

## 紅藻スサビノリの遺伝子導入におけるGUS遺伝子 一過性発現率と細胞viabilityの相関性

羽土 真\*<sup>1</sup>・川崎武仁\*<sup>1</sup>・鬼頭 鈞\*<sup>1</sup>・村瀬 昇\*<sup>1</sup>・水上 譲\*<sup>1</sup>

### Correlation between transient expression rates of introduced GUS gene and viability of recipient cells of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta)

Makoto Hado\*<sup>1</sup>, Takehito Kawasaki\*<sup>1</sup>, Hitoshi Kito\*<sup>1</sup>,  
Noboru Muradse\*<sup>1</sup>, and Yuzuru Mizukami\*<sup>1</sup>

The expression rates of introduced  $\beta$ -glucuronidase (GUS) gene into protoplasts of *Porphyra yezoensis* were compared and found to be different among thalli of 5 culture strains. However, these gene expression rates were not reproducible when a similar experiment was carried out using identical culture strains but other samples of thalli stocked at another facility. To know the reason why differences in GUS gene expression rate occurred, the correlation between expression rates of introduced GUS gene and viability of thalli was studied with the above 5 culture strains. The viability was measured by assays of ATP content, survival rates of protoplasts, cell division and photosynthesis activities. In all cases of the assays, the extent of the GUS gene expression rate seemed to be correlated closely with the ATP content, survival rates, cell division activities and photosynthesis activities. These results suggested that the GUS expression rates were strongly influenced by the viability of the thalli rather than difference of culture strains.

## 1 緒 言

最近の20年間に、遺伝子導入に関する研究は広範な動物を対象に活発に行われてきた。それらの成果は、遺伝子機能の解析や生物特性の改変などに役立てられているほか、医学や農学の分野では遺伝子操作技術としてすでに一部は実用化されている。しかし、海藻類、特に大型海藻類に関しては、これらの研究は著しく遅れており、最近やっと研究の著についたばかりである。紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は進化学上最も下等な植物種の1つであり、また、我が国の重要な海面養殖種でもあることから、本種の遺伝子導入に関する知見は、海藻類の基礎遺伝学および「海苔」育種の研究上重要である。しかし、スサビノリについてはこれらに関する知見は極めて乏しく、マーカー遺伝子の導入とそれらの一過性発現についての研究がわずかに報告されているに過ぎない<sup>1~4)</sup>。

遺伝子導入における遺伝子発現率は、遺伝子導入に用い

たベクターやプロモーターの種類および構造に大きく依存することは一般によく知られているが、遺伝子発現率に及ぼす細胞の遺伝学および生理学的諸条件の影響については研究報告が少ない。我々の以前の研究で<sup>3)</sup>、スサビノリプロトプラストへ遺伝子導入された $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の一過性発現の発現率は、遺伝子導入に用いたスサビノリ葉体試料の違いにより著しく異なることが示唆された。これらの葉体は「栽培品種」として異なった株由来ではあるが、遺伝学的に互いに極めて近縁であり、外見上の形態や色調にも相違は見られなかった。

本研究は、種々葉体間に見られる遺伝子発現率の相違の原因を明らかにすることを目的とした。種々の栽培品種間でGUS遺伝子の一過性発現率を比較するとともに、これらの栽培品種葉体における細胞の生理的な活性状態を解析し、遺伝子発現率と栽培品種あるいは細胞のviabilityの間の相関関係について調査した。

## 2 材料と方法

### 2.1 アマノリ葉体

平成13年に養殖されたスサビノリ栽培種を佐賀県有明水産振興センターより入手した。実験に供したのは、栽培品種「新サガ1号」, 「サガ5号」, 「S-14」, 「D-00」, 「D-34」, 「D-48」及び「T-18」の葉体で、これらの栽培品種は佐賀県有明水産振興センターにおいて保存されている各々の株の殻胞子葉体から放出させた単胞子1個から育成されたものである<sup>3)</sup>。これらの葉体は有明海の養殖場で長さ1~2cmに育成後、約3時間屋外で乾燥され、実験に使用するまでの間、一部は水産大学校(下関)で、残りは佐賀県有明水産振興センターで、-20℃に冷凍保存されたものである。

