

機関番号：15401
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009 ～ 2010
 課題番号：21880029
 研究課題名（和文） 多核単細胞性緑藻の細胞再構築現象を利用した
 新規遺伝子改変技術の開発
 研究課題名（英文） Study of a new transgenic technique in coenocytic green algae
 utilizing their protoplast regeneration ability
 研究代表者
 平山 真 (HIRAYAMA MAKOTO)
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教
 研究者番号：40535465

研究成果の概要（和文）：

多核単細胞性緑藻であるハネモ藻体を細断して人為的に細胞再構築現象を発生させ、これにより生じた自然プロトプラストにつき、レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）をコードする mRNA の導入を試みた。その結果、ポリエチレングリコールまたはカチオン性脂質を用いた手法に加え、同 mRNA を添加した人工海水中で藻体を細断したものにおいてもルシフェラーゼ活性が示され、簡便な外来遺伝子導入法を確立できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Reporter mRNA encoding *Renilla* luciferase was introduced into the sub-protoplasts, which were regenerated by squeezing out from the coenocytic green alga *Bryopsis plumosa*, using conventional transgenic methods with polyethyleneglycol and cationic lipid or a new method of which the reporter mRNA was added into the squeezing medium. The luciferase activities were detected in those sub-protoplasts introduced by the new method as well as by the conventional methods. These results indicated that a new easy transgenic technique in coenocytic green algae could be established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,020,000	606,000	2,626,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：遺伝子改変技術・海藻・細胞再構築現象・ハネモ

1. 研究開始当初の背景

近年、海藻について、その現存量や成長率、

陸上以外で養殖可能な点などが注目され、食料としての利用の他、海藻を資源としたバイ

オエタノール生産研究や、有用成分を海藻体内で作らせる、いわば「海藻工場」として利用するための遺伝子改変技術開発が進められている。遺伝子改変技術とは、外来遺伝子を導入、または内在遺伝子の機能を欠失・抑制することで遺伝子改変生物を作出する技術であり、高機能生物の作出、または機能未知遺伝子およびタンパク質の機能解析に極めて有用な手法として適用されている。効率的な遺伝子改変のためには、導入する外来遺伝子を核ゲノム近傍に輸送し（植物においては葉緑体ゲノムも対象）、ゲノム中に取り込まれる頻度を高くする必要がある。当該技術は脊椎動物や高等植物を初め、幅広い生物種で確立されており、微細藻類であるクラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* でもこのような手法が適用され遺伝子改変技術が確立されてつつあるが、大型藻類を対象とした現在の遺伝子改変技術はその低効率性から確立されているとは言えず、更なる安定・高効率な遺伝子改変技術の開発が望まれる。

2. 研究の目的

海藻において遺伝子改変技術が確立されていない要因として、海藻が多様な成分からなる細胞外被を有すること、および外来遺伝子を高効率に発現する転写調節領域（プロモーター）が不明であることが挙げられ、これらをいかに克服するかが本技術確立の鍵となる。一方、ハネモ *Bryopsis plumosa* を初めとする多核単細胞性緑藻は、他の動植物細胞にはみられない極めて特異な細胞再生機構をもつ。すなわち、藻体が損傷を受けると、海水中に流れ出た細胞内オルガネラは自然に凝集して原形質塊となり、やがて細胞膜を再生し（自然プロトプラスト）、さらに細胞壁を形成して元の藻体に成長する。すなわち、

特別な酵素処理を行わずとも細断操作のみによりプロトプラストを形成することが可能であることから、この細胞再構築現象の発生時の培養液中に外来遺伝子を添加することで、外来遺伝子が細胞内に輸送され、再生・成長過程においてゲノムへ取り込まれ易くなるものと考えられる。また、異型世代交代であるハネモの生活史は、人為的に完了させることに成功しており、モザイク状に形質転換された個体につき、人為的に世代交代処理を行うことで、遺伝子改変個体を作出することが可能であると期待される。そこで本課題では、多核単細胞性緑藻の細胞再構築現象に着目し、この生命現象を利用した新規遺伝子改変技術について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、蛍光タンパク質（YFP）およびルシフェラーゼ（hRluc）の融合タンパク質をコードする配列の上流に植物用プロモーター（カリフラワーモザイクウイルス 35S（CaMV35S））を組み込んだベクターを製作し、1) ハネモ藻体を対象としたパーティクルガン法、2) 人為的に細胞再構築現象を発生させ、1時間放置することにより生じた自然プロトプラストを対象としたポリエチレングリコール（PEG）法または3) カチオン性脂質によるリポフェクション法、もしくは4) 同ベクターを添加した人工海水中で藻体を細断する手法により遺伝子導入を試み、外来遺伝子の発現を経時的に蛍光顕微鏡またはルミノメーターで観察した。しかしながら、いずれの手法においても外来遺伝子発現が検出されなかったことから、同緑藻においては高等植物用プロモーターが機能しない、または供試したベクター由来転写産物の翻

