

る研究室がたくさんあって、彼らが病気の研究者と膝をつき合わせて議論しているのは面白いことである。現在人類が直面している最も重要な病気は癌であるが、癌細胞をよくみると、無制限に増殖し、他の臓器へ転移するという能力を獲得するためにはありとあらゆる手段を講じているということがわかる（実際にはそのような能動的なものではなく、結果的にそうなるようにたくさんの変異が蓄積しているのであるが）。癌研究の一つの目的は、どういう遺伝子レベルの変化の積み重ねが、癌細胞を成り立たせているかを理解することであるが、結局は、個々の遺伝子の働きがすべてわかってはじめて理解できるほど複雑である。したがって、細胞の営みをありとあらゆる角度から理解しようとする試みはそのまま癌研究につながる。現在、酵母の分子細胞生物学領域で、先頭を切って細胞の巧妙さに挑んでいる研究者達の中には、癌研究所の名を冠した研究機関に所属する人たちも多い。癌に限らず、現在医学系のジャーナルに多く見られる報告に、この病気はこの遺伝子の変異で起こる、という類のものがある。当然、遺伝子の配列だけではタンパク質の働きはわからないので、研究者はすぐにホモログのサーチを行う、とたちどころに、似たようなタンパクが酵母で細胞内小胞輸送で働いている、という報告に出くわす。したがって、この研究者は配列しかわからない遺伝子を持ってただ呆然とするわけではなく、次の日からヒトの細胞でこのタンパク質が細胞内小胞輸送に関与している可能性について検討し、後にこの病気はある特定のタンパク質の輸送が原因で生じることを知るわけである。この、病気を専門に研究している研究者にしてみれば、そのホモログタンパク質の役割を、モデル生物であれ詳細に研究している人たちが身の回りにいればとても心強いことであろう。

ポストゲノム時代に突入した現在、我々の遺伝子やタンパク質の働きに関する知識は飛躍的に増加している。分析技術の進歩やオートメーション化に支えられて、多くの分野にいわゆる網羅的な解析が導入されている。タンパク質間の相互作用、遺伝子の発現、変異株の作成と表現型解析、タンパク質の構造、等々。今後これらの解析がヒト細胞やモデル生物で行われ、生物間で比較解析されて、おそらくはすべての遺伝子（タンパク質）の働き方や機能の解明という方向に進むのであろう。これら網羅的な解析の一つの目的はある遺伝子（タンパク質）群を機能別にグループ化して生物を包括的に理解しようとするのであろう。しかしいくらこれらの網羅的な解析が進んでも、それらは大嶋先生が先鞭を付けた、一つ一つの変異株を詳細に解析する、という古典的な手法には取って代わらないであろう。たとえ酵母であっても、変異株の挙動は一つ一つ異なり、（つまりはタンパク質一つ一つ異なった機能を有するということであるが）その働きの本質解明には、網羅的解析は一つの参考を与えるにすぎないと思われる。

発酵という生命活動を通じて人を喜ばせる酵母が、さらに人が自分たちが何であるのかを知るためにも役立つようになったことから、酵母とはよくよく人と縁の深い微生物であると感慨深いものがある。私は現在医学系の研究所にいますが、医学も工学も応用という意味では似通っている。大嶋先生は醸酵工学科で基礎科学をやった人として当時珍しい存在であったが、それがゆえに、基礎を介して別の応用分野である医学研究にも影響を与えることができた。オリジナルな基礎科学はここまで貢献できる、というお手本のような仕事の一つであると思います。

酵母分子遺伝学から植物バイオテクノロジーへ

吉田 和哉

植物は太陽光エネルギーを受けながら光合成を行い、大気中の二酸化炭素を吸収、固定してデンプンを作る。ヒトを始めすべての動物は太古より植物に依存しながら生きてきた。遺伝学が確立した後は交雑育種が繰り返され、より良い作物が作り出されるようになった。植物の利用は、食糧以外にも環境汚染物質の吸収やバイオマスの供給など多岐に亘っている。形質転換技術の発達に伴って、遺伝子導入によって植物の機能を改良する植物