### 2.2 発現ベクターとプロトプラストへの遺伝子導入

先に構築した発現ベクターpYez-Rub4-GUSを用いた<sup>3)</sup>。このベクターはマーカー遺伝子として細菌のGUS遺伝子<sup>6, 7)</sup>を持ち、その上流にプロモーターとしてスサビノリのリブローズ-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(Rubisco)遺伝子のプロモーター<sup>3)</sup>が連結されている。このベクターを既報<sup>3)</sup>と同様のセルポレーターエレクトロポレーションシステム(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD)を用いたコンデンサー放電方式のエレクトロポレーション法によってプロトプラストへ遺伝子導入した。遺伝子導入における電気的條件は、パルス電圧200V, パルス幅47msであり、また、用いたベクターDNA濃度は0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。場合によっては、GUS遺伝子発現のネガティブコントロールとしてサケDNAをプロトプラストへ導入した。

### 2.3 プロトプラスト培養およびGUS活性細胞の検出

エレクトロポレーション後のプロトプラストを既報<sup>3)</sup>に従い、液体培地及び寒天培地で培養した。培地にはSWM-III培地を用い、ストレプトマイシンおよびペニシリンGカリウムをそれぞれ最終濃度が50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した。GUS活性細胞の検出には既報<sup>3)</sup>と同様の方法を用いた。即ち、遺伝子導入後、細胞を液体培地中15℃で1ないし2日間培養し、その後5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニドシクロヘキシルアンモニウム塩(X-Gluc: 和光純薬)1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ を含む低融点アガ

ローズ液を培養液に加え、固形化して寒天培地とした後、さらに15℃で2日間以上静置して青く染まった細胞を観察した。GUS遺伝子発現細胞の出現頻度(発現率)は、全細胞及び青く染まった細胞を計数し、全細胞数に対する青い細胞の割合から求めた。

### 2.4 細胞のviabilityの測定

葉体の生理的な活性状態を葉体間で比較するため、種々葉体のATP含有量、プロトプラストの培養中の生存率、プロトプラストの細胞分裂活性および種々葉体の光合成活性について調査した。ATPの定量はプロメガATPアッセイシステム(ENLITEN ATP assay system)によりプロメガ社(Madison, W.I.)の説明書に従って行った。プロトプラストの生存率は、寒天培養したシャーレ中のプロトプラストの生細胞数を計数し、培養開始直後の生細胞数に対する培養4, 8および12日目の生細胞数の割合として求めた。生死細胞の判定は、顕微鏡観察による細胞の色や大きさを指標とした。細胞分裂活性は、寒天培養したプロトプラストを培養4および8日後に観察し、それぞれの観察日ごとに全細胞数に対する2分裂細胞の割合を計数して、割合の多いものほど生理活性が高い細胞とみなした。光合成活性は大型試料用に改良されたプロダクトメーター法<sup>9, 10)</sup>により行い、温度15℃下で、光強度を50, 20及び0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の順に変化させた。このような条件下で吸収・放出された酸素量を葉体表面積及び葉体乾重量で補正後、光合成-光直線をプロットし、その直線の傾きで光合成活性を比較した。

## 3 結果

### 3.1 種々葉体におけるGUS遺伝子発現率

栽培品種5品種(新サガ, S-14, D-00, D-48およびサガ5号)からなる6種類の葉体試料からそれぞれプロトプラストを調製し、ベクターpYez-Rub4-GUSを用いて電気パルスを与えた後、5日間培養してGUS遺伝子発現細胞を調べた。Fig. 1に示したように、古い葉体(1998年産サガ5号)を除いて、用いたすべての葉体から調製したプロトプラストにGUS遺伝子の発現が観察された。しかし、発現細胞の出現頻度(発現率)は葉体間で異なり、最も高い約7.5%から最も低い約2.0%まで、最大で3倍以上の差が観察された。このような発現率の差は栽培品種間に遺伝的に固定された形質なのか否かを調べるため、Fig. 1の実験で用いた葉体と同じ栽培品種で、凍結保存場所がFig. 1の場

