

サンゴ共生藻における形質転換技術開発の現状と展望

石井悠, 丸山真一郎

東北大学大学院生命科学研究科

〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

Yuu Ishii, Shinichiro Maruyama

Methods for genetic transformation of coral symbiont algae:

Current status and future directions

Keywords: algae, cnidarian animals, endosymbiosis, *Symbiodinium*, transformation

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

6-3, Aramaki Aza-Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8578, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8c5.00124

1. 褐虫藻：動物と共生する藻類

1-1. 褐虫藻とは

単細胞藻類の中には海産無脊椎動物と共生関係にある種が存在し、中でも刺胞動物（クラゲ・サンゴ・イソギンチャクなど）に細胞内共生する渦鞭毛藻類（*Symbiodinium* spp.）は褐虫藻と呼ばれ（図）、貧栄養の熱帯・亜熱帯海域の生態系を支える一次生産者としての大きな役割を担っている。サンゴ礁において、共生藻である褐虫藻の光合成で作られたエネルギーの 90%は宿主であるサンゴに受け渡されているとも言われている（井上 2007）。なお広義には、褐虫藻（zooxanthella）とは海産無脊椎動物に共生する黄色ないし茶褐色の単細胞藻類の総称であるが、本稿では刺胞動物に共生する *Symbiodinium* spp. を狭義の褐虫藻として扱う。

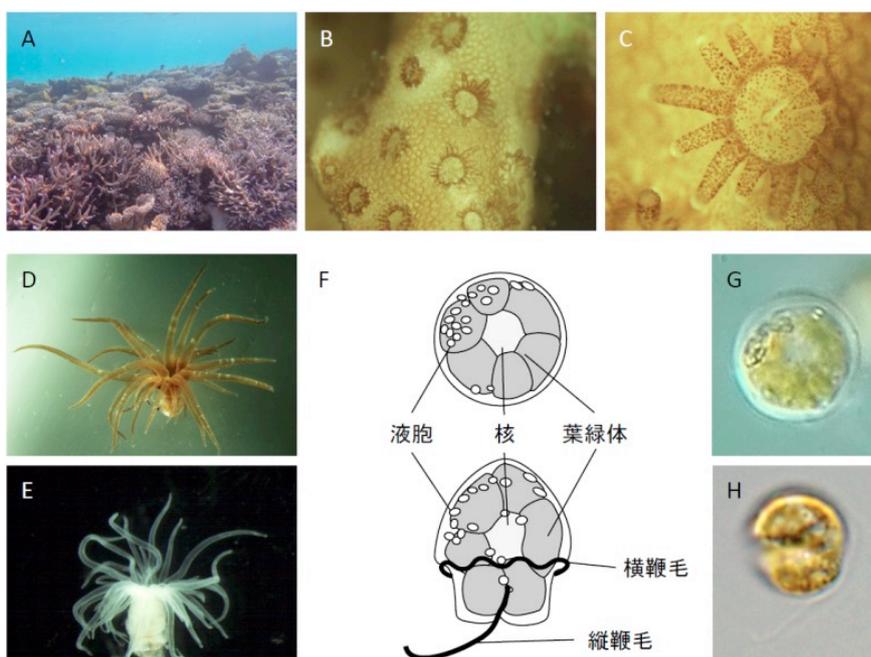


図 刺胞動物と共生する褐虫藻
 (A) 熱帯海域のサンゴ礁 (B,C) 褐虫藻を共生させる造礁サンゴ（刺胞動物門花虫綱イシサンゴ目ハナヤサイサンゴ科）(D) 褐虫藻を共生させたセイタカイソギンチャク (*Exaiptasia pallida*) (E) 「白化処理」により非共生状態にしたセイタカイソギンチャク (F) 褐虫藻模式図 (上: 球形細胞, 下: 遊泳細胞) (G) 褐虫藻 (*Symbiodinium* sp. clade B) 球形細胞 (H) 褐虫藻 (*Symbiodinium* sp. clade B) 遊泳細胞

1-2. サンゴと褐虫藻の共生研究

造礁サンゴにおいては、共生の崩壊により褐虫藻がサンゴから抜け落ち、最終的にサンゴ自体が死滅へと向かう「白化現象」が起こることが知られ、数多くの研究が行われてきた。サンゴの白化現象には「色素の喪失」と「藻体の喪失」という二段階の過程があること、様々な外的因子（温度、日照、活性酸素、pH など）が関与していることなどが報告されている（Brown 1997, Takahashi et al. 2008）。

