

Thraustochytrid 類を用いた高度不飽和脂肪酸生産と 異種遺伝子の発現に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 基礎環境微生物学分野 足立 匠

1. 目的

海洋性真核微生物であるラビリンチュラ類は、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの不飽和脂肪酸を多量に蓄積することを始めとし、スクワレン、アスタキサンチンといった有用物質の生合成能が注目されている。その生合成経路の解明や、その性質を利用する分子育種のためには、遺伝子の導入や破壊などの遺伝子操作を行うことが必要である。現在までに、Thraustochytrid 類微生物に対して、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法、アグロバクテリウムによる感染を用いた形質転換法が報告されている。しかし *Aurantiochytrium limacinum* SR21 株 (以下 SR21 株), Thraustochytrid 類の 12B 株 (以下 12B 株) については、非常に高い DHA 生産量が報告されているものの、現在までに形質転換株が確立されていない。本研究では、既知の方法での形質転換が確認できなかったそれら 2 株をモデルとして、形質転換法の改良を検討することにより、Thraustochytrid 類微生物に広く適用可能な形質転換法の確立を目指した。

2. 方法・結果

対象株の SR21 株と 12B 株は、BY+790 培地を用いて 30°C で振盪培養した。形質転換用プラスミドは、12B 株のポリペプチド鎖伸長因子 α (EF-1 α) 遺伝子のプロモーターおよびターミネーター配列、18S rRNA 配列、ネオマイシン耐性遺伝子を用いて構築した。同プラスミドを鋳型に 18S rRNA 配列に特異的なプライマーを用いた inverse PCR を行って直鎖状とした DNA 断片を用いて、既報のエレクトロポレーション法での遺伝子導入を試みた。また、ネオマイシン耐性遺伝子カセットを有する pCambia0390 ベクターを保持した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株の感染による遺伝子導入についても検討した。遺伝子導入は G418 耐性を有するコロニーの出現により確認した。しかし、いずれの株、方法でも形質転換株を得ることはできなかった。これら株について、ジルコニアビーズを用いた表面細胞壁処理とエレクトロポレーション法の併用による形質転換を試みた。エレクトロポレーションの前段階として、0.5mm のジルコニアビーズを菌体懸濁液に加えてボルテックス処理を施し、菌体表面を傷つけることにより、SR21 株、12B 株の両菌株にて、その後のエレクトロポレーション法による G418 耐性形質転換株を得ることに成功した。また継代による G418 耐性の安定性、抽出ゲノムを用いた PCR により、ネオマイシン耐性遺伝子がゲノム DNA に組み込まれていることが確認された。

3. 考察

既知の方法では形質転換が不可能であった SR21 株および 12B 株について、既知の方法に前処理を組み合わせることで形質転換株が得られることが明らかとなり、Thraustochytrid 類微生物における形質転換の可能性を広げることができた。また、これら菌株の遺伝子導入においては細胞壁が障壁の一因であったと考えられた。他生物での形質転換時における既存の細胞壁処理の方法として、細胞壁消化酵素を用いた細胞のプロトプラスト化などが挙げられるが、本研究で用いたビーズによるボルテックス処理はそれらと比較しても簡便であり、有用であると考えられる。