



Efficient transgene expression by alleviation of translational repression in plant cells

植物培養細胞において翻訳抑制の回避による導入遺伝子の効率的な発現

(JBB, Vol. 118, No. 4, 434–440, 2014)

上田 清貴・大河原錬也・山崎将太郎・眞田 裕司
木下 恵利・米田 新・出村 拓・加藤 晃*

植物培養細胞は有用物質生産システムの有効な宿主の一つであり、実際に有用な外来遺伝子を導入し、医療用タンパク質や工業用酵素といった有用物質を生産する試みが盛んに行われている。また、翻訳後修飾を行うことができるため、大腸菌では不可能な糖鎖のような複雑な構造を持った物質の生産が可能である。また、哺乳類細胞と比較しても生産コストが低く、ウイルス汚染などの危険性が低いことも大きな利点である¹⁾。培養細胞で効率的な物質生産を行うためには、培養液あたりの生産量が多いことが重要であり、分泌タンパク質生産などでは細胞濃度が高い培養後期（定常期）の状態、高密度培養を行うことも高生産の一つの方法と考えられる。

しかし、これまでの研究から、植物が熱・塩・低酸素・乾燥といった非生物学的ストレスに曝されると、細胞内の翻訳状態が著しく変化し、細胞全体として翻訳が抑制されることが報告されている²⁾。植物細胞を培養する場合にも、培養後期には培養前期と比べて、栄養飢餓・低酸素といった非生物学的ストレスの存在が予想され、同様に翻訳過程が強く抑制されると考えられる。このことは、植物培養細胞に導入した有用遺伝子の発現も、培養後期には翻訳レベルで抑制され生産性が低下することを意味している。一方で、そうした状況下においても一部のmRNAからの翻訳は抑制されず、活発に翻訳されるものも存在している。

そこで本研究では、植物培養細胞に導入した有用遺伝子について、培養後期においてもmRNAからの翻訳が抑制されず、効率的に発現できる導入遺伝子発現系を提供することを目的とした。

まず、ポリソームマイクロアレイ解析により、シロイヌナズナ培養細胞T87株の培養前期と培養後期の翻訳状態をすべてのmRNA種について数値化した。ポリソームマイクロアレイ解析とは、ショ糖密度勾配遠心によりリボソームが結合したポリソームmRNAを分画し、それをマイクロアレイにより定量する方法である。今回は、細胞質に存在する全mRNAに対し、翻訳されているポリソーム画分に存在するmRNAの量がどのくらいあるかを比として数値化した。その結果、培養後期のmRNA

の翻訳状態は、培養前期と比較して全体として抑制される（ポリソーム形成率が低下）ことが明らかとなった。一方で、すべてのmRNAからの翻訳が抑制されるわけではなく、活発に翻訳される（ポリソーム形成率が高い）mRNAも存在していた。

我々は、これまでに非生物学的ストレスの一種である熱ストレス（培養前期のT87株を37°C 10分間処理）による翻訳状態変化を同じくポリソームマイクロアレイにより解析しており³⁾、今回の培養前期と後期での結果と比較すると、個別mRNAとして類似した傾向を示す結果を得ている。これらの結果は、ストレス種を問わず同様の翻訳制御機構が存在することを意味している。一方で、傾向が一致しないmRNAもまた存在しており、ストレス種特異的な翻訳制御機構の存在も示唆された。

これまでの知見から各種非生物学的ストレス下での翻訳制御には、5'非翻訳領域（5'UTR）が重要な役割を担っていることが報告されている⁴⁾。そこで次に、培養後期および熱ストレス下でともに翻訳が抑制されないmRNAの5'UTRを付加したレポーター遺伝子を含む発現ベクターを構築し、シロイヌナズナ培養細胞（T87株）へ導入した。得られた形質転換細胞を用いて、培養後期におけるレポーター遺伝子の翻訳状態を評価し、翻訳抑制回避能力を実証した。また、同5'UTRを付加したモデル遺伝子（西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ遺伝子）を含む発現ベクターを構築し、タバコ培養細胞（BY2）へ導入した。得られた形質転換細胞を用いて、培養後期におけるペルオキシダーゼ遺伝子の翻訳状態を評価し、付加した5'UTRが持つ翻訳抑制回避能力の汎用性（遺伝子/植物種）を実証した。

植物培養細胞での有用物質（有用タンパク質）生産を行う上で、この技術要素は必須であり、特に、高密度培養時におけるストレスによる生産性低減の回避に有効であると考えられる。

- 1) Desai, P. et al.: *Biotechnol. Adv.*, **28**, 427 (2010).
- 2) Bailey-Serres, J. et al.: *Trends Plant Sci.*, **14**, 443 (2009).
- 3) Matsuura, H. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 448 (2010).
- 4) Matsuura, H. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **54**, 474 (2013).