また、サンゴと褐虫藻の種レベルの相互関係を明らかとするため、褐虫藻の分子系統学及び群集地理学的アプローチによる研究も行われている。サンゴに共生している褐虫藻は形態的には同一に見えても、実際には複数の種（分子系統により識別される「クレード」として扱われることも多い）が存在し（Rowan & Powers 1991）、サンゴの生息する海域によって異なるクレードの褐虫藻が共生している（諏訪, 井口 2009）。さらに刺胞動物の中でも、サンゴでは発生段階が進むに従って共生させる褐虫藻の種類が減少する（特異性が高くなる）が、褐虫藻を共生させるイソギンチャク的一种では幼生と成体で同様の取り込み傾向を持つことが明らかになっている（Hambleton et al. 2014）。

1-3. 宿主刺胞動物からの共生メカニズム解明へのアプローチ

近年、褐虫藻の宿主であるサンゴのゲノム情報が解読され（Shinzato et al. 2011）、次世代シーケンサーを利用した遺伝子発現量解析では、褐虫藻と共生していない幼生のサンゴがはじめて褐虫藻と共生する際には、サンゴの細胞内で代謝機能や食胞に関連する遺伝子の発現制御がごく初期にのみ変化する可能性が示唆され（Mohamed et al. 2016）、今後より詳細な解析が進むことが期待される。一方、実験的な取り扱いの難しいサンゴ種に代わり、褐虫藻を細胞内に共生させる刺胞動物のモデル生物として、褐虫藻を共生させない状態でも生存できるセイタカイソギンチャクが注目されており、ゲノム解読も完了している（Baumgarten et al. 2015）。セイタカイソギンチャクの共生状態と非共生状態におけるプロテオーム解析が行われ、共生状態では脂質や窒素代謝に関与するタンパク質の発現が高くなることが示される（Oakley et al. 2016）など、宿主側の共生状態の分子メカニズムを明らかにするためのツールが徐々に整備されつつある。

1-4. 褐虫藻からの共生メカニズム解明へのアプローチ

宿主側からのみならず、近年褐虫藻2種のゲノムが解読された（Lin et al. 2015, Shoguchi et al. 2013）ことから、褐虫藻側からの共生に関わる遺伝子発現の解析、さらには遺伝子の機能に関する研究が進展することが期待される。その一方でコピー数の極端に増加した遺伝子ファミリーや、他の生物種には見られない特殊なゲノム構造を持つことも示され（Maruyama et al. 2015, Shoguchi et al. 2013）、褐虫藻に特化した遺伝子・ゲノムの機能解析ツールの開発を行うことが急務となっている。

2. 様々な光合成生物における形質転換法

2-1. 形質転換法が必要とされる理由

順遺伝学的手法で変異個体を解析することができれば、ゲノム機能解析を行う上で非常に強力なツールとなるが、微細な褐虫藻の形態変異や、刺胞動物との共生の可否などの表現型を元に変異体のスクリーニングや単離を行うのは非常に困難である。このような場合、ゲノム機能解析には逆遺伝学的手法が利用できるかどうかの研究を進展させていく上での大きな鍵となるが、それには遺伝子導入法の開発が

不可欠である。

2-2. 他の植物における形質転換（真核微細藻類を中心に）

遺伝子導入法は全ての生物で共通の方法が確立されている訳ではなく、個別の種に対応した導入法の開発が求められる。これまでに多くの光合成生物で遺伝子導入法が確立されており、導入方法の開発は直接的に様々な生物における遺伝子機能解析の進展に貢献してきた（表）。

