

海産有用藻類、特に褐藻植物における遺伝子組み換え技術に関する基礎的研究

長里千香子（北海道大学北方生物圏フィールド科学センター室蘭臨海実験所）

本研究は、北海道沿岸域において繁茂しているコンブなどが含まれる褐藻植物を研究対象とし、遺伝子組み換え体作製技術に向けての基礎的研究を行った。真核の藻類において、遺伝子組み換え技術が確立していると言えるのは、緑藻クラミドモナス、珪藻、渦鞭毛藻といずれも単細胞性藻類である。一方、大型藻においても、環境浄化や水産学的価値といった重要性とその有効利用が注目され、遺伝子組み換え体作製に関する研究が行われてはきている。しかしながら、それらの試験的研究の多くは陸上植物で一般的に用いられている発現ベクターを藻類細胞に導入するという方法であったため、レポーター遺伝子としてベクターに組み込まれている GUS の発現はみられたものの一過性であり、未だ確立された技術であるとは言いがたい状況である。安定な遺伝子組み換え体を得るために、宿主となる生物のゲノムに由来するプロモーター領域を明らかにし利用すること、発現ベクターを導入する生活環のステージ、および方法について検討を行うといったことを目的として研究を行ない、以下のような実験結果を得た。

実験室内で生活環を容易に完結させることができる褐藻カヤモノリを用い、発現が比較的高いと思われるポリペプチド鎖延長因子 (EF-1 α) の cDNA 配列およびそれに対応するゲノム配列を決定し、インバース PCR 法を用いて、転写開始点および転写終結点より上流、下流の配列を明らかにした。プロモーター領域としては転写開始点と思われる部分より上流 1kb、ターミネーター領域としては 3' full race 法の結果を受けて、下流 350bp に相当する部分と green fluorescence protein (GFP) をコードする遺伝子とをつなげたベクターを構築した。導入方法については、生活環の中で細胞壁を持たない生殖細胞を用いて、クラミドモナスで行われているグラスビーズ法を用いたが、導入はされていないようであった。現在は、パーティクルボンバートメントにより藻体細胞への導入の条件を検定中である。また、将来、トランスフォーマントを選択する方法として、数種の薬剤感受性のテストをしたところ、ブラストサイジン (75-100mg/ml) の存在化で培養することにより、カヤモノリ、コンブの配偶体において 1 週間程度で死滅することが確認できた。

23

助成番号 0423

海産有用藻類、特に褐藻植物における遺伝子組み換え技術に関する基礎的研究

長里千香子

(北海道大学北方生物圏フィールド科学センター室蘭臨海実験所)

1. 研究目的

今後深刻化が予想される人口増加に伴う食料問題、地球環境問題などを解決する手段として、穀物をはじめとする農作物において、新品種の作出、生産工程の効率化を目指しての遺伝子組み換え技術が盛んに研究されている。一方、陸上農作物と比べ、コンブ、ワカメ、ノリといった海産有用藻類に関しては、種間交配、および、優良品種をプロトプラスト化し、再生や細胞融合を行うといった従来通りの育種方法でのみ品種改良が行われている。このような方法によっては、個々の品種に関して形態的、生理的、生態的特性が把握しきれないため、気象異変や病気による生産量の著しい低下に迅速に対応できない。大型藻類においては、有明海のノリ赤腐れ病、コンブの穴あき症等の発症報告や、海の砂漠化である磯焼け現象も深刻化しつつある中で、耐病性および環境変化への耐性をもった付加価値の高い品種を作成する必要性が急がれている。

これまで、大型藻類においても、環境浄化や水産学的価値といった重要性とその有効利用が注目され、遺伝子組み換え体作製に関する研究が行われてはきている。しかしながら、それらの試験的研究の多くは陸上植物細胞、もしくは動物細胞で制御されるプロモーター部位を持つ発現ベクターを藻類細胞に導入するという方法であった。このような発現ベクターでは、レポーター遺伝子である GUS の発現はみられるものの一過性であり、未だ確立された技術であるとは言いがたい状況である¹⁾。一方、現在、真核藻類において遺伝子組み換え技術が確立している緑藻クラミドモナス、珪藻といった単細胞性藻類では、宿主となる生物のゲノムに由来するプロモーターを組み込んだ発現ベクターを構築し、細胞に導入することによって安定な遺伝子組み換え体を得ている²⁾。