バイオテクノロジーが盛んになったが、その基盤として植物科学の基礎研究が重要であることは言うまでもない。本稿では、植物科学における酵母分子遺伝学の役割を紹介する。

モデル植物のシロイヌナズナ

酵母（ここでは *Saccharomyces cerevisiae*）は、真核生物における分子遺伝学解析のモデル細胞として位置づけ

られるが、植物科学ではシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) がモデル植物として用いられている。シロイヌナズナは、ゲノムサイズが小さい (約 1.3×10^8 bp)、世代時間が短く (1~2ヶ月) 個体サイズが比較的小さい、突然変異の解析法が確立している、形質転換が容易であるなど、モデル生物としての特性を備えている。シロイヌナズナを用いて、分化形態形成、光合成を含む主要代謝系、各種信号伝達経路、環境ストレス応答、ゲノム構造などの解析が世界中で活発に進んでいる。酵母では突然変異解析から多くの重要な遺伝子が発見されたが、シロイヌナズナも同様に、花の形成に機能する遺伝子群 (*ap2*, *pi*, *ap3*, *ag* が相互作用する ABC モデル¹⁾) や重力屈性に機能する遺伝子群 (*sgrs*)²⁾ などが有名である。また、生物学的に保存されたシステムに属する遺伝子の単離は、酵母遺伝子のホモログや酵母の突然変異を相補する遺伝子を探索する手法が用いられている。細胞周期制御遺伝子群、主要な信号伝達系遺伝子群、さらにイオン輸送体遺伝子 (後述) などがこの方法で単離されている。

部位特異的組換え系を利用した植物の形質転換法

植物に遺伝子を導入する方法はいくつかあるが、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) という土壤細菌を利用した形質転換法が一般的である。この方法は、アグロバクテリウムが植物に感染すると、自身の持つ Ti プラスミドの特定領域 (T 領域) を宿主植物細胞の染色体に組込むという性質を利用している。遺伝子導入のベクターとしては、Ti プラスミドの必要最小限な DNA に大腸菌の複製起点や薬剤耐性マーカー遺伝子を付加したバイナリーベクターが用いられる。目的遺伝子を連結したバイナリープラスミドを持つアグロバクテリウムを宿主植物の組織に感染させ、抗生物質の入った培地上で培養すると抗生物質耐性の形質転換植物が再生してくる。この方法を改良した形質転換法として、サイトカイニン合成にかかわる *ipt* 遺伝子と醤油酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) の内在性 pSR1 プラスミドの部位特異的組換え系 (本特集大嶋の項と文献3参照) を組合せた MAT (multi-auto-transformation) ベクターが開発された (Fig. 1).⁴⁾ アグロバクテリウム感染によって MAT ベクターが宿主植物の染色体に組込まれると、*ipt* 遺伝子の発現によってサイトカイニンの過剰生産が起こり、感染組織から多数の不定芽が分化する。これらの不定芽を新しい培地に移植し、頂芽優勢を消失した多芽体を形成した個体を選抜する。この個体の染色体上で、組換え酵素が組換え認識配列 (RS) に作用して RS にはさまれた *ipt* 遺伝子が脱落