遺伝子の導入方法は大きく分けて、（1）直接外来遺伝子を物理的・化学的に導入する方法と、（2）アグロバクテリウムやウイルスを介した外来遺伝子への生物学的応答機構を利用して導入する方法がある。（1）の方法としては、現在では PEG（ポリエチレングリコール）法やエレクトロポレーション法（電気穿孔法）、パーティクルガン法が主に用いられている。紅藻の *Cyanidioschyzon merolae* には PEG 法による遺伝子導入が有効であることが報告されている（Minoda et al. 2004, Ohnuma et al. 2008）。一倍体である原糸体を形成するヒメツリガネコケ（*Physcomitrella patens*）などでは、酵素により細胞壁などを溶かしプロトプラストの状態にしてからエレクトロポレーション法や PEG により遺伝子導入をする方法がよく用いられている（Schaefer et al. 1991, Schaefer & Zryd 1997）。エレクトロポレーション法自体にも開発が進んでおり、NEPA21 システムを用いた珪藻（*Phaeodactylum tricornerutum*）の遺伝子導入では、細胞への電気パルスを段階的にかけることでより細胞へのダメージを低減し、導入効率を上げることに成功している（Miyahara et al. 2013）。また、金やタングステン粒子に遺伝子 DNA を付着させて打ち込むパーティクルガン法は多くの真核微細藻類で用いられ、珪藻（*Phaeodactylum tricornerutum*）（Apt et al. 1996）やクロララクニオン藻（*Amorphochlora amoebiformis*）（Hirakawa et al. 2008）などで使用されている。（2）の方法としては、植物に感染して DNA を送り込む性質を持つアグロバクテリウムを用いて外来遺伝子配列を挿入する形質転換法が挙げられる。モデル陸上植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）やイネ（*Oryza sativa*）では、特別な機器を必要とせず、導入効率が高いことからこの方法がよく用いられている（Clough & Bent 1998, Hiei et al. 1994）。

3. 褐虫藻及び近縁種における形質転換

3-1. これまでに報告のある遺伝子導入法の詳細

過去に褐虫藻への遺伝子導入は2つのグループから報告されている。初めて報告した ten Lohuis and Miller は刺胞動物と共生関係にある *Symbiodinium microadriaticum* に、silicon carbide (SiC) ウィスカー（針状結晶）と外来遺伝子を混合することで、遺伝子導入を行っている（ten Lohuis & Miller 1998）。本報告では、薬剤耐性遺伝子を発現するプラスミドを基本構造とし、カリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA 転写プロモーターまたはアグロバクテリウムの p1'2'プロモーターの下流にレポータータンパク質である β -グルクロニダーゼ（GUS）の配列をつなぎ、酵素反応により蛍光分子を放出する基質を用いた GUS 蛍光解析及び、褐虫藻に発色基質である X-Gluc を反応させ検出する GUS 染色解析により導入を確認している。形質転換効率は $5-24/10^7$ (cells/cells) であった。

ten Lohuis and Miller の報告後、褐虫藻の遺伝子導入の報告はしばらく行われず、新たな遺伝子導入法が発表されたのは17年後の2015年、Ortiz-Matamoros らによるものであった（Ortiz-Matamoros et al. 2015a, b）。Ortiz-Matamoros らの報告では、近年ゲノムが解読された *Symbiodinium kawagutii* (Lin et al. 2015) と、*Symbiodinium* sp. Mf11.5b.1 (Mf11), *Symbiodinium microadriaticum* subsp. *microadriaticum* (S.KB8) に対し

てグラスビースと PEG を併用した方法 (Ortiz-Matamoros et al. 2015a) と土壌細菌のアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を用いた方法 (Ortiz-Matamoros et al. 2015b) で遺伝子導入を行っている。形質転換効率を向上させることに成功した後者の方法では、植物で恒常発現を誘導するアグロバクテリウムの nos プロモーターを用いて、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の microtubule binding domain (MBD), actin-binding domain 2 of fimbrin (FABD2), Receptor for activated C kinase 1C (AtRACK1C) のタンパク質の下流に GFP を融合して発現するプラスミドを使用している。導入の成功は RT-PCR による発現量解析と顕微鏡観察による観察により確認している。形質転換効率は *S. kawagutii* で $839/10^6$, Mf11 で $640/10^6$, *S.KB8* で $460/10^6$ (cells/cells) であった。

ten Lohuis and Miller らの報告では導入遺伝子を安定的に発現する株が樹立されたとの報告があるが、その後検証されていない。また、Ortiz-Matamoros らの2つの報告では一過性の遺伝子導入が可能であることは示されたが、導入された遺伝子が安定的に発現する株を得ることはできていない。このように、褐虫藻に対する遺伝子導入法の開発は未だに発展途上であり、更なる手法の改良が期待される。

