

# 光合成により合成された糖の有用物質への完全変換細胞の創出

得平 茂樹

東京都立大学大学院 理学研究科

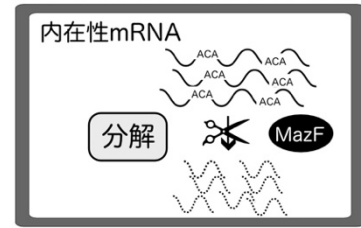
## 研究の目的

本研究では、バクテリアのトキシン-アンチトキシン系のトキシンタンパク質である MazF を利用した細胞機能の抑制システムを構築し、特定の代謝経路が優先的に機能する細胞を作り出す。MazF は mRNA 中に存在する ACA 配列を見つけ出し、その部分で mRNA を切断するリボヌクレアーゼである。ACA 配列はほとんど全ての mRNA に存在しているため、MazF が発現した細胞ではほとんどの mRNA が分解されてしまう。一方、MazF による切断から免れた ACA 配列を含まない mRNA はリボソームを独占することになり、大量に翻訳されるようになることを期待できる。したがって、ある特定の代謝経路を構成する酵素群をコードする全ての遺伝子から ACA 配列を取り除くことができれば、特定の代謝経路が優先的に機能する細胞を作り出すことができる (図 1)。本研究では、単細胞性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 において MazF を発現させ、人工的にデザインした ACA 配列を含まない遺伝子からなる代謝経路による効率的な物質生産を目指す。

## 方法

まず、MazF の発現により ACA 配列をもたない mRNA からの翻訳効率が向上するのかを、GFP をモデルとして大腸菌で調べた。*gfp* 遺伝子には ACA 配列が 26 カ所に存在している。GFP のアミノ酸配列を変えないように ACA 配列を置き換えた遺伝子 *gfpP* をデザインし、pBR322 をもとに、*gfpP* をアラビノース誘導性プロモーター P<sub>BAD</sub> から発現するプラスミド pKMgP と、同様に *gfp* を発現する pKMg とを作製した。また、pACYC177 をもとに、MazF をテトラサイクリン誘導性プロモーター P<sub>R0040</sub> から発現するプラスミド pKMmR と、pKMmR から P<sub>R0040</sub> と *mazF* を除去した pKM を作製した。実験には、pKMmR を保持する大腸菌 HST08 株に、さらに pKMg あるいは pKMgP を形質転換した株 KMmR+g と KMmR+gP を用いた。コントロールとして pKMmR の代わりに pKM を導入した KM+g と KM+gP を用いた。それぞれの株を 96 ウェルプレートを用いて、100 µg/ml アンピシリンと 30 µg/ml カナマイシンを含む 200 µl の LB 培地中で 37°C、2 時間振とう培養した後、

## MazFによる内在性機能の抑制



## 人工遺伝子システムの発現

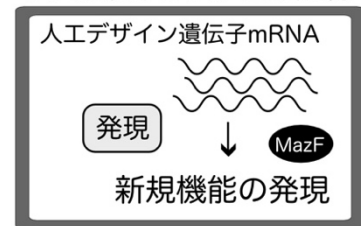


図1 本研究の概要

MazFで内在性mRNAを分解することにより、元々の細胞がもつ機能を抑制した細胞において、MazFに分解されないようにデザインした遺伝子を発現させ、優先的に機能する細胞を作り出す。

アラビノース（終濃度 0.1%）とアンヒドロテトラサイクリン（aTc）を添加し、さらに同条件で培養を続け、GFP 蛍光の強度を測定した（励起波長 485 nm, 観察波長 510 nm）。GFP 蛍光の強度は、600 nm における細胞の濁度で標準化した。

## 結果

ACA 配列を除去した *gfpP* 遺伝子の翻訳効率が元の *gfp* 遺伝子と変わらないことを調べるため、培養した KMmR+g と KMmR+gP にアラビノースを 0.001~1%の範囲で添加して GFP の発現を誘導し、GFP 蛍光強度を測定した。どちらの株においても、GFP 蛍光強度はアラビノース濃度が増加するのにもなって増加し、また各濃度での蛍光強度に大きな違いは見られなかった。したがって、*gfpP* と *gfp* の翻訳効率に差がないことが示された。

GFP の発現に対する MazF 発現の影響を調べるため、アラビノースと同時に aTc を添加し、MazF の発現も誘導した（図 2）。まず、KM+g と KMmR+g を比較すると、KM+g では誘導後すぐに GFP 蛍光が上昇するのに対し、KMmR+g では誘導後

