



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	クラミドモナス
Author(s)	福澤, 秀哉; 久保, 雄昭
Description	1章 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 3
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 17-21
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39085
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-004.pdf



3. クラミドモナス

福澤 秀哉¹⁾, 久保 雄昭¹⁾

緑藻クラミドモナス (和名, コナミドリムシ) は最も単純な細胞構造を持つ真核光合成生物であることから, 古くから光合成研究に用いられてきた^{1,2)}. 2007 年秋, 日米欧の研究者の協力によって JGI (<http://genome.jgi-psf.org/>) から雌株ゲノムのドラフト配列が公開された³⁾. 細胞の形質転換法の確立やレポーター遺伝子の整備も進み, 高等植物 (シロイヌナズナ) と原核光合成微生物 (シアノバクテリア) との間の橋渡しをするモデル生物として利用されている. 光合成を行ない鞭毛によって泳ぎ回るこのユニークな単細胞性の緑藻 (鞭毛虫) には, 太古の原始細胞が植物細胞や動物細胞に分岐した進化のヒントが秘められている. ここでは, クラミドモナスの特徴について概説するとともに, クラミドモナス実験室株の入手法や培養法について述べる⁴⁾.

Resources and culture of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*

Hideya Fukuzawa, Takeaki Kubo

Chlamydomonas reinhardtii is a biflagellate green alga, which has the simplest system in photosynthetic eukaryote. Moreover, the draft genome sequence of *Chlamydomonas* that has features similar to both plants and animals has been released in 2007. In this chapter, we introduce the characteristics of this unicellular organism and how to obtain and maintain the laboratory strains.

3.1 クラミドモナスの特徴

クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* は分子遺伝学的手法を取りうる唯一の緑藻で, 学術雑誌 Cell に “Green Yeast” と紹介され⁵⁾, 動植物の特徴を兼ね備えている (図 1). クラミドモナスは雌雄異株で *mt*⁺ と *mt*⁻ という 2 つの性 (接合型) に分かれており, どちらも有性生殖と無性生殖の両方の生活環を持つ (図 2). 葉緑体ゲノム (203 kb) が最初に発見され⁶⁾, その形質転換が最初に成功した生物種である⁷⁾. 現在では核 (約 120 Mb, *n*=17) とミトコンドリアを含めた 3 つのゲノムすべてについて遺伝子導入が可能となっており, 次のような特徴を持つ⁸⁾.

- ① 光合成, 呼吸, 生殖, (母性) 遺伝, 鞭毛運動などの生命現象に関わる変異株の単離が容易である.
- ② 葉緑体, チラコイド膜などの細胞構成成分の単離が比較的容易である.
- ③ 培養が容易で, 世代時間が約 5 時間と短い.
- ④ 雄雌株を掛け合わせ, 四分子を使った遺伝解析ができる.
- ⑤ ドラフトゲノム配列と EST 配列が公開され, ゲノ

ム地図が整備されている.

- ⑥ 核, 葉緑体でそれぞれ機能するレポーター遺伝子 (ARS⁹⁾, Luciferase¹⁰⁾, GFP¹¹⁾ など) や形質転換体の選抜に使用可能な薬剤耐性マーカー遺伝子 (ゼオシン, パロモマイシン, ハイグロマイシンなど) が使える.
- ⑦ 多細胞体制をとるボルボックスやゴニウムやプレオドリナなどの群体性藻類と進化上近縁であり, クラミドモナスの比較研究から多細胞生物の起源を示唆する



図 1: クラミドモナスの光学顕微鏡写真
クラミドモナスは等長の二本の鞭毛で遊泳し, 一つの大きな葉緑体で光合成を行う真核性緑藻である. 葉緑体の中に見える構造体は「ピレノイド」と呼ばれる構造体で, 炭酸固定の場になっている (矢印). スケールバーは 5 μ m を示す.

