

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780294

研究課題名（和文）円石藻の形質転換系の確立とココリス形成関連遺伝子の単離

研究課題名（英文）Investigation of transformation methods and genes related to coccolith formation, *Pleurochrysis carterae*

研究代表者

長坂 征治（NAGASAKA SEIJI）

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：60534013

研究成果の概要（和文）：海洋性の単細胞藻類である円石藻は、細胞表面に炭酸カルシウムを主成分とした円石（ココリス）を形成する。このココリス形成に関わる遺伝子として、培養液中のカルシウム濃度の変化に伴い円石藻細胞内で発現量の変化する遺伝子群を単離した。この中には、糖の生合成関連遺伝子と相同性の高いものも含まれていた。これらの遺伝子の機能解析のために形質転換系の確立を試み、遺伝子の細胞への導入までは成功したが、導入された遺伝子の過剰発現は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：Coccolithophore is a single-celled algae of the ocean, which forms coccoliths composed mainly of calcium carbonate on the cell surface. Genes, whose amount of expression changes according to the level of calcium concentration in the culture solution, were isolated as ones involved in the coccolith formation. These include the genes which have a high homology with the genes related to polysaccharides biosynthesis. Attempts were made to establish a transformation method for functional analysis of these genes. The injection of genes into cells was successfully conducted, however, their overexpression was not detected.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオミネラル、円石藻、形質転換、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

生物が行う無機鉱物の生成は、バイオミネラリゼーションと呼ばれ、微生物や藻類から植物、脊椎動物まで、広く生物界で観察される現象である。生物により生成される無機鉱

物であるバイオミネラルの形成機構は、様々な生物を対象として研究がなされているが未解明な部分が多い。バイオミネラルの研究は、炭酸カルシウムとして二酸化炭素を固定する機構に注目した地球環境分野での研究、

結晶成長の制御という意味でのナノテクノロジーへの応用を目的とした産業分野での研究、骨の再生などの医療分野への応用に向けた研究等、今後期待されている分野の一つである。

バイオミネラリゼーション研究の中で、円石藻の研究は重要な位置を占めており多くの報告がなされている。しかしながら、円石藻の研究は、主に生理学、生化学的な研究であり、ココリス形成機構に迫る研究は少ない。Marsh (1997) は、円石藻 *Pleurochrysis carterae* のココリスから、3種類の酸性多糖 (PS1, PS2, PS3) を単離し、PS2 について構造を決定した。これらの酸性多糖が、ココリスの周縁に局在していることから、ココリスの形成に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、*P. carterae* 細胞の変異源処理により、ココリスを形成していない株を作成し、これらが酸性多糖を合成していないことを示し、ココリス形成と酸性多糖との関係を示した。一方、Ozaki らは (2007)、*P. carterae* の近縁種である *P. haptonemofera* から、PS2 と類似した酸性多糖 (CMAP: coccolith matrix acidic polysaccharide) を単離、構造決定し、*in vitro* の系において、この多糖が炭酸カルシウムの結晶形成を阻害することを示した。このことから CMAP がココリス形成における結晶成長の制御に関与していることを示唆した。しかしながら、これらの酸性多糖の合成酵素、変異株の原因遺伝子については決定されておらず、酸性多糖のココリス形成への直接的な関与は証明されていない。これらの研究が、遺伝子の単離に至っていない原因として、分子生物学的な基盤が不十分であったことが挙げられる。

円石藻の分子生物学的な研究の報告は、近年になり増えつつあり、生理学的な研究から、円石藻 *Emiliania huxleyi* のココリス形成は、培養液中のリンあるいは窒素の不足により促進されることが報告されていた。*E. huxleyi* 細胞でリン欠乏、窒素欠乏条件下で発現誘導される遺伝子群が、マイクロアレイ法、SAGE 法により網羅的に解析している (Quinn et al. 2006, Dyhrman et al. 2006)。国内においても、円石藻 *P. haptonemofera* の EST 配列が解析され、この配列をもとにマイクロアレイが作成された。Fujiwara ら (2008) は、ココリスを形成しない変異株と野生型株との間での遺伝子発現の比較から、ココリス形成に関与する遺伝子群を報告している。さらに、アメリカでは *E. huxleyi* のゲノム解読プロジェクトが進められており、分子生物学的研究を行う基盤が整いつつある。