本研究では、北海道沿岸域において繁茂しているコンブ、ワカメ、ヒジキ、ホンダワラなどが含まれる褐藻植物を研究対象とし、褐藻植物での遺伝子組み換え体作製にむけての基礎的研究を行った。大型藻類、特に褐藻植物では、分子生物学的研究がほとんど行われておらず、利用できる情報が各種データベース上に少ないというのが現状ではある。そのため、まず最初に生活環、細胞周期を通して比較的高い発現量をもつと考えられる elongation factor 1 alpha(EF-1 α) の cDNA のクローニング、およびゲノム構造を明らかにし、発現ベクター構築のために EF-1 α 遺伝子のプロモーターおよびターミネーター領域と思わ

れる部分の塩基配列を明らかにした。また、遺伝子導入の方法についての検討と、外来 DNA が導入されたトランスフォーマントを選択するため発現ベクターに組み込む抗生物質に対する耐性遺伝子を検討するため薬剤感受性テストを行った。なお、本研究では、著者が無菌培養株を保有しており、実験室内で生活環が容易に完結させることができることから、主にコンブ類植物と分子系統学的に近縁である褐藻カヤモノリを用いて実験を行った。

2. 材料と研究方法

2.1 材料

カヤモノリ *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye) Link の生活史は、体長 50 cm にもおよぶ巨視的配偶体（雌雄異株）と微視的胞子体との異型世代交代を基本とする。配偶体、胞子体は成熟すると、それぞれ遊泳性の配偶子、遊走子を放出するが、これらは細胞壁がなく、放出後、基物に付着することによって細胞壁が形成される。そのため、成熟しているカヤモノリの配偶体を採集し、雌雄配偶子の放出を誘導後^{3),4)}、その一部を用いて核酸抽出を行った。また、残りの雌雄配偶子は単為発生による胞子体の単藻無菌培養株作製のために単離し、人工合成培地 ASP₁₂ NTA⁵⁾ にて 14°C 長日条件（14 h light: 10 h dark, 30-40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）下で継代培養を行った。配偶体誘導には、海水強化培地である PESI⁶⁾ に移し、10°C 短日条件（10 h light: 14 h dark, 30-40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で数週間培養することにより、配偶体形成を誘導した。

薬剤感受性を検定するために、カナマイシン、ゼオシン、ネオマイシン、ブラストサイジン を 25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、75 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように PESI 培地に添加し、雌性配偶子からの単為発生による胞子体、および、配偶体をそれぞれ、14°C 長日条件にて培養をした。

2.2 全 RNA の抽出と cDNA クローニング

全 RNA は、QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini Kit にて抽出を行った。EF-1 α の cDNA 単離のため、鋳型 cDNA は全 RNA から逆転写酵素、AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa) によって合成したものをを用いた。各生物において EF-1 α のよく保存されている部分に対するプライマーをデザインし、カヤモノリの EF-1 α の cDNA の部分配列、767 bp のクローニングを行った。その配列に基づいたプライマーを利用し、RACE 法（Rapid Amplification of cDNA ends）を TaKaRa-3'-Full RACE Core Set、TaKaRa-5'-Full RACE Core Set（ともに TaKaRa 社）を用いて 3'-cDNA 末端、5'-cDNA 末端に由来する増幅断片をクローニングし、DNA 配列を決定した。

2.3 ゲノム抽出とゲノム DNA の配列、およびサザン解析

ゲノム DNA は、すでに報告されている川井らの方法⁷⁾ に準じて抽出を行った。EF-1 α のゲノム DNA の配列を明らかにするために、cDNA の 5'-、3'-端の配列に基づいてプライマーをデザインし、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行ない、クローニング、塩基配列決定

を行った。

サザン解析に用いるゲノム DNA は 2.5 μg ずつ制限酵素 *ApaI*、*BamHI*、*BanIII*、*EcoRI*、*EcoRV* にて切断後、TAE/0.8%アガロース電気泳動後、ナイロンメンブレン、Hybond⁺ (Amersham)にキャピラリープロットングを行った。プローブは、cDNA の 5'-、3'-端の配列に基づいてデザインしたプライマーを用いてcDNAをPCRにて増幅させた断片に対して、Gene Images random prime labeling module (Amersham) を用いてフルオレセイン標識をし、これをプローブとして使用した。メンブレンは、プローブが添加してあるハイブリダイゼーション溶液とともに 60 °C、一晩反応をさせた。洗浄後、シグナルの検出は、Gene Images CDP-Star detection module (Amersham)を使用し、記載された方法に準じて行った。

