

エマチン耐性レベルを指標とした外来遺伝子に対する
転写抑制緩和変異クラミドモナス株の選抜

Isolation of gene silencing alleviated *Chlamydomonas* mutants
using the emetine resistance levels for a selection

修士論文

物質・生命システム工学コース 山根 雅裕

目次

目次	1 頁
要旨	2 頁
序論	3~4 頁
材料と方法	5~11 頁
結果と考察	12~32 頁
謝辞	33 頁
参考文献	33~34 頁

[要旨]

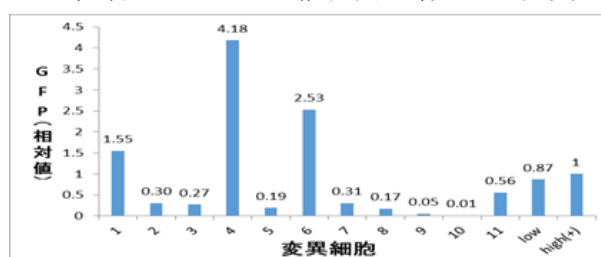
様々な組み換えタンパクの質の生産工場として、増殖が極めて速く、遺伝的性質がよく研究されている真正細菌 (*Bacteria*) が用いられている。しかし、真正細菌では、真核生物の酵素が正常に機能するために必要な糖鎖付加が一般的に行われない。このため、原核生物である真正細菌において真核生物由来の酵素遺伝子を発現させても、正しいタンパク質の折り畳み構造が再現されないため正常な生理活性を持つタンパク質を生産できないことが多い。

それに対して、真核単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) による、真核生物由来のタンパク質生産系はいくつかの点で有望である。クラミドモナスは真正細菌と同様に増殖が速く、遺伝的性質がよく研究されているモデル生物である。また、無機塩類のみの安価な培地の利用が可能であり、細胞内には有害な物質は含まれておらず、生産させたタンパク質を細胞ごと利用できる面を有している。一方で、クラミドモナスは外来遺伝子を導入されると、外来遺伝子に対して特異的な強い転写抑制 (Transcriptional Gene Silencing :TGS) が働く。そのため、外来遺伝子由来の生産物を大量に得ることは困難である。またクラミドモナスでは、外来遺伝子の発現に対して寛容なゲノム内の領域はほぼ無いと考えられている。転写抑制は遺伝子のメチル化修飾と、それに対して、共役的に起こるヒストン修飾が主な機構であると考えられている。シトシンのメチル化に反応して、クロマチンが凝集構造をとる事で転写抑制が引き起こされる事が示唆されている。本研究では、すでに得られている転写抑制緩和株を用い、さらなる人為的な突然変異により、いっそう転写抑制が緩和された変異株の選抜を行った。

材料として、同研究室サリ一らの先行研究により得られた転写抑制が緩和された株 *met1(UVM)-47A*、*met1(UVM)-47B*、*met1(UVM)-57* の 3 株を用いた。

方法は、UV 照射後の外来遺伝子発現量を示す為に、予め細胞に薬剤耐性 (Emetine 耐性) を賦与する遺伝子 (*cry-1* 遺伝子) を導入した。*cry-1* 形質転換体の中でも薬剤耐性が低い細胞を一次選抜細胞とし、UV 照射による突然変異を誘発して、二次クリーニングを行なった。この選抜により、強い転写抑制の働く位置に導入されていた *cry-1* 遺伝子に対する転写抑制機構が破壊、もしくは軽減した株の選抜が可能であると期待できる。これらの二次選抜細胞は *ble-GFP* 遺伝子が既に導入されており、*GFP* タンパク量を Western Blotting 法により測定することで、転写抑制がどの程度緩和されたかを推定した。

二次選抜後では、Emetine 耐性は突然変異前よりも 1.5~3 倍上昇していた。また、外来遺伝子である *ble-GFP* のタンパク質増加量としては、最大でおよそ 4 倍程度の増加した変異細胞を獲得した。外来遺伝子に対して転写抑制がさらに緩和された変異体であると期待される。*ble-GFP* 以外の外来遺伝子にも同様に転写抑制が緩和されるのかその可能性を追求していきたい。



[序論]

様々な組み換えタンパクの質の生産工場として、増殖が極めて速く、遺伝的性質がよく研究されている真正細菌が用いられている(Terpe 2006)。真正細菌では、タンパク質の機能発現や構造の安定化を行うジスルフィド結合 (disulfide bond) の形成は可能だが、タンパク質の活性化や翻訳後修飾の機能調節を行うリン酸化 (phosphorylation)、アセチル化 (acetylation)、ユビキチン (ubiquitin) 化はできないか、限定的である。また、真正細菌では真核生物の酵素が正常に機能するために必要であり、タンパク質の親水性を高めると考えられている糖鎖付加 (glycosylation) も一般的に行われなない。このため、原核生物である真正細菌において真核生物由来の酵素遺伝子を発現させても、正しいタンパク質の折り畳み構造が再現されないため不溶化した凝集塊が生じ、正常な生理活性を持つタンパク質を生産できないことが多い(Sahdev et al. 2008)。

単細胞緑藻のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) による真核生物由来のタンパク質生産系はいくつかの点で有望である。クラミドモナスは真正細菌と同様に増殖が速く、遺伝的性質がよく研究されているモデル生物である。また、細胞内には有害な物質は含まれておらず、生産させたタンパク質を細胞ごと利用できる面を有している。一方で、クラミドモナスは外来遺伝子を導入されると、外来遺伝子に対して特異的な強い転写抑制 (Transcriptional Gene Silencing :TGS) が働くという面も有している(Kong et al. 2014; Neupert et al. 2009; Rasala et al. 2014; Mussnug 2015)。そのため、その転写抑制により外来遺伝子由来の生産物を大量に得ることは困難である。また、クラミドモナスでは、外来遺伝子の核ゲノムへの挿入は、ランダムな位置に起こるが、転写抑制はゲノムの全域に及んでおり、外来遺伝子の発現に対して寛容な位置はほぼ無いと考えられている(RAsala et al. 2012; Plucinak et al. 2015; Kong et al. 2015; Jinkerson et al. 2015)。

生物種によらず同様の経路で mRNA の塩基配列特異的分解と、遺伝子の転写そのものの不活性化が共通に起こっていることがわかってきた。標的となった遺伝子の特異的な不活性化には、塩基のメチル化修飾頻度との関連性が指摘されている。シトシン、特に CpG 配列にあるシトシンのメチル化がヒストンの脱アセチル化、及びヒストン H3 タンパクにある9番目のリジン残基のメチル化などを引き起こす。これに呼応して、クロマチンが凝集構造をとる事で転写抑制が引き起こされる事が示唆されている。クラミドモナスでも人為的に導入した外来遺伝子の発現が見られなかったり、得られる形質転換体の個数が遺伝子毎に大きく違ったりという現象が知られている(Cerutti et al. 1997; Kurniasih et al. 2016)。

本研究では、人為的な突然変異により転写抑制が緩和された変異株を獲得できないかと考え、その作出方法及び、転写抑制緩和率について研究した。そのためにまず、形質転換体ごとの外来遺伝子発現量を示す為、細胞に薬剤耐性を獲得する遺伝子を導入し、薬剤を含む培地で培養することで各形質転換体を選抜できると考えた。単細胞緑藻のクラミドモナスは、ハイグロマイシン (Hygromycin) やスペクチノマイシン (Spectinomycin)

などの葉緑体リボソームタンパクを標的とした薬剤である抗生物質に感受性を示す。また、これらの抗生物質を修飾する遺伝子をクラミドモナスに導入すると、抗生物質に耐性を示す形質転換体が高頻度で得られる。しかし、産物が酵素であるため、少量の遺伝子発現株においても、高い薬剤耐性株となる(Kong et al. 2015)。一方、代謝回転する外来遺伝子に対する遺伝子抑制の緩和変異体の選抜には、マーカー遺伝子の発現量と薬剤耐性強度が、広い範囲の薬剤濃度にわたって正比例するようなマーカーの使用が適当である。そこで遺伝子の発現量と薬剤耐性強度が広い範囲にわたって正比例することが知られている、*cry-1* 遺伝子と抗生物質のエマチン (Emetine) を用いることを考えた。*cry-1* 遺伝子が導入されたクラミドモナスは、翻訳が行われるリボソーム S14 が変異し、抗生物質エマチンに対して耐性を獲得することが知られている(Nelson et al. 1994; Neupert et al. 2009)。

抗生物質エマチンを用いて外来遺伝子の発現量を指標的に確認し、転写抑制が緩和された細胞を選抜することで、クラミドモナスが真核生物由来のタンパク質生産の場として活用できないか、その可能性を追求した。

[材料と方法]

Chlamydomonas reinhardtii の株

細胞壁が貧弱な *C. reinhardtii* CMJ030 (CC - 4533) の DNA メチル基転移酵素 *MET1* を変異させ、紫外線照射を経て、外来遺伝子の転写抑制を緩和し、導入遺伝子に高い変換率を示した 3 つの株 *met1(UVM)-47A*、*met1(UVM)-47B*、*met1(UVM)57* を同研究室の Sari から譲り受け用いた。

培養条件

met1(UVM)-47A、*met1(UVM)-47B*、*met1(UVM)-57* と、各変異株はすべて TAP 培養液 (Tris-Acetate-Phosphate 培地) と一部 N-free TAP 培地 (TAP 培地の成分のうち NH_4 を含まない) で培養した。液体培養する場合は TAP 培地に Emetine を添加し (TAP/eme)、 25°C 、5000lux (24 時間) の条件で振盪培養を行った。TAP/eme 寒天培地上で培養、および薬剤を添加した選択寒天培地でスクリーニングする場合は 25°C 、2500lux、(24 時間) の条件で静置培養した。寒天培地は終濃度 1% の寒天で固めてある。形質転換を行う場合は、寒天培地に非形質転換体致死量である終濃度 30~40 $\mu\text{g/ml}$ の Emetine を添加する。この培地に対数増殖期 ($2\sim 4 \times 10^8$ cells/ml) の細胞を培養することで、形質転換選抜に使用する。

Cry-1 遺伝子導入条件

met1(UVM)-47A、*met1(UVM)-47B*、*met1(UVM)-57* の 3 株を TAP 培養液で対数増殖期まで培養し、遠心分離処理を行った。遠心分離条件としては、3000rpm、5min、 17°C とした。遠心分離により細胞を沈殿させ、上澄みの培養液のみを入れ替えることで、元々の約 100 倍 (2×10^8 cell/ml) の細胞濃度に調節した。*cry-1* 遺伝子を含む plasmid p-631cry1 を制限酵素 EcoR I で切断し、線状化した DNA 3 $\mu\text{g/ml}$ を上記の細胞濃縮液 700 μl に加えて、電気穿孔法により NEPA21 (ネッパジーン社) を用いて遺伝子導入を行った。電気条件としては Poring Pulse (電圧: 250V、パルス幅: 8msec、パルス間隔: 50msec、回数: 2回、極性: +、減衰率 40%) Transfer Pulse (電圧: 20V、パルス幅: 50msec、パルス間隔: 8msec、回数: 5回、極性: +/-、減衰率 40%) である。

形質転換体のスクリーニング

非形質転換体最低致死量のアッセイ

met1(UVM)-47A、*met1(UVM)-47B*、*met1(UVM)-57*の3株をTAP培養液 5mlで3日間振盪培養し、細胞周期をおよそ対数増殖期中期に調整した。*Cry-1* 遺伝子導入前の Emetine 耐性限界を測定する目的で異なる濃度 TAP/eme 寒天培地に散布し培養した。寒天培地の Emetine 濃度としては 0 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、30 μ g/ml、40 μ g/ml、50 μ g/ml の6種類である。

標準的な方法に従った *cry-1* 形質転換体の選抜

細胞のダメージ回復と *cry-1* 遺伝子発現の為、遺伝子導入を行った細胞をTAP培養液に加え暗地で静置培養した。8~12時間培養後、各株の非形質転換体最低致死量を含む TAP/eme 寒天培地に散布し培養した。

変異 S14 リボソームの比率を高めた後の *cry-1* 形質転換体の選抜

遺伝子導入後一晩経過した細胞に、細胞内変異 S14 リボソームの比率を高める目的で、窒素源としてアンモニウム塩を含まない N-free TAP 培養液で3日間培養し、各株を飢餓状態に誘導した。クラミドモナスは窒素源欠乏の飢餓状態になると、細胞内のリボソームタンパクを積極的に分解することが知られているためである。飢餓状態後、TAP 培地に培地を置き換え 8~12時間暗室で静置培養した後に、非形質転換体最低致死量を含む Tap/eme 寒天培地に散布した。

広い Emetine 濃度におけるコロニーの生育速度と Emetine 耐性限界の関係性

形成されたコロニーをそれぞれ株種ごとに Large、Medium、Small のサイズごとに分別し、single colony isolation を行った。分離された single colony それぞれを 96 穴マイクロプレートで TAP 培養液 (200 μ l/well) を用いて細胞周期の定常期まで培養した。定常期まで培養することで、形質転換体ごとに細胞増殖速度の違いが存在しても、最終細胞濃度をほぼ一定に出来るためである。各細胞を 20 倍希釈した後に、コロニーの生育速度と Emetine 耐性の強度を調べる目的で、様々な Emetine 濃度の TAP/eme の寒天培地に各細胞を 10 μ l ずつ滴下し、Emetine 耐性限界を Spotting test で確認した。TAP/eme 寒天培地の Emetine 濃度としては、0、50、80、100、150、200、300 μ g/ml とした。同じ濃度の TAP/eme 寒天培地において、*cry-1* 遺伝子の発現が強く Emetine 耐性が強い細胞は、*cry-1* 遺伝子の発現が弱く Emetine 耐性が弱い細胞と比較して生育スピードが遅い、若しくは生育できないことが予想される。