訳が正常に行われていない可能性が考えられた。そこで、翻訳が行われるかどうかを確認するため、*in vitro* 転写により調製した hRluc mRNA につきハネモへの導入を試みた。ハネモ藻体内での効率的な翻訳を意図し、hRluc 翻訳領域の 5'および 3'末端にそれぞれハネモ内在性遺伝子 *B. plumosa* 11 kDa lectin c (BPL11c) 由来 5'および 3'非翻訳領域 (UTR) を付加した DNA 断片を作製し、*in vitro* 転写用ベクター (pGEM-T Easy, Promega) に挿入した。mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Ambion) により polyA 付加 hRluc mRNA を調製後 (図参照)、ハネモ藻体細断時に添加、または藻体細断後に生じた自然プロトプラストに PEG またはカチオン性脂質を用いるトランスフェクションに供し、生細胞でのみ hRluc 活性がみられる基質 ViviRen Live Cell Substrate (Promega) を用いて経時的に観察することで外来遺伝子導入の有無を調べた。その結果、いずれの手法においてもハネモ藻体内での hRluc 活性を認められ、細胞再構築現象を利用した上記手法による外来遺伝子導入を確認した。また、細胞再構築後 16 時間経過した自然プロトプラストにつき同様の手法を試みたところ、遺伝子導入が確認されなかったことから、初期自然プロトプラストでのみ上記手法が適用可能であると考えられた。さらに、mRNA をトランスフェクション後、5 時間ではルシフェラーゼのシグナルが得られず、20 時間でシグナルがみられたことから、細胞再構築初期においては藻体内での翻訳は行われていない可能性が考えられた。

次に、ハネモ藻体内において転写活性を有するプロモーターの獲得を目指し、ハネモ内在性転写調節領域の探索を試みた。構成的に発現する翻訳伸長因子 elongation factor 1 alpha (EF1a) を対象に、同遺伝子の配列情報

を得るため、まず、ハネモ藻体より全 RNA を抽出後、mRNA を精製し、完全長 cDNA を調製した。同 cDNA を鋳型に、ハネモ属他種由来 EF1a の既知部分塩基配列から設計したプライマーを用いて Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法に供し、ハネモ EF1a cDNA 全長塩基配列 1,764 bp を決定した。得られた塩基配列から新たにプライマーを設計し、別途ハネモ藻体から抽出したゲノム DNA を鋳型に inverse PCR 法を行うことでハネモ EF1a のプロモーターを含む領域の獲得を試み、約 3 kbp の増幅産物が得られた。今後、同領域により制御される発現ベクターを構築し、遺伝子改変ハネモの作出を目指す。



図. *In vitro* 転写により調製した mRNA の模式図

4. 研究成果

本研究により、多核単細胞性緑藻において初めて一過的な外来遺伝子の発現が示され、同藻類における遺伝子改変の可能性が示された。また、ハネモが示す細胞再構築現象を利用し、藻体の細断時に外来遺伝子を添加しておくことで、特別な試薬を用いることなく簡便に同遺伝子の導入が可能であることが見出された。このような手法をもとに、遺伝子改変技術が確立されれば、機能未知タンパク質遺伝子の解析に適用できることから、例えば炭化水素合成関連遺伝子の機能解析による海藻を資源としたバイオ燃料研究への応用など、他分野への貢献度も高い。加えて、

本課題で利用する緑藻の細胞再構築現象は、それ自体、“細胞の再生”という非常に興味深い生命維持機構であり、その分子レベルでの解明研究がさらに進むと見込まれる。少なくとも、本研究により得られた成果は、その他藻類における高効率な遺伝子改変技術の確立に基礎的知見を与えるものである。ハネモは、細胞再構築現象を示すとおり非常に生命力が強く、藻体が小型(藻長 10 cm、直径 1 mm ほど)のため実験室で容易に維持できる海藻であり、今後、遺伝子改変技術の確立に加え、ハネモゲノムが明らかとなれば、有用なモデル生物になると強く期待される。このように、本成果から波及する発展性・応用性は水産学をはじめ多分野に渡る。

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 真 (HIRAYAMA MAKOTO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教

研究者番号：40535465

(2) 研究分担者

()