

緑藻 *Tetrastichococcus* sp. P1 株のエレクトロポレーションを用いた形質転換法の検討

齋藤 亮佑 (筑波大学生物学類)

指導教員：前田 義昌 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

緑藻 *Tetrastichococcus* sp. P1 株はマレーシア泥炭地から単離された微細藻類である。泥炭地とは、樹木等が分解しきらず、有機物が蓄積した環境のことを指し、強酸性を示す水を多く含むという特徴がある。*Tetrastichococcus* sp. P1 株は pH 7 よりも pH 3 における生育速度が早い好酸性藻類であり、カドミウムに強い耐性をもつことが示されている[1,2]。この好酸性の特徴は、大規模培養の際に、強酸性条件で培養することで、他の微生物によるコンタミネーションを防げるという利点につながる。一方、カドミウム耐性については、*Tetrastichococcus* sp. P1 株がカドミウムに汚染された水環境をバイオレメディエーションにより浄化できる可能性を示唆する。しかしながら、*Tetrastichococcus* sp. P1 株の好酸性、カドミウム耐性のメカニズムはまだ明らかになっていない。

特に、カドミウム耐性については、先行研究により *Tetrastichococcus* sp. P1 株がカドミウムに暴露された際に高発現する金属輸送体が特定された[2]。しかし、これらの輸送体が金属イオンを細胞外から細胞内へ取り込む importer なのか、細胞外へ排出する exporter なのかは分かっていない。この疑問を解明するためのアプローチの一つとして、候補輸送体の遺伝子を用いて *Tetrastichococcus* sp. P1 株を形質転換させ、カドミウムイオンの動態を調べる方法がある。だが、*Tetrastichococcus* sp. P1 株において形質転換法は未だ確立されていない。そのため、本研究では、*Tetrastichococcus* sp. P1 株のエレクトロポレーションを用いた形質転換法の検討を行った。

【材料・方法】

1. 微細藻類の培養

Tetrastichococcus sp. P1 株は、Modified BG-11 培地 (pH4) [1] を用い、25 °C、光量子束密度 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で 120 rpm の振盪培養により培養した。培地には、50 $\mu\text{g/mL}$ アンピシリンを添加した。形質転換体を選抜する際は、5 $\mu\text{g/mL}$ ハイグロマイシン B を添加した。

2. プラスミド構築

Tetrastichococcus sp. P1 株の細胞を超音波破碎した。細胞破碎液に含まれる DNA をテンプレートとして、PCR によりルビスコ小サブユニット (RbcS) プロモーター、及びグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) ターミネーターを増幅した。また、当研究室が保有していたプラスミド pTiso_Lhcf17-PyAph7 をテンプレートとして、アミノグリコシド 7'-リン酸基転移酵素遺伝子 (Aph7) を PCR で増幅した。Aph7 は抗生物質であるハイグロマイシン B の耐性遺伝子である。次に、pSP73 を *EcoR* V により制限酵素処理を行った。これら 4 つの DNA 断片を In-fusion 反応により結合させ、プラスミド pSP73-Aph7 を構築した。

3. エレクトロポレーション

対数増殖期の細胞を高張液 (0.3 M マンニトール、0.3 M ソルビトール) で処理した。その後、形質転換バッファー (0.2 M マンニトール、0.2 M ソルビトール、80 mM KCl、5 mM

CaCl₂、10 mM HEPES) に約 1×10^6 個の細胞及び *Pvu* II で線状化した pSP73-Aph7 (5 μg) を加え、電極間距離 2 mm のキューベットを用いて、エレクトロポレーションを行った。電圧が 100 - 1500 V の単一パルス、200 - 1000 V の二重パルスをそれぞれ細胞に印加した。パルス印加後の細胞を暗条件において回復培養をした後に、5 $\mu\text{g/mL}$ ハイグロマイシン B 含有 Modified BG-11 寒天培地 (pH7) に播種した。その後、25 °C、70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ において培養した。

【結果・考察】

1. 高発現遺伝子のプロモーター、ターミネーターの探索

先行研究で取得されたトランスクリプトームデータを解析したところ、RbcS 遺伝子の RPKM は、酸性、及び中性条件下でそれぞれ 12,625 と 11,313 であった。GAPDH 遺伝子の RPKM は、酸性及び中性条件下でそれぞれ 2,652 と 2,799 であった。これらの遺伝子は両条件下において高発現していたため、RbcS 遺伝子の上流 440 bp と GAPDH 遺伝子の下流 400 bp を目的遺伝子の発現のためのプロモーター、及びターミネーターとして、それぞれ利用することとした。

2. 形質転換体の作出

1500 V のパルスを細胞に印加した際に、アーク放電が起こった。パルス印加後の細胞を寒天培地に播種した後、いずれの印加条件においても約 3 週間の培養を経てコロニーの形成が見られた。プラスミド非添加条件下と比較して、プラスミド有添加条件下では、多くのコロニーが形成された (Fig. 1)。

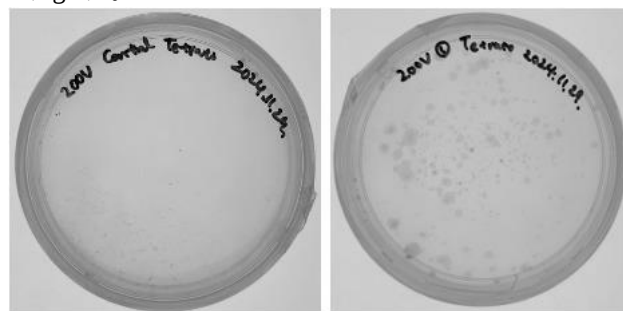


Fig. 1 エレクトロポレーション後の *Tetrastichococcus* sp. P1 株のコロニー形成 細胞に 200 V の単一パルスを印加し、ハイグロマイシン B 含有寒天培地に播種した後、3 週間後のコロニー形成の様子を示す。左はプラスミド非添加条件、右はプラスミド有添加条件を示す。

【今後の展望】

寒天培地上で生育している細胞に pSP73-Aph7 が維持されているかを PCR により確認する。

【参考文献】

- [1] Sahabudin et al. (2022) *J Appl Phycol*, 34, 1881 - 1892
- [2] Sahabudin et al. (2024) *Bioengineered*, 15, 2314888