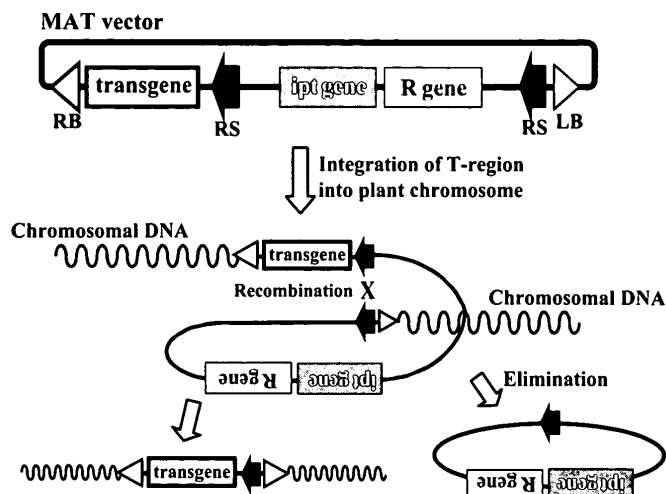


Fig. 1. Site-specific recombination system of pSR1 in the MAT vector. RB and LB: right and left borders of T-region. This figure was provided from Dr. Hiroyasu Ebinuma (Nippon Paper Industries Co Ltd.).

すると、頂芽優勢が回復し、正常な茎の伸長を示す形質転換体が得られる。MAT ベクター法は、1) マーカー遺伝子が再利用でき多重遺伝子導入が可能、2) マーカーフリー組換え体の作製、3) 形質転換体の選抜操作の簡略化、といった利点がある。特に2) は、遺伝子組換え植物 (食品) の安全性を高める技術として有効である。pSR1 の部位特異的組換え系は、染色体の特定部位への遺伝子導入や染色体操作技術への応用も期待できる。

植物の耐塩性研究における酵母の利用

ここで、植物の研究における酵母の利用法を、筆者も取り組んでいる植物の耐塩性に関する解析を例に紹介する。植物の塩ストレス耐性機構の解明は、塩害地の植生回復や海水農業を目的とした耐塩性植物の分子育種に直結する。植物が受ける塩ストレスは、高浸透圧ストレスと Na^+ 毒性の2つに大別される。浸透圧ストレスの情報伝達系は酵母で解析が進んでおり、細胞膜に局在する *Slh1* 浸透圧センサーが受けたストレス信号が MAP キナーゼ経路によって伝達され、最終的にグリセロール合成遺伝子の転写が誘導され、細胞内の浸透圧が調節される。⁵⁾ シロイヌナズナから酵母の *slh1* 変異を相補する *ATHK1* 遺伝子が単離され、植物でも酵母と同様の浸透圧ストレス信号伝達系の存在が予想されている。⁶⁾

一方、高濃度 Na^+ はさまざまな酵素反応を阻害することで細胞活性を低下させるが、 Na^+ に対する応答機構も酵母の研究が先行している。酵母では *ENA1* 遺伝子がコードする Na^+ -ATPase が細胞外への Na^+ 排出活性を持つ。⁷⁾ *ENA1* 遺伝子の発現は、高浸透圧条件下と高 Na^+

条件下で誘導され、前者は HOG-MAP キナーゼ経路を介して、後者はカルシニューリン経路によって信号が伝達される。⁸⁾我々は、酵母の *ENA1* 遺伝子をタバコ培養細胞で発現させ、細胞膜に局在した Ena1 タンパク質の働きによって導入細胞の Na^+ 耐性が向上することを示した。⁹⁾植物では細胞膜上の Na-ATPase は同定されていないが、酵母の *ENA1* 遺伝子を耐塩性植物の分子育種に利用できる可能性が強く示唆された。同様の試みとして液胞膜 Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子を導入することによって Na^+ の液胞隔離能を強化して Na^+ 耐性を向上させた報告がある。^{10, 11)}このうち、*AVP1* を用いた解析は Fink の研究室によるものである。余談になるが、Fink 教授は酵母のアミノ酸代謝系遺伝子の発現制御解析の大御所で大嶋先生とも親交が深く、筆者が大嶋研院生時代に投稿論文の掲載に関して世話になった経緯がある。つきなみな表現だが世間は狭いと感じている。

高濃度 Na^+ は、イオン毒性に加えて必須イオンである K^+ の取込み阻害を引き起こす。この現象は植物生理学的に古くから知られていたがその分子機構は長い間不明であった。酵母では Trk タンパク質が高親和性の K^+ 摂取に機能していることが知られており、*trk* 変異を相補するコムギ (*Triticum aestivum*) *HKT1* 遺伝子が単離された。¹²⁾*HKT1* 遺伝子は K^+ - Na^+ 共輸送体をコードしており、生理的に有害な濃度の Na^+ 存在下で *HKT1* を介し

