

名大発新規モデル海藻の開発

○白江 麻貴

生物・生体技術支援室 生物機能解析・実験実習技術グループ

概要

東海国立大学機構名古屋大学理学研究科附属臨海実験所（以下菅島臨海）では、2020年から周辺に生息する海藻を対象とした研究を開始した。本稿は2022年3月に第1回技術発表会にて発表した「大型藻類細胞生物学事始@菅島臨海」^[1]の続報である。菅島臨海周辺で採取された海藻のうち、現在は特に高い再生能力を持つ緑藻ハネモのモデル生物化に着手している。まず実験室でハネモの培養系を立ち上げ、このハネモシステムを用いて全ゲノム解読、トランスクリプトーム解析を行った。現在は分子機能解析手法を検討しており、遺伝子導入法の確立を当面の達成目標としている。今後さらに海藻再生の分子メカニズムを探ることで、細胞生物学のみならず水産業や海洋環境の持続可能性向上にも貢献しうると考えている。

1 背景

菅島臨海には現在5つの研究チーム（生物多様性・系統進化学チーム、海洋生物化学チーム、海洋細胞生物学チーム、分子生物学的技術の開発、海洋調査）がある^[2]。筆者は操船や備品試薬管理などの通常技師業務に加え、所内他チームや外部利用者の分子生物学実験を補助する「分子生物学実験系の開発」という1人チームに属し、現在は海洋細胞生物学チーム（五島剛太教授）の目指す「新規モデル海藻の確立」をサポートしている。



図1 菅島臨海前の栈橋と磯場

モデル生物とは元来「分子生物学とその周辺分野において普遍的な生命現象の研究に用いられる生物のこと。飼育・繁殖や観察がしやすい、世代交代が早い、遺伝子情報の解明が進んでいる種が使われる。^[3]」と理解されてきた。しかし近年、多くの生物種で遺伝情報の解析が進んでおり、これまでモデル化されていなかった生物種にも応用可能な実験技術が発展した。そのため、研究者はそれぞれ魅力的な特徴を持つ生物種を選び出し研究を行うことで、新規性・独創性に富んだ成果を得ることが可能となった。さらに様々な生物に目を向け最新技術を駆使することで、有用な資源の発見・技術の発展が期待されている。

海には多様な生物が生息している。その中でも海藻は、近年ブルーカーボン^[4]の生産者として生態学的にも社会的にも注目される一方、「磯焼け」（海藻の枯死）による減少が危惧されている^[5]。海藻は元来再生能力の高い生物であることは古くから知られているが、その細胞分子生物学的な知見はほとんどない^[6]。そこで菅島臨海周辺で採取できる海藻のうち、特に再生や細胞生物学的の観点から興味深い種を選び出すという作業から本業務を開始した。

2 海藻の選定

海藻は微細藻類と大型藻類に分類することができるが、本業務は磯 (潮間帯) に生息する大型藻類にフォーカスする。大型藻類には、主にアオサやアオノリなどの緑藻、トコロテンの材料となるマクサや海苔になるスサビノリなどの紅藻、コンブやワカメなどの褐藻がある。大型藻類のうち、これまでに全ゲノム解析が終了し、形質転換やゲノム編集といった分子生物学的な研究手法が確立している代表的な海藻として、緑藻ではスジアオノリ (*Ulva prolifera*)^[7]、褐藻ではシオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*)^[8]が挙げられる。これらの海藻は菅島においても採取可能である。しかし再生や細胞のダイナミクスを観察するためには、より適切な種を選定する必要があった。菅島臨海周辺の花藻を採取し切り刻んでみると、特に緑藻と紅藻において数日間のうちに再生現象を観察できた⁽⁶⁾。さらに興味深い再生パターンを持つ種について、他の藻類や動物を完全に除去する「単藻化」を行い、室内で培養を試みた。その結果、緑藻ではハネモ・シオグサ・ミル、紅藻ではダジアがモデル海藻候補として選出された。

緑藻は陸上植物の姉妹群であり、進化的側面からも興味深い。特にハネモは特徴的といえる。多核嚢状体という体制を持っており、多核の単細胞である。体長 10cm ほどに成長し鳥の羽のような葉状部を持つが、体内には多くの核が散在するにもかかわらず、核同士を仕切る細胞膜や細胞壁は存在しない。また極めて特殊といえるのは、「搾り汁」から再生できることである。藻体を切り刻み、絞り出した原形質を海水中に撒くと、30分から1時間ほどで凝集して球状の「プロトプラスト」を形成し (図3)、2,3日でそこから芽が出て10日ほどで葉状部までが再生される。そのメカニズムは全く分かっていない。

