

スサビノリ *Porphyra yezoensis* における
形質転換技術の開発に向けた無性胞子の生理学的研究

学位論文内容の要旨

海産紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は、我が国の水産業における代表的栽培種であるとともに、海洋植物のモデルの候補と考えられており、研究基盤技術の整備が進められている。しかしながら、スサビノリをはじめとした海産大型藻類においては、生活環、形態形成および環境応答の分子機構の解析に必須な形質転換技術は未だ確立されておらず、海藻類における分子生物学的研究が進まない大きな原因となっている。その打開に向けて、筆者の所属研究室では形質転換技術の基盤となる遺伝子導入法の開発を進めており、最近、コドン頻度をスサビノリのそれを適合させた改変 GUS 遺伝子や改変蛍光タンパク質遺伝子をレポーターとしたパーティクルガン法による一過的遺伝子発現系を確立した。しかし、この方法は藻体片を使用しているため、ゲノムへの遺伝子導入を考えた場合、藻体片からの遺伝子導入細胞の単離や選抜が大きな問題となる。筆者は、この問題がプロトプラストまたは単胞子を利用することで解決できると考え、本研究において3つのアプローチでその検証を行なった。具体的には藻体片から遺伝子導入細胞を単離するために、1) プロトプラスト調整法の利用の検討、2) 単胞子大量放出を可能とする新規人工合成培地の作製、そして3) 単胞子放出機構の生理学的研究である。

まず、プロトプラスト調整法を用いることによって藻体片から遺伝子導入細胞を単離できるかを検討した。海洋バクテリア由来の細胞壁分解酵素 (AMX) 溶液処理とアラントイン処理の2つの方法を試したところ、5.0 mg のスサビノリ葉状体から AMX 溶液を用いて得られたプロトプラストは平均 0.7×10^6 個であった。しかしながら、得られたプロトプラスト

の再生は確認できなかった。一方、アラントイン添加培地にて培養した藻体をホモジナイズすることにより得られたプロトプラストは、藻体 0.1g 当たり平均 1×10^6 個であり、その中の約 70% の個体が葉状体へと再生した。このことから、アラントイン処理により調整可能なプロトプラスト数は AMX 溶液の場合に比べて、藻体湿重量当たりで換算すると 1/14 であったが、遺伝子導入したスサビノリ藻体から再生可能なプロトプラストを得る方法としては大変有効であると考えられた。次に、実際にアラントイン処理した藻体にパーティクルガン法にて遺伝子導入を行ない、藻体から一過的遺伝子導入された細胞を単離することを試みた。遺伝子導入後、アラントイン処理した藻体においては遺伝子導入された細胞が藻体片 1 枚あたり (3.0×10^5 細胞) 約 700 個の細胞が確認された。また、遺伝子導入後に得られたプロトプラストは藻体 1 枚当たり約 40 細胞であり、これは藻体 1 枚当たり確認できる遺伝子発現細胞数 (700 細胞) の約 6% に相当するに過ぎなかったが、それらは発芽体へと再生することが確認された。

次に、単胞子の放出を遺伝子導入細胞の単離に利用するために単胞子大量放出を可能とする新規人工合成培地の作製を試みた。所属研究室ではスサビノリの培養には通常 ESL 培地を用いているが、ESL の作製に用いる市販の SEALIFE の成分組成は公表されていない。そのため、本研究では以前 Provasoli らにより海藻培養用の人工合成培地として開発された ASP₁₂ の組成を改変した基本培地 ASPMT1 を作製した。これを用いて藻体を培養した結果、ESL 培地で培養した葉状体と比較して生長量の減少が見られたが、単胞子嚢の形成が促進され、単胞子の放出量が約 2 倍増加することを見出した。この結果から、ASPMT1 を用いることで藻体から大量の単胞子を得ることができることが明らかになった。

以上の結果から、スサビノリ藻体片からの遺伝子導入細胞の回収は、アラントイン処理した藻体片を用いることで再生可能なプロトプラストとして可能であること、および人工合成培地を用いることで単胞子としても回収できる可能性があることが示された。

本研究ではさらに、上記の単胞子の回収をより効率的なものに改良するためには単胞子の形成と放出のメカニズムに関する知見が必須であると考え、人工合成培地を用いた単胞

子放出機構の解析を試みた。結果として、ASPMT1 中における単胞子放出の増加は培地中の Ca^{2+} 含有量が要因であることが明らかになった。実際に ASPMT1 の組成を改変したところ、ASPMT1 中の Ca^{2+} 量を増加させることで単胞子の放出量が少なくなり、逆に Ca^{2+} 量を減少させると多くなった。このことから、スサビノリの単胞子の放出には生育環境における細胞外 Ca^{2+} 量の変動が大きく影響を及ぼすと考えられた。また、この単胞子放出が光依存的であること、およびそれが光照射条件下でも光合成阻害剤 (DCMU) を添加することにより抑制されることを見出した。さらに Ca^{2+} を細胞内に流入させるカルシウムイオノフォアを添加することで暗条件下においても単胞子の放出が起こることがわかった。これらのことから、スサビノリ葉状体における単胞子の放出は、培養培地に含まれる Ca^{2+} 量が減少することで光合成依存的な細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入が起こり、それが引き金となって単胞子が大量に放出されると考えられたため、現在培地中の Ca^{2+} 濃度の調節による発生可能な単胞子の大量調整への応用を試みている。