2.4 インバース PCR 法によるプロモーター、ターミネーター領域の単離

EF-1 α の 5'上流および 3'下流のクローニングを行うため、インバース PCR 法を用いて未知領域の増幅を行った⁸⁾。ゲノム DNA 5 μg を制限酵素 *BanI*、*BanII*、*BanII I*、*EcoRI* でそれぞれ切断後、フェノール/クロロホルム、エタノール沈澱にて DNA の精製を行った。制限酵素処理による DNA 断片は T4 DNA Ligase (TaKaRa 社) にてセルフライゲーションを促し、環状にした。セルフライゲーションの反応を終えた DNA はフェノール/クロロホルム、エタノール沈澱にて精製し、PCR の鋳型として用いた。既知配列の中で、使用した制限酵素切断サイトを挟んで、sense primer を 3'側に、antisense primer は 5'側に位置するように、逆向きにデザインしたプライマーを用いて PCR を行ない、未知領域の増幅を行った。増幅断片はクローニングし、DNA 配列を決定した。

2.5 ベクターの構築

クローニングベクター-pEGFP (CLONTECH)の 5'-、3'-マルチクローニングサイトにはそれぞれ翻訳開始点直前までの 1,200 bp 上流の領域、および翻訳終結点から下流 350 bp を適切な制限酵素認識部位を持つプライマーにて PCR で増幅させ、ベクター内部に挿入した。

2.6 遺伝子導入法の検討

グラスビーズ法：単細胞性緑藻 *Chlamydomonas* の細胞壁をもたない株や細胞壁消化処理を施した細胞に対する遺伝子導入方法として用いられている⁹⁾。褐藻植物の配偶子は細胞壁を持たない細胞であることから、この時期の細胞に限ってこの方法を用いた。細胞液 300 μl に 0.5 mm のグラスビーズ 0.3 g、20% PEG 6000 を最終濃度 5%(wt/vol)、もしくは 10%(wt/vol)、DNA (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)を 20 μl を加え、15 ml のファルコンチューブに混合し、15、30、60 秒間、vibro shaker にて振とうをした。vibro shaker による振とう処理で、配偶子は遊泳性を失うが、培地で希釈して培養することにより、発生していくことを確認した。

パーティクルボンバートメント法：単為発生による孢子体、もしくは配偶体を、0.8%寒天上に置き、遺伝子導入装置 (日本医化) にて DNA をコートした 0.5 μm の金粒子を藻体に打ち込んだ。

3. 結果と考察

3.1 褐藻カヤモノリの EF-1 α 遺伝子の構造

これまで褐藻綱において、EF-1 α の遺伝子構造は明らかにされていなかったことから、発現ベクターに組み込む予定の EF-1 α のプロモーター、ターミネーター領域に相当する領域を検出するためには、cDNA をクローニングする必要があった。同じ不等毛植物門に属する黄金色藻オクロモナス *Ochromonas danica* において著者が明らかにしていた EF-1 α 遺伝子の配列と、他生物のアミノ酸配列とを比較してプライマーをデザインし、cDNA の部分配列 (767 bp)のクローニングを行った。その既知配列に基づいて RACE 法による 5'-側、3'-側の非翻訳領域の塩基配列を含む全長 cDNA の塩基配列を決定した。その結果、カヤモノリの EF-1 α の cDNA の全長は 1,945 bp、5'-側の非翻訳領域は 34 bp、ORF (Open Reading Frame)は 1,320 bp、3'-側の非翻訳領域は 591 bp であった (Fig. 1)。この結果からカヤモノリの EF-1 α は全長 440 アミノ酸残基からなる分子量 48.5 kDa、等電点 9.16 と推定された。他生物の EF-1 α との相同性を BLAST により検索した結果、*Arabidopsis*, human, *Drosophila*, *Saccharomyces* 等の EF-1 α と 74-76%の相同性があることがわかった。また、human, *Drosophila*, *Saccharomyces* 等の EF-1 α と比較して、カヤモノリ EF-1 α は 12 個のアミノ酸残基が欠失している部分があった。この部分は、213 と 214 番目のアミノ酸の間にあたるが、この 12 個のアミノ酸残基の欠失は *Porphyra*, *Arabidopsis*, *Oryza*, *Dictyostellium* と共通していることがわかった (Fig. 2)。

