

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		海産大型紅藻スサビノリにおける遺伝子発現および遺伝子破壊技術の確立			
研究テーマ (欧文) AZ		Establishment of the systems for expression and disruption of genes in sea red macrophyte <i>Porphyra yezoensis</i>			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓)ミカミ	名)コウジ	研究期間 B	2007 ~ 2008 年
	漢字 CB	三上	浩司	報告年度 YR	2009 年
	ローマ字 CZ	Mikami	Koji	研究機関名	北海道大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		国立大学法人 北海道大学大学院水産科学研究院・准教授			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>海産紅藻スサビノリ <i>Porphyra yezoensis</i> は、我国の海苔養殖の主要原料であり、その栄養価や経済性の高さから日本を代表する水産食資源としてその重要性が認識されている。そのため高品質、高生産性のスサビノリを開発するための分子育種法の緊急な確立が求められている。しかし、スサビノリを含む全ての大型海藻類において分子育種の基本となる遺伝子操作技術、特に外来遺伝子の導入と発現が不可能であるため、本研究では、スサビノリにおける外来遺伝子の発現系と遺伝子破壊系の確立を試みた。</p> <p>一過的外来遺伝子発現系の確立</p> <p>外来遺伝子の発現は大きく、一過的发現とゲノムへの遺伝子挿入による構成的発現に分けられるが、本研究ではまず一過的外来遺伝子発現系の開発を試みた。その結果、1) 導入遺伝子のコドン頻度を GC に富んだスサビノリのそれに合わせるよう塩基置換を行なうこと、2) 改変遺伝子の発現をスサビノリ遺伝子(アクチン遺伝子など)のプロモーターで制御すること、により世界で初めて大型海藻類において一過的外来遺伝子発現が可能となった。この技術開発により、GFP 等の蛍光タンパク質をレポーターとした遺伝子の機能解析が可能となり、実際に遺伝子産物の細胞内局在や遺伝子プロモーター領域の解析を行うことができた。これらの成果はすでに論文として報告することができている。</p> <p>遺伝子破壊系の確立</p> <p>本研究期間において、ゲノムへの DNA 挿入による遺伝子破壊技術は確立できなかった。大きな原因は、1) スサビノリがほとんど全ての抗生物質や除草剤に耐性であり、DNA 挿入におけるマーカー遺伝子を特定できなかった、2) マーカー遺伝子の発現に用いる外来遺伝子のプロモーターを見出すことができなかった、3) 葉状体における遺伝子導入細胞の単離・培養方法を確立できなかった、などが挙げられる。今後はこれらを解決し、世界に先駆けて遺伝子組換えスサビノリの作出を成功させたい。</p>					
キーワード FA	スサビノリ	海産紅藻類	一過的外来遺伝子発現		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）										
雑誌	論文標題 ^{GB}	Visualization of phosphoinositides via the development of the transient expression system of a cyan fluorescent protein in the red alga <i>Porphyra yezoensis</i> .								
	著者名 ^{GA}	Mikami, K., Uji, T., Li, L., Takahashi, M., Yasui, H., and Saga, N.	雑誌名 ^{GC}	<i>Mar. Biotechnol.</i>						
	ページ ^{GF}	563～569	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	11	
雑誌	論文標題 ^{GB}	Ca ²⁺ influx and phosphoinositide signalling are essential for the establishment and maintenance of cell polarity in monospores from the red alga <i>Porphyra yezoensis</i> .								
	著者名 ^{GA}	Li, L., Saga, N., and Mikami, K.	雑誌名 ^{GC}	<i>J. Exp. Bot.</i>						
	ページ ^{GF}	3477～3489	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	59	
雑誌	論文標題 ^{GB}	Visualization of nuclear localization of transcription factors with cyan and green fluorescent proteins in the red alga <i>Porphyra yezoensis</i> .								
	著者名 ^{GA}	Uji, T., Takahashi, M., Saga, N., and Mikami, K.	雑誌名 ^{GC}	<i>Mar. Biotechnol.</i>						
	ページ ^{GF}	in press	発行年 ^{GE}	2	0	0	9	巻号 ^{GD}	3	
図書	著者名 ^{HA}									
	書名 ^{HC}									
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}		
図書	著者名 ^{HA}									
	書名 ^{HC}									
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}		

欧文概要 E Z

Since the marine red alga *Porphyra yezoensis* is a major material for “Nori” production in Japan with high nutritive and economical values, urgent establishment of molecular breeding methods of *P. yezoensis* is expected for improvement of its quality and yield. However, gene transfer and genome manipulation systems have not yet been established in any marine macrophytes. In the present study, I tried to establish foreign gene expression and gene disruption systems in *P. yezoensis*.

Establishment of transient gene expression system

I found two important factors for efficient expression of foreign genes. One is an adjustment of the codon usage of foreign genes to that of *P. yezoensis* genes, and the other is a use of strong promoters of *P. yezoensis* genes, such as *actin1* and *GAPDH* genes. According to these improvements, promoter analysis with the β-glucuronidase reporter and protein localization analysis with fluorescent proteins have been performed successfully (Mikami *et al.*, 2009; Uji *et al.*, 2009).

Trying an establishment of the gene disruption system

I was not able to establish the gene disruption system based on the integration of foreign gene into the *P. yezoensis* genome. There are three major reasons: 1) Since *P. yezoensis* is tolerant for many kinds of antibiotics and herbicides, it was difficult to determine marker genes for selection of transformants, 2) it was difficult to determine a foreign gene promoter to drive the marker gene expression based on the characteristics of promoters from *P. yezoensis*, and 3) it was difficult to isolate transformed cells from gametophytes after gene transfer using the particle bombardment method. In near future, I hope to resolve these problems to establish the stable transformation system in macrophyte for the first in the world.