

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580268

研究課題名(和文) 有害・有毒プランクトンへの高効率な新奇遺伝子導入系の開発

研究課題名(英文) Development of effective transformation methods for harmful algae

研究代表者

足立 真佐雄 (Adachi, Masao)

高知大学・自然科学系・教授

研究者番号：70274363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ノリの色落ちの原因藻として知られる珪藻Rhizosolenia属に感染するウイルスおよび魚類の斃死を引き起こすラフィド藻Heterosigma akashiwoに感染するウイルスのゲノムDNAの配列を解析し、それらに含まれる遺伝子領域を推定し、その上流に位置するプロモーター領域を分離した。さらに、上記2種の有害藻の固相培養系について検討した結果、混釈固相培養によりこれらの培養が可能であった。前述したウイルス由来プロモーターを用い、これらの有害藻の形質転換を試みた結果、Rhizosolenia属の形質転換に成功した。本結果は、海産有害・有毒藻の形質転換系の確立事例として、世界初の成果である。

研究成果の概要(英文)：The objective for this study is to develop a transformation system of marine harmful microalgae using new promoters from microalgae-infecting viruses. We have determined the genome sequences of viruses which infect the diatom Rhizosolenia, the causative organism for bleaching of aquacultured 'nori' (Porphyra yezoensis) and the fish-killing raphidophyte Heterosigma akashiwo. We have succeeded in cultivation of the two harmful algae on semi-solid media containing low concentration of agarose. We have established a transformation method of Rhizosolenia using a vector which contained a new viral promoter isolated from a virus infecting the diatom. This is the first study describing the transformation system of harmful microalgae.

研究分野：水産学・水産学一般

キーワード：有害・有毒プランクトン 形質転換

様式 F-19

1. 研究開始当初の背景

これまで、高等動植物については、外来遺伝子を導入する手法が確立され、本法は特定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。一方、海産プランクトンに目を向けると、珪藻 *Phaeodactylum tricornutum*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros* sp. および渦鞭毛藻 *Symbiodinium* など、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。しかし、赤潮や魚介類の毒化の原因となる有害・有毒プランクトンへの遺伝子導入法に関する報告は、これまで全く報告が無い。

その報告が無い原因として、有害・有毒プランクトンに関するプロモーター(遺伝子の‘スイッチ’の役割を果たす)の情報が皆無であることを挙げることができる。一般に、遺伝子導入の成否の鍵を握るポイントとして、このプロモーターの‘善し悪し’が極めて重要となる。上述した無害プランクトンへの遺伝子導入の成功例では、それぞれ自身の持つ内在性プロモーターが使用されてきた。しかし、これら内在性プロモーターは自身の遺伝子発現調節を受けるために、導入遺伝子を強力に発現させることが難しく、また他の無害種に対し応用できないことも報告されており(Poulsen & Kröger 2005)、これを有害・有毒種に対し応用することは困難と考えられる。その一方で、高等動植物では、このような内在性プロモーターに起因する問題点を解決するために、これに感染するウイルス由来の外来性プロモーターが使用されており、大きな成果が得られている。

ところで、有害・有毒プランクトンに特異的に感染するウイルスの分離が近年相次いでいる。とりわけ、連携研究者の長崎慶三ら(瀬戸内海区水産研究所)は、赤潮原因ラフィド藻、渦鞭毛藻および珪藻類など多様なプランクトンから、様々なウイルスの分離に成功している(Nagasaki 2008)。さらに、彼らは分離したウイルスのゲノム配列について検討を進めている。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では有害・有毒プランクトンに感染するウイルス由来の外来性プロモーターに注目し、これを用いて遺伝子導入を行うことにより、様々な有害・有毒プランクトンに適用可能な汎用性を有し、さらに高効率かつ高発現型の新奇遺伝子導入法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) プランクトン感染性ウイルス由来のプロモーターの分離
ノリの色落ちの原因藻の1種として知られる

珪藻 *Rhizosolenia* 属に感染するウイルス、さらには魚類の斃死を引き起こすラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* に感染するウイルス等に注目し、連携研究者から分譲を受けたこれらのウイルス粒子より、ゲノム DNA をそれぞれ抽出する。同時に、提供を受けたウイルスのゲノム DNA の部分配列を解析し、これらに含まれる遺伝子領域を特定する。これを踏まえて、プロモーターを含むその上流領域を、PCR 法により増幅する。