た K^+ 摂取が阻害されることがわかり、 Na^+ による K^+ 摂取阻害の分子機構が示された。¹³⁾我々は、イネ (*Oryza sativa*) から *HKT1* 相同遺伝子を単離した。¹⁴⁾通常品種の日本晴から *OsHKT1* 遺伝子が単離され、耐塩性種のポカリからは *OsHKT1* 遺伝子に加えて *OsHKT2* 遺伝子が単離された。各 *OsHKT* の機能を調べるために、*trk* 変異酵母 (CY162) を用いた相補性試験と Na^+ 排出ポンプが欠損した Na^+ 高感受性酵母 (G19) を宿主とした Na^+ 輸送能検定を行った。その結果、*OsHKT1* は *trk* 変異を相補できないが *OsHKT2* は相補し (Fig. 2A), Na^+ 輸送活性は両分子ともに確認された (Fig. 2B)。これらの結果から、*OsHKT1* は Na^+ 輸送体、*OsHKT2* は K^+ Na^+ 共輸送体であると結論付けた。両分子のイオン輸送特性は、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学実験でも同様の結果であった。 K^+ 輸送を行うタンパク質は、P ループと呼ばれる種を越えて保存されたドメインを有することが知られている。¹⁵⁾*OsHKT* 各分子のアミノ酸配列を見ると、 K^+ 輸送活性を示す *OsHKT2* では P ループ内でよく保存されているグリシン残基が存在したが、*OsHKT1* ではセリンに置換されていた (Fig.3A)。そこ

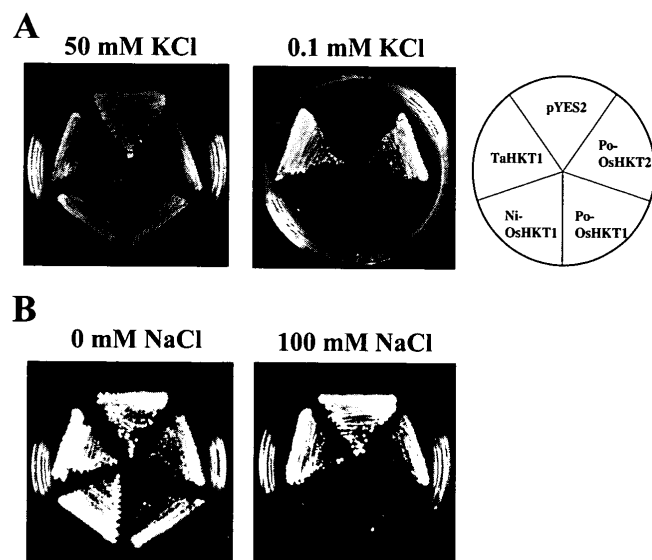


Fig. 2. Characterization of the ion-transport properties of *OsHKT*s. A: Complementation tests of *OsHKT1*, *OsHKT2*, or *TaHKT1* with the *S. cerevisiae* high-affinity K^+ uptake-deficient mutant strain CY162. pYES2 is an empty vector used as control. B: Na^+ -induced growth inhibition test of each *HKT* gene expressed in the *S. cerevisiae* salt-sensitive mutant strain G19.