全長 cDNA の配列に基づいてプライマーをデザインし、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行ない、クローニング、塩基配列決定を行った。その結果、ORF 内にイントロンが 2 か所存在することが明らかになった (Fig. 1)。

3.2 サザン解析

cDNA および、対応するゲノム構造が明らかになったことから、これら DNA 配列に基づいて、使用制限酵素の選択をし、カヤモノリのゲノム中での EF-1 α 遺伝子数をサザンハイブリダイゼーション法により解析を行った (Fig. 3)。使用した酵素は *ApaI*, *BamHI*, *BanIII*, *EcoRI*, *EcoRV* であった。*ApaI*, *EcoRI*, *EcoRV* においては強いシグナルを示す断片が一本ずつ見られた。*BamHI* で切断した DNA とのハイブリダイゼーションでは、シグナル強度の異なるバンドが 2 本現れた。カヤモノリの EF-1 α 遺伝子内部には *BamHI* による切断部位が存在していないが、後述しているインバース PCR 法にて cDNA に対応する配列よりさらに上流、下流をクローニングした結果、*BamHI* による切断箇所が 2 か所あり、その予想される断片のサイズがシグナル強度の強い断片のサイズ (4.5 kb)と同様であったことから、シグナルの弱い断片は、制限酵素による消化が不十分であったものがあり、検出された可能性が考えられた。一方、*BanIII* においては、シグナル強度の強い断片が 2 本と弱い断片が一本現れた。プローブに用いた cDNA に対応するゲノム DNA 部分には、*BanIII* により 2 か所切断される配列が存在しているが、シグナル強度の弱いバンドの検出は、*BanIII* の場

合と同様に制限酵素による不十分な消化に由来する可能性が考えられた。このようなサザン解析の結果から、カヤモノリの EF-1 α をコードする遺伝子は単一遺伝子として存在している可能性が示された。

3.3 EF-1 α の5'上流および3'下流のクローニング

EF-1 α の5'上流および3'下流の未知領域をクローニングするため、インバース PCR 法を用いた。5'上流の配列は、まず、制限酵素 BanIII で切断したゲノムをセルフライゲーションにより環化し、sense primer を3'側に、antisense primer は5'側に位置するように、逆向きにデザインしたプライマーを用いて PCR を行なった。その結果、転写開始点よりも590 bp 上流をクローニングすることができた。さらに上流の配列を明らかにするために BanI、ひきつづいてその結果をもとに BanII で断片化し、環化した DNA を鋳型として PCR を行なうことによって、581 bp、446 bp 上流の領域をクローニングすることができた。インバース PCR を3回行うことによって、のべ1,617 bp 上流の配列が明らかになった (Fig. 4)。3'下流の配列は、EcoRI で断片化した DNA を用いて同様の反応を行うことにより445 bp 下流の領域をクローニングすることができた。

3.4 発現ベクターの構築と遺伝子導入方法の検討

PCR で増幅させた翻訳開始点直前までの1,200 bp 上流の領域、および翻訳終結点から下流350 bp を挿入させた GFP 発現ベクターを構築し、以下の方法でカヤモノリ藻体への遺伝子導入を試みた。

遺伝子導入方法としてはグラスビーズ法とパーティクルボンバートメントによる方法を行った。今回構築したベクターが適切に働くものなのかがまだ不確かなことから、陸上植物で使われ、一部の大型藻類では一過性ではあるが発現が認められている¹⁾と報告されているカリフラワーモザイクウイルス35S プロモーター (CaMV35S) に制御され GFP が発現するベクターも同時に用いて検討を行った。グラスビーズ法、パーティクルボンバートメントによる導入方法を条件を変え検討を行ったが、CaMV35S および今回構築したベクターのいずれでも今回の導入条件では、GFP 発現が確認できる細胞は見られなかった。特に、パーティクルボンバートメントでは、打ち込んだ後の藻体を顕微鏡で観察すると厚い細胞壁の最外層にとどまっている金粒子が多数見られ、細胞内部に挿入された金粒子は見られないことから、DNA 自体が細胞内に導入されていないのではないかと考えられた。