合とは異なる別の葉体を用いて同一実験を試みた。Fig. 2に示したように、GUS遺伝子発現率は、Fig. 1の結果と同様、新サガ、S-14およびD-00において比較的高い値を示した。しかし、これらの3品種間で発現率の高さを比較すると、Fig. 1で見た結果とは異なっていた。Fig. 1では新サガが最も高かったのに対し、Fig. 2ではむしろS-14やD-00の方が新サガより高い発現率を示す傾向にあった。

### 3.2 葉体のviabilityの比較

Fig. 1に示した6種類の葉体試料間で細胞のviabilityを、ATP含有量、プロトプラスト生存率、細胞の二分裂活性および光合成活性を指標として比較した。Table 1は単位蛋白質質量当たりのATP量を葉体間で比較したものである。各々の栽培品種の葉体はGUS遺伝子発現率の高いものから順に並べてある。ATP量は葉体間でかなり異なり、遺伝子発現率の最も高い葉体と最も低い葉体間には2倍以上の差があるなど、概して、GUS遺伝子発現率が高いものほどATP量が多い傾向が見られた。

Fig. 3は、各栽培品種の葉体から調製したプロトプラストの寒天培地における生存率を示したものである。いずれの葉体から調製したプロトプラストも培養4日目までに著しい生存率の低下が見られたが、その後は、少なくとも培養12日目までは、このような大きな生存率の低下は見られなかった。培養初期の生存率の低下は、GUS遺伝子発現率が高い葉体ほど小さく、また、観察の全培養期間を通して、遺伝子発現率の高い葉体ほど高い生存率を示した。

Table 2にプロトプラストの細胞分裂活性を調べた結果を示した。葉体はTable 1と同様に遺伝子発現率が高いものから順に並べてある。培養4日目では、新サガから調製した細胞においてすでに50%以上の分裂像が観察された

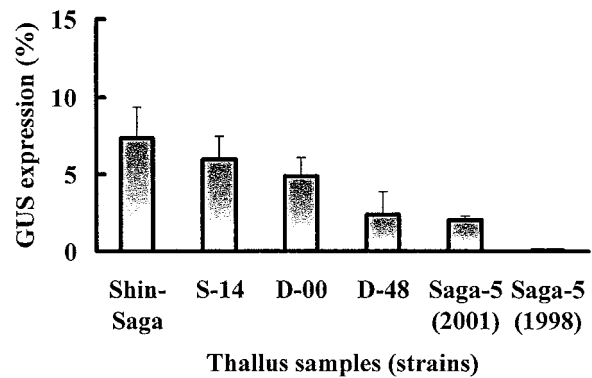


Fig. 1. Comparison of GUS gene expression rates among 5 culture strains. Protoplasts were prepared from thalli of 5 culture strains, introduced by the pYez-Rub 4 -GUS and cultured in agarose medium. GUS activities of protoplasts were assayed described in Materials and methods. The vertical bars indicate the standard deviations.

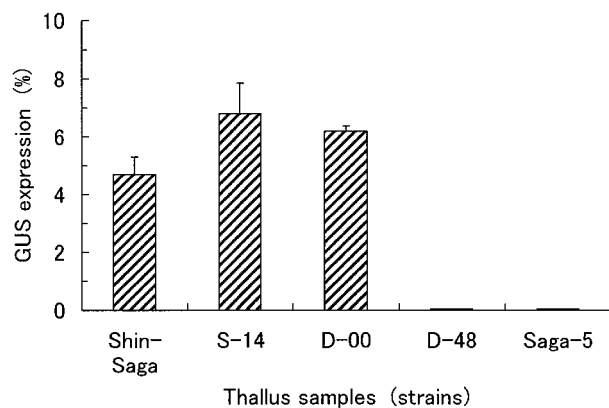


Fig. 2. Comparison of GUS gene expression rates among various samples of thalli. Protoplasts were prepared from five kinds of thalli stocked at a different facility from those described in Fig. 1. The introduction of the GUS gene, culture of protoplasts and assay of GUS activities were carried out as described in Fig. 1. The vertical bars indicate the standard deviation.