(2) 各種ウイルスプロモーターを組み込んだ遺伝子導入用プラスミドの構築
遺伝子導入用プラスミドの構築のために、抗生物質耐性遺伝子や緑色蛍光蛋白遺伝子(*egfp*)等のレポーター遺伝子と、ウイルス由来のプロモーターを、プラスミドに組み込む。そのため、MultiSite Gateway Pro システムに注目する。本システムは、制限酵素による切断ならびに DNA リガーゼによる連結を行うことなく、部位特異的組み換え酵素を用いて、極めて簡便かつ確実に、組み換えプラスミドの構築を可能とする(<http://www.invitrogen.com>)。これにより、様々なウイルスプロモーターを組み込んだ、遺伝子導入用プラスミドを構築する(Fig. 1)。



Fig. 1 ウイルスプロモーターのプラスミドへの組み込みと、その選抜
egfp: 改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子

(3) 有害・有毒プランクトンの抗生物質感受性試験

上述したプランクトンについて感受性試験を行う。抗生物質として G418、ゼオシン、ハイグロマイシンとノールセオスリシンを用いる。

(4) 有害・有毒プランクトンの固相培養系の確立

Rhizosolenia 属藻および *Heterosigma* 属藻をはじめとする有害・有毒プランクトンの固相培養法を検討する。その際、寒天培地を用いた一般的な塗抹培養法に加えて、近年報告された超低濃度のアガロースを用いた混釈固相培養法(Lakeman & Cattolico 2007)についても検討し、これらの培養系の確立を図

様式 F-19

る。

(5) パーティクルガンを用いた有害・有毒プランクトンへの遺伝子導入法の検討
藻類ウイルスのプロモーターを含む遺伝子導入用プラスミドを用いて、パーティクルガン法(Miyagawa et al. 2009)により、遺伝子導入を試みる。その際、打ち込み時の諸条件について検討することにより、最も高い形質転換効率を得られる条件を解明する。

(6) 導入遺伝子の発現量解析ならびにプロモーターの適用範囲の検討

遺伝子導入した緑色蛍光タンパク質の発現量を、蛍光プレートリーダー等を用いて客観的に評価する。さらに、それぞれのウイルスプロモーターが、どの範囲の生物種に対し適用可能か、特に珪藻綱やラフィド藻綱といった、'綱'の壁を越えて適用可能かについて検討する。

(7) 有害・有毒プランクトンに適用可能な優良プロモーターの選抜

引き続き、上記(6)の検討を行うことにより、各プロモーターの特性を検討する。具体的には、導入遺伝子をより強く発現させるものや、より広範囲の生物種に適用可能な(すなわち'汎用性'を有する)ものを選抜する。

(8) 人工的プロモーター創生可能性の検討
得られた藻類ウイルスプロモーターに関する塩基配列情報、ならび上記の検討により得られたそれぞれのプロモーターの特性について総合的に解析する。その結果を踏まえ、優良プロモーターの配列情報を抽出し、これを組み合わせるなどして、元のウイルスプロモーターと比較して、さらに強く導入遺伝子を発現させるものや、生物の綱を越えるなどしてより広範囲の生物種に適用可能な、人工的'スーパープロモーター'の創生の可能性について検討する。

4. 研究成果

(1) プランクトン感染性ウイルス由来のプロモーターの分離

ノリの色落ちの原因藻の1種として知られる珪藻 *Rhizosolenia* 属に感染するウイルスさらには魚類の斃死を引き起こすラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* に感染するウイルスのゲノム DNA の配列を解析し、これらに含まれる遺伝子領域を特定することに成功した。これを踏まえて、プロモーター(遺伝子のスイッチの役割を果たす)を含むその上流領域を、PCR法により増幅することに成功した。

(2) 各種ウイルスプロモーターを組み込んだ遺伝子導入用プラスミドの構築

遺伝子導入用プラスミドの構築のために、MultiSite Gateway Pro システム(invitrogen社製)を用いることにより、抗生物質耐性遺伝子と、上記のウイルス由来のプロモーターと