1) 京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野

研究も進められている。また、炭酸固定を制御する因子¹⁹⁾や、ピノレン酸（松の実に多く含まれる脂質）の生合成に関わる脂肪酸不飽和化酵素²⁰⁾など多様な研究に利用されている。

現在、実験室で利用されている株の多くは、1945年に G. M. Smith 博士が米国マサチューセッツ州の Amherst のジャガイモ畑で採取された雌雄一対の株に由来する⁴⁾。

3.2 ゲノムプロジェクト

クラミドモナスのゲノムサイズは約 120 Mbp で、その 13 倍をカバーするショットガン配列データから 1,557 スキャフォールドの配列が米国 DOE-JGI から公開された³⁾。配列はウェブサイト上で閲覧や BLAST 検索も可能である (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/>)。このショットガンゲノム解析には、雌株 CC-503 (cw92, mt+) が用いられた。このゲノムについては、遺伝マーカーの連鎖解析から染色体数は 17 本と推定されていたが、74 本のスキャフォールドが 17 本の染色体を形成し、ゲノムの 78% に相当する 95 Mbp の領域をカバーしている。EST 情報と遺伝子予測プログラムを用いて、15256 種の蛋白質コード領域が推定され、そのうち 56% の 8,631 種の発現が EST 情報より確認されている。雄株については、日本で C-9 株を標準株として、ゲノムライブラリーならびに EST 解析が進められている^{12,13)}。これまでに、低 CO₂ ストレス¹⁴⁾、強光ストレス¹⁵⁾、配偶子誘導¹⁶⁾、概日リズム¹⁷⁾、接合子形成¹⁸⁾に関する遺伝子が、cDNA アレイを用いて同定されている。特にこの cDNA アレイ作製には、多くの国内クラミドモナス研究者と「かずさ DNA 研究所」が協力した。現在も「クラミドモナス研究会」で活発な情報交換が行われている。

染色体上の遺伝子地図と物理地図、さらにゲノム配列のデータベースの充実によって、目的の遺伝子を単離するポジショナルクローニングが可能になりつつある。ゲノムライブラリー、EST ライブラリーの標準化が進められており、簡便な形質転換法が確立されている(第 5 章-2 参照)ので、他の生物を扱っている研究者も容易に利用できる環境が整ってきた。

3.3 株ならびにプラスミド DNA 等の入手方法

クラミドモナスの実験室株（野生株ならびに突然変異株）、ならびに各種有用プラスミド DNA は、複数の保存

機関から入所可能であるが、米国のクラミドモナスセンターが最も規模として大きい。ウェブサイト (www.chlamy.org) で情報を検索することができ、有償で分譲を受けることができる。EST 解析に用いられた野生型雄株 C-9 (mt-) は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトで支援を受けて国立環境研究所の微生物系統保存施設 (<http://mcc.nies.go.jp/>) で NIES-2235 株として保存されており入手できる。EST クローンは、かずさ DNA 研究所 (<http://est.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>) から入手できる。また、C-9 株のゲノムクローンと完全長 cDNA クローンについては、京都大学 (<http://chlamy.pmb.lif.kyoto-u.ac.jp/>) から公開される予定である。

3.4 培地と培養法

クラミドモナスは、液体培地、寒天培地のいずれでも培養が可能である。標準的な培地としては酢酸を炭素源として含む TAP 培地と、独立栄養培養に適した最小栄養 HSM 培地がある⁴⁾。長期で保存するときには、斜面 TAP 培地を作製し 18°C で保存が可能である（通常 2-3 ヶ月程度）。また液体窒素中での凍結保存技術も確立されつつある (www.chlamy.org/methods/)。ここでは、標準的な培地である TAP ならびに HSM 培地（液体・プレート）の作製法と培養法、クラミドモナス保存用のスラント培地について述べる。

[準備]

・TAP 培地

TAP 塩ストック液	10 ml
リン酸ストック液	1 ml
Hutner トレースエレメント	10 ml
(寒天末	15 g*)
+ 蒸留水	1 L

任意の容量に分注後、オートクレーブする。

・TAP 塩ストック液

NH ₄ Cl	40 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5 g
Tris	242 g
酢酸	100 ml
+ 蒸留水	1 L

・リン酸ストック液

K ₂ HPO ₄	10.8 g
KH ₂ PO ₄	5.6 g
+ 蒸留水	100 ml

・Hutner トレースエレメント

Na ₂ -EDTA	5.0 g
ZnSO ₄ ・7 H ₂ O	2.2 g
H ₃ BO ₃	1.14 g
MnCl ₂ ・4 H ₂ O	0.51 g
CoCl ₂ ・6 H ₂ O	0.16 g
CuSO ₄ ・5 H ₂ O	0.16 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ・4 H ₂ O	0.11 g
FeSO ₄ ・7 H ₂ O	0.50 g
KOH	1.6 g
+ 蒸留水	1 L