望ましい Emetine 耐性株の選抜

Spotting test の結果から、高濃度の TAP/eme 寒天培地まで生育できなかった Small size colony を一次選抜細胞としてスクリーニングした。その後に、一次選抜した細胞を再び Spotting test を行った。基本的には前述と同様の方法で行った。低薬剤耐性株のスクリーニングが目的のため、TAP/eme 寒天培地の Emetine 濃度としては、0、30、40、60、90、120、150、200 μ g/ml とした。二度目の Spotting test の結果から、生育速度が遅くはなく、Emetine 耐性が低い細胞を二次選抜株としてスクリーニングした。

PCR 法を用いた *cry-1* 遺伝子の確認

96 穴マイクロプレートに TAP 培養液 200 μ l/well で選抜した、低 Emetine 耐性細胞を 3~5 日培養する。各培養液をエッペンチューブに 80 μ l 採取した後、遠心分離処理を行った。遠心分離条件としては、5000rpm、5min、17°C である。細胞以外の上澄みを捨て、滅菌水を 100 μ l 加えて -30°C の冷凍処理をした。PCR に用いる際には室温にて解凍した後に、滅菌水で 5 倍希釈した。また、PCR 反応液は TOYOBO 社の KOD FX Neo の内容物を用いた。反応液の組成としては、ddH₂O が 4.3 μ l、2×PCR Buffer for KOD FX Neo が 10.0 μ l、2mM dNTPs が 4.0 μ l、Forward Primer 5 μ M が 0.8 μ l、Reverse Primer 5 μ M が 0.8 μ l、KOD FX Neo(1.0U/ μ l)が 0.1 μ l を一度懸濁し、懸濁液 17.0 μ l と細胞液 3 μ l を加えたものとする。PCR 反応条件としては、熱変性処理を 98°C で 15 秒、アニーリング処理を 58°C で 30 秒、伸長反応処理を 68°C で 60 秒、この一連の処理を 45 サイクルで行った。その後、アガロース 0.4g に対して TAE40ml と EtBr0.4 μ l を加えたアガロースゲルで電気泳動を行い、各低 Emetine 耐性細胞における *cry-1* 遺伝子の存在を確認した。

遺伝子抑制機構が緩和された突然変異体の作出

各細胞を 40ml の TAP 培養液にて振盪しながら対数増殖期中期(約 2×10^6 cell/ml)まで培養した後に、遠心分離処理を行った。遠心分離条件としては、3200rpm、7min、25°C である。細胞以外の上澄みを捨て、残った細胞を 20ml の TAP 培養液に懸濁することで、細胞濃縮液(約 5×10^6 cell/ml)にした。細胞濃縮液をプラスチックシャーレに移動し、シャーレの蓋を外したまま、60 秒間の紫外線照射を行った。この処理により 50~60%の細胞が死滅してしまうことが予想される。細胞をシャーレから移動させ暗室で 24 時間静置した後に、遠心分離処理を行った。遠心分離条件としては、3200rpm、7min、25°C である。細胞以外の上澄みを捨て、480 μ l の TAP 培養液で細胞を濃縮し、スクリーニングに用いる TAP/eme 寒天培地 1 枚あたりに 80 μ l の細胞濃縮液を散布した。TAP/eme 寒天培地の Emetine 濃度としては 150 μ g/ml、200 μ g/ml の 2 種類を用い、1 つの細胞種に対して、それぞれ 3 枚ずつ、計 6 枚の TAP/eme 寒天培地でスクリーニングを行った。

Western Blotting

関連試薬の調節

1) 0.5M Tris pH6.8

30.285g の Tris に超純水 350ml を加えた。あらかじめ調節しておいた 6N の塩酸を加え、pH メーターを用いて PH6.8 に調節した。超純水を加えて全量を 500ml にした。調整後、オートクレーブ滅菌処理を行った。

2) 1M Tris pH7.4

60.57g の Tris に超純水 350ml を加えた。6N の塩酸を加え、pH メーターを用いて PH7.4 に調節した。超純水を加えて全量を 500ml にした。調整後、オートクレーブ滅菌処理を行った。

3) 1M Tris pH8.8

60.57g の Tris に超純水 350ml を加えた。6N の塩酸を加え、pH メーターを用いて PH8.8 に調節した。超純水を加えて全量を 500ml にした。調整後、オートクレーブ滅菌処理を行った。

4) Acrylamide-bis stock solution 30%

Acrylamide 60g と N,N'-Methylenebisacrylamide 1.6g を超純水に加え、全量を 200ml に遮光保存した。

5) Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) solution 10%

Sodium Dodecyl Sulphate 10g を超純水に加え、全量 100ml にした。

6) Ammonium persulfate (APS)

ammonium persulfate 0.1g に超純水を加え、全量 1ml にした。

7) 1M Dithiothreitol (DTT)

Dithiothreitol 1.542g に超純水を加え、全量 10ml にした。

8) Resolving gel buffer

3)を 75ml と 5)を 2ml に超純水を加え、全量 100ml にした。

9) Stacking gel buffer

1)を 100ml と 5)を 4ml に超純水を加え、全量を 200ml にした。

10) 2×SDS Sample buffer

1)を 2ml、5)を 4ml、Glycerol を 2ml、超純水を 1.5ml、あらかじめ調節しておいた 0.02 % Bromophenol blue (BPB)を 150 μ l、7)を 0.5ml 加え、全量約 10ml にした。

11)10×Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T)

2)を 100ml と NaCl を 29.22g、超純水を全量 495ml になるまで加え、オートクレーブ処理を行った後、Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (tween20)を 5ml 加えて全量 600ml にした。

泳動サンプルの作成

各細胞と TAP 培養液 10ml を試験管に加え、3~5 日程度振盪培養した。分光光度計を用いて細胞数が 5.0×10^6 [cell/ml] となるように遠心分離処理を行った。遠心分離条件としては、 $3000 \times g$ 、5min、 $4^\circ C$ である。細胞以外の上澄みを捨て、集藻し $-30^\circ C$ で凍結した。各細胞に $40 \mu l$ の 10) を加え、ボルテックスを用いて攪拌しつつ解凍した。ウォーターバスを用いて 5 分間煮沸した後に、遠心分離処理を行った。遠心分離条件としては、 $16000 \times g$ 、2min、 $19^\circ C$ である。遠心分離により生じた上澄みをサンプルとして泳動に用いる。

SDS-PAGE の作成

耳付きガラス板とガラス板を 100 エタノールで拭き、Mini-PROTEIN Tetra Cell casting frame を組み立てた後に、casting stand に取り付けた。この時、ガラス板の下辺全体に白色ワセリンを適量塗布し、casting stand のパッドとガラス板の間にパラフィルムを挟んでおいた。Resolving gel(Running gel) を調整した後、ガラス板の隙間に 5ml 入れ、水飽和ブタノールで上から重層した。Resolving gel 1 枚当たりの組成は、4) が 2.5ml、8) が 3.0ml、超純水が 0.5ml、6) が $60 \mu l$ 、Tetra-methyl-ethylene-diamine (TEMED) が $6 \mu l$ である。30 分静置してゲルが固まるのを待ち、上層のブタノールを捨て蒸留水で洗い流す。余分な水分を取り除いた後、Stacking gel を調節してゲル液に重層し、コームを挿す。Stacking gel 1 枚当たりの組成は、4) が $330 \mu l$ 、9) が $910 \mu l$ 、超純水が $570 \mu l$ 、6) が $10 \mu l$ 、TEMED が $2 \mu l$ である。30 分間静置してゲルが固まるのを待ち、Mini-PROTEIN Tetra Cell casting frame と casting stand からガラス板を外して Electrode assembly に取り付け、Mini tank にセットした。Electrode assembly の内側と Mini tank に Electrophoresis buffer を適量入れた。Electrophoresis buffer の組成は、Tris が 4.5g、Glycine が 21.6g、SDS が 1.5、超純水を加え、全量を 1500ml とした。ゲルの各 well に BlueStar prestained protein marker を $2.5 \mu l/well$ とサンプルを $15 \sim 5 \mu l/well$ 入れ、10mA/gel で 15 分、20mA で 1 時間程度、電流を流し泳動させた。泳動終了後、ゲルを Electrode assembly とガラス板から外し、protein marker を目安に H3 と GFP タンパクに相当する領域をゲルから切り出した。予冷してあった Protein transfer buffer に浸している状態で Gel holder cassette に Fiber pad、Filter paper、Gel、Membrane、Filter paper、Fiber pad の順に重ねた。Protein transfer buffer の組成は、Tris が 0.6g、Glycine が 28.8g、SDS が 0.2g、Methanol が 400ml、超純水を加え、全量を 2000ml とした。また、Membrane は $0.2 \mu m$ の PVDF Membrane を予め Methanol と超純水による親水処理を施し、 $8 \times 3cm$ のサイズで用いた。低温室において転写用の

Buffer tank に Protein transfer buffer を適量入れ、その中に Gel holder cassette をセットし、一定電流 50mA で一晩転写させた。

Western Blotting によるタンパク質の測定

Buffer tank と Gel holder cassette から Membrane を外し、1×TBS-T 40ml で 10 分間洗浄した後に、Blocking buffer 10ml で H3 Membrane は室温、GFP Membrane は 4°C で 2 時間振盪した。1×TBS-T は 1l 60ml に超純水を加え、全量 600ml にしたものである。Blocking buffer は 1×TBS-T 150ml にスキムミルク 7.5g を加えたものである。一次ブロッキング完了後、それぞれの一次抗体液を用い、H3 Membrane は室温 2 時間、GFP Membrane は 4°C で一晩振盪した。一次抗体液の組成は、Blocking buffer 10ml に予め 2% に調節した sodium azide 100 μ l とポリクローナル抗体である Living Colors® Full-Length GFP Polyclonal Antibody(一次抗体)と Anti-Histone H3 antibody - Nuclear Loading Control and ChIP Grade(一次抗体) 1 μ l を添加したものである。一次抗体結合後の H3 Membrane を 1×TBS-T 40ml で 10 分間洗浄を 3 回行い、Blocking buffer 10ml で 30 分間振盪した。二次ブロッキング完了後、H3 Membrane に二次抗体液を用いて室温で 2 時間振盪した。二次抗体液の組成は、Blocking buffer 10ml に Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey(二次抗体) 0.5 μ l を添加したものである。1×TBS-T 40ml で 10 分間洗浄を 3 回行い、化学発光ルミノール試薬で H3 タンパクの量に応じて発光させ、化学発光検出装置 (CCD カメラ) を用いて撮影した。翌日、一次抗体結合後の GFP Membrane も同様に 1×TBS-T 40ml で 10 分間洗浄を 3 回行い、Blocking buffer 10ml で 30 分間振盪した。二次ブロッキング完了後、GFP Membrane に二次抗体液を用いて室温で 2 時間振盪した。二次抗体液の組成は、Blocking buffer 10ml に Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey(二次抗体) 0.5 μ l を添加したものである。1×TBS-T 40ml で 10 分間洗浄を 3 回行い、化学発光ルミノール試薬で GFP タンパクの量に応じて発光させ、化学発光検出装置 (CCD カメラ) を用いて撮影した。

顕微鏡による GFP タンパク質の観察

ble-GFP タンパク質を持つ細胞を TAP 培養液 10ml で 3~5 日振盪培養した。培養後、各細胞でプレパラートを作成し、顕微鏡を用いて 1000 倍の倍率で観察した。

[結果と考察]

非形質転換体最低致死量の確認

met1(UVM)-47A と *met1(UVM)-47B* は共に、Emetine 濃度 $20\ \mu\text{g/ml}$ まではコロニーの形成を確認できたが、 $30\ \mu\text{g/ml}$ では確認できなかった。*met1(UVM)-57* は、Emetine 濃度 $30\ \mu\text{g/ml}$ まではコロニーの形成を確認できたが、 $40\ \mu\text{g/ml}$ では確認できなかった。以上より、*met1(UVM)-47A*、*met1(UVM)-47B* では $30\ \mu\text{g/ml}$ 、*met1(UVM)-57* では $40\ \mu\text{g/ml}$ が非形質転換体最低致死量の TAP/eme 寒天培地であると判断した(図 1)。

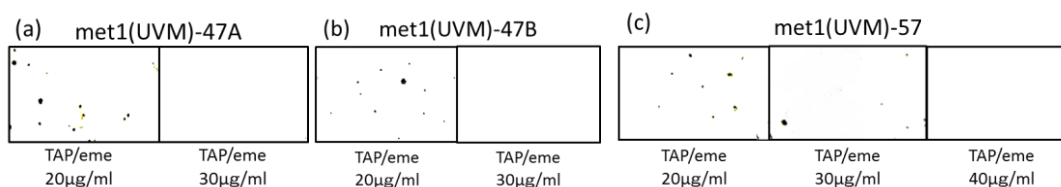


図 1. TAP/eme 寒天培地におけるコロニーの形成写真。(a) *met1(UVM)-47A* 株において、左が Emetine 濃度 $20\ \mu\text{g/ml}$ 、右が Emetine 濃度 $30\ \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(b) *met1(UVM)-47B* 株において、左が Emetine 濃度 $20\ \mu\text{g/ml}$ 、右が Emetine 濃度 $30\ \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(c) *met1(UVM)-57* 株において、左が Emetine 濃度 $20\ \mu\text{g/ml}$ 、真中 Emetine 濃度 $30\ \mu\text{g/ml}$ 、右が Emetine 濃度 $40\ \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。