Table 1. Comparison of ATP contents among various samples of thalli. ATP contents are expressed as relative luminescent units (RLU) per mg protein.

Thallus samples	RLU / mg protein		
	Exp. 1	Exp. 2	Average
Shin-Saga	3612	3939	3776
S-14	3265	3092	3179
D-00	3454	3430	3442
D-48	2371	2071	2171
Saga-5 (2001)	2504	2327	2415
Saga-5 (1998)	1588	1616	1602

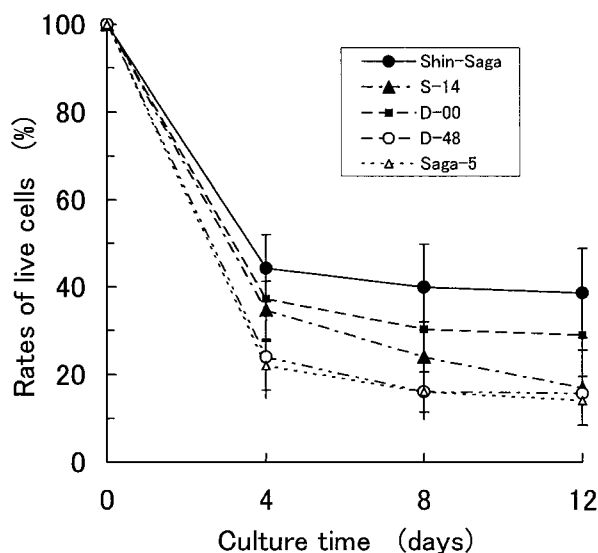


Fig. 3. Survival rates of protoplasts prepared from the five culture strains. The protoplasts were prepared from the same samples of thalli as those described in Fig. 1. They were cultured in agarose medium and incubated at 15°C. The survival rates were estimated at 4, 8 and 12 days of the incubation. The vertical bars indicate the standard deviation of the survival rates obtained from three culture plates for each sample of thalli.

が、発現率の低い葉体から調製した細胞では数%またはそれ以下であった。また、培養8日目にあっても、概して、遺伝子発率が高い葉体由来の細胞は低い葉体由来の細胞に比べ、より高い細胞分裂頻度を示した。

Table 3に、種々葉体の光合成活性の比較が示してある。この表から、GUS遺伝子発現率の高い葉体は低い葉体に比べ、多少のふれがあるものの、より高い光合成活性を持っていることがうかがえ、遺伝子発現率と光合成活性の間には明らかな相関がみられた。

#### 4 考 察

養殖ササビノリ葉体は、栽培品種が異なっても、また、凍結保存状態が多少異なっている葉体間でも、外観や顕微鏡観察像が互いに極めて類似している。さらに、葉体の生理的な状態を外観で推察するのは極めて困難である。プロトプラストの発生、再分化に関する研究においては、プロトプラストが効率よく分離され、再分化すれば葉体の選択に大きな注意を払う必要はなかった。しかし、遺伝子

Table 2. Comparison of cell division rates among various samples of thalli. Protoplasts were prepared from 5 kinds of thalli and cultured in agarose plates. At 4 and 8 days cultivation, the division cells were observed under a microscope. The rates of division cell to the total live cell in an agarose plate were calculated.

Thallus samples	Division cell (%)	
	4-day culture	8-day culture
Shin-Saga	55.8 ± 2.5	89.2 ± 2.5
S-14	16.5 ± 2.6	34.6 ± 9.2
D-00	9.4 ± 1.1	59.0 ± 2.5
D-48	0	7.1 ± 1.2
Saga-5 (2001)	3.8 ± 2.2	19.7 ± 6.7

Table 3. Comparison of photosynthesis activity among various samples of thalli.