ターミネーターをそれぞれプラスミドに組み込むことに成功した(Fig. 2)。

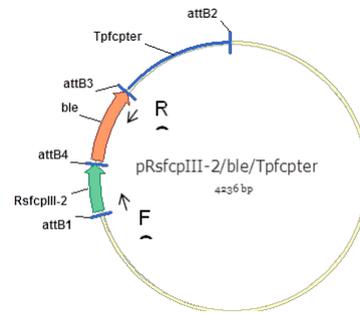


Fig. 2 *Rhizosolenia* に感染するウイルス由来プロモーターを抗生物質耐性遺伝子(ble)に連結し、これを組み込んだ形質転換ベクターのマップ

(3) 有害・有毒プランクトンの抗生物質感受性試験

上述したプランクトンについて感受性試験を行った結果、いずれの藻も抗生物質ノールセオスリシンに対して感受性を示すことが明らかとなった。

(4) 有害・有毒プランクトンの固相培養系の確立

Rhizosolenia 属藻および *Heterosigma* 属藻の固相培養法を検討した。その結果、いずれのプランクトンも、超低濃度(0.15~0.20%)のアガロースを用いた混釈固相培養を行うことにより、コロニーが得られた。後者の種については、再現実験によりコロニー形成が認められたが、前者の種については、その後行った再現実験により追試が出来なかった。

(5) パーティクルガンを用いた有害・有毒プランクトンへの遺伝子導入法の検討
作製した藻類ウイルスのプロモーターを含

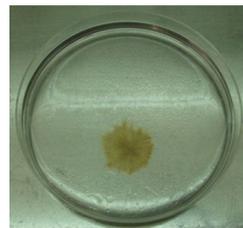


Fig. 3 0.15%アガロース混釈固相培地において *Rhizosolenia* 属藻が形成したコロニーの様子

む遺伝子導入用プラスミドを用いて、パーティクルガン法(Miyagawa et al. 2009)により、*Rhizosolenia* 属藻および *Heterosigma* 属藻に対して遺伝子導入を試みた。その結果、前者の種について形質転換体と思われる、抗生物質ゼオシンに耐性を示す株を取得することが出来た。一方、後者の種についてはパーティクルガン法による撃ち込み後の細胞回収の際に、細胞が凝集することから、その後の塗抹の操作が困難であり、形質転換体の取得が出来なかった。

(6) 導入遺伝子の発現量解析ならびにプロ

様式 F-19

モーターの適用範囲の検討

導入を図った抗生物質耐性遺伝子が細胞に導入されたか推定するために、ゲノミックPCRを実施した結果、*Rhizosolenia* 属藻については、野生株には見られない増幅産物認められたため、遺伝子は導入されたと考えられた。そこで、これが発現しているか確認するために、RT-PCRを実施した。その結果、野生株には見られない抗生物質耐性遺伝子に由来すると考えられる増幅産物を確認出来たことから、導入遺伝子は発現していると考えられた。

(7) 有害・有毒プランクトンに適用可能な優良プロモーターの選抜

ノリの色落ち原因藻の1種である中心目珪藻 *Rhizosolenia* 属に対し、有効に働くウイルスプロモーターを検討した結果、本属藻に感染するウイルスである RsRNAV に由来するプロモーターが、本藻の形質転換に有効であることが明らかとなった。また、記憶喪失性貝毒 (ASP) の原因藻として知られ、羽状目珪藻の1種である *Pseudo-nitzschia* 属藻の形質転換を視野に入れて、同じく羽状目珪藻のモデル種と知られる *Phaeodactylum tricornutum* を用いて、本種にも適用可能なウイルスプロモーターについて検索した結果、中心目珪藻 *Chaetoceros* 属藻に感染するウイルス由来プロモーターが羽状目の *P. tricornutum* にも適用可能であることが判明した。

(8) 人工的プロモーター創生の可能性の検討

上記の解析により得られた各種の珪藻感染ウイルス由来プロモーターに関して、Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements (PLACE)を用いて、それらの塩基中に存在するモチーフ配列を検索した結果、導入遺伝子を強く発現するプロモーターには Myb motif と思われる配列等が見られた。