3-2. 褐虫藻の近縁種における遺伝子導入

ここでは褐虫藻におけるゲノム機能解析の発展を牽引するような先行研究を紹介したい。渦鞭毛藻の近縁種でカキの寄生虫であるパーキンサス (*Perkinsus marinus*) では、ゲノム機能解析技術について多くの研究がなされている。Fernández-Robledo らの報告では、*P. marinus* の細胞膜タンパク質 MOE のプロモーターの下流に蛍光タンパク質 (GFP) をつないだ DNA コンストラクトを Cell Line Optimization Nucleofector Kit (LONZA 社) という細胞株最適化に特化したエレクトロポレーション法で導入しており、この時の導入効率は38%と非常に高い (Fernández-Robledo et al. 2008)。本報告では、蛍光顕微鏡観察により、遺伝子導入された細胞を分離し、RT-PCR 法及びサザンブロット法にて遺伝子導入を確認している。さらに Sakamoto らの報告では、ブレオマイシン耐性遺伝子の配列をコンストラクトに組み込むことで、遺伝子導入個体の薬剤スクリーニングが可能となり、遺伝子導入に成功した個体の単離を容易に行うことができるようになった (Sakamoto et al. 2016)。

3-3. 褐虫藻の遺伝子導入をより改良するために必要なこと

先に述べたように、褐虫藻の遺伝子導入に関しては過去に2つの報告があるものの、他の研究グループによる再現性は未だ確認されておらず、ゲノム機能解析への応用までは至っていない。褐虫藻の近縁種である *P. marinus* における遺伝子導入の成功により期待は高まっているものの、いつ、どの研究施設で行っても同様の結果が得られるような、簡便で高効率な遺伝子導入のプロトコルの確立・実用化のためには更なる方法論の検討が必要である。褐虫藻以外の植物細胞で遺伝子導入が汎用されている例を見るに、汎用性の高い遺伝子導入法の開発には大きく分けて3つの項目の検討が必要であると考えられる。

1. 遺伝子導入方法や条件の検討、試薬や機械の改良による導入効率の改善
2. プロモーター配列など発現ベクターの改良によるマーカー遺伝子の発現効率の改善
3. 薬剤スクリーニングなどの適切な選択マーカーの調査による選択効率の改善

1に関しては、これまでの褐虫藻の遺伝子導入に関する検討では、物理的に SiC ウィスカーで穴を開

けて導入する方法と、アグロバクテリウムを介した導入方法が報告されているが、他の PEG 法、エレクトロポレーション法などを検討する事で、より改善される可能性が考えられる。

2については個々の生物が持つゲノムの性状を最大限に考慮する必要がある。渦鞭毛藻類はコアヒストンを含むヌクレオソーム構造を持たない、ゲノム中に真核生物に共通の TATAbox プロモーター配列が見つからない (將口 2014) といった特殊な核ゲノムを持つ。また、mRNA のトランススプライシングが起きている (Zhang et al. 2007) など、転写後調節において特徴的なメカニズムを持つことも知られている。これらのことから、褐虫藻の生物学的特徴に合わせた外来遺伝子発現ベクターを作成するため、導入する外来遺伝子の配列を褐虫藻のコードン使用頻度に最適化する、実際に高発現している遺伝子のプロモーター領域を使用するなどの工夫が必要となる可能性も高い。近年褐虫藻 2 種 (*Symbiodinium kawagutii*, *Symbiodinium minutum*) の全ゲノム配列が報告されたことにより (Lin et al. 2015, Shoguchi et al. 2013), 発現コンストラクトを個々の褐虫藻株に最適化することが可能となり、より実用性の高い遺伝子導入法の開発に大きく貢献するものと考えられる。

3に関して、実際に遺伝子導入を用いた実験を行う場合、簡単に遺伝子導入された細胞のみを抗生物質により選抜できる事は大きな強みとなるが、抗生物質の効果は種によって異なる事から、適切に薬剤を選定しスクリーニングする系を確立する事が重要である。ただし、大量の遺伝子導入個体を使用しないような実験や、選択効率が非常に高くスクリーニングが簡便である場合などは、遺伝子導入効率自体は必ずしも高い必要はない。Hirakawa and Ishida の研究では、クロララクニオン藻に最適化した発現ベクターと、薬剤選抜を経ることなく単一細胞内でのタンパク局在を解明することに特化した実験系を構築し、葉緑体へのタンパク質輸送のメカニズムを明らかにした (Hirakawa & Ishida 2010)。このように、他のモデル生物で確立されている条件を満たすことにこだわらず、研究の目的や材料に合わせた遺伝子導入法を選択することが重要である。