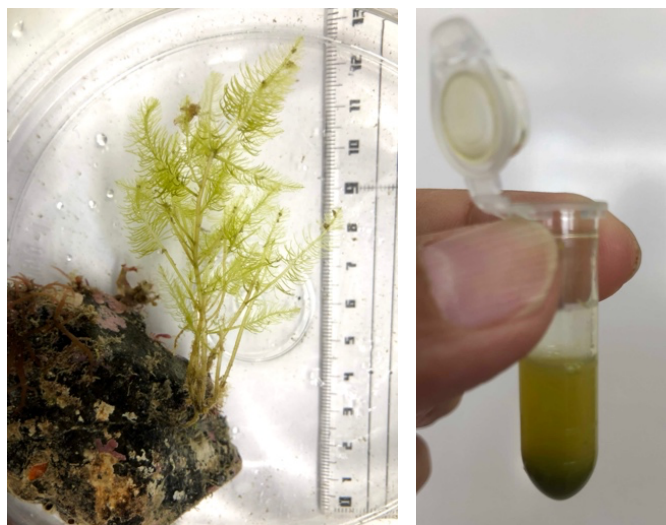


図2 ハネモ藻体 (左) と搾り汁 (原形質) (右)

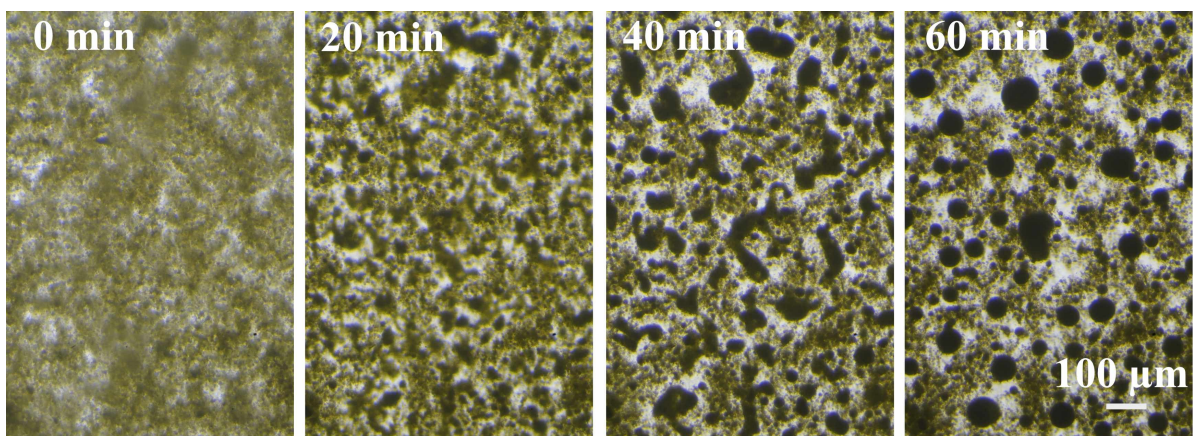


図3 ハネモ原形質の凝集とプロトプラスト形成

紅藻においてもいくつかの種で興味深い再生現象を観察できたが、ダジア (*Dasya* sp.) は加えて世代交代を管理する上で有利な種であった。ダジアの継代培養については前報^[1]を参照されたい。25°C培養条件下で特に生殖を誘導する必要もなく、シャーレの中でも最短1ヶ月で世代を回すことができた。そのためハネモとダジアをモデル海藻候補とした。

3 ゲノム解析

2021年度に科研費先進ゲノム支援に採択され、紅藻ダジアと緑藻ハネモの全ゲノム解読を依頼した。ダジアについては、フラスコで育てた藻体からゲノムDNA約10 μ gを抽出し、ライブラリー作製を依頼した。しかし、十分量高純度のDNAであることは確認できたものの、このゲノムDNAを用いたライブラリー作製は成功しなかった。原因は不明であるが、一般に海藻のゲノムDNAを抽出する際には多糖類が狭雑物として混入し、ライブラリー作製を妨げることがある^[9]。一方でハネモについてはシャーレで育てた藻体1gからのゲノム抽出およびライブラリー作製を依頼したところ成功し、ゲノム解析に移ることができた。その結果、ハネモの核ゲノムサイズは91.1Mbpであることが分かった。このゲノム配列は27のcontigにまとめられた(N50 length 6.7 Mb)ことから、ライブラリーから読み取られた塩基配列情報はかなり正確に繋がれていると考えられる。ちなみに前述したスジアオノリのゲノムサイズは103.8 Mbp^[7]、シオミドロは214 Mbp^[8]、シロイヌナズナは130Mbp、イネは373Mbp、ヒトは3Gbp^[9]である。また得られたタンパク質をコードする遺伝子の数も14,034と妥当であった。(スジアオノリ 10,311、シオミドロ 16,256、イネ 37,869、シロイヌナズナ 26,541、ヒト 21,306。) RNA-seqも併せてさらに詳細な解析がなされ、ハネモゲノム解析は論文にまとめられた^[10]。この情報をもとに、分子生物学的な実験を始めることになった。