オートクレープして室温に2日ほど保存すると、緑色から赤紫色に変色する。

・HSM 培地

No.1 ストック溶液	10 ml
No.2 ストック溶液	10 ml
Hutner トレースエレメント	10 ml
(寒天末)	15 g ^{*2})
+ 蒸留水	1 L

2 M KOH で pH 7.0 に調整する。ただし、培地の pH 変化を抑えたい場合は、終濃度 20 mM MOPS バッファー (pH 7.2) を添加する。任意の容量に分注した後、オートクレープ処理する。

・No.1 ストック溶液

NH ₄ Cl	50 g
MgSO ₄ ・7 H ₂ O	2.0 g
CaCl ₂ ・2 H ₂ O	1.0 g
+ 蒸留水	1 L

・No.2 ストック溶液

K ₂ HPO ₄	144 g
KH ₂ PO ₄	72 g
+ 蒸留水	1 L

A. TAP 培地での前培養

1) スラントまたは TAP 寒天培地上に生えているクラミドモナスのコロニーを、5 ml の TAP 培地を分注した試験管 (例えば、14 ml 容のポリプロピレンチュー

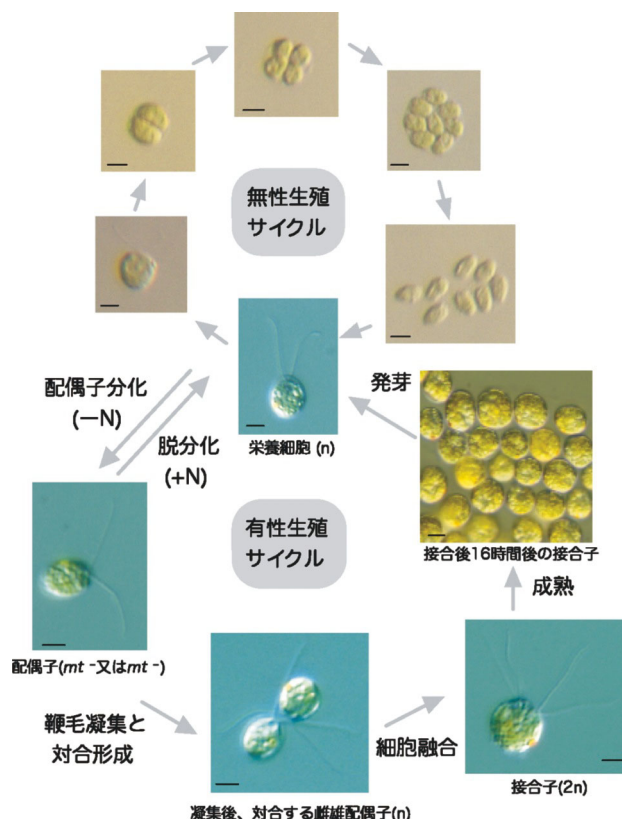


図2：クラミドモナスの生活環

クラミドモナスは雌雄の性(接合型)をもつ栄養細胞がそれぞれ独立して無性分裂を繰り返す無性生殖サイクルと、窒素源枯渇によって誘導される配偶子分化、両配偶子による鞭毛凝集、接合子形成を経て2セットの雌雄娘細胞を形成する有性生殖サイクルを持つ。スケールバーは5 μmを示す(文献2を改変)。

ブ), または 20~30 ml の TAP 培地を分注した 100 ml 容の三角フラスコに無菌的に接種する (図 2-A)。

2) 100~150 μmol・m⁻²・sec⁻¹ の光照射下で静置培養する。細胞は 3~4 日ほどで対数増殖期に達する。

3) 常に実験に使用できる前培養溶液として 7 日~10 日毎に新しい TAP 培地に植え換える。

B. TAP プレートでの培養

1) スラントまたは TAP 寒天培地上に生えているクラミドモナスのコロニーを、滅菌した白金耳、ニクロム線または爪楊枝で画線培養する。

2) プレートを逆さまにして 100~150 μmol・m⁻²・sec⁻¹ の光照射下で培養する。3~4 日ほどで寒天プレート上にシングルコロニーを形成する (図 2 B)。