4. 今後の展望

近年 TALEN や CRISPR/Cas9 といったゲノム編集技術の開発が進んでおり、実験に必要とされる条件の制限が少ないことから、非モデル生物においても応用されつつある (Reid & O'Brochta 2016)。植物においては、モデル生物であるシロイヌナズナやタバコ、コムギで成功例が報告されており (Li et al. 2013, Nekrasov et al. 2013, Shan et al. 2013), 緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) や真正眼点藻 *Nannochloropsis* でも CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集が報告されている (Baek et al. 2016, Shin et al. 2016, Wang et al. 2016)。

遺伝子導入法開発に王道なしと言われるように、それを志す当事者はひたすら可能性のありそうなパラメータを試し続けるという文字通り暗中模索、五里霧中の日々を過ごさざるを得ないということも少なくない。しかし、ひとたび褐虫藻の安定的な遺伝子導入法が確立されれば、遺伝子機能喪失 (ノックアウト) 個体を得ることができる遺伝子ターゲティングがなどの解析方法も応用可能となり、ますますゲノム機能解析が進むものと予想される。こうした遺伝子機能解析法が拡充していくことで、これまでの知見や近年明らかとなったゲノム情報などが活用され、サンゴと褐虫藻の共生関係の成立と崩壊の分子メカニズムがより詳細に明らかになることを期待したい。

謝辞

本稿を上梓するにあたり、東北大学・河田雅圭教授、中山卓郎博士、基礎生物学研究所・鎌田このみ博士に多大なるご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

引用文献

- Apt, K.E., Kroth, P.G., & Grossman A.R. 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mol. Gen. Genet.* 252:572–579.
- Baek, K., Kim, D.H., Jeong, J., Sim, S.J., Melis, A., et al. 2016. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Sci. Rep.* 6:30620.
- Baumgarten, S., Simakov, O., Esherick, L.Y., Liew, Y.J., Lehnert, E.M., et al. 2015. The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112:11893–11898.
- Brown, B.E. 1997. Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs.* 16:S129–138.
- Chen, H.L., Li, S.S, Huang, R., & Tsai, H. 2008. Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* 44:768–776.
- Chen, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhang, L., & Li, W. 2001. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Curr. Genet.* 39:365–370.
- Chow, K.C., & Tung, W.L. 1999. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Rep.* 18:778–780.
- Clough, S.J., & Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735–743.
- Dawson, H.N., Burlingame, R., & Cannons, A.C. 1997. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Curr. Microbiol.* 35:356–362.
- Debuchy, R., Purton, S., & Rochaix, J.D. 1989. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J.* 8:2803–2809.
- Doetsch, N.A., Favreau, M.R., Kuscuglu, N., & Thompson, M.D. 2001. Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic *psbK* operon. *Curr. Genet.* 39:49–60.
- Dunahay, T.G., Jarvis, E.E., & Roessler, P.G. 1995. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J. Phycol.* 31:1004–1012.
- Fernández-Robledo, J.A, Lin, Z., & Vasta, G.R. 2008. Transfection of the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157:44–53.
- Hambleton, E.A., Guse, A., & Pringle, J.R. 2014. Similar specificities of symbiont uptake by adults and larvae in an anemone model system for coral biology. *J. Exp. Biol.* 217:1613–1619.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271–282.
- Hirakawa, Y., & Ishida, K. 2010. Internal plastid-targeting signal found in a RubisCO small subunit protein of a chlorarachniophyte alga. *Plant J.* 64:402–410.
- Hirakawa, Y., Kofuji, R., & Ishida, K. 2008. Transient transformation of a chlorarachniophyte alga, *Lotharella amoebiformis* (Chlorarachniophyceae), with *uidA* and *egfp* reporter genes. *J Phycol.* 44:814–820