4 イメージング

ゲノム解析が進む中、少しでもハネモの細胞生物学を進めるべくイメージングを試みた。はじめに生体内における核の局在と動態を生体の核を染色するヘキスト 33342 で検出しようと試みたが、ハネモ生体にはヘキストがあまり浸透せず、上手く染められなかった。そこで、アルデヒド固定をし、抗チューブリン抗体と共にDAPIで核を染色する免疫染色を試みた。他の植物同様、ハネモでは葉緑体の自家蛍光が強かったが、先行研究の通り固定後1% TritonX-100で1時間処理することで自家蛍光を除去することができた^[11]。条件検討を行った結果、チューブリンが藻体細胞膜直下の長軸方向に繊維状に並び、その隙間に多数の核が挟まっている像を得ることができた。また、特に切断から1日ほど経った藻体の切断面近くでは核分裂が起き、DNAが凝集し染色体を形成する様子やチューブリンが紡錘糸を構成する様子が確認できた(図4、矢印)。これらのイメージング技術は今後ハネモの再生や細胞骨格のダイナミズムを観察して行く上で重要な手掛かりを与えうると考えられた。

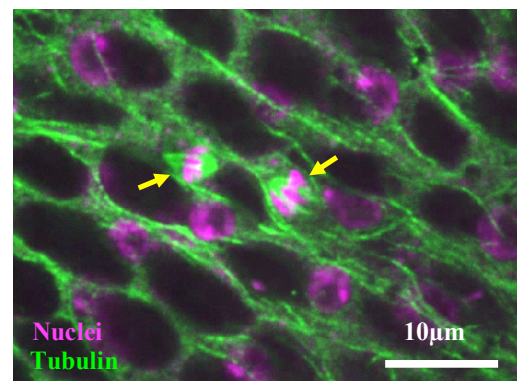


図4 ハネモ藻体のチューブリン（緑）と核（マゼンタ）の二重染色像

5 物質導入

ハネモのゲノム解析が終了すれば、遺伝子導入法を確立しライブイメージングや形質転換、ゲノム編集などを試みることになる。その際避けて通れないのがハネモ細胞内への核酸(DNAやRNA)導入である。しかし核酸はハネモ細胞内にも多く存在し外来物質として検出することが困難であったので、まずはデキストラノローダミンという蛍光物質の導入を試み、至適条件を検討することにした。デキストラノローダミンは赤い蛍光染料であり、デキストラノと結合させてあるので、導入を可視化できる。

物質導入の鍵となるのは導入手段である。一般的な方法としては1) 細いガラス針を藻体に突き刺して注入するインジェクション法、2) 金粒子に物質を付着させ真空内で藻体に打ち付けるパーティクルガン法、

3) 通電して細胞膜に一過性の穴をあけるエレクトロポレーション法などがある。これに対して、ハネモの特性を最大限活かせる可能性があったのが、ポリエチレングリコール（PEG）法であった。PEG法は元々酵母や植物でよく用いられる手法である。酵母や植物の場合は細胞壁があるので、まずこれを酵素で取り除く。得られた植物細胞は丸くなる。これをプロトプラストと呼んでいる。プロトプラストと導入したい物質を合わせPEGと混ぜると、物質が細胞内に取り込まれる。PEGは細胞膜に作用するが、その作用機序の詳細は分かっていない。ハネモの場合原形質を絞り出せばプロトプラスト化するので、原形質と目的物質にPEGを混ぜ合わせれば、プロトプラスト形成時に物質が導入される可能性があった。

様々な条件を検討した結果、ハネモ原形質を取り出した後すぐにPEG4000とデキストラン

ローダミン（155k）を合わせて10分ほど静置し、ゆっくり攪拌してから海水中に撒くことで、デキストランローダミンを含むプロトプラストが得られた（図5）。しかし、同じ方法で蛍光タンパク質GFPやRFPの導入を試みても蛍光は検出されなかった。従って、本手法では、物質の種類や濃度・分子量によって導入効率が異なる可能性が考えられた。現在さらに核酸DNA・RNAの効率的な導入方法とその検出方法を最適化するために実験を重ねている。