この様な現状において、遺伝子の機能解析を行うための円石藻の形質転換系の確立が早急に必要であり、ココリス形成の分子機構の研究に大きく寄与するものである。

一方、ココリス形成の形態観察は、1960 年代から電子顕微鏡による形態観察は行われてきた。しかしながら、これらの報告では、細胞構造の時間分解能の低い化学固定法による観察のみが行われている。より生きた細胞に近い形態の情報を得る方法として確立された急速、あるいは高圧凍結固定法を用いた細胞の観察はなされていない。これらの手法を用いることにより、新たな情報が得られるものと考えられ、得られた知見は、形質転換法の確立につづく、ココリス形成関連遺伝子の機能を評価する際に有用な情報となる。

2. 研究の目的

本研究では、円石藻 *Pleurochrysis carterae* の形質転換系の確立とココリス形成における形態変化の解析を目的としており、以下の二つを目標とする。(1) 円石藻での外来遺伝子の導入とタンパク質発現系の確立。(2) ココリス形成過程における形態の詳細観察と提唱モデルとの比較による再評価。

3. 研究の方法

(1) 形質転換法の確立

① 円石藻の薬剤耐性

形質転換した細胞を選抜するためには、一般的に薬剤、栄養などによる選抜が用いられている。円石藻については、栄養欠乏、過剰などによる選抜に用いる変異株が単離されていない。そのため、遺伝子発現系、特に恒常的な発現系を構築するには、薬剤選抜の条件検討が必須である。形質転換を行う準備として、薬剤 (アンピシリン、カナマイシンなどの抗生物質) に対する耐性について、生育速度を指標として評価を行い選抜に用いる抗生物質を決定した。

② プロトプラストの作成

円石藻細胞の表面は、ココリスで覆われており、これが遺伝子の導入を阻害することが予想される。一般的な細胞の形質転換にはプロトプラストの状態での遺伝子の導入が行われることから、円石藻についても、効率よくプロトプラストを作製することが必要であった。プロトプラストの作製法として、報告のあるカリウムを用いた浸透圧法、あるいは、EDTA でカルシウムを溶解させる方法などを検討した。

③ 円石藻への遺伝子の導入

円石藻細胞への遺伝子の導入には、一過性の発現としてパーティクルガン法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法を恒常的な発現として、海洋性藻類で報告例のあるアグロバクテリウム法を検討した。遺伝子を直接導入するパーティクルガン法、エレクトロポレーション法については、あらかじめ蛍光色素 (FITC デキストランなど) を用いて、細胞への導入について条件検討を行った。導入する遺伝子は、レポーター遺伝子として、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を用い、発現用のプロモーターには、植物や藻類で過剰発現が確認されている、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターを連結したベクターを用いた。また、ベクターではなく、真核生物の翻訳に必要な Cap アナログと poly (A) ポリメラーゼを用いて合成した mRNA を用いて形質転換を行った。形質転換の確認は、導入した GFP 遺伝子の産物であるタンパク質の蛍光を指標とした。また、タンパク質の発現についてウエスタンブロッティングによる確認を行った。

④ココリス形成関連遺伝子の解析

円石藻を天然海水の強化培地、異なるカルシウム濃度を添加した人工海水で培養し、マクロアレイを用いて遺伝子発現を解析した。これらの遺伝子の発現について、RT-PCR 法を用いて発現量の変化について確認を行った。

(2) 円石藻の形態観察

円石藻の形態観察に関する報告の多くで用いられている化学固定法よりも、生きている状態に近い状態で固定できる急速凍結法により細胞を固定、置換し観察を行った。

4. 研究成果

(1) 形質転換系の確立

①円石藻の薬剤耐性

形質転換細胞を選抜するための薬剤の選抜を行った。カナマイシン、リファンピシン、ハイグロマイシン、ゼオシンについて、それぞれの薬剤が円石藻の生育に与える影響を調べた。円石藻はゼオシン以外の薬剤に対しては高い耐性を示し、円石藻の形質転換細胞の選抜には適していないことが明らかになった。一方、円石藻の生育は、1 mg/l のゼオシンで約 50% 生育が阻害され、5 mg/l で完全に阻害された。しかしながら、天然海水を用いた場合には、生育阻害率が低くなっていたことから、形質転換細胞の選抜には、人工海水にゼオシンを添加した培地を用いることとした。

②プロトプラストの作成

本研究で用いた *Pleurochrysis carterae*

の近縁種 *P. haptonemofera* のプロトプラスト作成法をもとに、硝酸カリウムを用いた浸透圧変化によるプロトプラスト化の条件検討を行った。EDTA 溶液を用いる方法でのプロトプラスト化も行ったが、この方法では円石中の炭酸カルシウムの溶解は確認されたが、細胞は凝集しており、多糖類の残存が示唆された。一方で、硝酸カリウムを用いた方法では、円石の脱離した細胞が分散しており、形質転換に用いるのに適していると考えられた。また、プロトプラスト化の効率、円石の再生から判断される細胞の状態から、プロトプラスト化に適した条件が 200 mM の硝酸カリウムを含む溶液であることを明らかにした。