- 井上 功 2007. 藻類30億年の自然史 –藻類から見る生物進化・地球・環境–. 東海大学出版会. 神奈川.
- Kindle, K.L. 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:1228–1232.
- Lapidot, M., Raveh, D., Sivan, A., Arad, S.M., & Shapira, M. 2002. Stable chloroplast transformation of the unicellular red alga *Porphyridium* species. *Plant Physiol.* 129:7–12.
- Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., et al. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotechnol.* 31:688–691.
- Lin, S., Cheng, S., Song, B., Zhong, X., Lin, X., et al. 2015. The *Symbiodinium kawagutii* genome illuminates dinoflagellate gene expression and coral symbiosis. *Science.* 350:691–694.
- Maruyama, S., Shoguchi, E., Satoh, N., & Minagawa, J. 2015. Diversification of the light-harvesting complex gene family via intra- and intergenic duplications in the coral symbiotic alga *Symbiodinium*. *PLoS ONE.* 10:e0119406.
- Minoda, A., Sakagami, R., Yagisawa, F., Kuroiwa, T., & Tanaka, K. 2004. Improvement of culture conditions and evidence for nuclear transformation by homologous recombination in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 45:667–671.
- Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y., & Ifuku, K. 2013. Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by multi-pulse electroporation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:874–876.
- Mohamed, A.R., Cumbo, V., Harii, S., Shinzato, C., Chan, C.X., et al. 2016. The transcriptomic response of the coral *Acropora digitifera* to a competent *Symbiodinium* strain: the symbiosome as an arrested early phagosome. *Mol. Ecol.* 25:3127–3141.
- Muto, M., Fukuda, Y., Nemoto, M., Yoshino, T., Matsunaga, T., & Tanaka, T. 2013. Establishment of a genetic transformation system for the marine pennate diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580—a high triglyceride producer. *Mar. Biotechnol.* 15:48–55.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J.D.G., & Kamoun, S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 31:691–693.
- Oakley, C.A., Ameismeier, M.F., Peng, L., Weis, V.M., Grossman, A.R., & Davy, S.K. 2016. Symbiosis induces widespread changes in the proteome of the model cnidarian *Aiptasia*. *Cell Microbiol.* 18:1009–1023.
- Ohnuma, M., Yokoyama, T., Inouye, T., Sekine, Y., & Tanaka, K. 2008. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 49:117–120.
- Ortiz-Matamoros, M.F., Villanueva, M.A., & Islas-Flores, T. 2015a. Transient transformation of cultured photosynthetic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) with plant-targeted vectors. *Cien. Mar.* 41:21–32.
- Ortiz-Matamoros, M.F., Islas-Flores, T., Voigt, B., Menzel, D., Baluška, F., & Villanueva, M.A. 2015b. Heterologous DNA uptake in cultured *Symbiodinium* spp. aided by *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS ONE.* 10:e0132693
- Poulsen, N., Chesley, P.M., & Kröger, N. 2006. Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (bacillariophyceae). *J. Phycol.* 42:1059–1065
- Poulsen, N., & Kröger, N. 2005. A new molecular tool for transgenic diatoms: control of mRNA and protein biosynthesis by an inducible promoter-terminator cassette. *FEBS J.* 272:3413–3423
- Reid, W., & O'Brochta, D.A. 2016. Applications of genome editing in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 13:43–54.

- Rowan, R., & Powers, D.A. 1991. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science*. 251:1348–1351.
- Sakamoto, H., Kita, K., & Matsuzaki, M. 2016. Drug selection using bleomycin for transfection of the oyster-infecting parasite *Perkinsus marinus*. *Parasitol. Int.* 65:563–566
- Sawahel, W., Onde, S., Knight, C., & Cove, D. 1992. Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue by using the gene gun. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:314–315.
- Schaefer, D., Zryd, J.P., Knight, C.D., Cove, D.J. 1991. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 226:418–424.
- Schaefer, D.G., & Zryd, J.P. 1997. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 11:1195–1206
- Schiedlmeier, B., Schmitt, R., Müller, W., Kirk, M.M., Gruber, H., et al. 1994. Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:5080–5084.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., et al. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31:686–688.
- Shin, S.E., Lim, J.M., Koh, H.G., Kim, E.K., Kang, N.K., et al. 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 6:27810
- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., et al. 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*. 476:320–323.
- 將口 栄一 2014. 渦鞭毛藻類の独特な核ゲノム. 原生動物学会雑誌 47, 5-12.
- Shoguchi, E., Shinzato, C., Kawashima, T., Gyoja, F., Mungpakdee, S., et al. 2013. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure. *Curr. Biol.* 23:1399–1408.
- Sun, Y., Gao, X., Li, Q., Zhang, Q., & Xu, Z. 2006. Functional complementation of a nitrate reductase defective mutant of a green alga *Dunaliella viridis* by introducing the nitrate reductase gene. *Gene*. 377:140–149.
- Sun, Y., Yang, Z., Gao, X., Li, Q., Zhang, Q., & Xu, Z. 2005. Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Mol. Biotechnol.* 30:185–192.
- 諏訪 僚太, 井口 亮 2009. 造礁サンゴに共生する褐虫藻の分子系統学的研究に関するレビュー. 日本サンゴ礁学会誌 第10巻, 13-23.
- Takahashi, S., Whitney, S., Itoh, S., Maruyama, T., & Badger, M. 2008. Heat stress causes inhibition of the *de novo* synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:4203–4208
- Tan, C., Qin, S., Zhang, Q., & Jiang, P. 2005. Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *J. Microbiol.* 43:361–365
- ten Lohuis, M.R., & Miller, D.J. 1998. Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *Plant J.* 13:427–435.
- Teng, C., Qin, S., Liu, J., Yu, D., Liang, C., & Tseng, C. 2002. Transient expression of *lacZ* in bombarded unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* 14:497–500