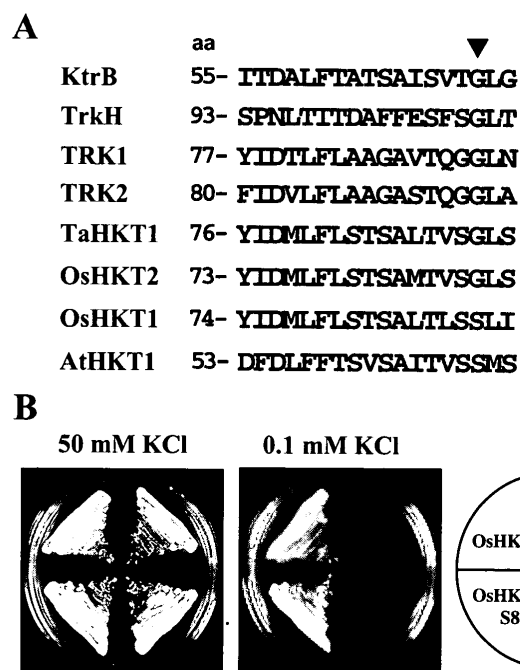


Fig. 3. P-loop domain is important for K^+/Na^+ selectivity of K^+ transporter. A: Alignment of amino acid sequences, including the conserved glycine residue (▼) in the proposed first P-loop domain of eight transporters. KtrB, *Vibrio alginolyticus*; TrkH, *E. coli*; TRK1 and TRK2, *S. cerevisiae*; TaHKT1, *T. aestivum*; OsHKT1 and OsHKT2, *O. sativa*; AtHKT1, *A. thaliana*. B: Mutation of *OsHKT1* serine-88 to glycine (*OsHKT1*-S88G) restores K^+ uptake competency of *S. cerevisiae* strain CY162, while mutation of glycine-88 to serine (*OsHKT2*-G88S) abrogates K^+ uptake.

で, OsHKT1 のセリンをグリシンに置き換えた変異型分子を作ったところ, K^+ 輸送活性が認められ, 逆に OsHKT2 のグリシンをセリンに置換すると, K^+ 輸送活性が消失した (Fig. 3B).¹⁶⁾ この結果は, P ループのグリシン残基が K^+ 選択性に重要であることを示すと共に, 酵母を宿主としたアッセイ系を利用して耐塩性タイプの変異型 HKT 分子 (K^+ 親和性が高く Na^+ 親和性が低い) をスクリーニングできる可能性が示唆された.

2000 年の年末にシロイヌナズナの全ゲノム配列解読が完了した. これにより, 植物科学もポストゲノム時代に突入し, 先行の酵母研究で開発された網羅的遺伝子解析ツールが急速に取入れられている. 遺伝子の機能同定法として, 酵母では遺伝子破壊実験が汎用されているが, 植物は核内の DNA 相同組換え活性が高くないために遺伝子破壊が難しい. 代替手段としてアンチセンス法や RNAi が用いられているが, 遺伝子機能を効率的に解析する技術的ブレークスルーが求められる. 遺伝子ネットワークの情報源や遺伝子機能のアッセイ系として, 植物

科学はまだまだ酵母の助けを借りそうである.

文 献

- 1) Goto, K. *et al.*: *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 449 (2001).
- 2) Fukaki, H. *et al.*: *J. Plant Res.*, **109**, 129 (1996).
- 3) Matsuzaki, H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **172**, 610 (1990).
- 4) Sugita, K. *et al.*: *Plant J.*, **22**, 461 (2000).
- 5) Posas, F. *et al.*: *Cell*, **86**, 865 (1996).
- 6) Urao, T. *et al.*: *Plant Cell*, **11**, 1743 (1999).
- 7) Haro, R. *et al.*: *FEBS Lett.*, **291**, 189 (1991).
- 8) Marquez, J. A. and Serrano, R.: *FEBS Lett.*, **382**, 89 (1996).
- 9) Yoshida, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94** (2002) in press.
- 10) Apse, M. P. *et al.*: *Science*, **285**, 1256 (1999).
- 11) Gaxiola, R. A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11444 (2001).
- 12) Schachtman, D. P. and Schroeder, J. I.: *Nature*, **370**, 655 (1994).
- 13) Rubio, F. *et al.*: *Science*, **270**, 1660 (1995).
- 14) Horie, T. *et al.*: *Plant J.*, **27**, 129 (2001).
- 15) Durell, S. R. *et al.*: *Biophys. J.*, **77**, 775 (1998).
- 16) Mäser, P. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6428 (2002).