

## 緑藻ハネモのモデル生物化に向けた技術開発

○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

大型海藻は人類にとって重要な水産・環境資源であるにもかかわらず、その分子生物学的な研究は他の動植物に比べると圧倒的に進んでいない。名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所では、大型海藻の深い生物学的理解と有効利用を目的として、令和2年度より大型海藻類のプロジェクトに着手した。発表者はその中で、様々な分子生物学的手法を大型海藻に適用するための技術開発を請け負っている。最近は特に緑藻ハネモのモデル生物化を目指しており、昨年度はゲノム解析に寄与し<sup>[1]</sup>、細胞内への物質導入に成功した<sup>[2]</sup>。現在は、RNA局在を解析する Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法、さらにゲノム編集法の技術開発を行っている。本稿ではそのうち FISH 法の開発について報告する。

### 1 背景

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」<sup>[3]</sup>、2024年3月に第3回技術発表会にて発表した「名大発新規モデル海藻の開発」<sup>[2]</sup>の続報である。ハネモを扱うことになった経緯はそちらを参照されたい。

ハネモは緑藻植物門のアオサ藻綱に属し、肉眼視できる大型海藻である。温帯の沿岸域に生息する。体制



図1 海中の石から生えているハネモ（福岡技師撮影）（左）とハネモの体制図<sup>[1]</sup>（右）

は特殊で、藻体内に隔壁が存在しない、巨大な単細胞体（多核単細胞体）である（図1）。葉状部・主軸・仮根といった部位からなり、単細胞にもかかわらず「器官分化」が見られる。さらに、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、2～3日で出芽し、10日ほどで葉状部までが再生される<sup>[2]</sup>。そのメカニズムは全く分かっていない。以上のように古くから独特な特色を持つ藻類であることが知られていたが、分子生物学的な研究はなされていなかった。

幸いなことにハネモは室内培養が容易で、単藻化が可能であった。単藻化した単一ハネモ藻体を元に、ゲノム解析と各「器官」の RNA-seq が行われた。その結果、ハネモ藻体内の主軸・分枝・仮根の各器官では、mRNA の発現パターンが異なることがわかった<sup>[1]</sup>。ハウスキーピングや細胞骨格系の関連遺伝子 mRNA はどの器官にも同程度高発現していた一方、一部の機能未知遺伝子 mRNA は特定の器官にのみ高発現していた。一般に、多細胞生物の器官分化は各器官の細胞が特異的遺伝子を発現することで成立・維持されており、mRNA の器官特異的な細胞内局在は多細胞生物でもよく知られている。しかし体長 10cm にもなる単細胞生物において、器官分化を成し得る mRNA 局在メカニズムは多細胞生物のそれと同じなのだろうか？さらには、それぞれの器官に局在する核は器官特異的な遺伝子発現（転写）を行っているのだろうか？つまり、ハネモの核は、細胞膜に区画されないにもかかわらず器官としてのアイデンティティーを持つのかという疑問が生じる。

## 2 イメージング

この疑問に答える手段を得るために、昨年はタンパク質局在解析手法の一つである免疫染色をハネモに適用し、報告した。ハネモの主軸は、中心部が液胞に満たされた直径約 100-300  $\mu\text{m}$  程度の筒状体である。筒の外殻には硬い細胞壁が存在し、そのままでは高分子物質を透過させることができなかった。そこでパラホルムアルデヒドで固定後、縦半分に切断して細胞壁を取り除き、得られた短冊状の藻体を用いたところ、免疫染色に成功した。そこで今回はこの手法を応用し mRNA の局在解析 Fluorescein in situ hybridization (FISH) の指摘条件を検討した。