標準的な方法に従った *cry-1* 形質転換体の選抜

met1(UVM)-47A、*met1(UVM)-47B*、*met1(UVM)-57* の 3 株を非形質転換体致死量である Emetine 濃度 $30\sim 40\ \mu\text{g/ml}$ の TAP/eme 寒天培地で培養したところ、コロニーは形成されず、*cry-1* 遺伝子を含む Emetine 耐性の形質転換体は確認できなかった。この原因としてクラミドモナス細胞に *cry-1* が導入され発現しても、本来細胞内に存在していた正常な S14 のリボソームの方が多く、導入された変異 S14 リボソームが少ない比率で細胞質内に混在する状態になっていたためと考えられる。この状態の細胞では十分な薬剤耐性が実現しないので、TAP/eme 寒天培地で生育してもコロニーが確認できなかったと考えた。*Cry-1* 遺伝子導入により Emetine 耐性を持つ形質転換体を得るには、TAP/eme 寒天培地による選抜前に、細胞内に存在する正常な S14 リボソームタンパク質をあらかじめ十分減らして、*cry-1* の産物である変異 S14 を持つリボソームの比率を増やしておく必要があると考えた。

変異 S14 リボソームの比率を高めた後の *cry-1* 形質転換体の選抜

窒素源欠乏に N-free TAP 培養液で誘導することで、*cry-1* 遺伝子による Emetine 耐性株の形質転換体の選抜に成功した。クラミドモナスの細胞は窒素源欠乏状態で 24 時間経つと生育速度が遅くなり、リボソームタンパクが半減することが知られている。これを 3 日間行うことで正常なリボソームタンパク質は誘導前の 1 割程度になり、*cry-1* 遺伝子による変異 S14 リボソームが Emetine 耐性の獲得に至ったと考えられる。

広い Emetine 濃度におけるコロニーの生育速度と Emetine 耐性限界の関係性

同じ濃度の TAP/eme 寒天培地において、*cry-1* 遺伝子の発現が強く Emetine 耐性が強い細胞は、*cry-1* 遺伝子の発現が弱く Emetine 耐性が弱い細胞と比較して生育スピードが遅い、若しくは生育できないことを期待した。以下に一例として 0 日目と 10 日目の Spotting test の様子を示す(図 2-1、図 2-2、図 2-3、図 2-4、図 2-5、図 2-6)。

約 2 週間後における各濃度の TAP/eme 寒天培地とコロニー生存率との関係をグラフ化したところ、colony size が大きいものは Emetine 耐性が強く、colony size が小さいものは Emetine 耐性が弱いことが確認できた。また、medium size colony と small size colony の傾向が同じようになってしまった原因としては視覚的に大別してしまった為だと考える。以上のことから、*cry-1* 遺伝子を導入されたクラミドモナス細胞は、広い Emetine 濃度においてコロニーの生育速度と Emetine 耐性限界は比例関係を持つことを確認した(図 3)。

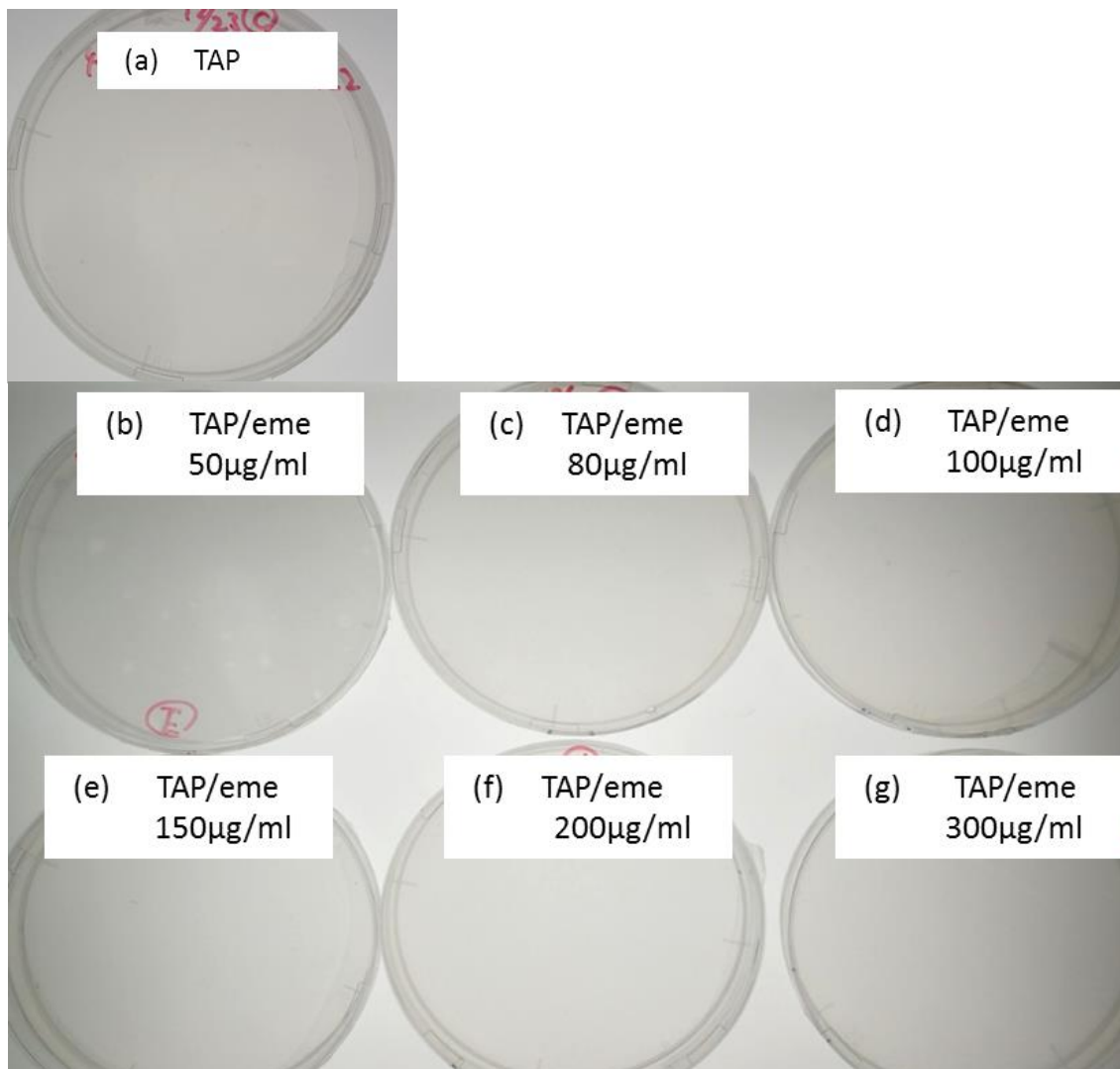


図 2-1. TAP/eme 寒天培地の Large size colony における Spotting test 直後の写真。1 段 8 細胞が 3 段あるため、寒天培地一枚に計 24 細胞ある。また、上段が *met1(UVM)-47A*、中段が *met1(UVM)-47B*、下段が *met1(UVM)-57* から遺伝子導入された細胞である。(a)通常の TAP 寒天培地である。(b)Emetine 含有量 $50 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(c)Emetine 含有量 $80 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(d)Emetine 含有量 $100 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(e)Emetine 含有量 $150 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(f)Emetine 含有量 $200 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(g)Emetine 含有量 $300 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。

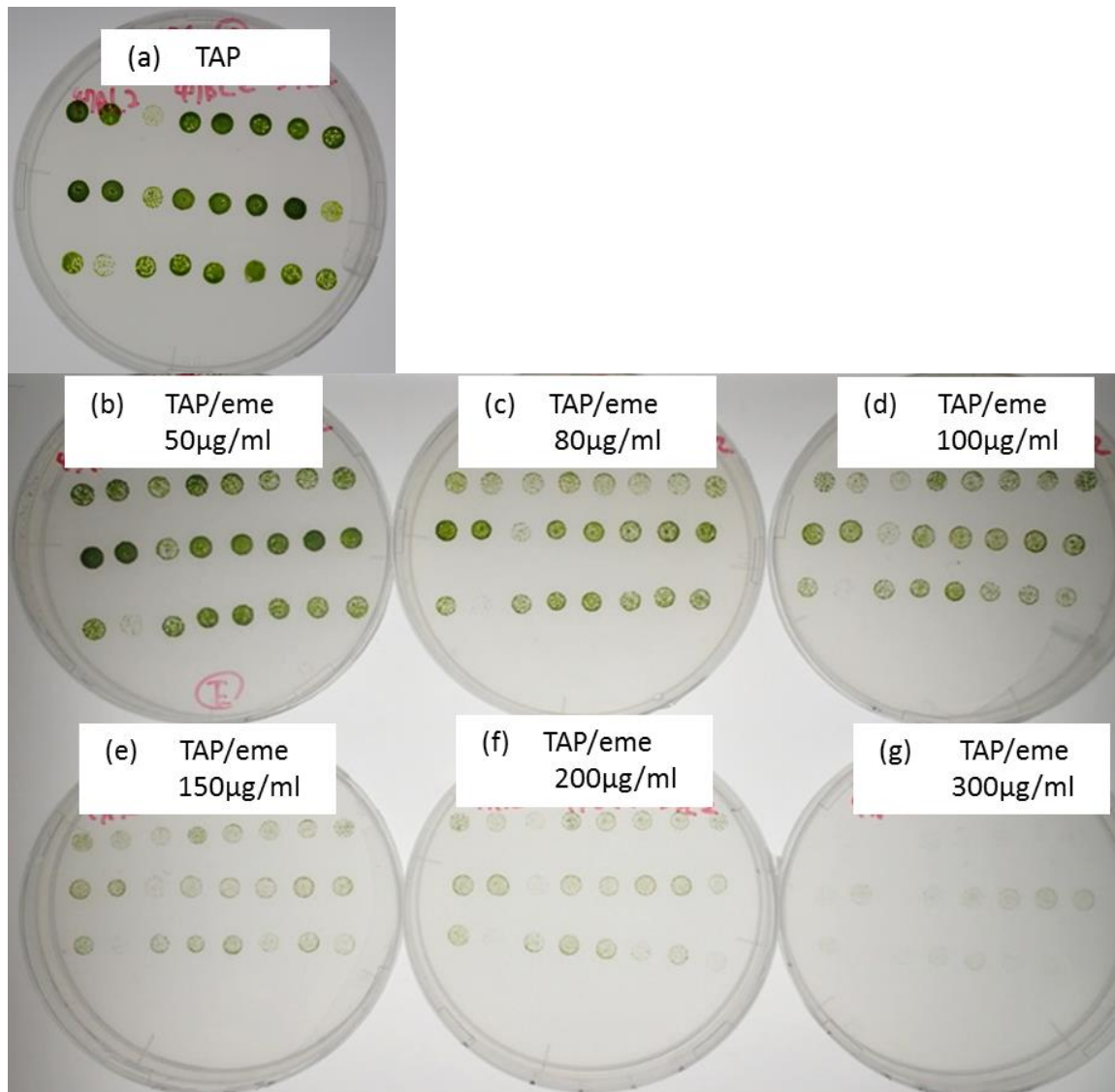


図 2-2. TAP/eme 寒天培地の Large size colony における Spotting test 10 日目の写真。1 段 8 細胞が 3 段あるため、寒天培地一枚に計 24 細胞ある。また、上段が *met1(UVM)-47A*、中段が *met1(UVM)-47B*、下段が *met1(UVM)-57* から遺伝子導入された細胞である。(a)通常の TAP 寒天培地である。(b)Emetine 含有量 $50 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(c)Emetine 含有量 $80 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(d)Emetine 含有量 $100 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(e)Emetine 含有量 $150 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(f)Emetine 含有量 $200 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(g)Emetine 含有量 $300 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。