表 光合成生物における遺伝子導入法

植物名	学名	導入法	文献
シロイヌナズナ	<i>Arabidopsis thaliana</i>	アグロバクテリウム	Clough & Bent 1998
ヒメツリガネコケ	<i>Physcomitrella patens</i>	PEG ¹ パーティクルガン ²	¹ Schaefer et al. 1991 ² Sawahel et al. 1992
緑藻	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	パーティクルガン ¹ PEG ²	¹ Debuchy et al. 1989 ² Kindle 1990
	<i>Chlorella</i> spp.	グラスビーズ ¹ エレクトロポレーション ²	¹ Dawson et al. 1997 ² Chen et al. 2001 ² Chow & Tung 1999
	<i>Dunaliella</i> spp.	パーティクルガン ¹ エレクトロポレーション ²	¹ Tan et al. 2005 ² Sun et al. 2005, 2006
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	パーティクルガン	Teng et al. 2002
	<i>Volvox carteri</i>	パーティクルガン	Schiedlmeier et al. 1994
	<i>Ostreococcus tauri</i>	エレクトロポレーション	van Ooijen et al. 2012
紅藻	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	PEG	Minoda et al. 2004
	<i>Porphyridium</i> sp.	パーティクルガン	Lapidot et al. 2002
珪藻	<i>Cyclotella cryptica</i>	パーティクルガン	Dunahay et al. 1995
	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	パーティクルガン	Poulsen & Kröger 2005
	<i>Navicula saprophila</i>	パーティクルガン	Dunahay et al. 1995
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	パーティクルガン ¹ エレクトロポレーション (NEPAgene) ²	¹ Apt et al. 1996, ¹ Zaslavskaia et al. 2000 ² Miyahara et al. 2013
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	パーティクルガン	Poulsen et al. 2006
	<i>Fistulifera</i> sp.	パーティクルガン	Muto et al. 2013
真正眼点藻	<i>Nannochloropsis oculata</i>	エレクトロポレーション	Chen et al. 2008
渦鞭毛藻	<i>Amphidinium</i> sp.	silicon carbide whiskers	ten Lohuis & Miller 1998
	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	silicon carbide whiskers ¹ グラスビーズ+PEG ² アグロバクテリウム ³	¹ ten Lohuis & Miller 1998, ² Ortiz-Matamoros et al. 2015a ³ Ortiz-Matamoros et al. 2015b
	<i>Symbiodinium kawagutii</i>	グラスビーズ+PEG ¹ アグロバクテリウム ²	¹ Ortiz-Matamoros et al. 2015a ² Ortiz-Matamoros et al. 2015b
	<i>Symbiodinium</i> sp.	グラスビーズ+PEG ¹ アグロバクテリウム ²	¹ Ortiz-Matamoros et al. 2015a ² Ortiz-Matamoros et al. 2015b
	パーキンサス類	<i>Perkinsus marinus</i>	エレクトロポレーション
ユーグレナ藻	<i>Euglena gracilis</i>	パーティクルガン	Doetsch et al. 2001
クロラクニオン藻	<i>Amorphochlora amoebiformis</i>	パーティクルガン	Hirakawa et al. 2008