

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580206

研究課題名(和文) アグロバクテリウムを用いた海産プランクトンへの高効率な遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文) Development of effective transformation methods for marine phytoplankton using *Agrobacterium*

研究代表者

足立 真佐雄 (ADACHI MASAO)

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号:70274363

研究成果の概要：

本研究では、まず海産プランクトンに対し、様々な条件の下でアグロバクテリウムを感染させ、その遺伝子導入を試みたが、形質転換体を得ることは出来なかった。そこで、海産藻類感染性ウイルスに由来するプロモーターを新たに用い、これを組み込んだ形質転換用プラスミドを構築した。本プラスミドを用いることにより、中心目珪藻種や羽状目珪藻種に対し、目レベルを超えて形質転換が可能であることが判明した。本結果は、海産藻類ウイルス由来のプロモーターの形質転換系への適用事例として、世界初の成果である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：プランクトン、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

これまで、多くの生物についてその細胞内に外来遺伝子を導入する手法が確立され、この遺伝子導入法は特定のタンパク質の大量発現はもとより、特定遺伝子の機能解明に極めて重要かつ必須の技術となっている。しかし、海洋性プランクトンに目を向けると、珪藻 *Pheodactylum tricorutum* (Apt et al. 1999, Zaslavskaja et al. 2000), *Cylindrotheca fusiformis* (Fischer et al. 1999) および渦鞭毛藻 *Symbiodinium* (Lohuis and Miller

1998) などごく一部の無害な種に限定して遺伝子導入法が報告されているが、これらの報告では導入法としてパーティクルガン法やシリコンカーバイド法を用いているため、いずれもその導入効率は極めて低い。その一方で、大多数の海洋性プランクトンについては、有害・有毒プランクトンも含めて、これまで導入法に関する知見は全く得られていない。

従来、陸上植物については土壌由来の細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) を用い、これを感染させることにより、高い効率で目

的とする遺伝子の導入が行われてきた。近年、このアグロバクテリウムは、植物に加え淡水性の植物プランクトン (*Chlamydomonas reinhardtii*, Kumar et al. 2004)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, Bundock et al. 1995, Piers et al. 1996) やヒトの培養細胞 (Kunik et al. 2001) に対しても感染性を示し、高効率で遺伝子導入を行うことが明らかにされ、本菌は真核生物全般へ応用可能であることが示唆されている。しかし、これまでに海産生物に対して、本菌を応用した例は皆無である。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究はアグロバクテリウムを用いて、様々な海産プランクトンへ適用可能な、高効率な遺伝子導入法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 珪藻の遺伝子導入に用いる組み換えプラスミドの構築

様々な海産プランクトンに適用することが可能であり、かつ高効率な遺伝子導入法を確立するために、モデルプランクトンとして、まず無害な珪藻 *Cylindrotheca fusiformis* を用いる。本藻は、すでに固相培養法が確立されており (Fischer et al. 1999)、これまでにパーティクルガン法を用いることにより、効率は低いものの遺伝子導入が可能ながことが明らかとなっている。よって、本藻を用いてアグロバクテリウムによる遺伝子導入を新規に試み、これにより得られる形質転換効率と、従来のパーティクルガン法により得られる形質転換効率を比較・検討することにより、アグロバクテリウム法の有効性を評価する。

(2) アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入条件の検討

本実験には、豪州の国際農業分子生物学応用研究所(CAMBIA) より分譲して頂いたアグロバクテリウム LBA44 株を用いる。まず、上述した方法により作製した組み換えプラスミドを、エレクトロポレーション法を用いて本細菌株に形質転換する。これにより得た組み換えプラスミドを保有しているアグロバクテリウムを、海水にて調製した YEP 培地を用いて前培養する。得られたアグロバクテリウムを、無害な珪藻 *Cylindrotheca fusiformis* に感染させる。この際、感染誘導物質である糖類やフェノール化合物の濃度や、感染させる細菌濃度、温度や照度等の条件について詳細に検討する。

(3) 藻類感染性ウイルスプロモーターを含

む遺伝子導入用プラスミドの構築

海産珪藻に感染するウイルスの複製酵素遺伝子上流より、プロモーター領域を含む DNA 断片を増幅する。同断片、抗生物質耐性遺伝子、および内在性ターミネーターを、MultiSite Gateway Pro (invitrogen 社製) により pBluescript SK- に連結させ、形質転換用プラスミドを構築する。

(4) ウイルスプロモーターを含むプラスミドを用いた遺伝子導入試験

上記により作成するプラスミドを、中心目珪藻 *Chaetoceros* sp. あるいは羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* に対し、パーティクルガン法で撃ち込み、形質転換を試みる。これらの藻体を、中心目珪藻 *Chaetoceros* sp. については抗生物質であるノールセオスリシンを含む、羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* についてはゼオシンを含む f12 固層培地上にてそれぞれ培養し、コロニー形成の有無を観察し、さらにはそれらの形質転換効率を求める。