以上の結果より、ノリの色落ちの原因藻の1種として知られる珪藻 *Rhizosolenia* 属に感染するウイルス由来プロモーターを用い、パーティクルガン法により形質転換を試みた結果、有害珪藻 *Rhizosolenia* 属の形質転換に成功した。本結果は、海産有害・有毒藻の形質転換系の確立事例として、世界初の成果である。また、本ウイルスプロモーターのモチーフ配列を検討した結果、Myb motif 等が見られたことから、今後他のモチーフの配列情報も抽出し、これらを組み合わせるなどして、さらに強く導入遺伝子を発現させるものや、生物の網を越えるなどしてより広範囲の生物種に適用可能な、人工的‘スーパープロモーター’の創生の実現が期待される。

(参考文献)

Lakeman, M. B. & Cattolico, R. A. (2007): J. Phycol., 43, 662-674.
Miyagawa-Yamaguchi, A., Okami, T., K. Ohnishi, Yamaguchi, H. and Adachi, M. (2009): Phycol. Res.,

57 (2), 147-149

Nagasaki, K. (2008): J. Microbiol., 46, 235-243.
Poulsen, N. & Kröger, N. (2005): FEBS Journal, 272, 3413-3423.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Victor Marco Emmanuel N. Ferriols, Ryoko Yaginuma, Masao Adachi, Kentaro Takada, Shigeki Matsunaga, Shigeru Okada, Cloning and characterization of farnesyl pyrophosphate synthase from the highly branched isoprenoid producing diatom *Rhizosolenia setigera*, Scientific Reports, in press, 2015, 査読有り

Tomohiro Nishimura, Shinya Sato, Wittaya Tawong, Hiroshi Sakanari, Haruo Yamaguchi, Masao Adachi, Morphology of *Gambierdiscus scabrosus* sp. Nov. (Gonyaulacales): A new epiphytic toxic dinoflagellate from coastal areas of Japan. Journal of Phycology, 50, 506-514, 2014, 査読有り

Takamichi Yoshimatsu, Haruo Yamaguchi, Haruka Iwamoto, Tomohiro Nishimura, Masao Adachi, Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae), Harmful Algae 36, 29-37, 2014, 査読有り
Toshiyuki Suzuki, Ryuichi Watanabe, Ryoji Matsushima, Kenji Ishihara, Hajime Uchida, Saori Kikutsugi, Tomoko Harada, Hiroshi Nagai, Masao Adachi, Takeshi Yasumoto, Masakazu Murata, LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 30 (8), 1358-1364, 2013, 査読有り

Tomohiro Nishimura, Shinya Sato, Wittaya Tawong, Hiroshi Sakanari, Keita Uehara, Md Mahfuzur Rahman Shah, Shoichiro Suda, Takeshi Yasumoto, Yohsuke Taira, Haruo Yamaguchi, Masao Adachi, Genetic diversity and distribution of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) in coastal areas of Japan. PLoS ONE, 8 (4), e60882, 2013, 査読有り

Naohito Hariganeya, Yuko Tanimoto, Haruo Yamaguchi, Tomohiro Nishimura, Wittaya Tawong, Hiroshi Sakanari, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Christina M. Preston, Masao Adachi, Quantitative PCR method for enumeration of cells of cryptic species of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis* spp. in coastal waters of Japan. PLoS ONE, 8 (3), e57627, 2013, 査読有り

Yuko Tanimoto, Haruo Yamaguchi, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Masao Adachi, Effects of temperature,

salinity and their interaction on growth of toxic *Ostreopsis* sp. 1 and *Ostreopsis* sp. 6 (Dinophyceae) isolated from Japanese coastal waters. Fisheries Sci., 79 (2), 285-291, 2013, 査読有り

Toshiyuki Suzuki, Ryuichi Watanabe, Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Nagai, Takeshi Yasumoto, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Masao Adachi, LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan. Harmful Algae, 20, 81-91, 2012, 査読有り

Haruo Yamaguchi, Takamichi Yoshimatsu, Yuko Tanimoto, Shinya Sato, Tomohiro Nishimura, Keita Uehara, Masao Adachi, Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) from Japanese coastal waters. Phycol. Res., 60 (4), 297-304, 2012, 査読有り

Haruo Yamaguchi, Yuko Tanimoto, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Tomohiro Nishimura, Keita Uehara, Masao Adachi, Culture method and growth characteristics of the marine benthic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. isolated from Japanese coastal waters. Fisheries Sci., 78(5), 993-1000, 2012, 査読有り

[学会発表](計 17 件)