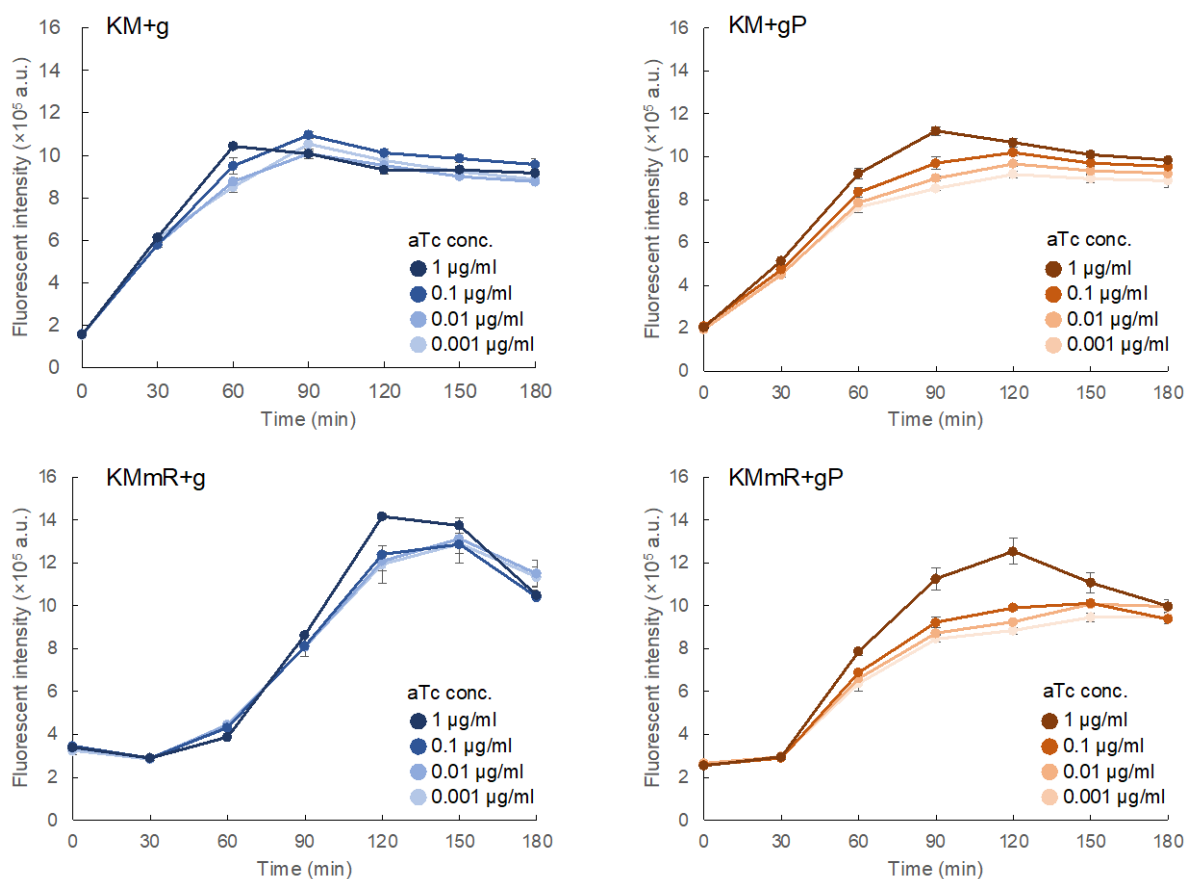


図2 GFP発現に対するMazFの影響

各株の培養液に0 minに0.1%アラビノースとそれぞれの濃度のaTcを添加し、GFPからの蛍光の強度を測定した。蛍光強度は600 nmにおける濁度で標準化した。KMmRはaTcによりMazFが発現する株、KMはMazFが発現しない株、gPはACA配列を除去した*gfp*が発現する株、gはACA配列を含む*gfp*が発現する株。

60分までは GFP 蛍光が増加しなかった。この結果は MazF により、*gfp* からのタンパク質合成が抑制されたことを示唆している。しかし、60分以降では GFP 蛍光は増加していき、120分における蛍光強度は KM+g と KMmR+g とで大きな違いが見られなくなった。したがって、60分以降では何らかの原因により MazF の働きが抑制されてしまっていると考えられる。また、MazF による GFP 蛍光の抑制は、aTc 濃度に依存していなかった。MazF の発現量の違いが GFP の発現抑制に対して影響していないと考えられ、aTc 非存在下で起こるごく低レベルでの MazF 発現により GFP の合成が抑制されたことが示唆された。

次に KMmR+g と KMmR+gP とを比較すると、KMmR+gP では 60分で GFP 蛍光が増加しており、ACA 配列を除去したことで MazF による翻訳の抑制効果が軽減されることが示された。また、KMmR+gP では、aTc 濃度が 1 µg/ml のときにはより低濃度の aTc の場合と比べて、顕著に GFP 蛍光強度が上昇していた。よって、MazF 発現が高くなると *gfpP* がより翻訳されやすくなることが示された。MazF により内在性の mRNA が分解されることで、*gfpP* mRNA に結合するリボソーム量が増加し、タンパク質合成量が増加したと考えられる。

## 結論

本研究により、MazF を発現させることでタンパク質合成が抑制されることが示された。しかし、その抑制効果は 60分以降に解消されてしまっていた。MazF の mRNA にも ACA 配列が 8カ所存在するため、*mazF* mRNA も分解されてしまい、MazF の発現が低下してしまった可能性が考えられる。導入する *mazF* からも ACA 配列を除くことで、抑制効果を持続させることができるのではないかと考えられる。また、aTc を添加していない条件でも、MazF によるタンパク質合成の抑制効果が見られたことから、MazF の発現レベルが非常に低くても十分に機能していると考えられる。さらに、MazF 存在下では *gfpP* からのタンパク質合成の方が *gfp* からよりも早く起こることが示され、ACA 配列を除去することで MazF による翻訳抑制効果が低減することが示された。また、MazF の発現量を増加させると、*gfpP* からのタンパク質合成が他のタンパク質より優先されることも示された。以上の結果から、MazF 発現細胞内では、ACA 配列を除去した遺伝子からのタンパク質合成が優先的に起こることが示唆された。しかし、MazF 影響は低レベルの発現でも大きいことから、本実験の成果をシアバクテリアに適用していくためには、シアノバクテリアにおける厳密な遺伝子発現制御系を開発する必要がある。

## 文献

- 1) Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G., and Inouye, M. (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **12**: 913-923.