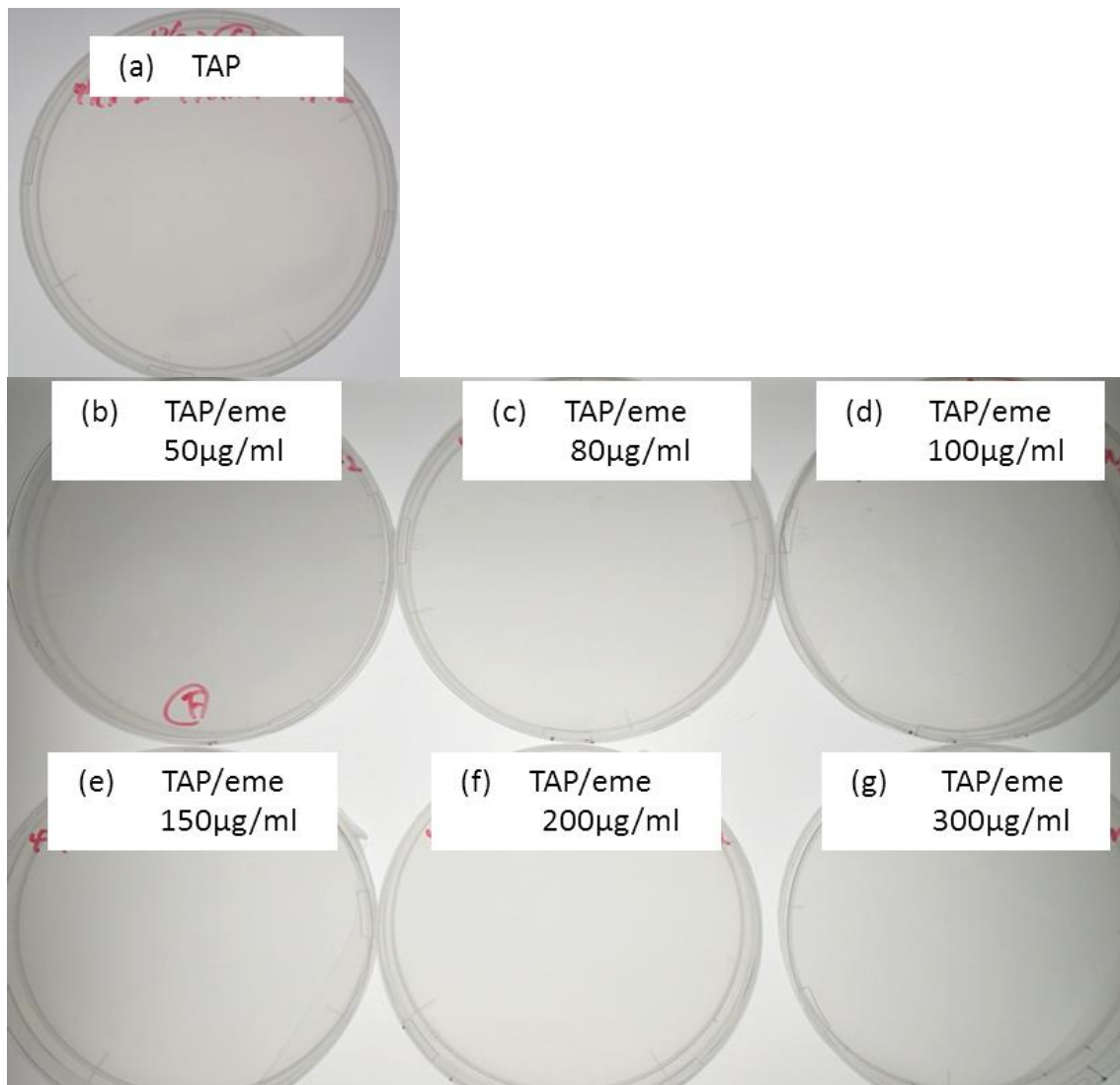


図 2-3. TAP/eme 寒天培地の Medium size colony における Spotting test 直後の写真。1 段 8 細胞が 3 段あるため、寒天培地一枚に計 24 細胞ある。また、上段が *met1(UVM)-47A*、中段が *met1(UVM)-47B*、下段が *met1(UVM)-57* から遺伝子導入された細胞である。(a)通常の TAP 寒天培地である。(b)Emetine 含有量 $50 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(c)Emetine 含有量 $80 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(d)Emetine 含有量 $100 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(e)Emetine 含有量 $150 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(f)Emetine 含有量 $200 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(g)Emetine 含有量 $300 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。

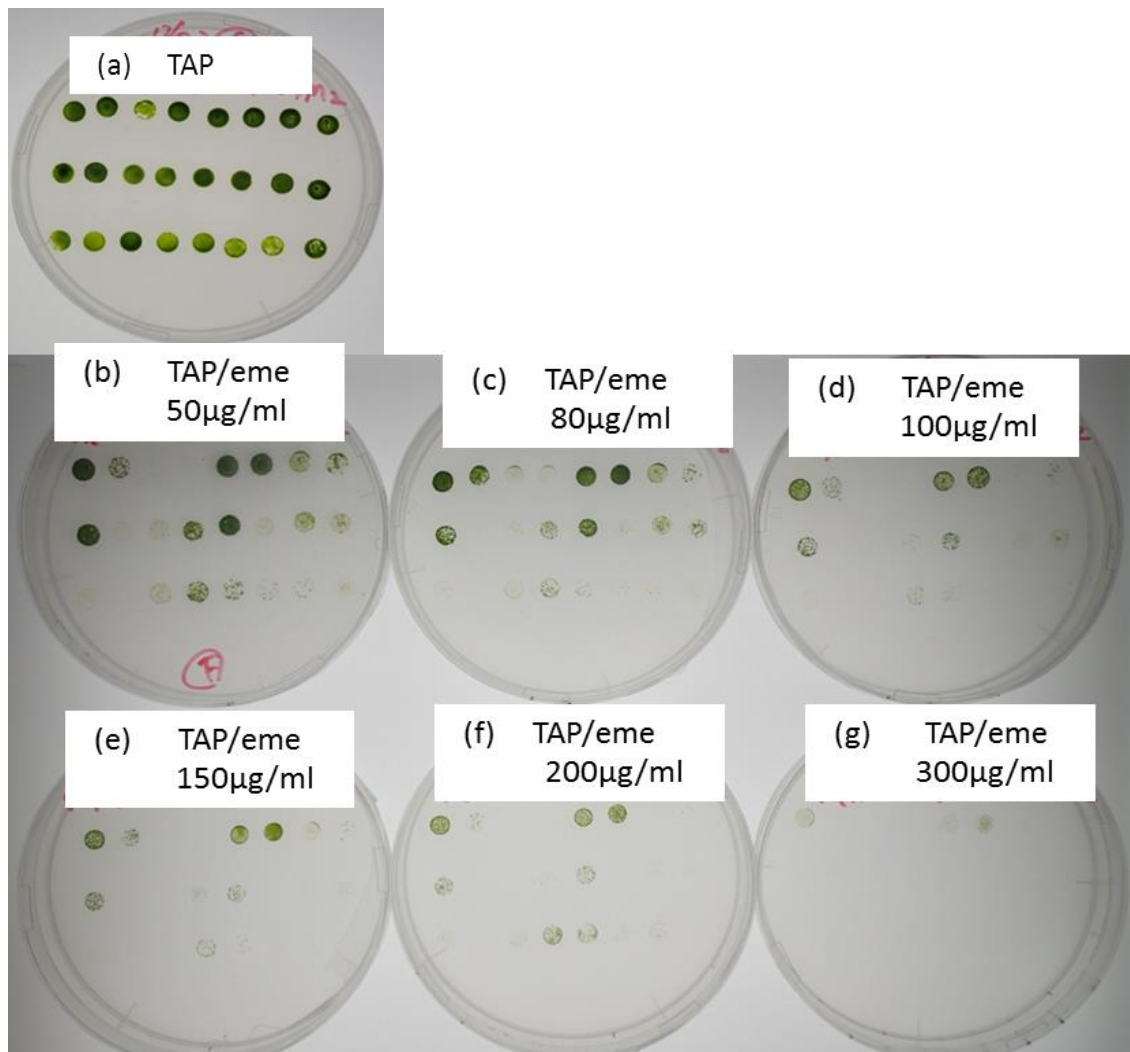


図 2-4. TAP/eme 寒天培地の Medium size colony における Spotting test 10 日目の写真。1 段 8 細胞が 3 段あるため、寒天培地一枚に計 24 細胞ある。また、上段が *met1(UVM)-47A*、中段が *met1(UVM)-47B*、下段が *met1(UVM)-57* から遺伝子導入された細胞である。(a)通常の TAP 寒天培地である。(b)Emetine 含有量 $50 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(c)Emetine 含有量 $80 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(d)Emetine 含有量 $100 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(e)Emetine 含有量 $150 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(f)Emetine 含有量 $200 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(g)Emetine 含有量 $300 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。

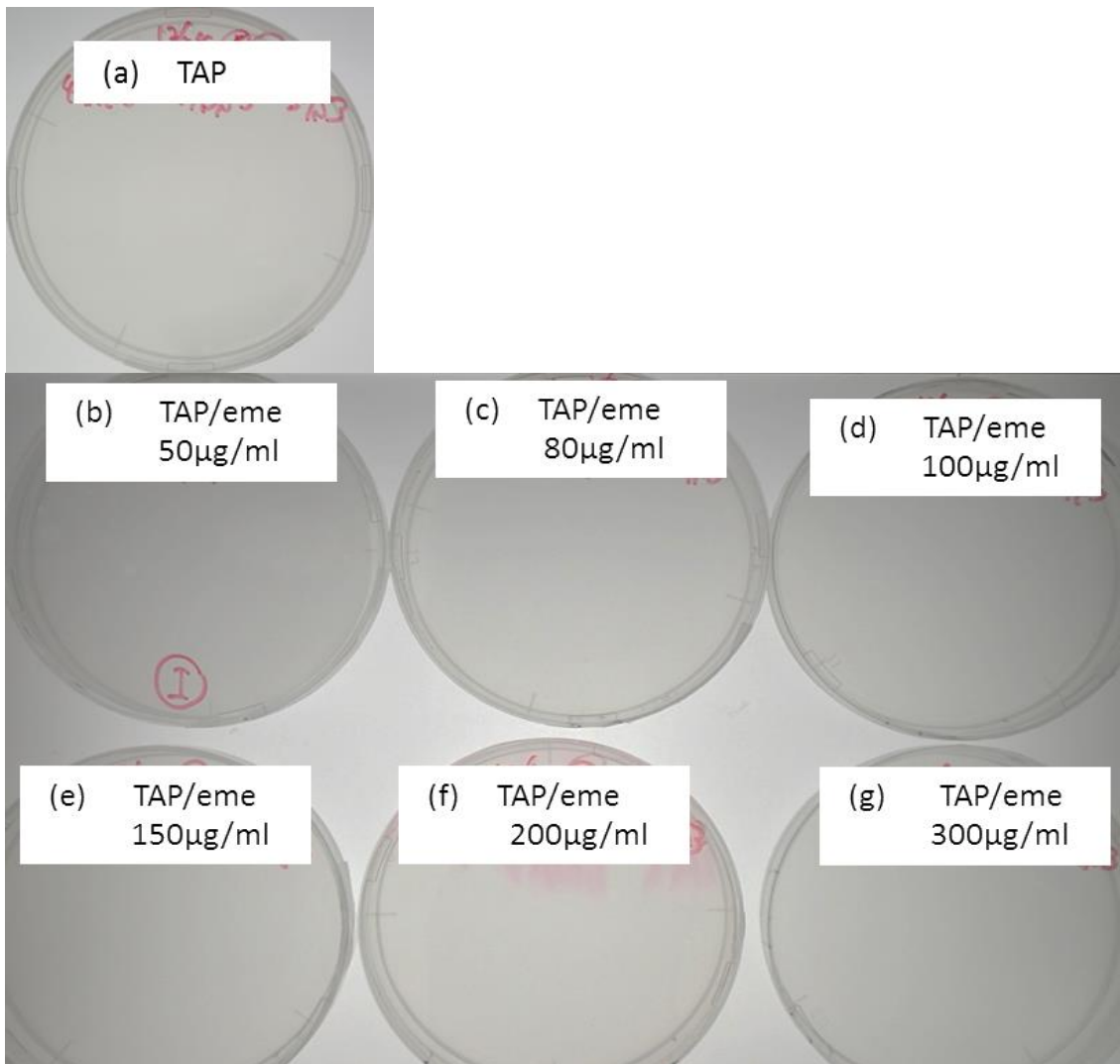


図 2-5. TAP/eme 寒天培地の Small size colony における Spotting test 直後の写真。1 段 8 細胞が 3 段あるため、寒天培地一枚に計 24 細胞ある。また、上段が *met1(UVM)-47A*、中段が *met1(UVM)-47B*、下段が *met1(UVM)-57* から遺伝子導入された細胞である。(a)通常の TAP 寒天培地である。(b)Emetine 含有量 $50 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(c)Emetine 含有量 $80 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(d)Emetine 含有量 $100 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(e)Emetine 含有量 $150 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(f)Emetine 含有量 $200 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(g)Emetine 含有量 $300 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。