3.5 薬剤感受性の検定

カヤモノリの配偶体、孢子体において薬剤感受性の検定をするために、カナマイシン、ゼオシン、ネオマイシン、プラストサイジンを25 μ g/ml、50 μ g/ml、75 μ g/ml、100 μ g/ml の濃度になるように PESI 培地に添加し、14°C 長日条件にて培養を行った。その結果、配偶体、孢子体はともに75 μ g/ml、100 μ g/ml のプラストサイジン添加培地で培養すると、培養開始から1週間程で藻体の色が落ち、死んでいることがわかった (Fig. 4)。一方、カナ

マイシン、ネオマイシン処理では、コントロールと比較して変化が見られなかった。ゼオシンは、75 µg/ml、100 µg/ml の濃度になると成長が抑制されたが、藻体の色落ちなどの顕著な効果はないことがわかった。プラストサイジンに対する感受性は、マコンブの配偶体においても同様の結果が得られた。

4. 今後の課題

褐藻植物において遺伝子組み換え体作製の実現に向けては、褐藻植物細胞で働く適切な発現ベクターの開発とともに、導入方法の工夫が必要であることが今回の研究により明らかになった。今後は、EF-1α以外の発現量が高いと思われる遺伝子およびプロモーター領域の単離を引き続き行うとともに、パーティクルボンバートメントによる遺伝子導入の方法を検討していくことが必要である。細胞壁をセルラーゼなどの消化酵素、もしくは EDTA (褐藻植物の細胞壁を構成しているアルギン酸に結合しているカルシウムをキレート作用により外す) などで前処理をし、部分的に細胞壁を消化させた段階で金粒子を打ち込むなどの検討も考える必要がある。

現在、フランスのロスコフ臨海実験所を中心として、褐藻 *Ectocarpus* におけるゲノムプロジェクトが進行中であり、配偶体、孢子体での EST 解析も同時に行われている。著者が所属する研究室もこのプロジェクトに参画しているが、これから明らかになる情報を利用して、より適切なプロモーターを選択することも可能となるが、いずれにせよ、褐藻植物における遺伝子組み換え技術は、ゲノム情報が整えられていく中で、その実現が非常に重要な課題となっている。

引用文献

- 1) Qin S, Jiang P, Tseng C (2005) Transforming kelp into a marine bioreactor. *TRENDS in Biotech* 23:264-268.
- 2) Leon-Banares R, Gonzalez-Ballester D, Galvan A, Fernandez E(2004) Transgenic microalgae as green cell-factories. *TRENDS in Biotech* 22:45-52.
- 3) Nagasato C, Motomura T, Ichimura T (1999) Karyogamy block by heat stress in the fertilization of brown algae. *J Phycol* 35:1246-1252.
- 4) Nagasato C, Motomura T, Ichimura T (2000) Spindle formation in karyogamy-blocked zygotes of the isogamous brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Eur J Phycol* 35:339-347.
- 5) Provasoli L (1963) Growing marine seaweeds. In De Virville, D. and Feldmann, J. [Eds.] *Proc. Int. Seaweed Symp. Vol.4*. Pergamon Press, Oxford, pp. 9-17.
- 6) Tatewaki M (1966) Formation of a crustaceous sporophyte with unilocular sporangia in *Scytosiphon lomentaria*. *Phycologia* 6: 62-66.

- 7) Kawai H, Muto H, Fujii T, Kato A (1995) A linked 5S rRNA gene in *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). J. Phycol. 31: 306-311.
- 8) Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. Genetics 120:621.
- 9) Kindle KL (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 87:1228-1232.

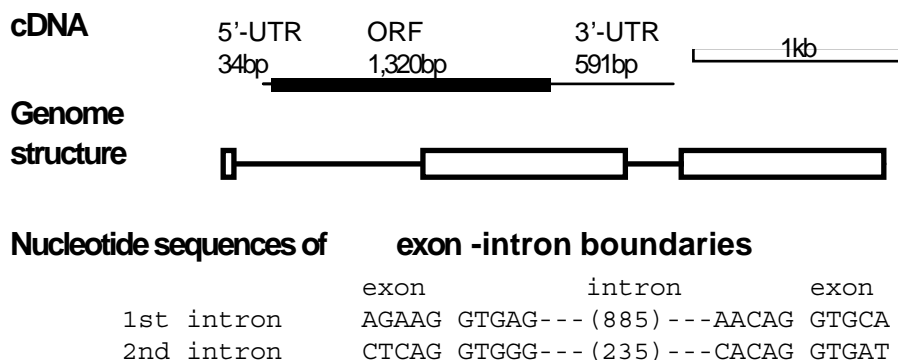


Fig. 1. cDNA and genome structures of EF-1 α gene in *Scytosiphon lomentaria*. In diagrammatic representation of the exon-intron structure, the corresponding positions between two genes are connected by thin lines. In nucleotides sequences of exon-intron boundaries, numerals in parentheses indicate the lengths of introns (bp).