Thallus samples	Relative photo. activity		
	Exp. 1	Exp. 2	Average
Shin-Saga	0.0812	0.0595	0.0703
S-14	0.0542	0.0538	0.0540
D-00	0.0477	0.0444	0.0461
D-48	0.0502	0.0440	0.0471
Saga-5 (2001)	0.0478	0.0374	0.0426
Saga-5 (1998)	0.0404	0.0297	0.0351

導入実験では、遺伝子発現率を高めるために、種々の葉体試料について遺伝子導入の効率や導入遺伝子の発現活性を調査する必要がある。Fig. 1 に示したように、遺伝子発現率は、実験に用いた葉体間でかなり異なっていることが明らかであった。また、Fig. 2 に示した実験から、同一の栽培品種であっても、葉体試料が異なれば遺伝子発現率も異なることが明らかにされ、Fig. 1 で見た遺伝子発現率の差異は「品種」の違いが原因で生じたものでないことが示唆された。

葉体のviabilityが遺伝子導入発現の効率に影響を及ぼしている可能性をATP含有量、プロトプラストの生存率、細胞分裂活性及び光合成活性の4つを指標にして調べた。Table 1, Fig. 3, Table 2 及び 3 から明らかなように、GUS遺伝子発現率が高い葉体ほど、ATP量が多く、プロトプラスト生存率が高く、さらに細胞分裂活性及び光合成活性も高かった。これらの結果は、遺伝子導入におけるGUS遺伝子発現率は葉体のviability、すなわち葉体を構成している個々の細胞のviabilityに密接に関係していることを示唆するものであり、細胞の高いviabilityが高いGUS遺伝子発現率をもたらすものと考えられた。

細胞のviabilityの差が何によって生じるかは不明である。栽培品種によって遺伝的に固定されたものでないことはFig. 1 及び 2 から明らかである。葉体の生育条件、凍結保存条件、凍結保存前に行う葉体の半乾燥処理条件等が葉体のviabilityに影響を与えるものと思われるが、このことに関しては今後の詳細な検討が必要である。

## 謝 辞

養殖アマノリ葉体をご提供いただいた佐賀県有明水産振興センターの川村博士並びに横尾、三根の各氏に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) J. E. Kubler, S. C. Minocha, and A. C. Mathieson : Transient expression of the GUS reporter gene in protoplasts of *Porphyra miniata* (Rhodophyta). *J. Mar. Biotechnol.*, **1**, 165-169 (1994).
- 2) M. Okauchi and Y. Mizukami : Transient  $\beta$ -glucuronidase (GUS) gene expression under control of CaMV 35S promoter in *Porphyra tenera* (Rhodophyta). *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, Suppl. **1**, 13-18 (1999).
- 3) 羽土 真・岡内正典・村瀬 昇・水上 譲:リブローサーニリン酸カルボキシラーゼ遺伝子プロモーターを用いたスサビノリ (*Porphyra yezoensis*) プロトプラストにおけるGUS遺伝子の一過性発現, *SUISANZOSHOKU*, **51**, 355-360 (2003).
- 4) Y. Mizukami, M. Hado, H. Kito, M. Kunimoto, and N. Murase : Reporter gene introduction and transient expression in protoplasts of *Porphyra yezoensis*. *J. Appl. Phycol.*, **16**, 23-29 (2004).
- 5) 横尾一成・三根崇幸・荒巻 裕・川村嘉応:ノリ保存株から分離したクローン株の素材評価, 佐賀県有明水産振興センター研究報告, **21**, 105-110 (2003).
- 6) R. A. Jefferson, S. M. Burgess, and D. Hirsh:  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8447-8551 (1986).
- 7) R. A. Jefferson: Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **5**, 387-405 (1987).
- 8) Y. Mizukami, M. Okauchi, and H. Kito: Effect of cell wall-lytic enzymes on the electrofusion efficiency of protoplasts from *Porphyra yezoensis*. *Aquaculture*, **108**, 193-205 (1992).
- 9) Y. Yokohama and S. Ishimura: A new device of differential Gas-Volumeter for ecological studies on small aquatic organisms. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **25**, 75-80 (1969).
- 10) 横浜康継・前川行幸:プロダクトメーター (差動式検容計) による大型試料の光合成および呼吸測定, *藻類*, **36**, 29-36 (1988).
- 1) J. E. Kubler, S. C. Minocha, and A. C. Mathieson : Transient expression of the GUS reporter gene in pro-