

## D114

## 合成プロモーターシステムによる卵管特異的高発現の誘導

(九大院工・化工) ○(学) 山元 秀晃、(学) 沼田 健作、寺森 正志、(正) 河邊 佳典、  
(正) 井藤 彰、(正) 上平 正道\*

## 1. 緒言

我々はこれまでに、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法によって、卵を含めた全身において、組換えタンパク質を高発現するトランスジェニック鳥類の作製に成功している。しかし、目的タンパク質の種類によっては、全身発現させてしまうと生体に悪影響が及ぶ恐れがあり、トランスジェニック鳥類において様々な種類の組換えタンパク質を生産できるようにするためには、卵白をつくる卵管組織特異的に目的タンパク質を発現させることが望まれる。一般的に、組織特異的な遺伝子発現を達成するためには、その遺伝子発現制御領域 (プロモーター) を発現ベクターに組み入れる必要があるが、プロモーター領域の一部だけでは組織特異性が発揮されないばかりか、発現量も低下してしまう。本研究では、卵管組織で発現している卵白タンパク質であるオボアルブミンおよびコンアルブミンのプロモーター領域を TRE-tTA 合成プロモーターシステムと組み合わせることで、卵管組織特異的高発現の誘導を試みた。

## 2. 実験方法

TRE-tTA 合成プロモーターシステムに必要な発現ベクター (図 1A) およびレトロウイルスベクター (図 1B) を作製した。レポーター遺伝子として  $\beta$ -galactosidase (LacZ) 遺伝子を用いた。システムの評価では NIH3T3 細胞を、卵管組織特異的な発現評価ではニワトリ初代卵管細胞およびニワトリ胚性線維芽細胞を用いた。プラスミド発現ベクターの遺伝子導入は遺伝子導入試薬を使用した。遺伝子導入 48 時間後、細胞を回収し、ONPG を基質として  $\beta$ -gal 活性を測定した。

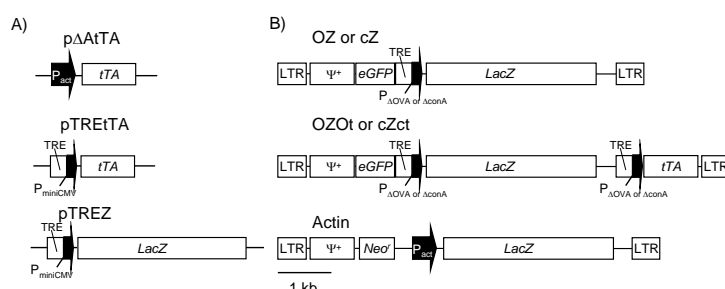


図 1. ベクターコンストラクト

## 3. 結果および考察

卵管特異的な少量発現を大量発現へ導くために、TRE-tTA 合成プロモーターシステムを卵管組織特異的なプロモーターと組み合わせることを考案した。これは、組織特異的なプロモーターから発現された tTA が TRE 配列下流の tTA を誘導し、再び TRE 配列に結合することで、さらに大量の tTA が発現誘導されるポジティブフィードバックの仕組みをとる。このシステムを評価するために、構成的プロモーターを用いた tTA 発現ユニットと共に TRE-tTA 発現ユニットをプラスミドベクターにより NIH3T3 細胞内に導入し、 $\beta$ -gal 活性測定を行った。この結果、ポジティブフィードバック作用により、約 15.2 倍の発現量増加が見られた。

次に、卵管組織特異的な発現のために、TRE 配列下流のプロモーター配列をオボアルブミンあるいはコンアルブミン最小プロモーター配列と置換した。このプロモーター配列を含む発現ユニットをウイルスベクターにより初代卵管細胞へ導入したところ、卵管細胞特異的な発現が確認され、ポジティブフィードバック作用を働かせることで、卵管細胞において約 8.2 倍発現量が増加した (Fig. 2)。これは、いまだ高発現の実績のあるニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターに匹敵する発現量であった。これらの結果から、卵管組織特異的な人工合成プロモーターを用いた本発現システムが、卵管組織特異的な高発現をもたらすことが示された。

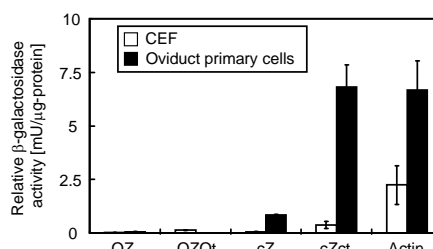


図 2. ニワトリ卵管細胞を用いた合成プロモーターによる組織特異的な発現の評価

\*FAX: 092-802-2793, phone: 092-802-2743

e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp