

藻類学最前線



微細藻類への遺伝子組換え最前線

松田向平¹・平川泰久²

はじめに

昨今のシークエンス技術の発展により、ゲノム解読やトランスクリプトーム解析はとて身近なものになった。藻類でも広範な種で配列情報が公開されており、誰でも簡単に手にすることができる。核ゲノムにおいても、ドラフトゲノムを含めれば、全ての主要な藻類群（緑藻、紅藻、灰色藻、渦鞭毛藻、不等毛藻、ハプト藻、クリプト藻、ユーグレナ藻、クロララクニオン藻）で利用可能である。しかし、日々蓄積する遺伝子情報とは裏腹に、遺伝子組換え技術の確立は一部の種に限られてきた。遺伝子組換えは、遺伝子機能解析などの基礎研究から有用物質を細胞内で生産させる応用研究まで幅広く用いることができる。そのため、多様な藻類での遺伝子組換え技術の需要が高まっており、近年その開発が急速に進められている。アメリカの Moore 財団の支援を受けた Experimental Model Systems (EMS) プロジェクトでは、世界中の研究グループにより、微細藻類を含む多様な原生生物への遺伝子導入系の開発が 2015 年から進められてきた。その成果は最近報告され、約 20 種で遺伝子組換えに成功している (Faktorová *et al.* 2020)。

遺伝子組換えとは一般的に「外来遺伝子 (DNA) を細胞内に導入して発現させること」である。そのため、遺伝子ノックダウン技術である RNAi や、近年のゲノム編集技術である TALEN や CRISPR/Cas9 は、遺伝子組換えとは異なる場合がある。例えば RNAi では、二本鎖 RNA を直接細胞へ導入した場合は遺伝子組換えの定義から外れるが、二本鎖 RNA を発現する DNA ベクターを細胞に導入した場合は遺伝子組換えとなる。同様に CRISPR/Cas9 でも、Cas9 タンパク質と単鎖ガイド RNA の複合体を細胞内に導入した場合は遺伝子組換えではないが、それらを発現する DNA ベクターを細胞に導入した場合は遺伝子組換えとなる。本稿では、近年報告されている微細藻類への遺伝子組換え技術を中心に、ゲノム編集技術に関しても一部紹介する。

遺伝子組換えに必要な要素

外来遺伝子を細胞内に導入し、タンパク質として発現させるためには二つの重要な要素がある。一つは核酸導入法で、もう一つは発現プロモーターである。核酸導入法はその名の通り、DNA を細胞膜や細胞壁などの物理的障壁を突破して細胞内へと導入する手法のことである。それには大きく分けて 3 つあり、リポフェクション法やリン酸カルシウム法、ポリエチレングリコール (PEG) 法などの化学的手法、ガラスビーズ法やエレクトロポレーション法、パーティクルガン法

やインジェクション法などの物理的な手法、そしてアグロバクテリウム法などの生物的な手法である。それぞれの手法にメリット・デメリットがあり、オールマイティーなもの存在しない。そのため、それぞれの細胞に合った手法を選ぶ必要がある。化学的手法は壁をもつ細胞には不向きであるが条件が合えば非常に高い導入効率を示し、物理的手法は壁をもつものにも適用できるが細胞へのダメージが大きい。生物学的手法は高等植物で広く使われており、長鎖 DNA を導入するのに適している。もう一つの要素である発現プロモーターには 2 種類あり、内在性プロモーターと外来性プロモーターである。内在性のは遺伝子導入を行う生物から単離したプロモーターで、一般的に発現量の高い遺伝子の上流領域を使用する。藻類の場合は、集光性タンパク質遺伝子やルビスコ遺伝子のプロモーターが使用されることが多い (Doron *et al.* 2016)。一方、外来性プロモーターには、近縁生物に由来するものやウイルス由来のものがある。ウイルス由来のプロモーターには広範な生物に使用できるものもあり、カリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S プロモーターは、陸上植物はもちろん、複数の藻類でも機能することが報告されている (Doron *et al.* 2016)。新たな遺伝子導入系の開発は、核酸導入法と発現プロモーターのどちらか一方に問題があると成功しないし、どちらに問題があるかは成功するまで分からない。まずは、確実に核酸導入できる手法・条件を見つけることが重要である。EMS プロジェクトでは直鎖多糖に蛍光物質を結合した FITC-dextran などを用いて細胞への核酸導入条件を検討しており、著者らもこの方法でクロララクニオン藻への新たな遺伝子導入系の開発に成功している（これに関しては後述する）。

