

論文の内容の要旨

農学国際 専攻
平成 22 年度 博士課程進学
氏名 本間 洋平
指導教員名 山川 隆

論文題目 糖誘導性プロモーターを用いた植物による異種タンパク質生産系の開発に関する研究

1 章 序論

植物の遺伝子組換え技術が確立してから、今日では植物に有用物質を生産させる第 2 世代の **genetically modified organism (GMO)** の開発が注目されている。第 2 世代の **GMO** の開発課題の 1 つに導入した物質の安定的な蓄積が挙げられる。例えば、ワクチン抗原タンパク質などの有用物質を蓄積する作物を食しても有用物質の蓄積量が少量では免疫応答の誘導は認められないと予想される。その解決策として、目的物質の条件特異的な生産や貯蔵器官への蓄積、などが挙げられる。本研究で著者は目的物質の条件特異的な生産に着目して、タンパク質を大量に蓄積する植物の開発を行った。

2 章 糖誘導性プロモーターを用いたタバコによる GUS の高発現

Youhei Honma, Takashi Yamakawa High-level expression of sucrose inducible sweet potato sporamin gene promoter: β -glucuronidase fusion gene in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Biotechnol.* 2015 (in press)

第 2 世代の **GMO** の開発において、宿主植物に導入する遺伝子の発現コンストラクトの設計が重要である。植物用の発現コンストラクトによく用いられる **CaMV35SRNA** プロモーター (35S) は導入した遺伝子を宿主植物全体に常時発現させるが、宿主植物への負担が大きいと考えられている。一方、条件特異的に発現誘導するプロモーターは宿主植物への負担が少なく、植物を用いたタンパク質生産系の開発に適していると考えられる。そこで著者は糖濃度に応じて発現誘導が可能なサツマイモ由来のプロモーター **Spo^{min}** を用いて、糖処理によってタンパク質を大量に生産する植物の開発を目的とした。

まず著者は **Spo^{min}** の下流にレポータータンパク質 (**GUS**) の遺伝子を連結した **GUS** 発現コンストラクトを作成した。次に **Spo^{min}** が植物体内において糖処理によって遺伝子発現を誘導するか確認するため、組換え体の作成が容易であるタバコに **GUS** 発現コンストラクトを導入し、糖処理による **GUS** の発現パターンを解析した。その結果、糖処理によって **Spo^{min}** はタバコの各器官 (葉、茎、根) において **GUS** の発現を誘導し

た。最大生産量は6%スクロースを葉に処理したときであり(約44.9 µg GUS/g leaf fresh weight)、35SによるGUS生産量の最大18.0倍であった。従って、Spo^{min}は植物を用いたタンパク質生産系の開発に有用ではないかと考えられる。

3章 糖誘導性プロモーターを用いたタバコ毛状根によるGUSの高発現

Youhei Honma, Takashi Yamakawa High-level expression of sucrose inducible sweet potato sporamin gene promoter: β-glucuronidase fusion gene in transgenic *Nicotiana glauca* hairy roots. (in preparation)

毛状根は、*Agrobacterium rhizogenes* の感染によって誘導される、分枝が著しく生育が旺盛な根である。また、毛状根は生合成した物質を培地中へ漏らす。従って、2章で作成した組換えタバコから毛状根を誘導することで、糖処理によって発現誘導されたタンパク質を培地へ漏出する系の開発が可能であると考えられる。そこで著者はGUS発現コンストラクト導入タバコの毛状根を誘導し、糖処理によるGUSの発現パターンを解析した。その結果、糖処理によってSpo^{min}は毛状根においてもGUSの発現を誘導した。最大生産量は10%スクロースを処理したときであり(約10.2 µg/g root fresh weight)、35SによるGUS生産量の約82.5倍であった。また、Spo^{min}によって発現誘導されたGUSの毛状根から培地中への漏出も認められ、最大漏出量は約10 ng/ml culture mediumであった。従って、Spo^{min}は毛状根を用いたタンパク質生産系の開発においても有用ではないかと考えられる。

4章 糖誘導性プロモーターを用いたサツマイモによるGUSの高発現

Youhei Honma, Takashi Yamakawa High-level expression of sucrose inducible promoter: β-glucuronidase fusion gene in transgenic sweet potatoes. *Plant biotechnol.* (in preparation)

サツマイモは、①熱帯を中心に栽培可能地域が広い、②単位面積当たりの収量がイネの約3倍(13.4 t/ha FAO, 2013)、③デンプンやタンパク質などを蓄積する塊根を形成する、などの特徴があり、組換え体作成用の作物として優れている。しかし、サツマイモ組換え体の作成には、用いる品種や組織などを検討した知見に加えて、実験者の技術や経験が必要である。大谷らの方法に従い、著者はサツマイモの高系14号の茎頂を用いて組換え体を作成しているが、組換え体取得率は約1.5%であった。そこで、まず組換え体取得率の向上を検討した。組換え体作成には第2章で作成したGUS発現コンストラクトを用いた。その結果、組換え体取得率が約6.67%まで向上した。

次に、作成した組換えサツマイモを用いて糖処理によるGUSの発現パターンを解析した。その結果、糖処理によってGUSの発現誘導が認められたが、塊根において糖処理無しの条件におけるGUSの発現量の方が高かった。糖処理無しにおける最大生産量は約52.8 µg GUS/g tuberous root fresh weightであり、35SによるGUS生産量の最大1177.6倍であった。サツマイモは塊根内における糖濃度が高いため、外部からの糖処理が無くても塊根形成の際に葉から転流された糖によってGUSの発現が既に誘導されていたと考えられる。従って、Spo^{min}によるタンパク質生産系は、サツマイモの塊根の様な糖濃度が高い器官を用いる場合、糖処理無しでタンパク質の大量生産が可能だと考えられる。

5章 まとめ

本研究は Spo^{min} を用いたタンパク質の高発現に関する初の報告である。他の糖誘導性プロモーター、例えばジャガイモ由来のパタチンプロモーターによる GUS の発現量は本研究の 0.1%未満である。Spo^{min} 以外にもサツマイモ由来の複数の糖誘導性プロモーターの報告があるが、物質生産系の開発に用いられた報告は無く、Spo^{min} に比べてタンパク質の発現量は低い。糖誘導性プロモーターの遺伝子発現には糖が必要であるが、用いる作物内の糖濃度が高い場合、外部からの糖処理が無くても器官形成の間に十分なタンパク質の生産を行うことができると考えられる。従って、本研究は第 2 世代の GMO の開発に大きく貢献できると予想される。