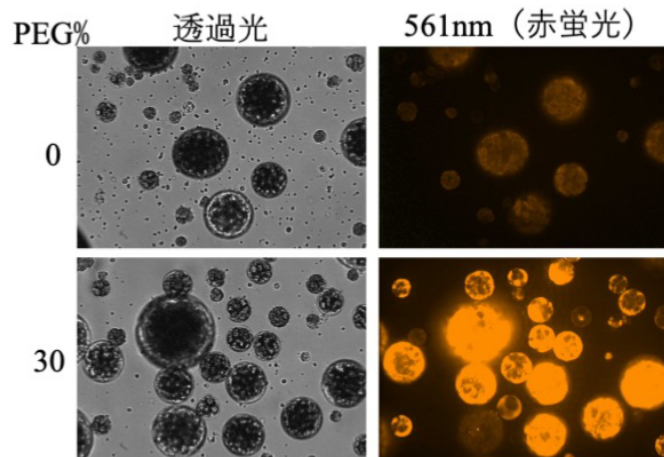


図5 PEGによるプロトプラストへのデキストランローダミン導入

6 展望

デキストランはハネモ細胞内に導入することができたが、その他のタンパク質や核酸についてはさらに導入条件を検討する必要がある。また、核まで輸送されるには別の導入手段や条件が必要かもしれない。個々の目的に合わせて至適条件を検討し、ハネモの細胞分子生物学研究の推進を支えていきたい。

また、ハネモ以外の海藻についてもモデル化を検討していくことに意義があると考えられる。ミルはハネモと同じハネモ目の緑藻であり、多核嚢状体の体制を持つが、搾り汁を海水に撒いても再生はしない。ハネモとミルの間で何が違うのかを解析することで、ハネモの再生能力について理解が深められるかもしれない。また、紅藻は海苔やアガロース（寒天）でも知られるように良く商業利用されている一方で、細胞分子生物学的な研究はあまり進んでいない。ダジアなど紅藻のモデル生物化を進めることで、将来的に役立つ知見や技術が得られる可能性がある。どんな海藻をどのような研究に用いるかは研究者に委ねるが、それぞれの目的に合う海藻を提供し、実験技術を最適化するのが技術職の役割である。

7 謝辞

本稿の業務は菅島臨海所長である五島剛太教授から依頼を受けて行った。科研費先進ゲノム支援においては、国立遺伝学研究所の豊田敦特任教授にライブラリー作製を、東京工業大学の伊藤武彦教授にハネモの全ゲノム解読を行なっていただいた。ハネモゲノム解析は東京工業大学の埴大輝氏、名古屋大学の落合乾大氏が行なった。イメージングおよび物質導入実験は名古屋大学小河華美氏の研究のサポートとして行なっている。本研究は科研費奨励研究「多細胞性海藻における再生現象のイメージング」(21H04162)、および理学部技術開発・研鑽経費「新規モデル海藻の培養・研究技術開発」から助成を受けた。

参考文献

- [1] 白江-倉林麻貴 (2022) 「大型藻類細胞生物学事始@菅島臨海」 第1回東海国立大学機構技術発表会
<http://www.tech.nagoya-u.ac.jp/archive/r03/Vol1/honkou/o12.pdf>
- [2] 名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所ホームページ・研究内容
<https://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~SugashimaMBL/research/index.html>
- [3] フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』「モデル生物」
<https://ja.wikipedia.org/wiki/モデル生物>
- [4] 国土交通省 HP 「ブルーカーボンとは」
https://www.mlit.go.jp/kowan/kowan_tk6_000069.html
- [5] 水産庁 HP 「磯焼けとは」
https://www.jfa.maff.go.jp/j/gyoko_gyozyo/g_gideline/attach/pdf/index-36.pdf
- [6] Shirae-Kurabayashi M, Edzuka T, Suzuki M, Goshima G (2022) Cell tip growth underlies injury response of marine macroalgae. PLoS ONE 17(3): e0264827.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0264827>
- [7] Tamura K, Bono H (2022) Genome Sequence of the Edible Green Alga *Ulva prolifera*, Originating from the Yoshinogawa River in Japan.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9584216/>
- [8] Mark J. Cock et al.: (2010) The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. Nature 465, 617–621.
<https://www.nature.com/articles/nature09016>
- [9] 西辻光希 (2019) 「未開拓な大型海藻ゲノムの現状とこれから」 藻類 Jpn. J. Phycol. 67: 81-87.
http://sourui.org/publications/sorui/list/Sourui_PDF/Sourui-67-02-81.pdf
- [10] Ochiai KK, Hanawa D, Ogawa HA, Tanaka H, Uesaka K, Edzuka T, Shirae-Kurabayashi M, Toyoda A, Itoh T, Goshima G. (2023) Genome sequence and cell biological toolbox of the highly regenerative, coenocytic green feather alga *Bryopsis*. bioRxiv.
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.11.22.568388v1>
- [11] 本村泰三・菱沼佑 (2010) 「間接蛍光抗体法による海藻類の細胞骨格の観察」 藻類 Jpn.J.Phycol. 45:175-181.
http://sourui.org/publications/sorui/list/Sourui_PDF/Sourui-45-03.pdf