一次共生藻類への遺伝子導入

一次共生藻類はシアノバクテリアを取り込み葉緑体を獲得したグループで、緑藻、紅藻、灰色藻、ポーリネラ (*Paulinella chromatophora*) が含まれる。このうち緑藻と紅藻では、いくつかの種で遺伝子導入系が開発されているが、灰色藻とポーリネラにおいては報告がない。大型藻でも緑藻のアオサ属 (*Ulva*) や紅藻のアマノリ属 (*Pyropia*) などで遺伝子導入系が報告されているが (Mikami 2013)、ここでは微細藻類を中心に見て行こう。

モデル緑藻と言えば *Chlamydomonas reinhardtii* であるが、2007 年に核ゲノムが解読された本種では (Merchant *et al.* 2007)、1990 年代にはパーティクルガン法やガラスビーズ法、エレクトロポレーション法による遺伝子導入系が開発さ

表 1. 主要な高次共生藻類への遺伝子導入系

藻類群・種名	遺伝子導入法	プロモーター	引用文献
ユーグレナ藻 <i>Euglena gracilis</i>	アグロバクテリウム / パーティクルガン / エレクトロポレーション	CaMV35S	Khatiwada <i>et al.</i> (2019)
クロラクニオン藻 <i>Amorphochlora amoebiformis</i>	パーティクルガン / エレクトロポレーション	RbcS	Hirakawa <i>et al.</i> (2008), Fukuda <i>et al.</i> (2020)
不等毛藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	パーティクルガン / エレクトロポレーション	Fcp	Apt <i>et al.</i> (1996), Miyahara <i>et al.</i> (2013)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	エレクトロポレーション	Vcp	Kilian <i>et al.</i> (2011)
渦鞭毛藻 <i>Amphidinium</i> sp.	SiCa+PEG	CaMV35S, nos	ten Lohuis & Miller (1998)
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	SiCa+PEG	CaMV35S, nos	ten Lohuis & Miller (1998)
<i>Symbiodinium</i> spp.	アグロバクテリウム	CaMV35S, nos	Ortiz-Matamoros <i>et al.</i> (2015)
ハプト藻 <i>Pleurochrysis carterae</i>	PEG	Fcp	Endo <i>et al.</i> (2016)
<i>Tisochrysis lutea</i>	PEG	Lhc	Endo <i>et al.</i> (2018)

CaMV35S, cauliflower mosaic virus 35S; Fcp, fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein; Lhc, Light-harvesting complex protein; nos, nopaline synthase; PEG, polyethylene glycol; RbcS, rubisCO small subunit; SiCa, silicon carbide; Vcp, violaxanthin/chlorophyll *a*-binding protein

れている (Jinkerson & Jonikas 2015)。 *C. reinhardtii* への遺伝子導入には細胞壁をもたない変異株や除去した細胞が用いられることが多いが、複数回の矩形波を採用したエレクトロポレーション法が細胞壁をもつ細胞にも有効であることが報告されている (Yamano *et al.* 2013)。さらに、少量の DNA で高い導入効率を示す条件なども報告され (Wang *et al.* 2019)、より簡便で効率の良い遺伝子導入系の開発が行われている。その他の緑藻を見てみると、緑藻綱の *Dunaliella salina* や *Volvox carterii*、マミエラ藻綱の *Ostreococcus lucimarinus* や *Micromonas commoda* など、 *C. reinhardtii* と同様な手法で遺伝子導入に成功している (Doron *et al.* 2016, Faktorová *et al.* 2020)。一方、最近報告された *Acutodesmus obliquus* と *Neochloris oleoabundans* への遺伝子導入系は一風変わっている (Muñoz *et al.* 2019)。これは生物学的手法で、プラスミド DNA をもつ大腸菌と藻類細胞を混合し、2時間程度インキュベートすると、プラスミドが藻類細胞へ取り込まれるというものである。しかし、どのように DNA の移動が起こるのかは明らかにされていない。

紅藻では、2004年に全ゲノム配列が報告された *Cyanidioschyzon merolae* で、DNA と細胞と PEG を混合して数分インキュベートするだけという非常にシンプルな遺伝子導入系が開発されている (Matsuzaki *et al.* 2004, Ohnuma *et al.* 2008)。また、アンチセンス鎖を利用した遺伝子発現抑制 (Ohnuma *et al.* 2009) や相同組換えによる遺伝子ノックダウン (Fujiwara *et al.* 2017) が利用可能であることに加え、同調培養系や葉緑体単離法なども確立しており、モデル紅藻としての地位は揺るぎない。他の紅藻では、キノリモ属の *Porphyridium purpureum* で非常に面白い報告があるので紹介したい。 *P. purpureum* は 2013 年にゲノム配列が報告さ