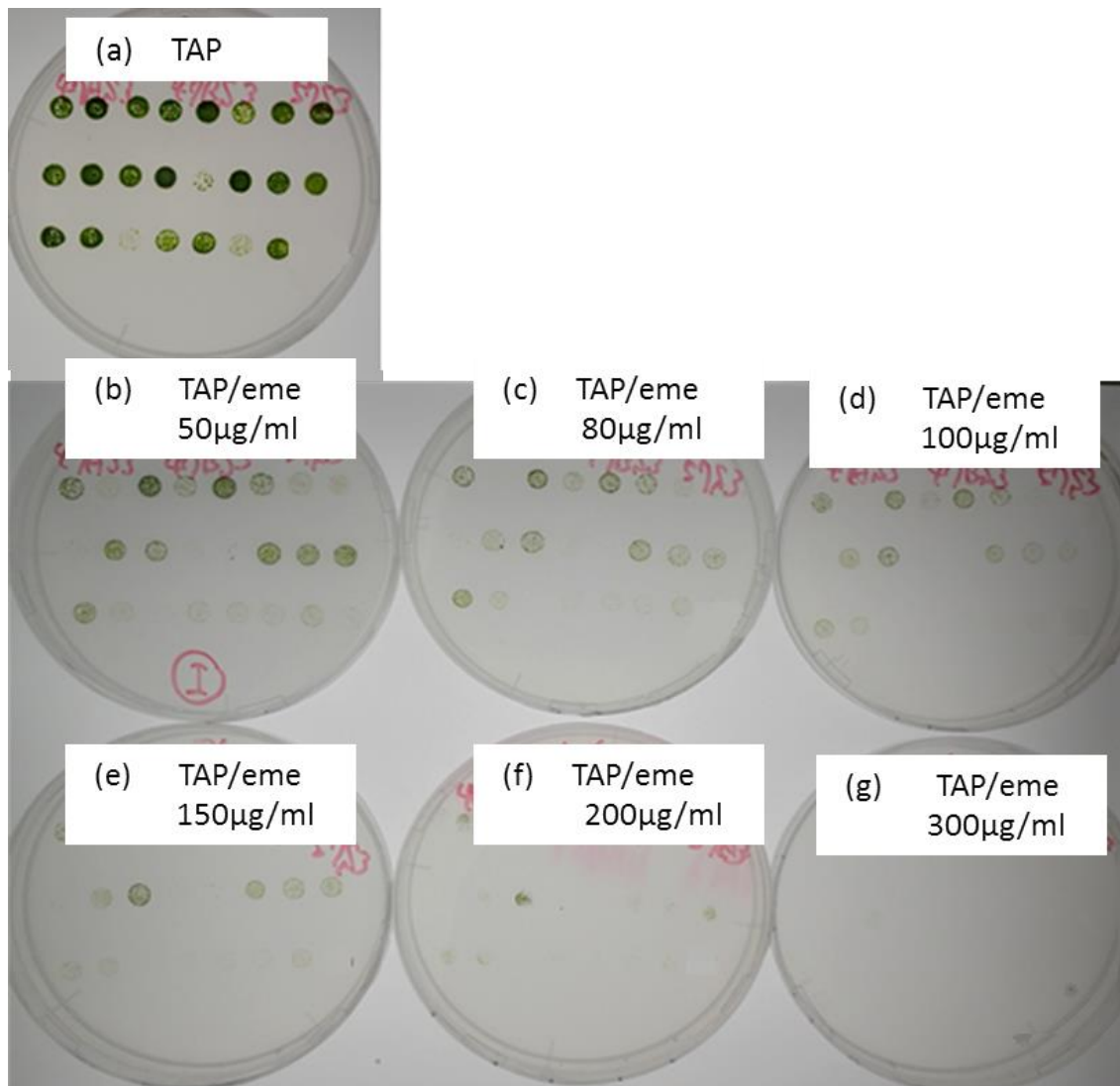


図 2-6. TAP/eme 寒天培地の Small size colony における Spotting test 10 日目の写真。1 段 8 細胞が 3 段あるため、寒天培地一枚に計 24 細胞ある。また、上段が *met1(UVM)-47A*、中段が *met1(UVM)-47B*、下段が *met1(UVM)-57* から遺伝子導入された細胞である。(a)通常の TAP 寒天培地である。(b)Emetine 含有量 $50 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(c)Emetine 含有量 $80 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(d)Emetine 含有量 $100 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(e)Emetine 含有量 $150 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(f)Emetine 含有量 $200 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。(g)Emetine 含有量 $300 \mu\text{g/ml}$ の寒天培地である。

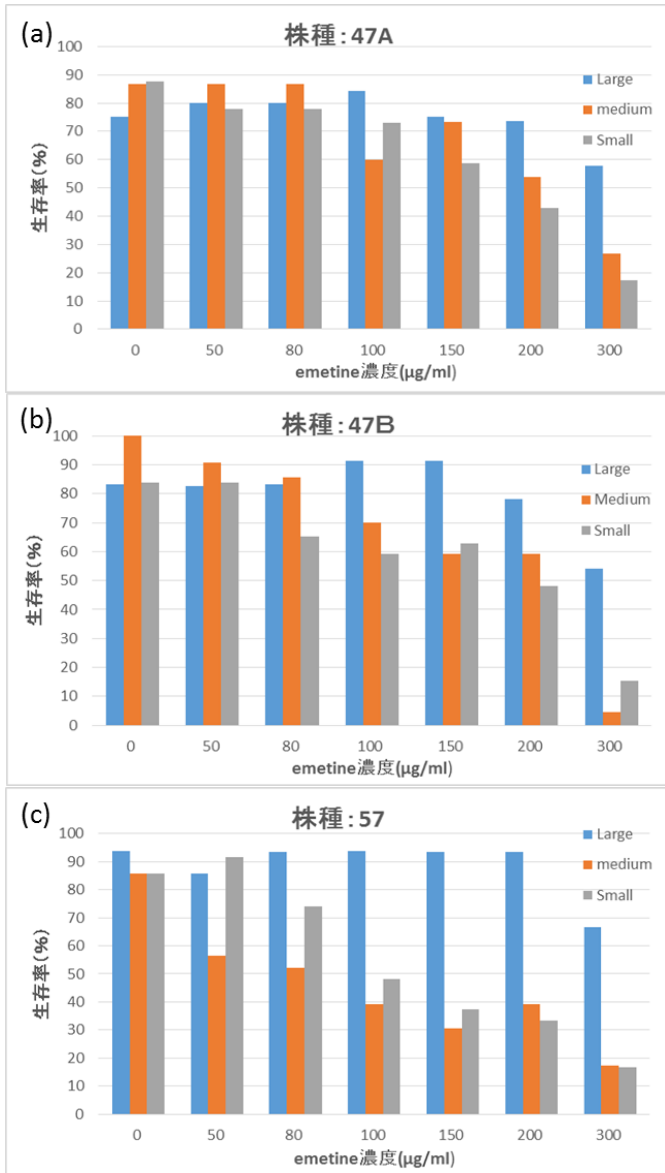


図 3. コロニーの生育速度と Emetine 耐性限界に関する Spotting test をグラフ化したものである。

(a) *met1(UVM)-47A* の株種についての結果である。横軸が TAP/eme 寒天培地における Emetine 濃度[$\mu\text{g/ml}$]である。縦軸が各 *cry-1* 遺伝子形質転換体の生存率[%]である。青色のグラフは Large size colony、橙色のグラフは Medium size colony、灰色は Small size colony である。

(b) *met1(UVM)-47B* の株種についての結果である。横軸が TAP/eme 寒天培地における Emetine 濃度[$\mu\text{g/ml}$]である。縦軸が各 *cry-1* 遺伝子形質転換体の生存率[%]である。青色のグラフは Large size colony、橙色のグラフは Medium size colony、灰色は Small size colony である。

(c) *met1(UVM)-57* の株種についての結果である。横軸が TAP/eme 寒天培地における Emetine 濃度[$\mu\text{g/ml}$]である。縦軸が各 *cry-1* 遺伝子形質転換体の生存率[%]である。青色のグラフは Large size colony、橙色のグラフは Medium size colony、灰色は Small size colony である。

望ましい Emetine 耐性株のスクリーニング

一次選抜の結果、株種 *met1(UVM)-47A*、*met1(UVM)-47B*、*met1(UVM)-57* のそれぞれで 10 株、15 株、27 株選抜した。また、二次選抜の結果、*met1(UVM)-47A-11*、*met1(UVM)-47B-2*、*met1(UVM)-47B-8*、*met1(UVM)-47B-14*、*met1(UVM)-57-14*、*met1(UVM)-57-20*、*met1(UVM)-57-24* の計 7 株を選抜した。また、各細胞の Emetine 耐性限界は TAP/eme 寒天培地において $60 \mu\text{g/ml}$ であり、各株種でそれぞれ通常の TAP 培地の生育は極端に遅くはなく、Emetine 耐性限界が比較的到低い細胞であることを確認できた。以下に一例として二次選抜の際の 10 日目の Spotting test の様子を示す(図 4)。スクリーニングする際に用いた TAP/eme 寒天培地の Emetine 濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ について、Emetine 濃度 $120 \mu\text{g/ml}$ と Emetine 濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ の TAP/eme 寒天培地と比較して細胞の生育状況が明らかに異なることから十分に攪拌出来ていなかった可能性が考えられる。

(a) *Met1(UVM)-47A*

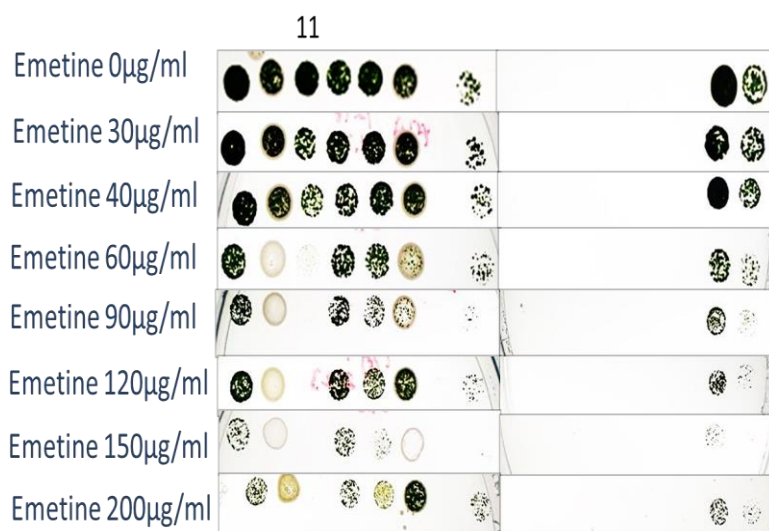
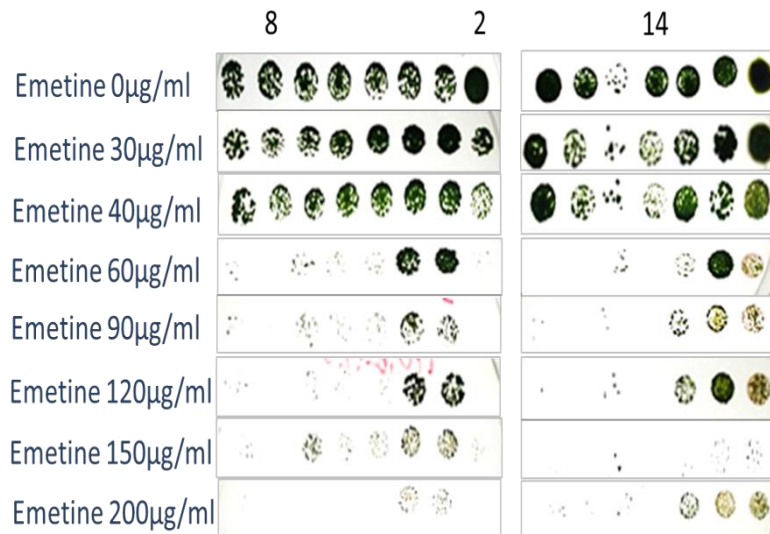


図 4. 二次選抜の際の Spotting test 10 日目の写真。(a)株種 *met1(UVM)-47A* である。横 1 列に 10 細胞あり 8 列ある。1 列ごとに TAP/eme 寒天培地の Emetine 濃度が異なる。上から Emetine 濃度 $0 \mu\text{g/ml}$ 、 $30 \mu\text{g/ml}$ 、 $40 \mu\text{g/ml}$ 、 $60 \mu\text{g/ml}$ 、 $90 \mu\text{g/ml}$ 、 $120 \mu\text{g/ml}$ 、 $150 \mu\text{g/ml}$ 、 $200 \mu\text{g/ml}$ である。各細胞の上の数字 11 はサンプルナンバーで実際に選抜した細胞である。

(b) *Met1(UVM)-47B*



(b) 株種 *met1(UVM)-47B*

である。横 1 列に 15 細胞あり 8 列ある。1 列ごとに

TAP/eme 寒天培地の

Emetine 濃度が異なる。上

から Emetine 濃度 0 µg/ml、

30 µg/ml、40 µg/ml、60 µ

g/ml、90 µ g/ml、120 µ g/ml、

150 µ g/ml、200 µ g/ml で

ある。各細胞の上の数字 2、

8、14 はサンプルナンバー

で実際に選抜した細胞である。

(c) 株種 *met1(UVM)-57* で

ある。横 1 列に 27 細胞あり

8 列ある。1 列ごとに

TAP/eme 寒天培地の

Emetine 濃度が異なる。上

から Emetine 濃度 0 µ g/ml、

30 µ g/ml、40 µ g/ml、60 µ

g/ml、90 µ g/ml、120 µ g/ml、

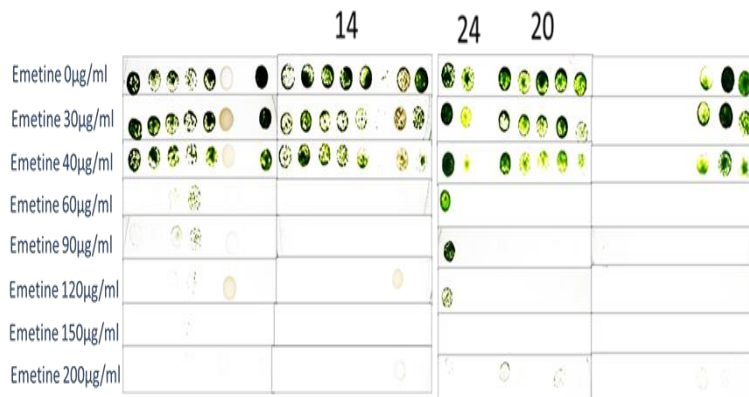
150 µ g/ml、200 µ g/ml で

ある。各細胞の上の数字 14、

20、24 はサンプルナンバー

で実際に選抜した細胞である。

(c) *Met1(UVM)-57*



PCR 法を用いた *cry-1* 遺伝子の確認

PCR 法の結果から、低 Emetine 耐性細胞が TAP/eme 寒天培地で生育できていることは、他の変異による生育ではなく *cry-1* 遺伝子の獲得であることが、すべての低 Emetine 耐性細胞で確認できた(図 5)。

