HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	核ゲノム
Author(s)	福澤, 秀哉; 久保, 雄昭
Description	5章 形質転換 2. クラミドモナス a
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, 587-590
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39197
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-081.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

2．クラミドモナス
a．核ゲノム

福澤　秀哉[1)]，久保　雄昭[1)]

緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* は，核，葉緑体，ミトコンドリアの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，外来遺伝子の導入や遺伝子タギング法による突然変異株の作製も容易になっている[1,2)]．本稿では，クラミドモナスの核ゲノムの2種類の形質転換法（エレクトロポレーション法・ガラスビーズ法）を紹介する．

Nuclear transformation methods for a green algae, *Chlamydomonas reinhardtii*

Hideya Fukuzawa, Takeaki Kubo

The nuclear transformation techniques are powerful tools for isolation of new mutants, and also for complementation of mutant phenotypes by introducing exogenous DNA segments into the nuclear genome. We described two methods for nuclear genome transformation in a green algae, *Chlamydomonas reinhardtii*. Linealized DNA fragments encoding selectable markers can be introduced into the nuclear genome by using electroporation and glass beads. Especially dominant selectable markers are useful for the selection of transformants for gene tagging.

2.a.1　クラミドモナスの形質転換

クラミドモナスの核ゲノムの形質転換は，1990年にKindleによって初めてガラスビーズ法による形質転換法が報告されて以来，広く行われるようになった[3−5)]．また1998年にはエレクトロポレーション法による高効率の形質転換法も開発され[6)]，ガラスビーズ法と共に一般的な形質転換法として利用されている．また栄養要求性変異株を宿主にしたマーカー遺伝子や，選抜マーカーとしての薬剤耐性遺伝子も報告されており，実験の目的に応じたマーカーの選択を行うことが可能になっている（表1）．栄養要求性マーカー（硝酸還元酵素）や薬剤耐性マーカーを使った遺伝子タギング法は新しい遺伝子の発見につながる有用な方法である[7,8)]．宿主として用いるクラミドモナスの栄養要求性変異株や野生株，ならびにマーカー遺伝子は開発者もしくは米国のChlamydomonas Center（http://www.chlamy.org/）から入手可能である（第1章-3参照）．

2.a.1.1　エレクトロポレーションによる核ゲノムの形質転換

細胞のDNAによる形質転換には，細胞壁が障害となるので，細胞壁の不完全な変異株を使うことが多い．細胞壁が正常な株を形質転換に使いたい場合は，クラミドモナス由来の細胞壁溶解酵素ガミートライシン（マトリクス・メタロプロテアーゼ）を使って細胞壁を除去して使用する[9)]．ただし，完全に細胞壁を失った細胞は物理的に弱いので，使用する株毎に処理条件を検討する必要がある．

［試料］
- pSP124S[注1] 制限酵素EcoRIで切断し，線状DNAにしておく．
- クラミドモナス宿主株CC-2627（5D：*nit1-305*，*cw15*，*mt*$^-$）[注2]

［試薬］
- TAP培地[注3]
- TAP-50 mM Sucrose[注4]

1）京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野

注1　RbcS2プロモーターにコドン適合型ゼオシン耐性遺伝子（*Ble*）を連結させたコンストラクト．http://www.chlamy.org/plasmids.htmlから入手可能．表1参照．
注2　硝酸還元酵素遺伝子 *NIT1* と細胞壁欠損（*cw*）の変異株．エレクトロポレーション法及び後に述べるガラスビーズ法では，細胞壁合成酵素の変異株を用いることが多いが，この株は，完全に細胞壁を失っているわけではなく，形態は卵形である．
注3　TAP培地の作製法については，第1章-3参照．
注4　浸透圧調整用．

表1：クラミドモナ核ゲノムの形質転換に利用できるマーカー遺伝子や薬剤耐性遺伝子

マーカー遺伝子	酵素名	宿主株	選択培地・抗生物質	文献
NIT1（*NIA1*）	Nitrate reductase	*nit1*⁻ 株	TAP（NO_3）培地	5，10
THI10	Hydroxyethylthiazole kinase	*thi10*⁻ 株	Thiamin 添加培地	11
ARG7	Argininosuccinate lyase	*arg7*⁻ 株	TAP-アルギニン添加培地	12
BLE	Zeocin 結合タンパク質	野生株	Zeocin 添加培地	13，14
APHVII	Aminoglycoside 3′ -phosphotransferase VII	野生株	パロモマイシン添加培地	15
APHVIII	Aminoglycoside 3′ -phosphotransferase VIII	野生株	ハイグロマイシン添加培地	16

・1.2% 選択培地

［器具・装置］

・培養用エアインキュベーター
・Gene PulserII（BioRad）
・滅菌済み爪楊枝
・滅菌済み平底 96 穴タイタープレート
・エレクトロポレーション用キュベット（電極間距離 4 mm）