れ (Bhattacharya *et al.* 2013)、パーティクルガン法による遺伝子導入系は最近になって報告された (Li & Bock 2018)。通常の真核生物の遺伝子組換えでは、導入した外来遺伝子は染色体に組み込まれ、ゲノム複製により娘細胞へと引き継がれる。しかし *P. purpureum* の場合、導入した環状プラスミド DNA は染色体に組み込まれることなく、核の中で自己複製することが報告された。詳しいメカニズムは不明だが、 *P. purpureum* の核にはバクテリア型の DNA 複製機構があることが示唆されている (Li & Bock 2018)。

高次共生藻類への遺伝子導入

真核藻類には緑藻や紅藻に由来する葉緑体をもつ者がいる。緑藻や紅藻を直接取り込むイベントは二次共生だが、紅藻由来の葉緑体をもつ二次共生藻類を他の真核生物が細胞内共生した場合は三次共生となる。これらをまとめて高次共生と呼ぶことにする。高次共生藻類の中で、クリプト藻を除く各藻類群において遺伝子導入系の報告があり (表 1)、それぞれについて見ていこう。

ユーグレナ藻の *Euglena gracilis* は、健康食品への利用などで近年注目を集めており、遺伝子導入系の開発も進められている。ドラフトではあるが、2019年に核ゲノム配列も報告されている (Ebenezer *et al.* 2019)。2001年にパーティクルガン法による *E. gracilis* の葉緑体への遺伝子導入系が報告されているが (Doetsch *et al.* 2001)、核への遺伝子導入は長らく成功していなかった。そして近年、本種において CaMV35S プロモーターを含むベクターを用いた遺伝子導入系が報告された (Khatiwada *et al.* 2019)。驚くことに、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、及びエレクトロポレーション法の 3 つの異なる方法で遺伝子導入に成功したと報告している。

しかし、導入遺伝子が核ゲノムに組み込まれた証拠は示されておらず、第三者による再現実験が待たれる。また遺伝子組換えではないが、Cas9 タンパク質複合体をエレクトロポレーション法により *E. gracilis* に導入し、目的遺伝子への塩基挿入・欠失を確認したという報告もある (Nomura *et al.* 2019)。今後もユグレナ藻は *E. gracilis* を中心に開発が進みそうである。

クロララクニオン藻では、2012年に *Bigelowiella natans* においてゲノム配列が解読されている (Curtis *et al.* 2012)。しかし、遺伝子導入系は本種ではなく他種の *Amorphochlora amoebiformis* で開発されている。著者らは、2008年にパーティクルガン法による *A. amoebiformis* への遺伝子導入系を報告したが、導入効率は低く、一過的な発現しか確認できないという課題があった (Hirakawa *et al.* 2008)。最近になって、蛍光物質 (FITC-dextran) が細胞内に導入される条件をエレクトロポレーションを用いて検討したところ、ヒトの培養細胞で使用されている条件が適していることが解った。これを基に、著者らはエレクトロポレーション法による高効率な遺伝子導入系の開発に成功した (Faktorová *et al.* 2020)。また、安定的な遺伝子導入株の作出には薬剤耐性遺伝子などの選抜マーカーを用いるのが一般的だが、著者らは蛍光タンパク質 GFP を発現する細胞をマイクロピペット法により単離することで遺伝子導入株の確立に成功している (Fukuda *et al.* 2020)。現在は、効率的な薬剤選抜法の開発と *A. amoebiformis* のゲノム解読を進めている。

不等毛藻は、高次共生藻類の中で最も遺伝子導入系の開発が進んでいる藻類群である。複数種の珪藻で遺伝子組換えが可能で、*Nannochloropsis* 属でも報告がある (Kilian *et al.* 2011)。その中でモデルとなるのは、羽状珪藻の *Phaeodactylum tricornutum* である。本種では、1996年にパーティクルガン法による遺伝子導入系が開発され (Apt *et al.* 1996)、その後エレクトロポレーション法も開発されている (Miyahara *et al.* 2013)。さらに、RNAi による遺伝子ノックダウン (De Riso *et al.* 2009)、TALEN (Daboussi *et al.* 2014) や CRISPR/Cas9 (Nymark *et al.* 2016) を用いたゲノム編集技術も開発されている。*P. tricornutum* は高次共生藻類の中でも数歩進んだ存在であり、他の藻類で遺伝子組換えを行う上での良い見本となっている。

