

テトラヒメナを利用した異種タンパク質分泌の試み
ーセルロース分解系構築へ向けてー

中島 千佳, 遠藤 浩 (金沢大・理・生物)

Construction of Secretory System of Foreign Proteins using
Tetrahymena thermophila

Chika NAKASHIMA and Hiroshi ENDOH (Dept. Biol., Fac. Sci., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Lower termites harbor many kinds of protists and bacteria in their hindgut. They digest cellulose with cellulases secreted from termite salivary glands and from symbiotic protists. The former cellulases work in the foregut, whereas the latter work in the hindgut; the termites have developed dual cellulose-digesting system. Using this system, lower termites digest more than 80% of the cellulosic biomass that is taken up. This system is highly efficient, but it is unusable in vitro because of the difficulty of culturing the symbiotic protists under an aerobic environment. *Tetrahymena thermophila* has

many attributes of an ideal expression host of foreign proteins, such as a rapid growth rate, growth on inexpensive media, high cell density, and the ease of culturing large volumes. In this study, we intend to introduce cellulase genes from both the termite and symbionts into the *T. thermophila* genome, by which they can secrete cellulases extracellularly. Our goal is to construct a new cellulose-digesting system under an aerobic environment, combining *Tetrahymena* cells with foreign cellulase genes of different origins. Now, we are constructing a secretion system of foreign proteins such as GFP, using a prepro-peptide derived from several cysteine proteases of *T. thermophila*, and changing codons of a few cellulase genes to optimize the codon usage.

【目的】 下等シロアリは嫌気的環境である腸内に複数種の鞭毛虫を共生させており、摂食した木材を自身と共生鞭毛虫のセルラーゼによる二重の消化システムにより分解していると考えられている¹⁾。この分解システムにより、下等シロアリは摂食した木材をおよそ 80% 以上分解することができる。これだけ高効率に木材を分解する生物は自然界でも珍しいとされ、下等シロアリのセルロース分解システムが注目されている。

テトラヒメナは世代時間が短い (26°C で約 4 時間)、安価で単純な栄養条件下での培養が可能、高密度 (2.2×10^7 cells/ml) での大量培養が容易であるなど、外来遺伝子発現のための宿主として理想的な性質を持っている。現在までに、テトラヒメナを用いて外来遺伝子を発現させた例はいくつか報告されており^{2,4)}、大腸菌や酵母に代わる宿主として期待されている。そこで本研究では、テトラヒメナに下等シロアリとその共生鞭毛虫のセルラーゼ遺伝子を導入し、テトラヒメナの細胞外分泌タンパク質の 1 つであるシステインプロテアーゼの prepro-peptide に相当する配列を利用してセルラーゼの細胞外への分泌を試みる。

現在、食料と競合しないバイオエタノールとしてセルロース系エタノールの開発が盛んにおこなわれているが、セルロースの分解が困難であるなどの理由で実用化には至っていない。我々は、効率的にセルロースを分解している下等シロアリと、好気条件下で急速に高密度状態での培養が容易なテトラヒメナを組み合わせることで、高活性で高効率な新規セルロース分解系が構築できると考えた。この新規セルロース分解系の実用化への可能性を探ることが、本研究の最終的な目標である。

【方法】

GFP の分泌

システインプロテアーゼ遺伝子を 5'UTR, 3'UTR それぞれ 1 kb 程度含むようにクローニングした。その後、prepro-peptide に相当する配列以下の翻訳領域を GFP 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子に置き換え GFP 分泌用のプラスミドベクターを作製した。これを金粒子にコートした後、パーティクルガンを用いて大核内に導入した。形質転換体は選択薬剤であるパロモマイシン存在下でスクリーニングした。

セルラーゼ遺伝子のクローニング

下等シロアリ自身のセルラーゼ遺伝子は、ヤマト

シロアリ *Reticulitermes speratus* から得た。腸を除去したヤマトシロアリから RNA を抽出し RT-PCR により cDNA を合成した。現在のところ、この cDNA から唾液腺のセルラーゼ遺伝子 1 種類 (accession no. AB008778) をクローニング済みである。共生鞭毛虫のセルラーゼ遺伝子は、オオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* の共生鞭毛虫の遺伝子を用いた (理化学研究所, 守屋繁春氏より提供)。

【結果と考察】 GFP 分泌用のプラスミドベクターを導入した形質転換体は現在スクリーニング中であり、GFP が細胞外に分泌されるかはまだ明らかになっていない。しかし、テトラヒメナのホスホリパーゼ A₁ の prepro-peptide を用いて外来タンパク質を細胞外に分泌させた例はすでに報告されている⁴⁾。このホスホリパーゼ A₁ の prepro-peptide は、細胞外分泌タンパク質であるカテプシン L 様プロテアーゼのそれと非常に類似している⁵⁾。また本研究で用いるシステインプロテアーゼもこのカテプシン L 様プロテアーゼである。これらのことから、今回作製したプラスミドベクターを導入した形質転換体は、GFP を分泌することが予想される。

GFP の分泌を確認後は、作製したプラスミドベクターの GFP 遺伝子領域をセルラーゼ遺伝子と置き換え、テトラヒメナに導入する予定である。

今後は、作製したプラスミドベクターの GFP 遺伝子領域をセルラーゼ遺伝子と置き換え、テトラヒメナに導入し活性を調べる予定である。また、メタロチオネイン 1 のプロモーターを用いて過剰発現させることも計画している。セルラーゼ遺伝子はテトラヒメナのコードン使用頻度に合わせて、コードンの改変が必要である。コードンの最適化、過剰発現、高活性が得られるセルラーゼ遺伝子の組み合わせ等を検討し、実用化へ向けた分解系構築の可能性を探っていくたい。

【文献】

- 1) Nakashima, K. et al. (2002) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 777-784.
- 2) Gaertig, J. et al. (1999) *Nat. Biotechnol.*, 17, 462-465.
- 3) Peterson, D.S. et al. (2002) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 122, 119-126.
- 4) Weide, T. et al. (2006) *BMC Biotechnol.*, 6, 19.
- 5) Kiy, T. et al. (1993) *Exp. Cell Res.*, 205, 286-292.