以上のように、スサビノリにおける安定的形質転換技術を確立する上で必須である藻体片からの遺伝子導入細胞の回収は、アラントイン処理を施すことで回収率は低いが可能であること、また新規の人工合成培地を用いることで単胞子としても回収できる可能性があることが示された。従って、これらを利用することで遺伝子導入細胞の効率的な培養と選抜が可能になると考えられる。さらに、人工合成培地を用いた実験により、これまで明らかにされていなかったスサビノリの無性生殖の制御機構に関する生理学的知見を得ることができた。これらの知見は、今後スサビノリ葉状体における単胞子嚢形成および単胞子放出を制御している分子機構の解明や効率的な単胞子の単離およびその回収の技術的な進展に貢献すると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 嵯 峨 直 恆
副 査 教 授 安 井 肇
副 査 准教授 三 上 浩 司
副 査 准教授 水 田 浩 之

学 位 論 文 題 名

スサビノリ *Porphyra yezoensis* における 形質転換技術の開発に向けた無性胞子の生理学的研究

海産紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) は、我が国の水産業における代表的栽培種であるとともに、海洋植物のモデルの候補と考えられており、研究基盤技術の整備が進められている。しかしながら、スサビノリをはじめとした海産大型藻類においては、それらの生命現象の分子機構の解析に必須な形質転換技術は未だ確立されていない。スサビノリにおいては藻体片中の細胞に遺伝子導入することが可能となっているが、遺伝子導入細胞の単離や選抜が大きな問題となっている。本研究は、スサビノリ藻体片からの遺伝子導入細胞の回収を可能とするためにスサビノリの無性胞子の生理学的研究を行うことで、スサビノリにおける安定的形質転換技術の確立に貢献することを目的としている。

まず、プロトプラスト調整法を用いることによって藻体片から遺伝子導入細胞を単離できるかを検討した。海洋バクテリア由来の細胞壁分解酵素溶液処理とアラントイン処理の2つの方法を試したところ、いずれにおいてもプロトプラストを得ることができたが、アラントイン処理した藻体片から得られたプロトプラストのみが再生可能であった。また、実際にアラントイン処理した藻体片にパーティクルガン法で遺伝子導入したところ、藻体片中の遺伝子導入細胞を回収率は低い、再生可能なプロトプラストとして単離することに成功し、その再生体も確認できた。

次に、単胞子の放出を遺伝子導入細胞の単離に利用するために単胞子大量放出を可能とする新規人工合成培地の作製を試み、それを用いて藻体を培養することで単胞子嚢の形成が促進され、単胞

子放出量が増加することを見出した。さらに、上記の単胞子の回収をより効率的なものに改良するためには単胞子の形成と放出のメカニズムに関する知見が必須であると考え、人工合成培地を用いた単胞子放出機構の解析を試みた結果、培養培地に含まれる Ca^{2+} 量が減少することで光合成依存的な細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入が起こり、それが引き金となって単胞子が大量に放出されることを明らかにした。

以上の結果から、スサビノリにおける安定的形質転換技術を確立する上で必須である藻体片からの遺伝子導入細胞の回収は、アラントイン処理を施すことで回収率は低いが可能であること、また新規の人工合成培地を用いることで単胞子としても回収できる可能性があることが示され、これらを利用することで遺伝子導入細胞の効率的な培養と選抜が可能になると考えられた。さらに、人工合成培地を用いた実験により、これまで明らかにされていなかったスサビノリの無性生殖の制御機構に関する生理学的知見を得ることができており、これらの知見は今後スサビノリ葉状体における単胞子嚢形成および単胞子放出を制御している分子機構の解明や効率的な単胞子の単離およびその回収の技術的な進展に貢献すると期待される。

主論文は平成 23 年 1 月 20 日 11 時から 12 時まで第 2 研究棟特別講義室において、審査員および関連教員 14 名および一般聴講 26 名のもと発表された。一般聴講においては、細胞壁分解酵素を用いて調整したプロトプラストが発生しない理由、藻類における形質転換技術の現状、低 Ca^{2+} 下における藻体の成長についての質問がなされた。また、審査員および関連教員においては、単胞子に対してのパーティクルガン法の利用、単胞子放出時における藻体の状態、単胞子のノリ養殖への利用および単胞子放出機構のその他のアマノリ属植物への応用について質問がなされた。また、自然界で生育しているスサビノリの単胞子放出を考えた場合、海水中の Ca^{2+} の低下は河川水の流入や天候による影響を考慮する必要があるなどのコメントがなされた。得られた結果は本種に関わる基礎生物学の充実のみならず、今後の海産藻類の応用研究の発展に大いに寄与するものと評価できる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。