Sl	EF-1 α	WYKG-----PYLL
Py	EF-1 α	WYKG-----PCLL
At	EF-1 α	WYKG-----PTLL
Os	EF-1 α	WYKG-----PTLL
Dd	EF-1 α	WYKG-----PTLL
Hs	EF-1 α	WFKGWKVERKEGNASGVSL
Dm	EF-1 α	WFKGWKVERKEGNADGKSTI
Sc	EF-1 α	WYQGWQKETKAGVVKGKTL

Fig. 2. Partial alignment of the amino acid sequences of several EF-1 α . Sl; *Scytosiphon lomentaria*, Py; *Porphyra yezoensis*, At; *Arabidopsis thaliana*, Os; *Oryza sativa*, Dd; *Dictyostellium discoideum*, Hs; *Homo sapiens*, Dm; *Drosophila melanogaster*, Sc; *Saccharomyces cerevisiae*.

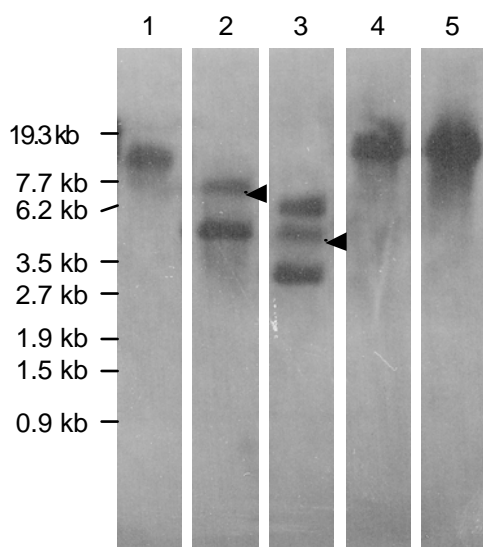


Fig. 3. Southern blot hybridization of the EF-1 α gene. *Scytosiphon lomentaria* DNA was digested with *Apal* (lane 1), *BamHI* (lane 2), *BanIII* (lane 3), *EcoRI* (lane 4) and *EcoRV* (lane 5). Size markers (λ phage DNA digested with *EcoT141*) are indicated at the left. Arrowheads in lane 2 and 3 point to the unexpected bands with faint signal.

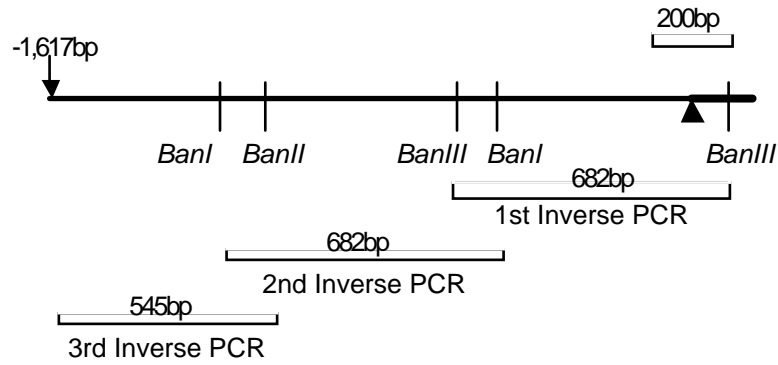


Fig. 3. Cloning of upstream region of EF-1 α using inverse PCR method. The recognition sites of *BanI*, *BanII* and *BanIII*, which were used for digestion of DNA in each inverse PCR step, are indicated. Arrowhead shows transcription start site.

