のプロモーター領域を含むゲノム DNA 配列のクローニング法を示し、cDNA 配列との構造比較と RT-PCR による mRNA 発現の特徴について論じた。第5章では、第4章で決定したプロモーター領域を含むゲノム DNA 配列を利用した発現ベクターの開発を行い、それらを用いた遺伝子導入を試みた。第6章では、研究の総括を行い、形質転換系の確立における今後の課題ならびに研究方針について論じた。

第2章において、陸上植物用 pBI221 ベクターをパーティクルガンによってタマネギの表皮細胞とスサビノリ TU-1 株へ導入し、 β -glucuronidase 遺伝子の一過性発現における GUS 活性を組織化学的アッセイによる手法で検出した。タマネギの表皮細胞の一過性発現効率 $[2.5(\pm 1.1) \times 10^{-4}\%]$ を 1 とし、スサビノリ TU-1 株への一過性発現効率を相対的に比較した。その結果、一過性発現効率はパーティクルガンの発射口と試料との距離が 8 cm の条件で約 5.5×10^{-3} 倍であり、発射口と試料との距離が 9 cm の条件で約 1.1×10^{-1} 倍であった。

第3章において、葉状の配偶体由来する cDNA ライブラリーから EF-1 α 遺伝子の候補を単離し、その構造と発現を明らかにした。塩基配列を決定した cDNA の全長は 1,644 bp であり、その配列中に推定 449 個のアミノ酸に翻訳される読み取り枠が見つかった。インターネット上のデータベースを利用した相同性検索やモチーフ検索を行った結果、他の生物の EF-1 α 遺伝子と相同の領域であることを確認した。ノーザンハイブリダイゼーションにより、本遺伝子の発現は葉状の配偶体と糸状の胞子体の両世代で認められ、発生段階によって発現量の顕著な変動は見られなかった。

第4章において、葉状の配偶体由来するゲノムライブラリーから EF-1 α 遺伝子上流配列を含むゲノム DNA のクローンの候補を単離し、その構造と発現を明らかにした。ゲノム DNA のクローン中には約 1.3 kbp の上流配列が見つかった。また、本遺伝子は 5' 非翻訳領域に 1 個のイントロンを持つことが明らかとなった。インターネット上のデータベースを利用した相同性検索やモチーフ検索を行った結果、他の生物の EF-1 α 遺伝子と相同の領域であることが分かった。RT-PCR により、本遺伝子の発現は葉状の配偶体と糸状の胞子体の両世代で認められた。

第5章において、イントロンを含む約 1.3 kbp の EF-1 α 遺伝子上流配列を利用してスサビノリ用にプロモーター領域を改変した発現ベクター、p47GUS と p47GUS-IL を構築した。この2つのベクターをパーティクルガンによってスサビノリ TU-1 株へ導入し、 β -glucuronidase 遺伝子の一過性発現における β -glucuronidase の活性を組織化学的アッセイによる手法で検出した。この結果から、p47GUS に用いられたイントロンを含む約 1.3 kbp の EF-1 α 遺伝子上流配列は、陸上植物で開発された発現ベクター pBI221 よりもプロモーター部分として機能していることが示唆された。

主論文は平成 15 年 1 月 29 日 16 時から 17 時まで第二研究棟特別講義室において、審査員および関連教官 9 名および一般聴講 20 名出席のもと発表された。一般聴講においては、目的の遺伝子を含むゲノムクローンの取得方法、5' 非翻訳領域に含まれるイントロンの特徴、金属粒子のサイズと導入する強さとの関係について質疑・応答がなされた。また、審査員および関連教官においては、スサビノリにおける形質転換系の確立後の展望、発現ベクターのターゲットとする細胞ステージや細胞内における発現部分について質疑・応答がなされた。本論文で開発したスサビノリ固有の遺伝子上流配列を利用した発現ベクターは、大型藻類の形質転換の研究に貢献すると判断し、博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。