遺伝子組換えに関していえば、渦鞭毛藻が最も厄介な藻類である。EMS プロジェクトでも、多くのグループが渦鞭毛藻への遺伝子導入系の開発に取り組んだが成功例は無かった (Faktorová *et al.* 2020)。渦鞭毛藻への遺伝子組換えの最初の報告は1998年で、*Amphidinium* と *Symbiodinium* に CaMV35S プロモーターを含むベクターを炭化ケイ素と PEG を用いた手法で導入したものであった (ten Lohuis & Miller 1998)。しかし著者らの知る限り、この20年でこの手法を用いた研究論文は発表されていない。Ortiz-Matamoros *et al.* (2015) は、*Symbiodinium* にシロイヌナズナ用のベクターをアグロバクテリウム法で導入できると報告したが、その細胞

は光合成色素を失い増殖できていない。Chen *et al.* (2019) は、既存の様々な方法を *Symbiodinium microadriaticum* に試したが、遺伝子組換えに成功しなかったと報告している。つまり、未だ渦鞭毛藻では生理学的・遺伝学的な解析ツールとして利用可能な遺伝子導入系の確立には至っていない。

最後はハプト藻だが、円石藻の *Pleurochrysis carterae* で遺伝子導入系が報告されている (Endo *et al.* 2016)。円石藻の細胞表面は炭酸カルシウムからなる殻に覆われており、これが核酸導入の際の一つの障壁になっている。彼等らは細胞から円石を除いたプロトプラストを用いて PEG 法により遺伝子導入に成功している。ここで興味深いのはプロトプラストを作成するレシピである。植物細胞のプロトプラスト化ではセルラーゼなどの細胞壁消化酵素が用いられるが、円石藻ではタンパク質分解酵素 (proteinase K) で処理することで効率的に円石を除去できると報告している。さらにこの手法は、他の円石藻 *Tisochrysis lutea* でも試され、遺伝子組換えに成功している (Endo *et al.* 2018)。円石を持たないハプト藻では、*Isochrysis galbana* にアグロバクテリウム法 (Prasad *et al.* 2014) とパーティクルガン法 (Faktorová *et al.* 2020) で遺伝子導入した報告がある。一方、ゲノム解読の終わっている *Emiliania huxleyi* では未だ遺伝子組換えの成功例は報告されていない。

まとめ

本稿では藻類への遺伝子組換え技術の近年の進展状況をまとめた。著者らが見落としている報告もあると思うが、藻類への遺伝子組換え技術は着々と進んでいると言える。遺伝子導入系の開発はあくまで一つのスタートであり、この技術を用いて分子細胞生物学的な基礎研究や産業応用に繋げていくことが重要である。その際、報告されている遺伝子導入系が信頼できるものかを十分吟味する必要がある。実際、報告の中には十年以上、再現性が示されていないものもある。また、研究技術の開発における問題の一つが、成功したものしか論文として世の中に出てこないことである。つまり、失敗を知らない研究者が同じ失敗を繰り返してしまう可能性がある。Faktorová *et al.* (2020) は、成功しなかった遺伝子導入系の開発に関するデータも補足情報として公開しており、ネガティブデータの共有を行っている。今後もこのような取り組みが増えていくことで、遺伝子導入系の開発は益々進展していくだろう。

引用文献

- Apt, K. E., Kroth-Pancic, P. G. & Grossman, A. R. 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol. Gen. Genet.* 252: 572-579.
- Bhattacharya, D., Price, D. C., Chan, C. X. *et al.* 2013. Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nat. Commun.* 4: 1941.
- Chen, J. E., Barbrook, A. C., Cui, G., Howe, C. J. & Aranda, M. 2019. The genetic intractability of *Symbiodinium microadriaticum* to standard algal transformation methods. *PLoS ONE* 14: e0211936.