［方法］

1）宿主株5Dを，TAP培地1 lで26°C，100～150 μmol・m^{-2}・sec^{-1} 光照射下で1～2×10^{6}cells/ml（対数増殖期）まで培養する．
2）培養液を一部採取し，10% glutaraldehyde を 1/10 量添加して細胞を固定し，血球計算板で細胞数を測定する．
3）700×g で 10 分間遠心して集藻し，細胞を 1×10^8 cells/ml になるように TAP＋50 mM Sucrose で再懸濁する．
4）形質転換に用いる pSP124S 溶液を 20 μg 加える．
5）4 mm キュベットに細胞懸濁液 250 μl を移し，15°C で 5-15 分冷却する．
6）電気パルスを一回加える[注5]．
7）ポレーション処理後の細胞を 15 ml FALCON TUBE に分注した TAP 培地 12 ml に懸濁し，ローテーターで回転させながら 100～150 μmol・m^{-2}・sec^{-1} の光照射下で 16 時間培養する．
8）抗生物質 Zeocin を 10 μg/ml 含む 1.2% TAP プレートにスプレッダーで均一に広げ，5 分間静かに置いて，細胞を寒天培地になじませる．
9）シャーレを裏返して 100～150 μmol・m^{-2}・sec^{-1} の光照射下，26°Cで培養し，約一週間すると，形質転換体のコロニーが得られる（図 1）[注6]．
10）コロニーを滅菌爪楊枝で拾い，TAP 寒天培地に画線し，1 日培養した後に，0.2 ml の TAP 培地を分注したタイタープレートに移して細胞が生え揃うまで培養する．

2.a.1.2 ガラスビーズ法を用いた核ゲノムの形質転換[4)]

［試料］

・クラミドモナス宿主株 CC-2627（5D；*nit1-305*，*cw15*，*mt*⁻）
・プラスミド DNA pMN24E[注7]

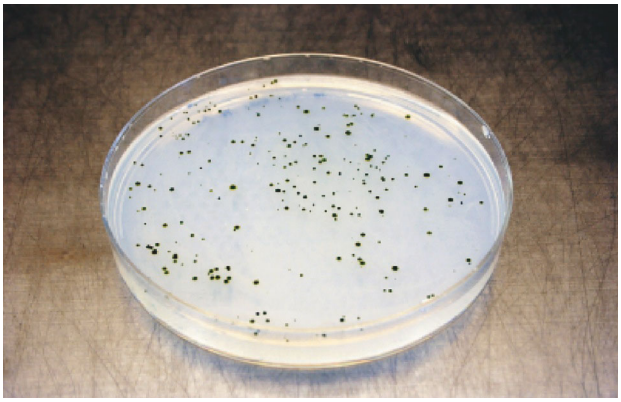

図1：エレクトロポレーション法によってゼオシン含有培地上に生育した形質転換体

注5 ジーンパルサーIIを用いた場合の設定は，キャパシタンス 25 μF，負荷電圧 2,000 V/cm（＝800 V/4 mm）バイパス抵抗としてセメント抵抗（330 Ω）を電極間に配線する．この条件で時定数は 5.0 程度（4.5～5.5）を示す．

注6 約一週間でコロニーが見え始め，2 週間目までの間に 1～2 mm の大きさになる．シャーレの蓋に水滴が付いたままだと，雑菌が混入する可能性があるので，定期的にクリーンベンチ内で除く．

注7 硝酸還元酵素遺伝子 *NIT1* 全長を含むプラスミド DNA（pMN24）を *Eco*RI で切断後，フェノール処理・エタノール沈殿して使用する．表 1 参照．

[試薬]
・TAP 培地
・$TAP_{(NO3)}$ 培地[注8]
・20% PEG（6000）溶液（シグマ）[注9]

[器具・装置]
・ボルテックスミキサー VORTEX-GENIE 2（Scientific industries）
・培養用インキュベーター
・滅菌済み平底 96 穴タイタープレート
・直径 0.35〜0.5 mm のガラスビーズ（イウチ）[注10]

[方法]
1）宿主株 CC-2627 を，1 L の TAP 培地中で，26°C，100〜150 μmol・m^{-2}・sec^{-1} 光照射下で 1〜2×10^6 cells/ml（対数増殖期）まで培養する．
2）培養液を一部採取し，10% グルタルアルデヒドを 1/10 量添加して細胞を固定し，血球計算板で細胞数を測定する．
3）700×g，20°C，10 分間遠心して集藻し，上清を十分に取り除く[注11]．
3'）細胞壁をもつ株を用いる場合には，ここで集めた細胞をオートライシンを含む酵素液に懸濁して 15〜30 分，光照射しながらゆっくりと振盪して細胞壁を除く[注12]．
4）沈殿した細胞を TAP（NO_3）培地で 2×10^8cells/ml になるよう再懸濁する．
5）5 ml のガラスビーズを入れた 50 ml 遠沈管に細胞懸濁液を 5 ml 加える．
6）20 μg の pMN24E プラスミド DNA（濃度 1 μg/μl）と，1.66 ml の 20%PEG（6000）溶液を加える．
7）ボルテックスを最高速度にして，30 秒撹拌する．
8）遠沈管の 50 ml の目盛りまで TAP（NO_3）培地を加えて細胞をよく懸濁し，ガラスビーズがよく底に沈むよう，遠沈管を立てたまま 10 秒程度静置する．
9）上清を新しい 50 ml 遠沈管に移す．
10）700×g，20°C，10 分間遠心して集藻し上清を捨てる．
11）1 ml の TAP（NO_3）培地を加えてボルテックスにより細胞を再懸濁する．
12）一枚の TAP（NO_3）プレートあたり 0.1-0.5 ml の細胞懸濁液をスプレッダーで均一に広げ，細胞が流れなくなるまで静置する．
13）シャーレを逆さにして 26°C，100〜150 μmol・m^{-2}・sec^{-1} の光照射下，約 10-14 日間静置培養する．
14）コロニーを爪楊枝で拾い，0.2 ml の TAP（NO_3）培地を分注したタイタープレートに移して細胞が生え揃うまで培養する[注13]．

