

氏 名	かわ 河 田 よし 悦 かず 和
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2602 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on recombinant DNA techniques for cyanobacterium <i>Spirulina platensis</i> (ラン藻スピルリナの遺伝子組換え技術の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 東 肇 教 授 井 上 國 世 教 授 村 田 幸 作

論 文 内 容 の 要 旨

スピルリナは、1960年代以降、健康食品や飼料、さらには食用の青色色素フィコシアニンの原料資源として利用され、現在では世界各地で商業培養が行われている。今後、より広範にスピルリナを利用するためには、培養コストの低減化とともに、有用物質生産量を増加させるなどの技術開発により菌体の付加価値を向上させることが重要である。本研究は、スピルリナの遺伝子組換えに関する基本技術の確立を試み、原核生物の新たな遺伝子組換え手法の開発と、これらの技術をもとにスピルリナの形質転換を行ったもので、その主たる内容は次のように要約される。

1. ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 でのサケ成長ホルモンの生産

ラン藻での遺伝子組換えの基礎技術を検討するため、まずは関連技術がある程度確立されているシネココッカスを用いて、サケ成長ホルモンの生産を試みた。大腸菌の *trp* プロモーターにより誘導されるサケ成長ホルモン遺伝子を常在するプラスミドに導入し、成長ホルモン発現ベクター pQSG1 を作成した。このベクターを *Synechococcus* sp. PCC7002 に導入したところ、総タンパク質量の0.1%に相当する成長ホルモンの発現を認めた。しかしながら、本手法は、プラスミドを持たないラン藻スピルリナに応用し難いことが判明した。

2. メチル化された DNA に有効なゲノムライブラリーの作成

スピルリナのゲノム DNA は、内在する制限酵素などから自身を保護するためメチル化されており、制限酵素で切断することが難しい。そこで、T ベクターによる PCR 産物のクローニング効率が高いことに注目し、これを用いてゲノムライブラリーを作成した。ゲノム DNA を超音波により断片化し、両末端を平滑化した。dATP のみを基質として *Taq* ポリメラーゼを反応させ、一塩基アデニンが伸長したゲノム DNA 断片を得た。これを T ベクターと接合し、大腸菌に形質転換してゲノムライブラリーを作成した。その作成効率は、 3.0×10^5 cfu/ μ g T ベクターであった。さらに、致死性遺伝子を含むベクターを用いるなどの改善により、作成効率を10倍程度向上させ、このライブラリーからカロテノイド生合成系遺伝子 *crtB* と *crtP* のクローニングに成功した。

3. リポフェクション法の大腸菌への適用

スピルリナと同じ原核生物である大腸菌をモデル生物とし、温和な条件で遺伝子などを細胞に導入する手法であるリポフェクション法を本菌に適用した。大腸菌は、内膜をペプチドグリカン層や外膜がおおっている構造を持っており、遺伝子を導入するには、高電圧や、ルビジウム、カルシウムなどの薬剤が用いられてきた。ペプチドグリカン層などを持たない培養細胞などには、カチオンリポソームを用いたリポフェクション法が汎用されているが、大腸菌などには適用できないと考えられていた。本研究では、この手法が大腸菌にも適用でき、ごく簡単に遺伝子が導入できることを見いだした。形質転換効率は、最高 2.0×10^5 cfu/ μ g ベクターであり、カルシウム法などと比較して、1/10-1/100程度の効率であった。また、この手法はプラスミド DNA だけでなく、トランスポゾン-トランスポザゼ複合体の導入にも有効であった。

4. スピルリナの形質転換手法の開発

Tn5 トランスポゾンとトランスポザーゼの複合体を *in vivo* で作成し、電気穿孔で導入する手法が最近開発された。本研究ではこの技術を改良し、トランスポゾン-トランスポザーゼ複合体に、さらにカチオンリポソームを複合化することで、より安定、高頻度にトランスポゾンを導入するシステムを開発した。スピルリナゲノム由来のプロモーターにより誘導される *cat* を含む Tn5 トランスポゾンと、トランスポザーゼにより一次複合体を形成した。これにカチオンリポソームを加え、二次複合体を形成した。本複合体を単細胞化した *Spirulina platensis* strain C1 の菌体と混合し、電気穿孔を行い、選択培養をおこなった。約3週間後、クロラムフェニコール 2.0 µg/ml の濃度でトランスポゾンを含む形質転換体が生育していることを確認した。経時的にサンプリングしながら培養したところ、1年以上安定的に CAT が発現し、サザンブロット解析によりゲノムに *cat* が導入されていることを確認した。

以上のように、本論文は、原核生物に対する遺伝子工学手法を開発、改善することにより、スピルリナの安定的な遺伝子組換えができることを示したものである。著者は、さらに、開発、改善された組換え手法が、スピルリナだけでなく、他のバクテリアなどへの適用が可能であり、汎用的な手法として広範な利用が可能であることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

スピルリナは、健康食品、飼料、さらには食品色素用資源として世界各地で商業培養が行われている。しかしながら、より広範にスピルリナを利用するためには、培養コストの低減化とともに、遺伝子組換え手法による有用物質生産量の向上など菌体の付加価値のさらなる向上が望まれている。本研究は、これまでその手法の開発が十分ではなかったスピルリナの遺伝子組換え技術の基盤を確立することを目的としたもので、成果として評価できる点は以下のとおりである。

1. ラン藻の一種、*Synechococcus* sp. PCC7002, において、サケ成長ホルモンを総タンパク質量の0.1%で発現生産させることに成功した。サケの飼料となる本藻類に生理機能を併せもたせることに成功した本成果は、広く商業培養がなされているラン藻スピルリナでの遺伝子組換え技術の確立が、より付加価値の高い菌体作成へ繋がる可能性を示したものである。
2. メチル化されたゲノムなどの DNA において効率的なライブラリー作成法を提示し、そのライブラリーからカロテノイド生合成系遺伝子 *crtB* や *crtP* をクローニングした。本法は、通常単一の PCR 産物をクローニングするのに用いる T ベクターをライブラリー作成に用いたもので、単純な手法であるがゆえに汎用できる技術として評価できる。
3. スピルリナと同じ原核生物である大腸菌に対して、カチオンリポソームを用いたリポフェクション法を適用し、形質転換に成功した。リポフェクション法は、細胞膜の構造から原核生物では検討されていなかった。ここで得られた形質導入効率は低いものの、実験操作は平易であり、汎用可能なものと思われる。また、古細菌、真核生物で行われているリポフェクション法が原核生物にも適用されたことで、遺伝子取り込みに関する脂質膜の役割などに新たな視点を与えるものと評価できる。
4. Tn5 トランスポゾン-トランスポザーゼ酵素の複合体に、さらにカチオンリポソームを複合化することにより、より安定、かつ高頻度にトランスポゾンを導入する手法を開発し、本手法を用いて *cat* によるスピルリナの安定的な形質転換体の作出に成功した。ここで得た基本技術は、商業的に重要なスピルリナや他の微生物の組換え手法として、今後、広く利用されることが期待される。

以上のように、本論文は、ラン藻スピルリナの高度利用を目指して、汎用性のある遺伝子組換え手法を開発したもので、その成果はスピルリナの利用拡大の観点から関連する応用的諸分野に貢献するのみならず、遺伝子工学や応用微生物学など基礎的学術分野に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。