コントロール実験としてハウスキーピング遺伝子 *EF1 $\alpha$*  と細胞骨格系遺伝子 *Tubulin  $\alpha$*  の mRNA 検出を試みた。藻体を固定し、エタノールで一度脱水した後に脱エタノールし、proteinase K 処理をしてサンプル内の mRNA を暴露し、ジコキシゲニン (DIG) 標識した RNA probe を mRNA にハイブリダイズさせ、そこにペルオキシダーゼ (POD) で標識した抗 DIG 抗体を結合させた。シグナル増強には TSA Plus Fluorescence Kits (Akoya Bioscience) を用いた。さらに、同じサンプルに抗チューブリン抗体による免疫染色を行い、二重染色を試みた（発表者の過去論文<sup>[4]</sup>手法を改変）。すると mRNA は主軸細胞質内に顆粒状に散在し、*Tubulin  $\alpha$*  の繊維とは共局在しないことがわかった（図2）。今後は器官特異的遺伝子群の mRNA 局在解析を行う予定である。

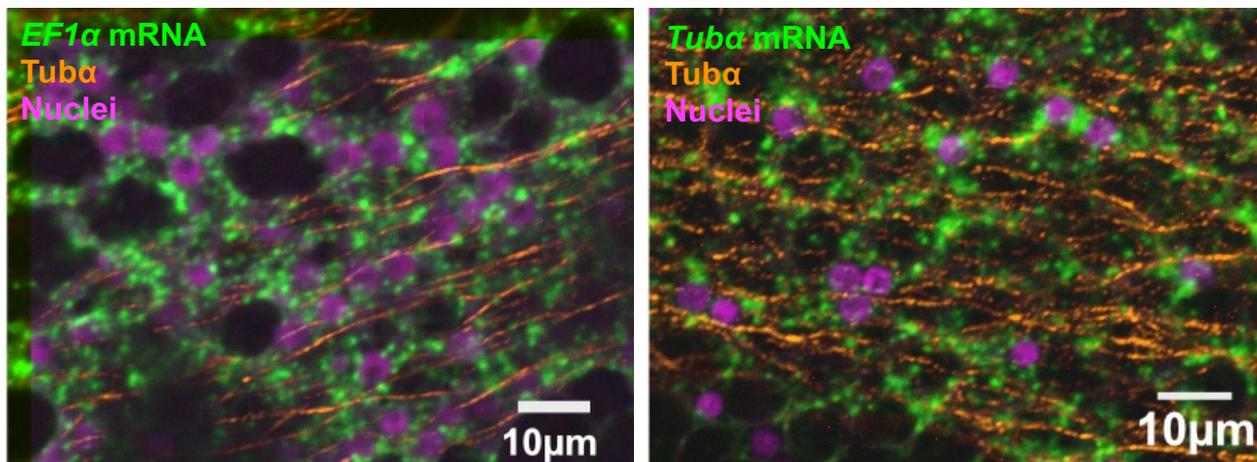


図2 ハネモの主軸における *EF1 $\alpha$*  (左) *Tubulin  $\alpha$*  (右) mRNA とチューブリンの局在

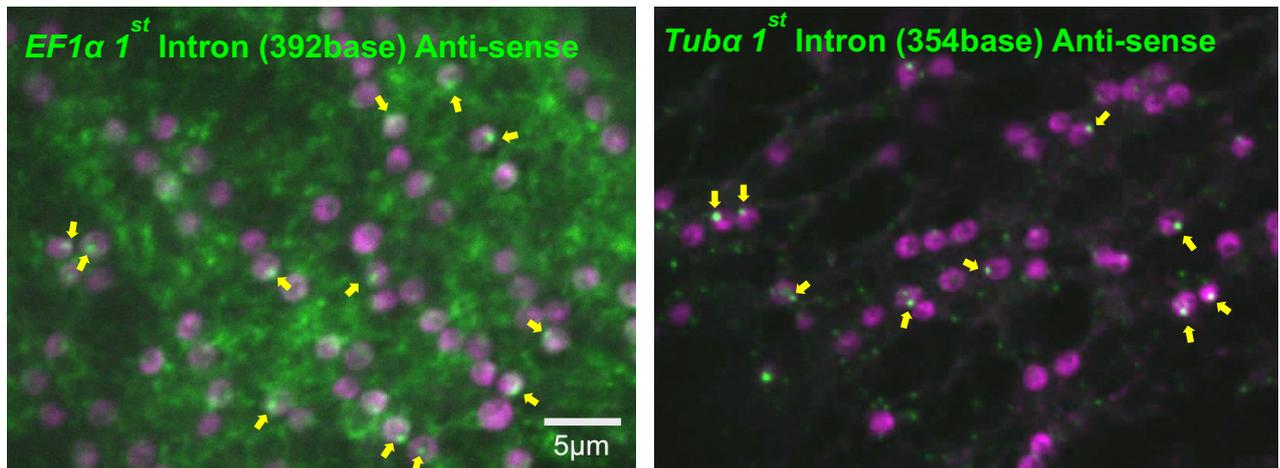


図3 ハネモの主軸における *EF1α* (左) *Tubulin α* (右) pre mRNA の局在

次に、ハネモ細胞内の各器官に局在する核が特異的遺伝子を発現しているのかどうかを、FISHで調べることは可能だろうか？核ゲノムからは intron を含む pre-mRNA が転写されるが、intron は mRNA が核外に移動する前にスプライシングにより除去される。そこで核内の pre-mRNA を検出するため intron の FISH を試みた。ハネモの *EF1α*、*Tubulinα* 遺伝子の intron に対する RNA probe を作製し、ハネモ主軸を用いて FISH を行ったところ、予想通り核局在が検出された（図3）。以上のように、ハネモにおける mRNA だけでなく pre-mRNA の FISH が可能となった。今後器官特異的な遺伝子のプローブを用いることで、各器官特異的に発現する遺伝子の mRNA がどの核から転写されるのか、明らかになるはずである。