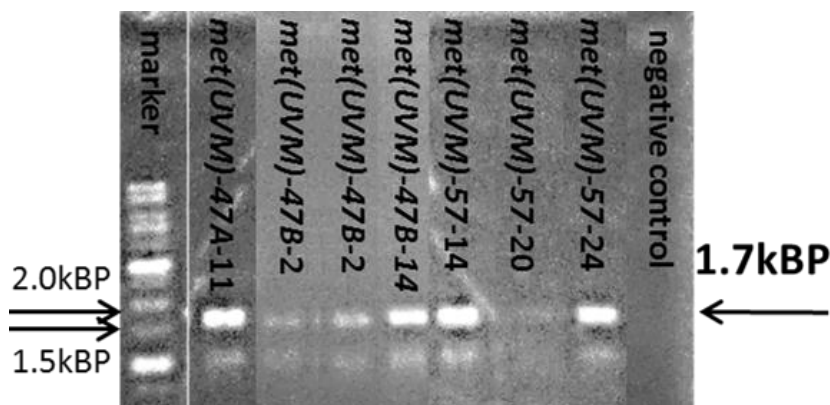


図 5. 低 Emetine 耐性細胞に電気泳動を行った写真である。計 9 レーンあり、左から marker、*met1(UVM)-47A-11*、*met1(UVM)-47B-2*、*met1(UVM)-47B-8*、*met1(UVM)-47B-14*、*met1(UVM)-57B-14*、*met1(UVM)-57-20*、*met1(UVM)-57B-24*、negative control である。

遺伝子抑制機構が緩和された突然変異体の作出

スクリーニングの結果、各低 Emetine 耐性限界選抜細胞から TAP/eme 寒天培地の Emetine 濃度が高濃度である $150 \mu\text{g/ml}$ と $200 \mu\text{g/ml}$ で、生育できる変異細胞を獲得することが出来た。また、各細胞の TAP/eme 寒天培地における Emetine 耐性限界は、紫外線照射前が $60 \mu\text{g/ml}$ であった。紫外線照射後の向上率は、*met1(UVM)-47A-11* が $150 \mu\text{g/ml}$ で 2.5 倍以上、*met1(UVM)-47B-2* が $200 \mu\text{g/ml}$ で 3.3 倍以上、*met1(UVM)-47B-8* が $150 \mu\text{g/ml}$ で 2.5 倍以上、*met1(UVM)-47B-14* が $150 \mu\text{g/ml}$ で 2.5 倍以上、*met1(UVM)-57-14* がコロニーなし、*met1(UVM)-57-20* がコロニーなし、*met1(UVM)-57B-24* が $200 \mu\text{g/ml}$ で 3.3 倍以上とほぼ向上した(図 6)。形成されたコロニーの数は株種によりかなり異なるが、*cry-1* 遺伝子の発現量が紫外線照射によって向上した変異細胞であることが期待できる。

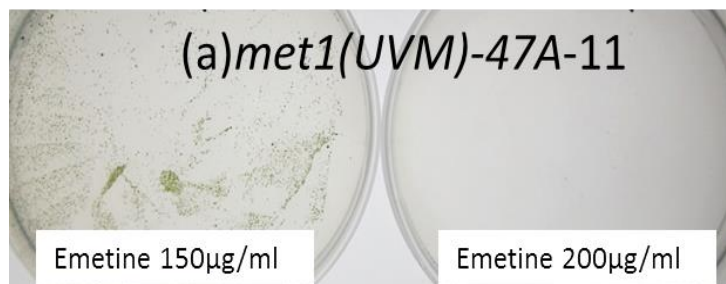
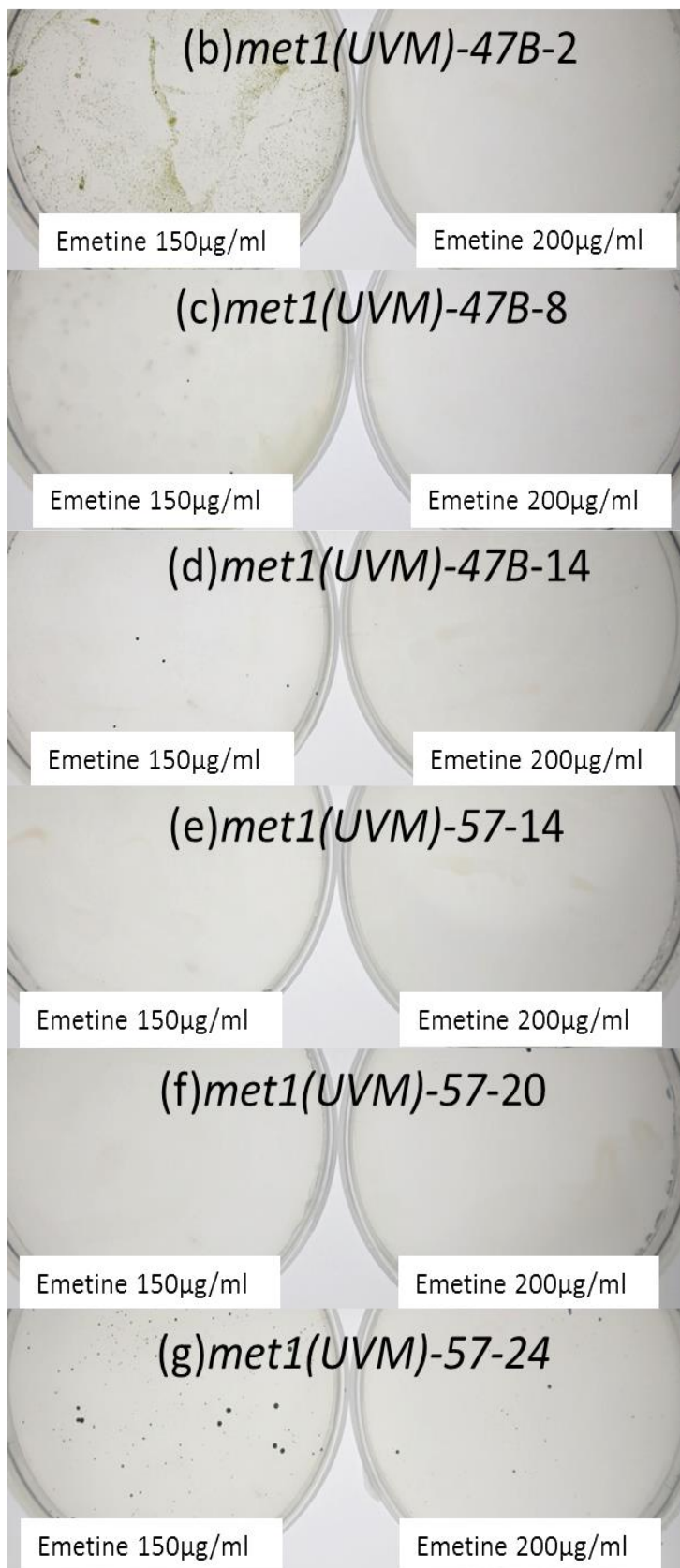


図 6. 紫外線照射後に TAP/eme 寒天培地で生育して、およそ 10 日目の様子。(a)*met1(UVM)-47A-11* 株の様子。左の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ であ



り、右の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ である。(b) *met1(UVM)-47B-2* 株の様子。左の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ であり、右の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ である。(c) *met1(UVM)-47B-8* 株の様子。左の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ であり、右の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ である。(d) *met1(UVM)-47B-14* 株の様子。左の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ であり、右の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ である。(e) *met1(UVM)-57-14* 株の様子。左の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ であり、右の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ である。(f) *met1(UVM)-57-20* 株の様子。左の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ であり、右の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ である。(g) *met1(UVM)-57-24* 株の様子。左の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ であり、右の TAP/eme 寒天培地が Emetine 濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ である。

Western Blotting による測定

先行研究より導入されている外来遺伝子 ble-GFP 遺伝子の発現量を Western Blotting 法を用いて解析した。その際、紫外線照射による突然変異体と、各変異体の紫外線照射前である先行研究で得られた株種を比較した。同じ位置に導入された ble-GFP 遺伝子の発現率の違いから、ble-GFP タンパク質量が紫外線照射によって向上したものが得られれば、*Chlamydomonas reinhardtii* の特徴的な TGS 経路の緩和、若しくは破壊された株である可能性が高い。Western Blotting 結果、一部の細胞で先行研究の株種よりも ble-GFP タンパク質量が向上した細胞を獲得することに成功した。株種 *met1(UVM)-47A* を基に遺伝子導入した *met1(UVM)-47A-11* を紫外線照射によって生じた *met1(UVM)-47A-11-1* は GFP 相対値が 1.6 倍程度、*met1(UVM)-47A-11-4* は 4.2 倍程度だった。株種 *met1(UVM)-47B* を基に遺伝子導入した *met1(UVM)-47B-2* を紫外線照射によって生じた *met1(UVM)-47B-2-6* は GFP 相対値が 2.5 程度、*met1(UVM)-47B-2-11* は 1.1 程度だった。株種 *met1(UVM)-47B* を基に遺伝子導入した *met1(UVM)-47B-14* を紫外線照射によって生じた *met1(UVM)-47B-14-31* は GFP 相対値が 6.7 程度、*met1(UVM)-47B-14-32* は 1.2 程度、*met1(UVM)-47B-14-33* は 4.8 程度、*met1(UVM)-47B-14-36* は 1.5 程度、*met1(UVM)-47B-14-37* は 2.5 程度、*met1(UVM)-47B-14-38* は 4.2 程度だった(図 7-1、図 7-2、図 7-3、図 7-4、図 7-5、図 7-6、図 7-7)。

そのため、*met1(UVM)-47A-11-1* と *met1(UVM)-47A-11-4* は TGS 経路の緩和に成功した変異細胞か外来遺伝子由来の Emetine 耐性限界と ble-GFP タンパク質生産のみ向上した細胞の可能性が高いことが考えられる。一方、遺伝子導入後の細胞である *met1(UVM)-47B-2* と *met1(UVM)-47B-14* は紫外線照射前の時点で、GFP 相対値が高い数値を示していたため *met1(UVM)-47B-2* と *met1(UVM)-47B-14* 系列の細胞は、Emetine 耐性限界のみ向上したか、ble-GFP タンパク質生産のみ低下した細胞であることが考えられる。また、今回測定を行った 57-24 系列の全ての細胞は GFP 相対値が低下していたことから、*met1(UVM)-57*、若しくは *met1(UVM)-57-24* 系列の細胞は Emetine 耐性限界のみ向上したか、ble-GFP タンパク質生産のみ低下したことが考えられる。

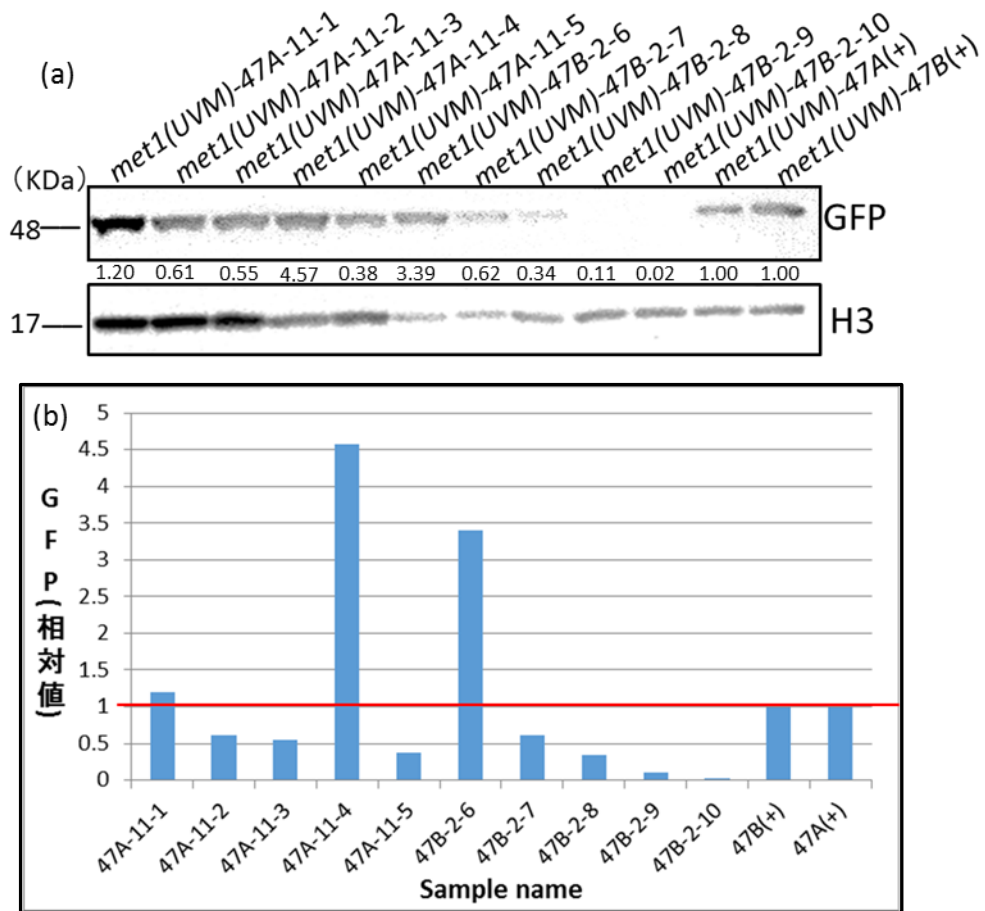


図 7-1. *met1(UVM)-47A*, *met1(UVM)-47B* 系列細胞の Western Blotting 結果。(a) 実際のバンドの写真。バンドの間にある数値は、遺伝子導入前であるポジティブコントロール細胞の ble-GFP 含有量を 1.00 としたとき、サンプル細胞の ble-GFP 相対値を表している。(b) 各細胞の ble-GFP 相対値をグラフ化したものであり、ポジティブコントロールの数値である 1.00 を赤線で表している。