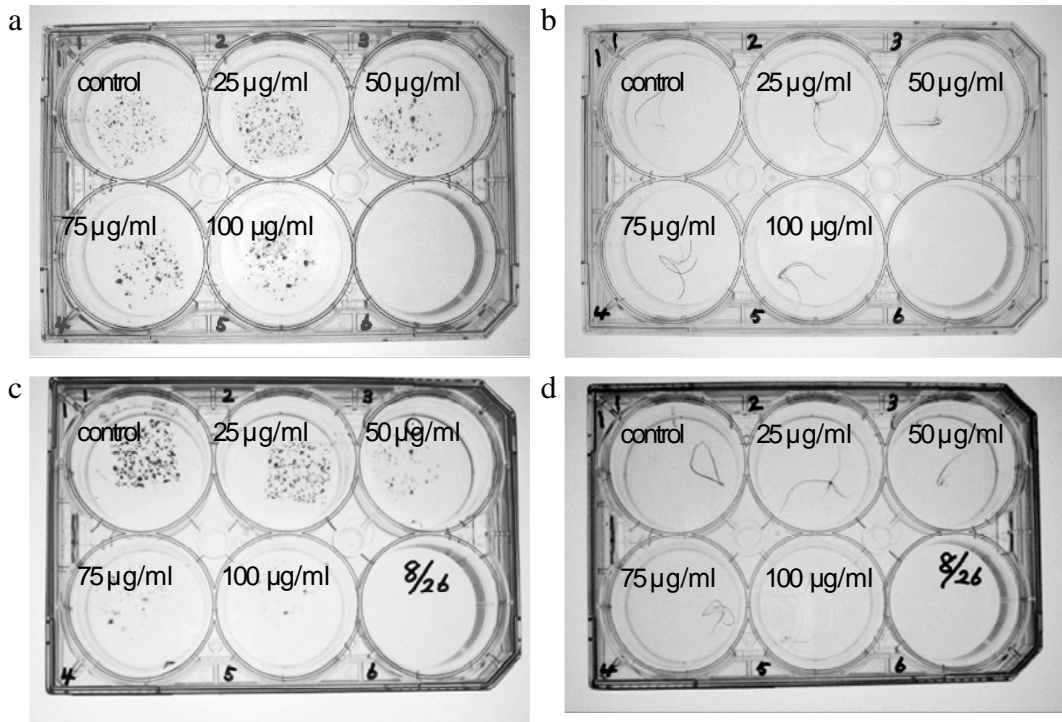


Fig. 4. Blastcidine sensibility in the cells of *Scytosiphon lomentaria*. The sporophytes (a) and gametophytes (b) of *Scytosiphon* were incubated under the existence of 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$ blastcidine. The cells of sporophytes (c) and gametophytes (d) after a week were extinct by incubation under the existence of 75–100 $\mu\text{g/ml}$ blastcidine.

Preliminary study on improvement of nuclear transformation of marine seaweed,
especially brown algae

Chikako Nagasato

Muroran Marine Station, Field Science Center for Northern Biosphere,
Hokkaido University

In this study, preliminary study on improvement of methods and strategies for efficient nuclear transformation in brown algae, including *Laminaria* and *Undaria*, which grow commonly on the coast of Hokkaido, was carried out. In eukaryotic algae, reproducible and efficient genetic transformation systems have been available for only a part of microalgae such as the green alga *Chlamydomonas* and the diatom *Phaeodactylum*, and endogenous promoters were used in all case. Until now, there were trial experiments for gene transfer in macroalgae for the purpose on significance of ecology and marine resource. In these studies, an expression vector for transformation of land plants was used, and transient expression of GUS gene was reported. However, transformation frequency was low and the stable transformation system in brown algae has not been achieved yet. For establishment of efficient nuclear transformation in brown algae, application of an expression vector using a homologous gene, method of DNA delivery, and stages in the life cycle of the algae for this purpose was examined.

I isolated and analyzed cDNA and genomic DNA coding the polypeptide elongation factor one alpha (EF-1 α) from brown alga *Scytosiphon lomentaria*, which is easy to complete the life cycle in laboratory. After that, the promoter and terminator regions were examined by inverse PCR method. As the result, 1.6 kb upstream of the putative translation site and 500 bp downstream of the polyadenylation site were elucidated, and a part of the regions were fused to the green fluorescence protein gene (*Gfp*). Next, the glass beads methods, namely cells are vortexed in the presence of DNA, glass beads and polyethylene glycol (PEG), which has been used for the transformation in *Chlamydomonas*, was tried to introduce genes in reproductive cells of brown algae. But this method was not effective in brown algae. Now, I am examining the standard condition of the particle-gun method in brown algal cells. Also, pharmaceutical sensibility in brown algal cells was examined. As the result, cells of *Scytosiphon* and *Laminaria* were extinct by incubation under the existence of 75–100 μ g/ml blastcidine for a week.