3) サージカルテープを巻いて乾燥を防ぎ、5~20 μmol・m⁻²・sec⁻¹ の比較的暗い場所で保存する。

C. TAP（液体）での培養

- 1) 乾熱滅菌処理した 100 ml 三角フラスコに TAP 培地を 50 ml 分注する。
- 2) TAP 液体培地で前培養していたクラミドモナス培養液を 1/100~1/50 希釈で接種する。
- 3) 約 80 rpm で攪拌しながら、 $100\sim150\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ の光照射下で培養する。3~4 日で対数増殖期に達する（図 3 C）。

D. スラント培地でのクラミドモナス細胞の長期保存

- 1) TAP(+1.5%の寒天末)に終濃度 0.4%(W/V)の割合で Yeast Extract (DIFCO 社)を加え、湯浴させて溶解させた後、スクリュキャップ付きガラス試験管に 5 ml 分注し、オートクレーブ処理する。
- 2) オートクレーブ後、固まる前にガラス試験管をチューブラックに立て、傾斜をつけてスラント培地を固化させる。
- 3) 寒天プレート上のクラミドモナスのコロニー、あるいは前培養の TAP 培地から白金耳を用いて、スラント培地に画線培養の要領で接種する（図 3 A）。
- 4) $100\sim150\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ の光照射下で培養し、ス

ラント培地上に細胞が生えてきたら、弱光下（ $5\sim20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ）、 18°C で培養する。

- 5) スラント培地上の細胞の様子を観察しながら、2~3 ヶ月に一度植え換えを行う。

E. HSM（液体・寒天）培地での培養

- 1) 通気用シリコンチューブと培養栓〔例えばシリコセン（信越ポリマー株）〕付の大試験管を乾熱滅菌処理し、これに HSM 培地を 50 ml 分注する。
- 2) TAP 培地で前培養していたクラミドモナス培養液を 1/100~1/50 希釈で接種する。
- 3) おだやかに通気しながら、 $100\sim150\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ の光照射下で培養する。3~4 日で対数増殖期に達する（図 3 C）。