4. 研究成果

(1) 珪藻の遺伝子導入に用いる組み換えプラスミドの構築

まずドイツ・Regensburg 大学の Kröger 教授らに分譲して頂いた珪藻のプロモーター領域 (遺伝子発現に必須となる部分) を含むプラスミド pNICgfp-ble (Fig. 1) と、豪州の国際農業分子生物学応用研究所(CAMBIA) より分譲して頂いたアグロバクテリウム用の Ti プラスミド pCAMBIA2301 (Fig. 1) を連結し、組み換えプラスミドの作成に成功した (Fig. 1)。さらに、その塩基配列を確認した。

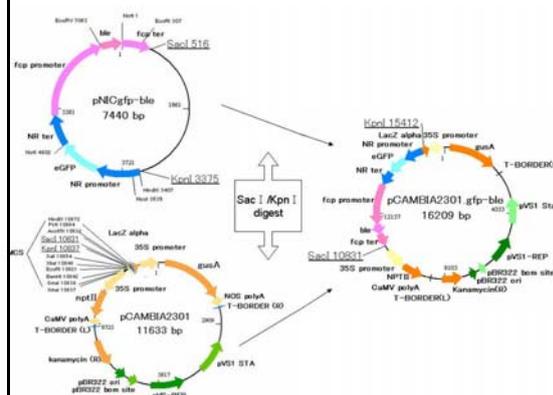


Fig. 1 珪藻のプロモーターを含むプラスミド pNICgfp-ble とアグロバクテリウム用の Ti プラスミド pCAMBIA2301 の連結による組み換えプラスミドの構築

(2) アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入条件の検討

構築に成功したアグロバクテリウム用遺

伝子導入プラスミドを、まずアグロバクテリウムに形質転換させ、これを用いて、無害な羽状目珪藻 *Cylindrotheca fusiformis* に対し、一般的に用いられる感染条件のもとで遺伝子導入試験を行ったところ、形質転換体を得ることは出来なかった。そこで、本菌の感染誘導物質である糖類やフェノール化合物の濃度や、感染させる細菌濃度、温度や照度等の条件を変化させ、再度感染試験を行ったが、いずれの条件のもとでも、形質転換体を得ることが出来なかった。

(3) 藻類感染性ウイルスプロモーターを含む遺伝子導入用プラスミドの構築

海産珪藻に感染するウイルスの複製酵素遺伝子の近位より、プロモーター領域を含む DNA 断片を増幅した。同断片、抗生物質耐性遺伝子、および内在性ターミネーターを、MultiSite Gateway Pro (invitrogen 社製) により pBluescript SK-に連結させ、Fig. 2 に示す形質転換用プラスミドの構築に成功した。

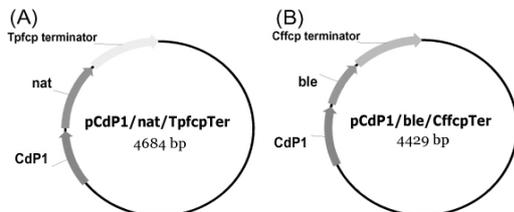


Fig. 2 Map of the transformation vector pCdP1/nat/TpfcTer (A) and pCdP1/ble/CffcTer (B). CdP1: promoter of the putative replication-associated protein gene, TpfcTer: *Thalassiosira pseudonana* fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding protein (fcp) gene terminator, CffcTer: *Cylindrotheca fusiformis* fcp terminator, nat: nourseothricin resistant gene, ble: zeocin resistant gene.

(4) ウイルスプロモーターを含むプラスミドを用いた遺伝子導入試験

まず、珪藻ウイルス由来のプロモーターを含むプラスミド (pCdP1/nat/TpfcTer, pCdP1/ble/CffcTer, Fig. 2) を、パーティクルガンを用いて *Chaetoceros* sp. および *Phaeodactylum tricornutum* に対しそれぞれ形質転換を試みたところ、いずれの藻についても、形質転換体が認められた (Table 1)。同様の実験を繰り返し行ったが、再度形質転換体が認められ、その再現性を確認した。また、珪藻の持つ内在性プロモーターを組み込んだ陽性対照用のプラスミド pTpfcP/nat/TpfcTer と pCffcP/ble/CffcTer を用いて、*Chaetoceros* sp. および *P. tricornutum* に対しそれぞれ形質転換を試みたところ、上述したウイルスプロモーター使用時に得られた形質転換効率と同程度、あるいはその 4~13 倍程度の効率がそれぞれ得られた (Table 1)。また、プロモーターを含

まない陰性対照用のプラスミドを用いて、同様に形質転換を試みたところ、全く形質転換体を得られない、あるいは得られた場合であっても、ウイルスプロモーター使用時と比較して明らかに低い効率が得られた (Table 1)。

Table 1 Transformation efficiencies of *Chaetoceros* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* using various plasmid.

