

線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた外来遺伝子大量発現系の構築

網野 比佐子

(東京大学大学院医学系研究科 生物医化学教室)

目的

本研究は、自由生活性線虫で全ゲノムの塩基配列が明らかになっている *Caenorhabditis elegans* を用いた外来遺伝子の発現系の確立を目的としている。外来遺伝子の発現系は数多くが確立されているが、真核生物由来の遺伝子発現系はフォールディングや翻訳後修飾など多くの問題が解決されていない。本線虫は多細胞真核生物で、しかも細菌同様にタンクでの大量培養も可能であり、これまでにない新しい真核生物由来の遺伝子発現系と考えられる。

方法

我々は、寄生性線虫である回虫 *Ascaris suum* のミトコンドリア呼吸鎖複合体 に着目して研究をおこなってきた。A. suum 成虫は哺乳類小腸という嫌気的環境に生育し、嫌気的呼吸を行い、特に key enzyme である複合体 はフマル酸還元酵素活性を示し、寄生適応に重要な役割を果たしている。本研究では、外来遺伝子として A. suum の複合体 を C. elegans 内での組み換えたんぱく質としての発現を試みた。

1) ハウスキーピング遺伝子として見出ししているコハク酸脱水素酵素遺伝子である鉄—硫黄サブユニット(Ip)の上流部分からプロモーター活性を持つ領域を GFP をレポーター遺伝子として検討した。2) 1) のプロモーター領域を pUC19 に由来する Fire のベクターに挿入して、発現ベクターを構築した。3) 2) の発現ベクターに A. suum 成虫複合体 の 4 サブユニットの cDNA を導入し、これらの発現プラスミドをマイクロインジェクションで C. elegans に導入した (Fig. 1)。発現解析は、ウェスタンブロット法、活性測定により行った。

結果

GFP を用いたプロモーターの発現部位を観察することにより、複合体 Ip サブユニットの上流域 2kb により、C. elegans の虫体全体で GFP の発現が誘導されることを見出した。構築した発現プラスミドを導入した系統に紫外線を照射することにより、発現プラスミドの染色体への導入を行い、プラスミドを安定維持する系統を得た。また、トランスジェニック C. elegans より調製した細胞画分を用いてウェスタンブロット解析より、A. suum ミトコンドリア呼吸鎖複合体 の各サブユニットが C. elegans のミトコンドリアに局在していることを明らかにした。さらに、調製したミトコンドリアを用いてフマル酸還元酵素活性を測定したところ、野生株と比較して約 3 倍に増加してい

た(Fig. 2)。陰イオン交換クロマトグラフィによる部分精製の結果、各サブユニットが同一の溶出ピークを示した。

結論

本研究の結果、*A. suum* の複合体 が *C. elegans* 内で活性を維持したまま発現し、ミトコンドリアへ移行していることが明らかとなった。ミトコンドリアの膜たんぱく質である複合体 を組み換えたたんぱく質として発現させる報告は今回が初めてであり、発現宿主として、*C. elegans* を用いることの有用性を示すものとして興味深い結果である。

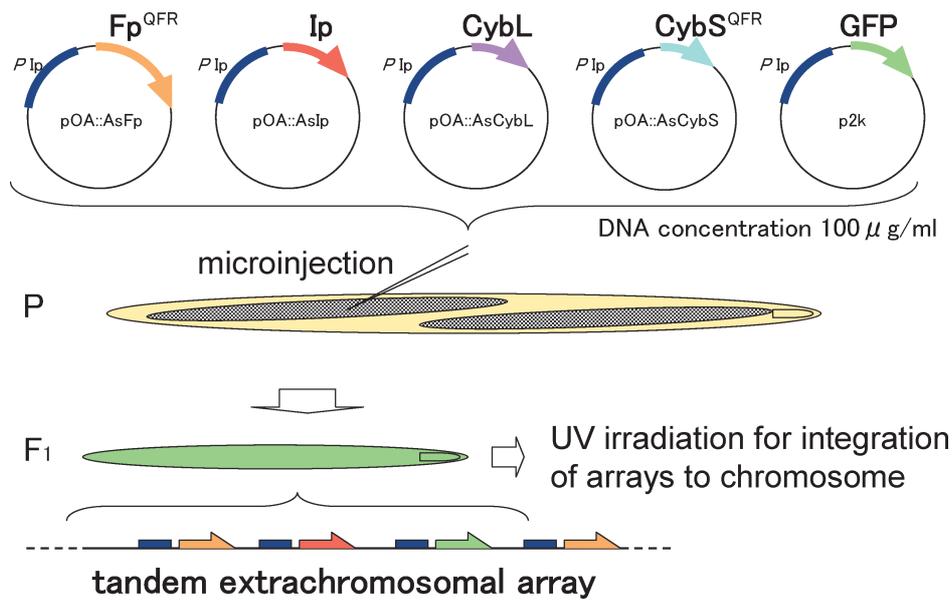


Fig. 1. Scheme of obtaining transgenic line.

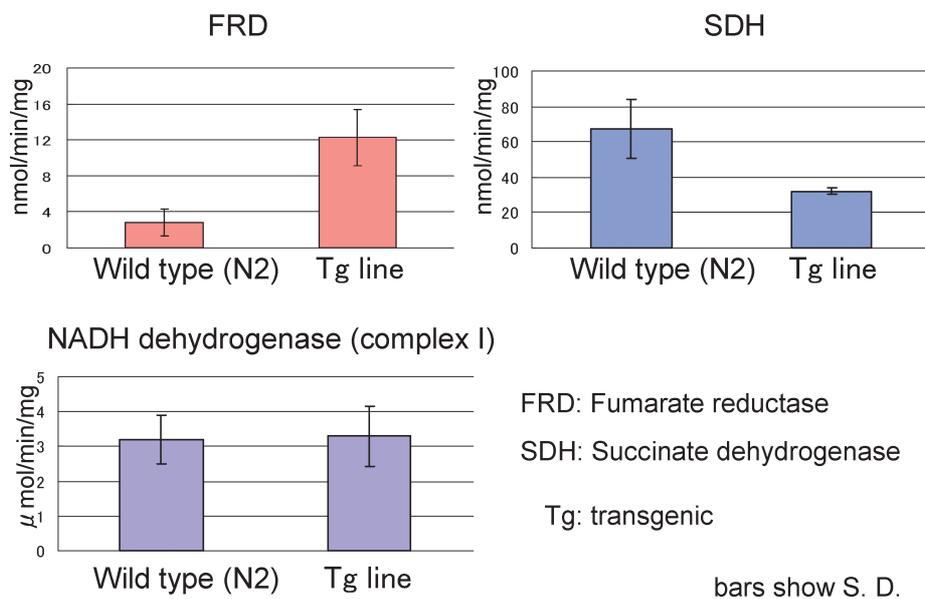


Fig. 2. Comparison of enzymatic activities.