

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) 発現ベクターの大核 DNA への組み込み

竹中 康浩¹, 三井 洋司², 芳賀 信幸³ (¹産業技術総合研究所, ²徳島文理大学香川薬学部創薬学科生理化学講座, ³石巻専修大学理工学部生物生産工学科)

Genomic integration of DNA microinjected into *Paramecium caudatum*

Yasuhiro TAKENAKA¹, Youji MITSUI² and Nobuyuki HAGA³ (¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), ²Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences at Kagawa Campus, Tokushima Bunri University, ³Department of Biotechnology, Ishinomaki Senshu University)

SUMMARY

We developed a novel expression vector, pTT3, for transformation in *Paramecium caudatum*. In this study, we examined how microinjected DNA is maintained in the macronucleus of transformant cells. The vector, pTT3 H2B-PcVenus, was constructed by using the *P. caudatum* histone H2B gene which was fused with a codon-optimized and superenhanced yellow fluorescent protein gene named PcVenus. Upon microinjection of the vector, significant fluorescent signals derived from histone H2B-PcVenus were detected throughout the macro- and micronuclei of transformant cells. We analysed the genomic DNA of fluorescence-positive clones using the southern blot and plasmid rescue methods.

[目的] 我々はこれまで、ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)の分子生物学ツールとなる遺伝子発現ベクターの開発を行ってきた(1)。本遺伝子発現ベクターをゾウリムシ大核にマイクロインジェクションすると約30%の細胞は遺伝子導入から数十回以上の細胞分裂を経ても安定して遺伝子発現が観察されるのに対し、残りの細胞では細胞分裂に伴って発現が低下したり全く発現が認められなかった。本研究ではゾウリムシ形質転換効率の向上を目的としてゾウリムシヒストン H2B と黄色蛍光タンパク質である PcVenus のフュージョンプロテインを発現するコンストラクト(2)をゾウリムシ大核にマイクロインジェクションし、導入した遺伝子が核中でどのように維持されているのかをサザンブロットにより解析した。さらにプラスミドレスキュー法によりゲノム中に組み込まれている導入遺伝子を含む断片を回収し、導入遺伝子の両側の塩基配列を解析した。

[方法] ヒストン H2B cDNA は *Paramecium caudatum*, KoscA4 [syngen 3 (O-type) mutant (tnd2/tnd2)] の SMART RACE cDNA (TAKARA) より *Tetrahymena thermophila* のヒストン H2B のアミノ酸配列をもとに設計したプライマーを用いて増幅された。クローニングされたヒストン H2B の翻訳領域は黄色蛍光タンパク質である PcVenus とともに発現ベクター pTT3 の *Dra* I-*Sac* I サイトに導入された。pTT3 H2B-PcVenus は *Bam* HI で直鎖状に切断され、フェノーールクロロホルム抽出、エタノール沈殿にて精製した後、マイクロインジェクションに供された。H2B-PcVenus の発現はマイクロインジェクションから約18時間後に蛍光顕微鏡観察にて確認された。ゲノム DNA は蛍光顕微鏡で発現が確認された4クローンか

ら DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)を用いて調製された。ゲノム DNA を1種もしくは2種の制限酵素で処理した後、0.7%アガロースゲルにて泳動を行い、Hybond N+ナイロンメンブレン (GE healthcare)に転写した。メンブレンを PcVenus 全長をもとにしたプローブと42度で一晩ハイブリさせた後、2x SSC-0.1% SDS 中で65度、30分間、2回以上洗浄した。-80度にて BioMax MS film (Kodak)を感光させ、シグナルを検出した。プラスミドレスキュー法では、形質転換体のゲノム DNA を *Afl* II にて切断後、セルフライゲーションさせ、大腸菌 TOP10 (Invitrogen)にエレクトロポレーションにより導入した。LB-カルベニシリプレートに生えてくるコロニーよりプラスミドを調製し、シーケンスを行った。

[結果と考察] ヒストン H2B-PcVenus を発現する細胞は、核に強い蛍光が観察され、形質転換前と比較して増殖速度や細胞の形態に変化は認められなかった。形質転換体のサザンブロット解析により導入したベクターは大核内でコンカテマーを形成したり、エピソームとして存在しているのではなく、大核ゲノム中にランダムに組み込まれている事が明らかとなった。またプラスミドレスキュー法により挿入されたプラスミド DNA を含むゲノム DNA を回収し、8コロニーからプラスミドを調製してそれぞれ塩基配列を解析したところ、挿入部位と思われるゲノム配列には明らかな特徴や相同性は認められず、導入 DNA が特定の部位ではなくランダムに染色体中に挿入されていることが裏付けられた。以上の結果をふまえて、今後積極的にゲノム DNA に組み込まれるような遺伝子発現ベクターを開発し、さらに高効率なゾウリムシ形質転換法が確立されることが期待される。

[文献]

- 1) Takenaka, Y., Haga, N., Harumoto, T., Matsuura, T., Mitsui, Y., 2002. *Gene* 284, 233-240.
- 2) Takenaka, Y., Yanagi, A., Masuda, H., Mitsui, Y., Mizuno, H., Haga, N., 2007. *Gene* 395, 108-115.