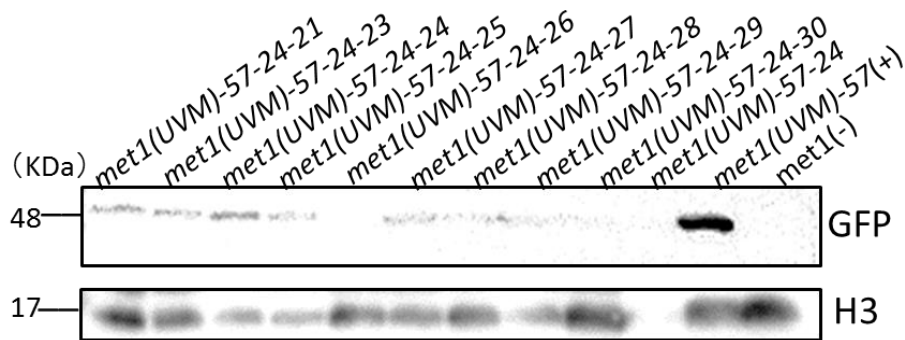


図 7-2. *met1(UVM)-57* 系列細胞の Western Blotting 結果。図は実際のバンドの写真であり、ポジティブコントロール細胞の ble-GFP 含有量が圧倒的に多いであるため、数値化を行っていない。

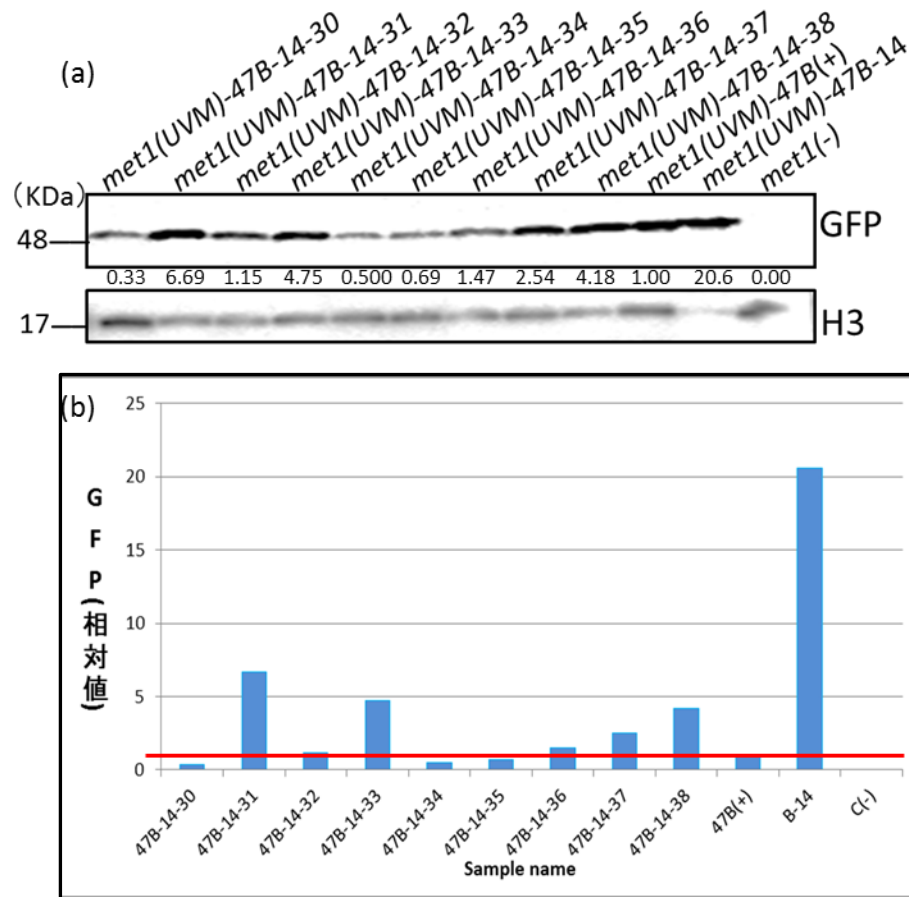


図 7-3. *met1 (UVM) -47B* 系列細胞の Western Blotting 結果。(a) 実際のバンドの写真。バンドの間にある数値は、遺伝子導入前であるポジティブコントロール細胞の ble-GFP 含有量を 1.00 としたとき、サンプル細胞の ble-GFP 相対値を表している。(b) 各細胞の ble-GFP 相対値をグラフ化したものであり、ポジティブコントロールの数値である 1.00 を赤線で表している。

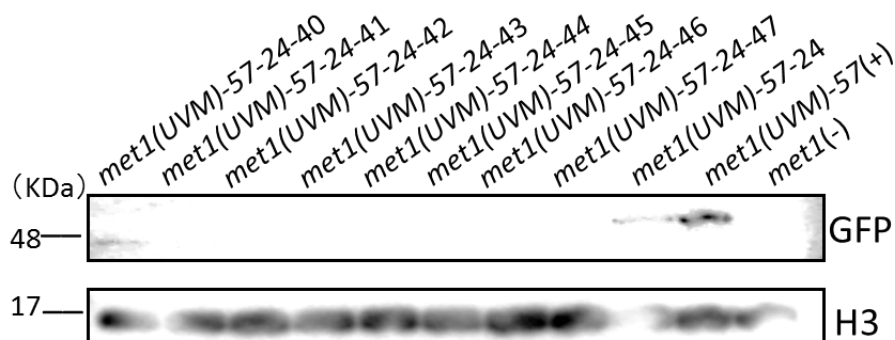


図 7-4. *met1 (UVM) -57* 系列細胞の Western Blotting 結果。図は実際のバンドの写真であり、ポジティブコントロール細胞の ble-GFP 含有量が圧倒的に多いであるため、数値化を行っていない。

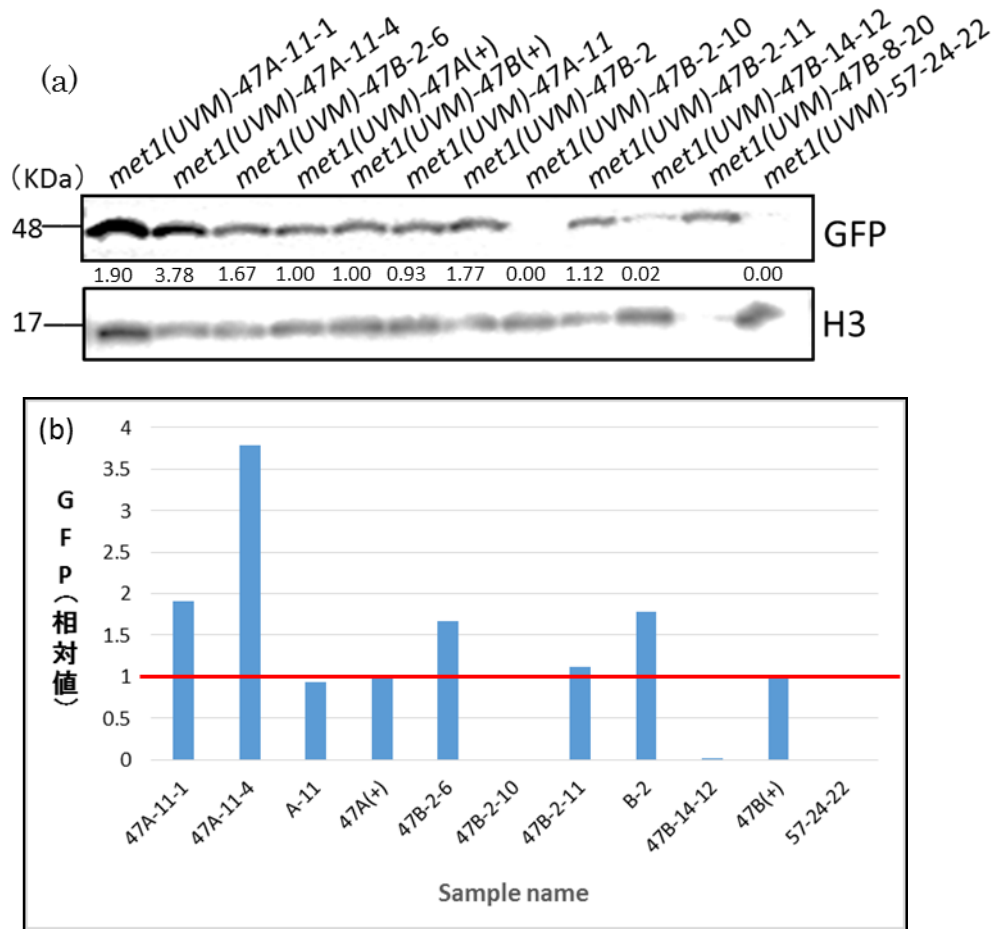


図 7-5. *met1 (UVM)-47A*, *met1 (UVM)-47B met1*、*(UVM)-57* 系列細胞の Western Blotting 結果。(a) 実際のバンドの写真。バンドの間にある数値は、遺伝子導入前であるポジティブコントロール細胞の ble-GFP 含有量を 1.00 としたとき、サンプル細胞の ble-GFP 相対値を表している。(b) 各細胞の ble-GFP 相対値をグラフ化したものであり、ポジティブコントロールの数値である 1.00 を赤線で表している。

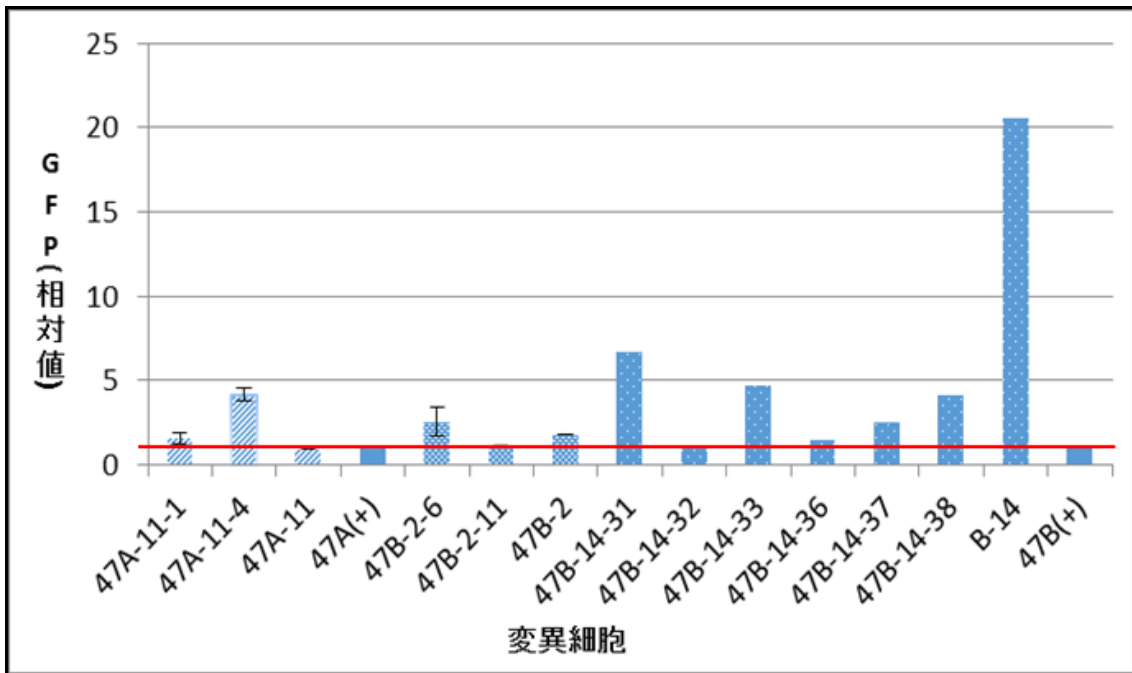


図 7-7. 今回得られた変異細胞のうち、ポジティブコントロール細胞より GFP 相対値が向上した細胞をまとめグラフにしたもの。試行回数が複数回のはエラーバーをつけている。

顕微鏡による GFP タンパク質の観察

Western Blotting 法の結果から ble-GFP タンパク質が先行研究の細胞より向上した変異細胞を得ることが出来た。そこで ble-GFP タンパク質が蛍光を発することを利用して、先行研究で得られた細胞や低 Emetine 耐性細胞、TGS 経路の緩和が期待できる細胞の ble-GFP タンパク質の比較を顕微鏡観察により確認した(図 8-1、図 8-2、図 8-3)。顕微鏡による観察の結果、Western blotting 法により ble-GFP タンパク質量が極端に多い細胞は蛍光量も強い傾向であることが確認できた。特に *met1(UVM)-47A-11-4* や *met1(UVM)-47B-14* は蛍光量が強くなっていた。以上の結果から、Western Blotting の結果も踏まえ、先行研究で得た細胞より紫外線照射によって蛍光量が強くなった変異細胞は、TGS 経路の緩和が生じたと期待できる。