〈注意〉照度を下げて前培養時した細胞を植え替えて、急に照度を上げると細胞が白化する場合があるので、照度は測定して管理する必要がある。

〈謝辞〉貴重なコメントを頂いた京都大学大学院理学研究科の西村芳樹先生に感謝します。

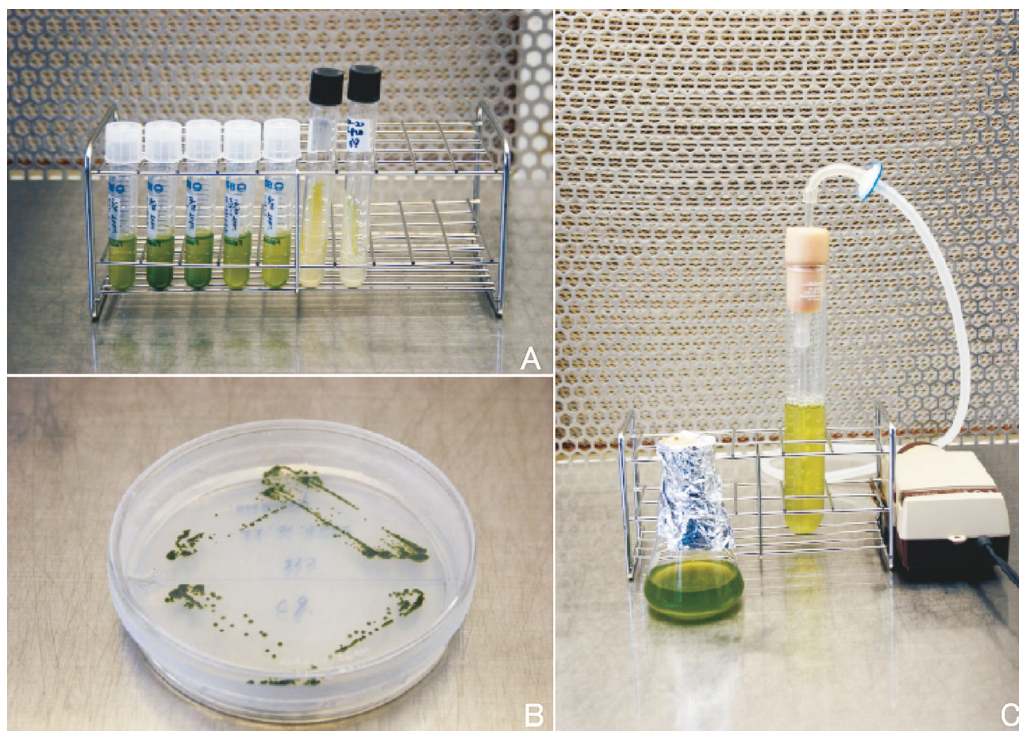


図 3：クラミドモナスの培養の様子。

A. クラミドモナス細胞を TAP 培地（5 ml；14 ml 容ラウンドチューブ）に静置培養したものと、長期保存用のスラント培地（スクリュキャップ付きガラスチューブ）で培養したもの。B. クラミドモナス細胞を画線培養した TAP プレート。シングルコロニーを形成する。C. TAP 培地（100 ml 三角フラスコに 20 ml の培養液）での静置培養，ならびに大試験管での通気培養。右は、50 ml の HSM 培地に、滅菌フィルター（直径 25 mm，ポアサイズ $0.2\ \mu\text{m}$ のシリンジフィルター）を通して通気している。

引用文献

- 1) 高橋裕一郎, 福澤秀哉, 蛋白質核酸酵素 (共立出版) **45** (2000) P.1937.
- 2) 福澤秀哉, 久保雄昭, 山野隆志, 蛋白質核酸酵素 (共立出版) **53** (2008) P.1133.
- 3) S. Merchant et al., Science **318** (2007) P.245.
- 4) E. H. Harris, The *Chlamydomonas* Sourcebook 2nd Ed. (2009) Vol. 1, Academic Press.
- 5) U. W. Goodwinnough, Cell **70** (1992) P.533.
- 6) R. Sager, & M. R. Ishida, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **50** (1963) P.725.
- 7) J. E. Boynton, N. W. Gilham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randorph-Anderson, D. Robertoson, T. M. Klein, & K. B. Shark, Science **240** (1988) P.1534.
- 8) E. H. Harris, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. **52** (2001) P.363.
- 9) J. P. Davis, D. P. Weeks, & A. R. Grossman, Nuc. Acid Res. **20** (1992) P.2529.
- 10) T. Matsuo, K. Onai, K. Okamoto, J. Minagawa, & M. Ishiura, Mol. Cell. Biol. **26** (2006) P.863.
- 11) M. Fuhrman, W. Oertel, & P. Hegemann, Plant J. **19** (1999) P.353.
- 12) E. Asamizu, Y. Nakamura, S. Sato, H. Fukuzawa, & S. Tabata, DNA Res. **6** (1999) P.369.
- 13) E. Asamizu, K. Miura, K. Kucho, Y. Inoue, H. Fukuzawa, K. Ohyama, Y. Nakamura, & S. Tabata, DNA Res. **7** (2000) P.305.
- 14) K. Miura, T. Yamano, S. Yoshioka, T. Kohinata, Y. Inoue, F. Taniguchi, E. Asamizu, Y. Nakamura, S. Tabata, K. T. Yamato, K. Ohyama, & H. Fukuzawa, Plant Physiol. **135** (2004) P.1595.
- 15) T. Yamano, K. Miura, & H. Fukuzawa, Plant Physiol. **147** (2008) P.340.
- 16) J. Abe, T. Kubo, Y. Takagi, T. Saito, K. Miura, H. Fukuzawa, & Y. Matsuda, Curr. Genetics **46** (2004) P.304.
- 17) K. Kucho, K. Okamoto, S. Tabata, H. Fukuzawa, & M. Ishiura, Plant Mol. Biol. **57** (2005) P.889.
- 18) T. Kubo, J. Abe, T. Oyamada, M. Ohnishi, H. Fukuzawa, Y. Matsuda, & T. Saito, Plant Cell Physiol. **49** (2008) P.981.
- 19) T. Kohinata, H. Nishino & H. Fukuzawa, Plant Cell Physiol. **49** (2008) P.273.
- 20) M. Kajikawa, K. T. Yamato, Y. Kohzu, S. Shoji, Y. Sakai & H. Fukuzawa, Plant Cell Physiol. **47**: 64-73 (2006).