より技術的なことに言及すれば、この実験で最も困難なのは各器官のサンプルを得ることである。主軸は比較的太くまっすぐな筒状でトリミングしやすいが、葉状部は細く、仮根はさらにクネクネと曲がっていることが多く、シート状のサンプルを得るのは難しい。サンプルに細胞壁が残ると非特異的なシグナルが増強される。現在、切断した主軸から仮根部を再生させて実験に用いようとしているが、今の培養環境では仮根が再生する頻度は出芽頻度に比べて極めて低く、サンプルが得られにくい。今後は仮根再生の頻度を上げるための工夫が必要になる。

### 3 展望

器官特異的に発現する遺伝子の mRNA や pre-mRNA がどのようにハネモ細胞内に局在しているのかが分かれば、次にそれらの遺伝子、さらにその局在性を制御する遺伝子の機能を明らかにしていくことになる。本稿では記載を控えるが、ハネモにおいては RNAi やゲノム編集といった機能解析手法も軌道に乗り始めている。今後、最も重要で未だ成功していない技術はライブイメージングである。現在は、形質転換やノックインといった技術によって蛍光タンパク質遺伝子をハネモゲノムに導入するための条件検討を続けている。

### 4 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。ハネモゲノム解析は東京工業大学の塙大輝氏、名古屋大学の落合乾大氏が行なった。ハネモ RNA-seq は落合乾大氏が行なった。ハネモイメージング技術開発は名古屋大学落合乾大氏・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 令和3-5年度「新規モデル海藻の培養・研究技術開発」令和6年度「大型海藻ハネモにおけるゲノム編集技術開発」から助成を受けた。厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] 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*. *The Plant Journal*. 119(2):1091-1111.
- [2] 白江-倉林麻貴 (2024) 「名大発新規モデル海藻の開発」第3回東海国立大学機構技術発表会 <https://www.tech.nagoya-u.ac.jp/archive/r05/Vol3/honkou/o6.pdf>
- [3] 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>
- [4] Shirae-Kurabayashi M, Matsuda K, Nakamura A. (2011) Ci-Pem-1 localizes to the nucleus and represses somatic gene transcription in the germline of *Ciona intestinalis* embryos. *Development*.138: 2871-2881.