Species	Transformation vector	He pressure (psi)	Average transformants per 10 ⁶ cells (ns2)	
			Trial 1	Trial 2
<i>Chaetoceros</i> sp.	pCdP1/nat/TpfcTer	1350	1.00	1.00
	pTpfcP/nat/TpfcTer	1350	1.00	1.00
	pnat/TpfcTer	1350	N.D.	0
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	pCdP1/ble/CffcTer	1100/1550	5.00	17.5
	pCffcP/ble/CffcTer	1100/1550	67.0	71.0
	pble/CffcTer	1100/1550	N.D.	4.00

以上の結果より、中心目珪藻 *Chaetoceros* に感染するウイルス由来のプロモーター CdP1 は、中心目珪藻 *Chaetoceros* sp. のみならず、羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* にも有効であることが判明した。従来報告されてきた珪藻の遺伝子導入系では、珪藻自身の持つ‘内在性プロモーター’が用いられ、その適用範囲は、そのプロモーターが由来する種など極めて限定的なものであったが、今回用いた藻類感染性のウイルス由来プロモーターは、中心目、羽状目という‘目レベル’を超えた、汎用性を備えた珪藻種の形質転換の可能性を示唆するものである。

(参考文献)

- Apt, E., Kroth-Pancic, P. G. and Grossman, A. R. (1996): Mol. Gen. Genet., 252, 572-579.
- Bundock, P., Den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. G. M. and Hooykas, P. J. J. (1995): EMBO J., 14, 3206-3214.
- Fischer, H., Robl, I., Sumper, M. and Kröger, N. (1999): J. Phycol., 35, 113-120.
- Kumar, S. V., Misquitta, R. W., Reddy, V. S., Rao, B. J. and Rajam, M. V. (2004): Plant Sci., 166, 731-738.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V. (2001): Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 1871-1876.
- Lohuis, M. R. and Miller, D. J. (1998): The Plant Journal, 13, 427-435.
- Piers, K. L., Heath, J. D., Liang, X., Stephens, K. M. and Nester, E. W. (1996): Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, 1613-1618.
- Zaslavskaja, L. A., Lippmeier, J. C., Kroth, P. G., Grossman, A. R. and Apt, K. E. (2000): J. Phycol., 36, 379-386.

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5件)

①Miyagawa A., Okami T., Kira N., Yamaguchi H., Ohnishi K. and Adachi M., High efficiency transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* with a promoter from the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. Phycological Research, 57, 142-146, 2009, 査読有り

②Yoshimochi T., Hikichi Y., Kiba A. and Ohnishi K., The pleiotropic regulator PhcA negatively controls expression of the first component of a regulatory cascade necessary for *Ralstonia solanacearum* hrp regulon induction. J. Bacteriol in press, 2009, 査読有り

③Adachi M., Okamoto N., Matsubara M., Nishijima T. and Suzuki T., Occurrence of toxic *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae) in Uranouchi Inlet, Japan. Fisheries Science, 74, 1315-1321, 2008, 査読有り

④Hojo H., Koyanagi M., Tanaka M., Kajihara S., Ohnishi K., Kiba A. and Hikichi Y., The hrp genes of *Pseudomonas cichorii* are essential for pathogenicity on eggplant but not on lettuce. Microbiology, 154, 2920-2928, 2008, 査読有り

⑤Yoshikane Y., Yokochi N., Yamasaki M., Mizutani K., Ohnishi K., Mikami B., Hayashi H. and Yagi T., Crystal structure of pyridoxamine-pyruvate amino-transferase from *Mesorhizobium loti* MAFF303099. J. Biol. Chem., 283, 1120-1127, 2008, 査読有り

[学会発表] (計4件)

①宮川亜利沙・外丸祐司・長崎慶三・山口晴生・足立真佐雄, 藻類感染性ウイルスプロモーターを用いた海産珪藻の形質転換系の開発, 第12回マリンバイオテクノロジー学会, 早稲田大学大久保キャンパス(2009年5月31日)

②Arisa Miyagawa, Yuji Tomaru, Keizo Nagasaki, Haruo Yamaguchi and Masao Adachi, Development of marine diatom transformation system using viral promoter, SCOR Viral Ecology Meeting, Poster Presentation, Newark, USA, (17-21 May 2009)

③Arisa Miyagawa, Haruo Yamaguchi and Masao Adachi, Stable nuclear transformation of the diatom *Chaetoceros* sp., The 8th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Poster Presentation, Busan, Korea, (13-15 November, 2008)

④Masao Adachi, Takuji Ikegami, Haruo Yamaguchi, The genus *Ostreopsis* in the coastal regions in Tosa Bay, southern part of Japan, The 13th International Conference on Harmful Algae, Poster Presentation, The Hong Kong Disneyland Hotel, Hong Kong, China (3-7 November, 2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

①特願 2009-013577・海産藻類を形質転換するために用いられる新規プロモーター、発明者:足立真佐雄、長崎慶三、外丸裕司、出願人:国立大学法人高知大学、独立行政法人水産総合研究センター、2009年1月23日、国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

氏名:足立 真佐雄

所属・職名:高知大学教育研究部自然科学系・教授

研究者番号:70274363

(2)研究分担者

氏名:大西 浩平

所属・職名:高知大学教育研究部総合科学系・教授

研究者番号:50211800