

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780186

研究課題名(和文)多核単細胞性緑藻を用いた有用物質生産のための遺伝子組換え技術の開発

研究課題名(英文) Study of a transgenic technique in coenocytic green algae for the production of useful proteins

研究代表者

平山 真(HIRAYAMA, MAKOTO)

広島大学・生物圏科学研究科・助教

研究者番号：40535465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多核単細胞性緑藻ハネモの細胞再構築現象を利用した外来遺伝子導入法について検討した。ハネモ内在性遺伝子のプロモーター制御下でレポーターを発現するベクターを構築し、ベクターを添加した溶液中で藻体を細断しプロトプラストを形成させる手法を含む、種々の導入法により藻体内への外来遺伝子導入を試みたが、いずれの手法においてもレポーターの発現は認められなかった。また、養殖種クビレズタを対象に、先行研究によりハネモで外来遺伝子の発現がみられたレポーターmRNAを導入する手法を適用したが、ハネモの場合とは異なり、同藻でのレポーターの発現は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, transgenic method utilizing cell regeneration of coenocytic green alga *Bryopsis plumosa* was investigated. The expression vectors where the expression of the reporter genes were controlled by the house keeping gene promoter of *B. plumosa* were constructed. Although the foreign gene introduction to the algal bodies was attempted by several methods including conventional ones and a new one of which the reporter gene was added into the squeezing medium, the reporter expression was not detected in any of the methods. In addition, the reporter mRNA encoding *Renilla luciferase* was introduced into the cultivated coenocytic green alga *Caulerpa lentillifera* by the method where *B. plumosa* showed the reporter expression in the previous study, however, the luciferase activity was not detected in the cultivated species.

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：遺伝子組換え 海藻 細胞再構築現象 ハネモ クビレズタ ウミブドウ

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術は、外来遺伝子を導入、または内在性遺伝子の機能を欠失・抑制することで遺伝子組換え生物を作出する技術であり、高機能生物の作出や、機能未知遺伝子およびタンパク質の機能解析に有用な手法として用いられる。ここで外来遺伝子導入法を例にとると、効率的な遺伝子組換えのためには、外来遺伝子を細胞内に輸送し、ゲノム中に取り込まれる頻度を高くする必要がある。一般的に用いられる遺伝子導入法としては、パーティクルガン法、顕微注入法、トランスフェクション法などがある。遺伝子組換え技術は脊椎動物や高等植物をはじめ、幅広い生物種で確立されており、藻類においても、クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* などの微細藻類でこのような手法が適用されて確立されている。一方、紅藻スサビノリ *Porphyra yezoensis* や褐藻マコンブ *Laminaria japonica* などの大型藻類でも同様の手法による開発研究がなされており、一過的発現は観察されているものの、未だ形質転換に至っていないか、もしくは極めて低効率である。その要因として、多様な成分からなる海藻の細胞外被が外来遺伝子の取り込みを阻害すること、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）が海藻において不明である点などが挙げられ、これらによる遺伝子導入効率の低さをいかに克服するかが本技術確立の鍵となる。

ハネモ *Bryopsis plumosa* をはじ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、環境水中に流れ出し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・細胞壁を再生して元の植物体に成長する。ここで外来遺伝子導入と合わせて考えてみると、外来遺伝子を添加した培養液中で細胞再構築現象を発生させることで、細胞外皮の影響を受け

ずに、再生過程で細胞内に外来遺伝子が受動的に取り込まれると期待される。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世代交代処理を行うことで、一様に外来遺伝子を発現する遺伝子組換え個体を作成可能であると考えられる。また、ハネモの配偶子は藻体（配偶体）の広範囲で形成されることから、遺伝子組換えされた核が次世代へ受け継がれる確率も高いものと期待される。

申請者は、先行研究において、*in vitro* 転写により調製したルシフェラーゼ（hRluc）mRNA につきハネモへの導入を試みた。すなわち、同 mRNA を添加した滅菌人工海水中で無菌培養したハネモ藻体を細断し、一晚静置することで細胞を再構築させ、その後ルシフェラーゼ活性の有無を観察した。その結果、活性が認められ、細胞再構築現象を利用した外来遺伝子導入が確認された。さらに、高等植物用プロモーター（CaMV35S）を用いてレポーター遺伝子（蛍光タンパク質-ルシフェラーゼ融合タンパク質）を発現するベクターを作製し（高等植物内で発現・機能確認済み）、上記と同様の手法によりハネモ藻体への遺伝子導入を試みたところ、レポーターの発現は検出されなかった。そのため、用いた高等植物用プロモーターは同緑藻では機能しないものと考えられ、ハネモ内在性のプロモーターを用いた発現ベクターの構築が望まれる。

2. 研究の目的

海面で養殖可能である点から海藻を用いた有用物質生産が囑望されているが、その前提となる遺伝子組換え技術は確立されておらず、実用化に至っていない。本研究では、細胞損傷により流出したオルガネラから細胞が再生するという驚異の機構をもつ多核