Victor Marco Emmanuel N. Ferriols・Kentaro Takada・Masao Adachi・Shigeki Matsunaga・Shigeru Okada. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 北海道大学 (3 月 27 日~31 日, 2014)

角野貴志・山口亜利沙・外丸裕司・長崎慶三・岡見卓馬・吉良望・福永一成・山口晴生・大西浩平・足立真佐雄. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 北海道大学 (3 月 27 日~31 日, 2014)

西村朋宏・坂成浩嗣・Wittaya Tawong・上原啓太・井口大輝・池上拓志・中村正利・吉岡拓也・阿部翔太・山口晴生・足立真佐雄. 2013 年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会, 東北大学 (9 月 27 日~30 日, 2013)

吉松孝倫・田中愛依・谷知宏・山口晴生・岡内正典・足立真佐雄. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 三重大学 (9 月 19 日~22 日, 2013)

吉松孝倫・田中愛依・谷知宏・山口晴生・足立真佐雄. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 三重大学 (9 月 19 日~22 日, 2013)

石井健一郎・大西晃・足立真佐雄・澤山茂樹. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 三重大学 (9 月 19 日~22 日, 2013)

Masao Adachi, Takashi Kadono, Arisa Miyagawa-Yamaguchi, Yuji Tomaru, Keizo Nagasaki, Takuma Okami, Nozomu Kira, Kazunari Fukunaga, Haruo Yamaguchi and Kohei Ohnishi. EMBO Workshop, The Molecular Life of Diatoms, Paris, France (June 25-28, 2013)

角野貴志・山口亜利沙・外丸裕司・長崎慶三・岡見卓馬・吉良望・福永一成・山口晴生・

大西浩平・足立真佐雄. 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 沖縄県市長村自治会館 (6 月 1 日~2 日, 2013)

福永一成・吉松孝倫・大西裕美・角野貴志・山口晴生・足立真佐雄. 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 沖縄県市長村自治会館 (6 月 1 日~2 日, 2013)

Tomohiro Nishimura, Naohito Hariganeya, Tawong Wittaya, Hiroshi Sakanari, Yuko Tanimoto, Haruo Yamaguchi and Masao Adachi, 15th ICHA 2012 KOREA, Changwon Gyeongnam, Korea (Oct. 29-Nov. 2, 2012)

Yuko Tanimoto, Haruo Yamaguchi, Takamichi Yoshimatsu and Masao Adachi, 15th ICHA 2012 KOREA, Changwon Gyeongnam, Korea (Oct. 29-Nov. 2, 2012)

Wittaya Tawong, Tomohiro Nishimura, Hiroshi Sakanari, Haruo Yamaguchi and Masao Adachi, 15th ICHA 2012 KOREA, Changwon Gyeongnam, Korea (Oct. 29-Nov. 2, 2012)

Haruo Yamaguchi, Yuya Tomoria, Yuko Tanimoto, Masao Adachi, 15th ICHA 2012 KOREA, Changwon Gyeongnam, Korea (Oct. 29-Nov. 2, 2012)

Masao Adachi, Takamichi Yoshimatsu, Haruka Iwamoto, Tomohiro Nishimura and Haruo Yamaguchi, PICES 2012 Annual Meeting, Hiroshima, Japan (October 12-21, 2012)

Kazunari Fukunaga, Naoto Hariganeya, Haruo Yamaguchi, Yuji Tomaru, Keizo Nagasaki, Masao Adachi, The 9th APMB2012, Kochi, Japan (July 13-16, 2012)

Tomohiro Nishimura, Shinya Sato, Wittaya Tawong, Hiroshi Sakanari, Keita Uehara, Shah, Md Mahfuzur Rhaman, Shoichiro Suda, Takeshi Yasumoto, Yosuke Taira, Haruo Yamaguchi and Masao Adachi, The 9th APMB2012, Kochi, Japan (July 13-16, 2012)

Masao Adachi, Arisa Miyagawa-Yamaguchi, Yuji Tomaru, Keizo Nagasaki, Kazunari Fukunaga, Kohei Ohno, Takuma Okami, Nozomu Kira, Kohei Ohnishi and Haruo Yamaguchi, 2nd International conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, Poster Presentation, Westin San Diego, USA (June 10-13, 2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名: 足立 真佐雄 (ADACHI Masao)
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 (OHNISHI Kohei)
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