今後の展望として、Western Blotting 法で測定した細胞の中で TGS 経路の緩和の可能性のある細胞に、*cry-1* 遺伝子や ble-GFP 遺伝子以外の他の外来遺伝子を導入し、同様に転写抑制が緩和されるか比較することで、TGS 経路緩和の有無を検証することが求められる。

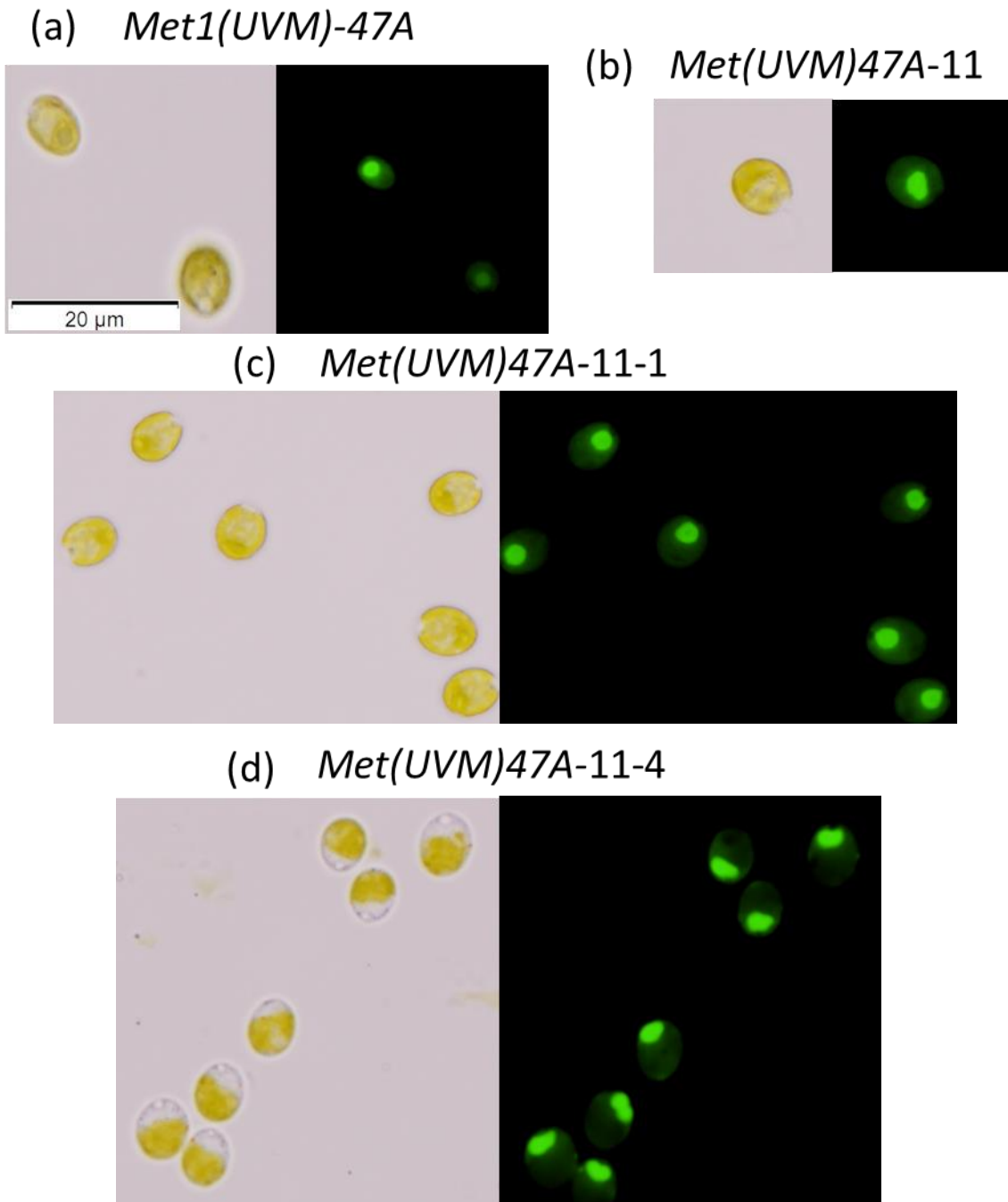
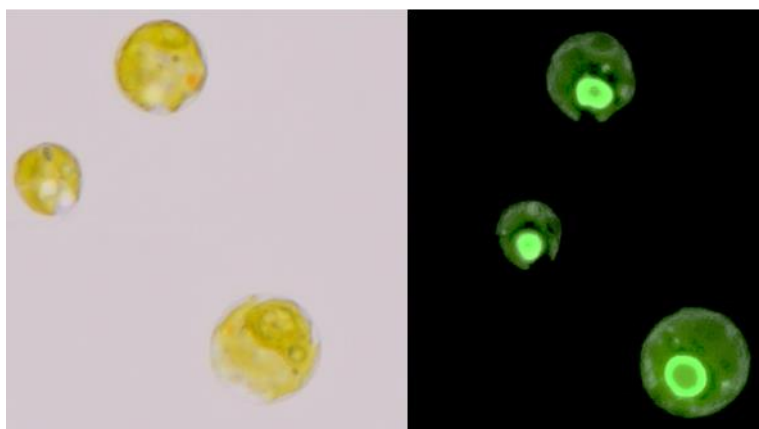


図 8-1. *met1(UVM)-47A* 株系統における顕微鏡を用いた明視野観察(左)と蛍光観察(右)の様子。

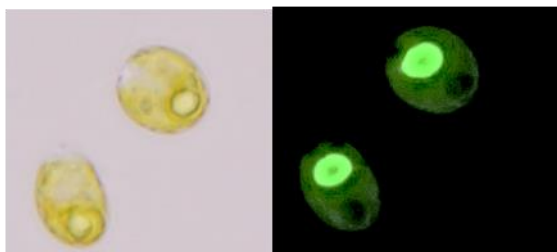
(a)*met1(UVM)-47A* における観察写真。(b)*met1(UVM)-47A-11* における観察写真。

(c)*met1(UVM)-47A-11-1* における観察写真。(d)*met1(UVM)-47A-11-4* における観察写真。

(a) *Met1(UVM)-47B*



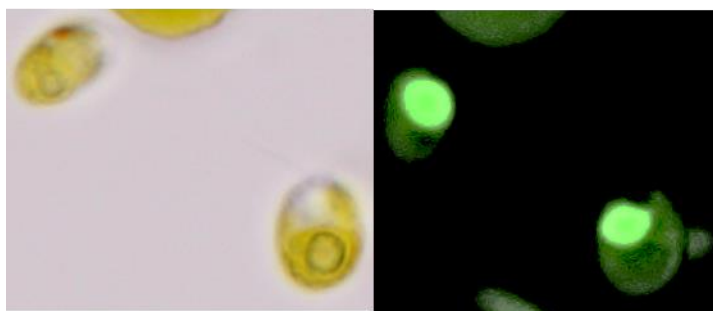
(b) *Met1(UVM)-47B-2*



(c) *Met1(UVM)-47B-8*



(d) *Met1(UVM)-47B-14*



(e) *Met1(UVM)-47B-2-6*

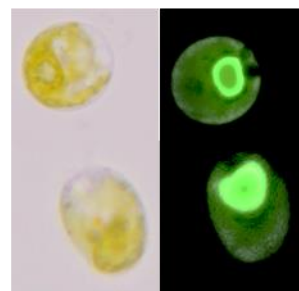
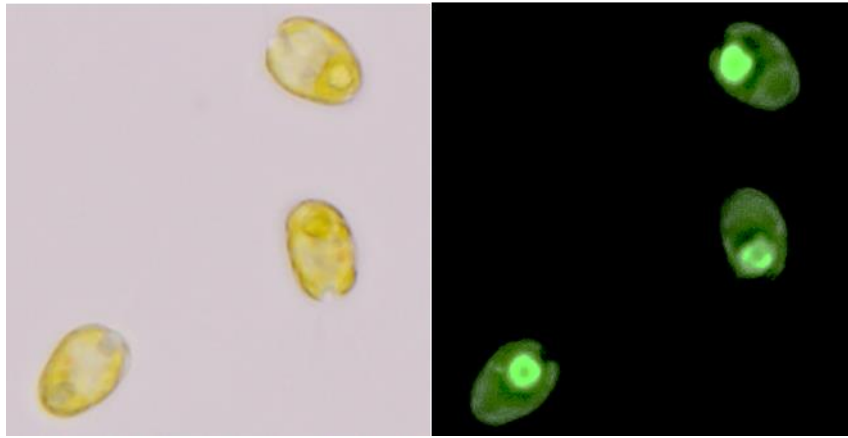


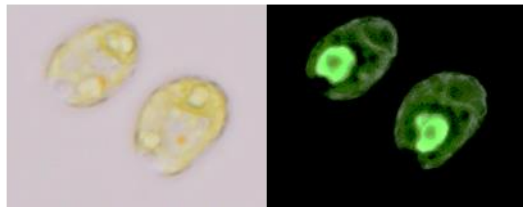
図 8-2. *met1(UVM)-47B* 株系統における顕微鏡を用いた明視野観察(左)と蛍光観察(右)の様子。

(a)*met1(UVM)-47B*における観察写真。(b)*met1(UVM)-47B-2*における観察写真。(c)*met1(UVM)-47B-8*における観察写真。(d)*met1(UVM)-47B-14*における観察写真。(e)*met1(UVM)-47B-2-6*における観察写真。

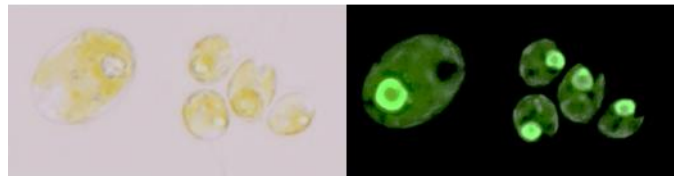
(a) *Met1(UVM)-57*



(b) *Met1(UVM)-57-14*



(c) *Met1(UVM)-57-20*



(d) *Met1(UVM)-57-24*

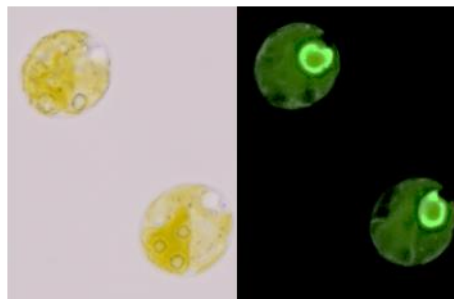


図 8-3. *met1(UVM)-57*株系統における顕微鏡を用いた明視野観察(左)と蛍光観察(右)の様子。

(a)*met1(UVM)-57*における観察写真。(b)*met1(UVM)-57-14*における観察写真。(c)*met1(UVM)-57-20*における観察写真。(d)*met1(UVM)-57-24*における観察写真。

[謝辞]

大濱武教授にはこの研究を始めるきっかけを与えていただき、また実験を進める上で様々な助言をしていただきました。また、同研究室のメンバーにも、研究を円滑に進められるようサポートをしていただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

[参考文献]

Cerutti H, Johnson M, Gillham NW, Boynton JE (1997) Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 9:925-945.

Jinkerson RE, Jonikas MC (2015) Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *Plant J*.

Kong F, Yamasaki T, Ohama T (2014) Expression levels of domestic cDNA cassettes integrated in the nuclear genomes of various *Chlamydomonas reinhardtii* strains. *J Biosci Bioeng* 117:613-616.

Kong F, Yamasaki T, Kurniasih SD, Hou L, Li X, Jvanova N, Okada S, OhamaT (2015) Robust expression of heterologous genes by selection marker fusion system in improved *Chlamydomonas* strains. *J Biosci Bioeng* 120x:239-245.

Kurniasih SD, Yamasaki T, Kong F, Okada S, Widyaningrum D, and Ohama T (2016) UV-mediated *Chlamydomonas* mutants with enhanced nuclear transgene expression by disruption of DNA methylation dependent and independent silencing systems. *Plant Molecular Biology*. 92(6):629-641.

Musgnug JH (2015) Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 5407-5418.

Nelson JAE, Savereide PB, and Lefebvre PA (1994) The CRY1 Gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: Structure and Use as a Dominant Selectable Marker for Nuclear Transformation. *MOLECULAR AND BIOLOGY*. 14(6)4011-4019.

Neupert J, Karcher D, Bock R (2009) Generation of *Chlamydomonas reinhardtii* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J* 57:1140-1150.

Plucinak, Horken KM, Jiang W, Fostvedt J, Nguyen ST, Weeks DP (2015) Improved and versatile viral 2A platforms for dependable and inducible high-level expression of dicistronic nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J.

Rasala B, Lee P, Briggs SP, Mendez M, Mayfield SP (2012) Robust expression and secretion Xylanase in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. PLoS One.

Sahdev S, Khattar SK, Saini KS (2008) Production of active eukaryotic protein through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem 307:249-264.

Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production; from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotrchnol 72:211-222.

Zhang R, Patena W, Armbruster U, Gang SS, Blum SR, Jonikas MC (2014) High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA. Plant Cell 1-13.