[トラブルシューティング]
1．形質転換効率が低い．
主な原因として宿主株の細胞壁が再生している可能性がある．細胞壁の有無の検定を次のように行う．250 μl の培養液に 0.075% Triton-X，5 mM EDTA を加え，5-10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する．攪拌後の細胞を顕微鏡で観察すると，細胞壁欠損の細胞は破壊されるが，細胞壁が残っていると生細胞が観察される．もし細胞壁が再生していれば株のストックからシングルコロニーをとり，細胞壁の薄いものを選び出す．もしくは，細胞壁溶解酵素を使って細胞壁を除く操作を加える．

2．バクテリアの混入がみられる．
50 μg/ml のアンピシリンを含む TAP プレートに画線培養し，シングルコロニーを単離し直すとよい．また形質転換の前に少量の LB 培地に細胞懸濁液を加えて一晩 37°Cで振とう培養し，バクテリアの混入がないことを確認しておく．

〈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．

参考文献

1）福澤秀哉・九町健一・三浦謙治：植物のゲノム研究プロ

注8 TAP 培地の塩ストック液の NH_4Cl を KNO_3 で置き換えたもの．
注9 脱イオン水に溶解し，120°Cで 15 分間オートクレーブ後，遮光して室温で保存する．
注10 濃硫酸に 30 分ほど沈め，その後十分な流水で硫酸を除く．さらに 180°Cで 3 時間乾熱滅菌処理してから，滅菌済み 50 ml 遠沈管に 5 ml づつ分注しておく．
注11 培地中に含まれるアンモニア塩が残ると，形質転換株の選抜時宿主株も生育してしまうので，滅菌済マイクロピペットを用いて可能な限り除去する．
注12 野生株の雌雄配偶子を高効率で接合させ，30 分後の細胞液を遠心した上清液をガミトライシンの粗酵素液として利用する．−80°Cで 3 ヶ月程度は保存が可能である．
注13 筆者らの研究室では，透明アクリル製のデシケータに，三角フラスコに入った水をくぐらせた 1 %CO_2 ガスを含む空気を通気して培養している．ガスを水中に通すことでチャンバー内の湿度を高く保つことができ，培地の乾燥を防ぐことができる．また光合成に必要な CO_2 ガスを供給することにより増殖速度が上昇する．

トコール（佐々木卓治・田畑哲之・島本　功監修），pp.169-178，秀潤社（2001）.
2）福澤秀哉，久保雄昭，山野隆志，蛋白質核酸酵素（共立出版）Vol.53（9）（2008）P.1133.
3）K. L. Kindle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (1990) P. 1228.
4）H. Fukuzawa, K. Ishizaki, K. Miura, S. Matsueda, T. Ino-ue, K. Kucho, & K. Ohyama, Can. J. Bot. **76** (1998) P. 1092.
5）K. Kucho, S. Yoshioka, F. Taniguchi, K. Ohyama, H. & Fukuzawa, Plant Physiol. **133** (2003) P.783.
6）K. Shimogawara, S. Fujiwara, A. Grossman, H. & Usuda, Genetics **148** (1998) P.1821.
7）H. Fukuzawa, K. Miura, K. Ishizaki, K. Kucho, T. Saito, T. Kohinata, & K. Ohyama, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98** (2001) P.5347.
8）T. Matsuo, K. Okamoto, K. Onai, Y. Niwa, & K. Shimogawara, M. Ishiura, Genes Dev. **22** (2008) P.918.
9）Y. Matsuda, & T. Kubo, Gametolysin. *In* Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd ed. Academic Press. (2004) P. 1140.
10）K. L. Kindle, R. A. Schnell, E. Fernandez, & P. A. Lefebvre, J. Cell Biol. **109** (1989) P.2589.
11）P. J. Ferris, Genetics **141** (1995) P.543.
12）R. Debuchy, S. Purton, & J. D. Rochaix, EMBO J. 8 (1996) P.1432.
13）D. R. Stevens, S. Purton, & J. D. Rochaix, Mol. Gen. Genet. **251** (1996) P.245.
14）V. Lambreras, D. R. Stevens & S. Purton, Plant J. **14** (1998) P.1441.
15）P. Berthold, R. Schmitt, & W. Mages, Protist **153** (2002) P.401.
16）I. Sizoba, M. Fuhrman, & P. Hegemann, Gene **277** (2001) P.221.