- Curtis, B. A., Tanifuji, G., Burki, F. *et al.* 2012. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 492: 59–65.
- Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A. *et al.* 2014. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology. *Nat. Commun.* 5: 3831.
- De Riso, V., Raniello, R., Maumus, F., Rogato, A., Bowler, C. & Falciatore, A. 2009. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic Acids Res.* 37: e96.
- Doetsch, N. A., Favreau, M. R., Kuscuoglu, N., Thompson, M. D. & Hallick, R. B. 2001. Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic *psbK* operon. *Curr. Genet.* 39: 49–60.
- Doron, L., Segal, N. & Shapira, M. 2016. Transgene expression in microalgae— from tools to applications. *Front. Plant Sci.* 7: 505.
- Ebenezer, T. E., Zoltner, M., Burrell, A. *et al.* 2019. Transcriptome, proteome and draft genome of *Euglena gracilis*. *BMC Biol.* 17: 11.
- Endo, H., Yoshida, M., Uji, T., Saga, N., Inoue, K. & Nagasawa, H. 2016. Stable nuclear transformation system for the coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*. *Sci. Rep.* 6: 22252.
- Endo, H., Hanawa, Y., Araie, H., Suzuki, I. & Shiraiwa, Y. 2018. Overexpression of *Tisochrysis lutea* Akd1 identifies a key cold-induced alkenone desaturase enzyme. *Sci. Rep.* 8: 11230.
- Faktorová, D., Nisbet, R. E. R., Fernández Robledo, J. A. *et al.* 2020. Genetic tool development in marine protists: emerging model organisms for experimental cell biology. *Nat. Methods* 17: 481–494.
- Fujiwara, T., Ohnuma, M., Kuroiwa, T., Ohbayashi, R., Hirooka, S. & Miyagishima, S. Y. 2017. Development of a double nuclear gene-targeting method by two-step transformation based on a newly established chloramphenicol-selection system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Plant Sci.* 8: 343.
- Fukuda, K., Cooney, E. C., Irwin, N. A. T., Keeling, P. J. & Hirakawa, Y. 2020. High-efficiency transformation of the chlorarachniophyte *Amorphochlora amoebiformis* by electroporation. *Algal Res.* 48: 101903.
- Hirakawa, Y., Kofuji, R. & Ishida, K. 2008. Transient transformation of a chlorarachniophyte alga, *Lotharella amoebiformis* (Chlorarachniophyceae), with *uidA* and *egfp* reporter genes. *J. Phycol.* 44: 814–820.
- Jinkerson, R. E. & Jonikas, M. C. 2015. Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *Plant J.* 82: 393–412.
- Khaliwada, B., Kautto, L., Sunna, A., Sun, A. & Nevalainen, H. 2019. Nuclear transformation of the versatile microalga *Euglena gracilis*. *Algal Res.* 37: 178–185.
- Kilian, O., Benemann, C. S. E., Niyogi, K. K. & Vick, B. 2011. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 21265–21269.
- Li, Z. & Bock, R. 2018. Replication of bacterial plasmids in the nucleus of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nat. Commun.* 9: 3451.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-i, T. *et al.* 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653–657.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O. *et al.* 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245–250.
- Mikami, K. 2013. Current advances in seaweed transformation. Radis-Baptista, G. (ed.) *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxicology*. pp. 323–347. IntechOpen, London.
- Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y. & Ifuku, K. 2013. Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by multi-pulse electroporation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 874–876.
- Muñoz, C. F., Sturme, M. H. J., D'Adamo, S., Weusthuis, R. A. & Wijffels, R. H. 2019. Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation. *Algal Res.* 39: 101453.
- Nomura, T., Inoue, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Yamada, K., Iwata, O., Suzuki, K. & Mochida, K. 2019. Highly efficient transgene-free targeted mutagenesis and single-stranded oligodeoxynucleotide-mediated precise knock-in in the industrial microalga *Euglena gracilis* using Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Biotechnol. J.* 17: 2032–2034.
- Nymark, M., Sharma, A. K., Sparstad, T., Bones, A. M. & Winge, P. 2016. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Sci. Rep.* 6: 24951.
- Ohnuma, M., Yokoyama, T., Inouye, T., Sekine, Y. & Tanaka, K. 2008. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 49: 117–120.
- Ohnuma, M., Misumi, O., Fujiwara, T., Watanabe, S., Tanaka, K. & Kuroiwa, T. 2009. Transient gene suppression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Protoplasma* 236: 107–112.
- Ortiz-Matamoros, M. F., Islas-Flores, T., Voigt, B., Menzel, D., Baluška, F. & Villanueva, M. A. 2015. Heterologous DNA uptake in cultured *Symbiodinium* spp. aided by *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS ONE* 10: e0132693.
- Prasad, B., Vadakedath, N., Jeong, H. J., General, T., Cho, M. G. & Lein, W. 2014. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of haptophytes (*Isochrysis* species). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 8629–8639.
- ten Lohuis, M. R. & Miller, D. J. 1998. Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *Plant J.* 13: 427–435.
- Wang, L., Yang, L., Wen, X., Chen, Z., Liang, Q., Li, J. & Wang, W. 2019. Rapid and high efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation. *Biosci. Rep.* 39: BSR20181210.
- Yamano, T., Iguchi, H. & Fukuzawa, H. 2013. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J. Biosci. Bioeng.* 115: 691–694.

(¹ 筑波大学生命環境科学研究科, ² 筑波大学生命環境系)