③円石藻への遺伝子の導入

エレクトロポレーション法での遺伝子導入を行う前に、FITC デキストランを用いて、擬似的に遺伝子導入条件の確立を行った。プロトプラストへの FITC デキストランの導入を蛍光顕微鏡下で確認し、もっとも導入効率の高かった条件で、形質転換用の GFP タンパク質発現ベクターを細胞へ導入した。このベクターは、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーター制御下で、GFP 遺伝子を過剰発現させるものである。エレクトロポレーション処理を行った細胞を蛍光顕微鏡下で緑色蛍光の検出を行ったが、円石藻の強い自家蛍光存在下でも認められる明瞭な緑色蛍光の発現は確認されなかった。そこで、抗 GFP 抗体を用いて、ベクターを導入した細胞での GFP タンパク質発現を確認した。GFP タンパク質のシグナルは検出されたが、非常に弱く、発現までの過程で抑制、あるいは分解されていることが示唆された。アクチンプロモーターを用いた発現誘導、合成 mRNA を用いて、エレクトロポレーションによる形質転換を行ったが、導入した緑色蛍光タンパク質の過剰発現にはいたらず、蛍光あるいは抗生物質耐性を指標とした形質転換細胞の選抜法の確立は未達成であった。そのため、導入ベクターの発現誘導に注目し、円石藻の形質転換に使用するプロモーターを植物用のものを流用するのではなく、円石藻由来の恒常性発現遺伝子のプロモーター領域の単離を行った。マクロアレイ解析で、遺伝子発現が高かった α チューブリンを目的遺伝子とし、その上流配列の単離を試みた。現在のところ、約 1 kbp の上流配列が得られており、これを用いた円石藻の形質転換と、さらに上流の配列の単離を行っている。

④ココリス形成関連遺伝子の解析

本研究で用いた *P. carterae* の近縁種であ

る, *P. haptonemofera* の cDNA マクロアレイを用いて *P. carterae* の遺伝子発現解析を行った. 培養液中のカルシウム濃度の増加に伴い発現量の増加する遺伝子群の存在が明らかとなった. これらの遺伝子について *P. carterae* の cDNA ライブラリーから単離し, qRT-PCR 法を用いてマクロアレイの結果の評価を行った. カルシウム濃度依存性の発現誘導を示した5つの遺伝子では, いずれも培地中のカルシウム濃度上昇に伴う遺伝子発現の誘導が確認された. これらの中には, 糖の生合成, カルシウムの輸送に関わる酵素遺伝子が含まれていることから, ココリスの形成過程に関与する遺伝子群であることが期待される.

(2) 円石藻の形態観察

高圧凍結法を用いて, 円石藻の凍結固定とそれに続く凍結置換, 包埋を行い透過型電子顕微鏡で形態観察を行った. ココリスはゴルジ小胞の中で, 楕円形の有機基盤の辺縁にのみ形成される. 有機基盤の中央部には, 結晶の形成を阻害する物質があることが示唆されていたが, 本研究の一連の操作によって調整した試料の観察から, 電子染色を受けにくい領域の存在が明確に観察された. その様子から, 糖類などの有機物が, 有機基板上で円石の形成を制御していることが示唆された.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① K. Saruwatari, S. Nagasaka, N. Ozaki, H. Nagasawa. Morphological and crystallographic transformation from immature to mature coccoliths, *Pleurochrysis carterae*. Marine Biotechnol, 査読有, vol. 13, 801-809, 2011

[学会発表] (計4件)

- ① 笠島 大貴, 遠藤 博寿, 長坂 征治, 横尾直樹, 猿渡 和子, 小暮 敏博, 藤原 祥子, 都筑 幹夫, 長澤 寛道 円石藻のココリスに含まれる新規タンパク質の同定と局在解析 日本農芸化学会 2011年 3月25日~28日 京都女子大学(京都) (震災により中止したが, 要旨集の発行を

以て開催したとみなす)

- ② 笠島 大貴, 遠藤 博寿, 長坂 征治, 猿渡和子, 小暮 敏博, 長澤 寛道 円石藻のココリス形成に関わるタンパク質の探索と解析 日本農芸化学会 2010年3月27日~3月30日 東京大学(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長坂 征治 (NAGASAKA SEIJI)
東洋大学・生命科学部・准教授
研究者番号: 60534013

(2) 研究分担者 (0)

(3) 連携研究者 (0)