単細胞性緑藻を対象に、遺伝子組換え技術の確立を図ると共に、導入遺伝子の高発現に有効な転写調節領域の探索を行い、海藻を用いた有用物質生産の実用化を目指した。

3. 研究の方法

まず、データベース上および先行研究で明らかとなったハネモ属遺伝子配列を網羅的に解析することで、使用頻度の高いコドン を推定し、レポーターとして用いる緑色蛍光タンパク質 AcGFP 遺伝子配列につきコドン を最適化した合成 DNA を調製した。次に、ハネモ藻体内で効率的な外来遺伝子発現に寄与すると期待されるハネモ内在性遺伝子 elongation factor-1 α (EF-1 α) の転写調節領域を対象に、先行研究により決定されたハネモ EF-1 α cDNA および同ゲノム部分配列を参考に inverse PCR 法に供した。獲得したハネモ EF-1 α プロモーターおよびコドン最適化 AcGFP 遺伝子配列を用いてハネモ用発現ベクターを構築し、合わせて、高感度かつ定量性に優れるルシフェラーゼ (hRluc) 遺伝子をレポーターに用いたベクターの調製を行った。プロモーターについては、転写開始点または翻訳開始点の各上流域を検討した。ハネモ雄株を対象に、これら発現ベクターにつき、1) 藻体を対象としたパーティクルガン法、2) 藻体を細断後、形成されたプロトプラストを対象としたトランスフェクション法 (MultiFectam (Promega) Lipofectamin 2000 (Life Technologies) 使用) または 3) ベクターを添加した人工海水中で藻体を細断しプロトプラストを形成させる手法、によりハネモへの導入を試み、経時的にレポーターの発現の有無を調べた

次に、上述の推定 EF-1 α プロモーター領域に加えて、inverse PCR 法によりさらに上流域の獲得を目指した。獲得した配列を用いて、コドン最適化 AcGFP または hRluc 遺伝子をレ

ポーターに用いたハネモ用発現ベクターを構築し、上記の 3 手法によりハネモ雄株への導入を試みた。上記と同様、プロモーターは転写開始点および翻訳開始点の各上流域を検討した。

また、先行研究でハネモにおいて外来遺伝子発現が認められた手法が他種海藻へ適用可能か検討するため、ハネモと同様、多核単細胞性で損傷治癒能を有し、養殖種であるクビレズタ *Caulerpa lentillifera* (ウミブドウ) への導入を試みた。すなわち、ハネモで行った手法を参考に、外来遺伝子として、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Ambion) により調製した polyA 付加 hRluc mRNA を用い、1) クビレズタ藻体を細断し、損傷治癒後にトランスフェクションする手法 (MultiFectam、Lipofectamin 3000 (Life Technologies) 使用) または 2) 外来遺伝子を添加した人工海水中で藻体を細断し、損傷治癒させる手法、により同藻への導入を試みた。

4. 研究成果

ハネモ EF-1 α 転写調節領域のクローニングの結果、1,046 bp の推定 EF-1 α プロモーター領域のクローニングに成功した。同プロモーター領域につき、比較的ハネモと系統進化的に近いと考えられる微細藻クロミドモナスのものと配列比較することで機能部位の推定を試みたが、顕著な類似性は認められなかった。同プロモーターの制御下でコドン最適化 AcGFP 遺伝子または hRluc 遺伝子を発現するよう調製したハネモ用発現ベクターにつき、ハネモ雄株を対象に、上述の種々導入法を検討したが、いずれの手法・ベクターにおいても外来遺伝子の発現は認められなかった。同推定 EF-1 α プロモーター領域 1,046 bp では外来遺伝子の発現みられなかったため、さらに上流域の獲得を目指し、同様に inverse

PCR 法に供することで、1,572 bp の同推定プロモーター領域のクローニングに成功した。上述と同様にコドン最適化 AcGFP 遺伝子または hRluc 遺伝子をレポーターに用いたハネモ用発現ベクターにつきハネモへの導入を試みた結果、いずれの手法・ベクターにおいても外来遺伝子発現はみられなかった。

次に、養殖種であるクビレズタ（ウミブドウ）を対象に、先行研究によりハネモで外来遺伝子の発現が認められた手法を参考に、hRluc mRNA を用いて同藻への導入を試みた。その結果、ハネモの場合とは異なり、同藻ではレポーターの発現が確認されなかった。

以上の結果から、ハネモにおいて、導入した外来遺伝子は細胞内に取り込まれるものの、核での効率的な発現のためには、藻体の処理方法ならびに使用する DNA 量など、より詳細な条件検討が求められる。また、藻体細断時の溶液中に外来遺伝子を添加するのみで細胞内へ導入される現象は、現時点ではハネモに特異的であることから、他種海藻への適用の有無についてさらに検討する必要がある。

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 1 件)

1. 平山 真, 榎谷 みなみ, 賀谷 悠平, 堀 貫治. 多核単細胞性緑藻ハネモ *Bryopsis plumosa* への外来遺伝子導入法の検討, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 26-30 日, 東京.

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