

シゾンゲノムを遺伝資源とした有用植物作出の試み

三角 修己

現在、温暖化や砂漠化、酸性雨などによる環境変動が現実問題として地球上の生態系にさまざまな影響を及ぼしつつある。特に作物や森林など、地球上の一次生産者であり物質生産や酸素、二酸化炭素の循環に重要な役割を果たす植物への影響は人間をはじめとした地球上の全生物にとって深刻な問題となっている。このような環境問題に対して人類を挙げて環境改善へ取り組むことの必要性は言うまでもないが、一方で生物科学研究の成果を集結して環境変動に強い有用なストレス耐性植物(作物)を作出することもその解決策の1つとして進められている。これまでに、遺伝子工学技術を用いた有用植物の作出には、主にシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) などを用いて、各種環境ストレスに曝された時に発現、機能する遺伝子を同定し、それをストレス耐性遺伝子として利用したり、乾燥地域や酸性土壌、高塩濃度などの特殊な環境で生育する植物に特有の遺伝子を探索して用いるなどの方法が取られてきた。

一方、著者らは高温強酸性環境に棲息する単細胞原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 通称“シゾン”で、一真核生物としてはじめて全ゲノム(核、ミトコンドリア、色素体)を100%解読し、その増殖、遺伝、環境適応などの生物現象を遺伝子レベルで明らかにする手立てを手に入れた^{1,2)}。このシゾンの完全なゲノム情報と、高温(50°C)、強酸性(pH1-2)、高金属イオン濃度環境下に棲息するという特質に着目し、極限環境藻類の環境適応遺伝子を遺伝資源として利用する、従来の研究手法とは違った切り口で有用なストレス耐性植物の作出を試みた。その成果について簡単に紹介したい。

イデユコゴメ類の棲息環境

シゾンは高温強酸性そして高硫黄の環境に棲息する原始紅藻のイデユコゴメ綱(Cyanidiophyceae)に属する単細胞性の紅藻である。イデユコゴメ綱には代表的な3種、シゾン、シアニジウム(*Cyanidium caldarium*)、ガルデリア(*Gardieria sulphuraria*)が含まれる。シアニジウムとガルデリアは日本の草津、箱根などの高温酸性温泉(硫黄泉)などにも広く棲息しているが、ゲノムが解読された *C. merolae* の10Dはイタリアのナポリの温泉混合藻から純化された株である。これらイデユコゴメ綱に属す

る藻類が自然界で棲息する高温の温泉水や硫化水素の噴出口には他の真核生物はほとんど棲息していない。また研究室での培養環境下においても、無菌操作をしなくとも他の微生物の混入はほとんど生じない。このようなシゾンの棲息する高温、硫酸酸性的な場所は、太古の極限的であった地球環境の名残とも考えることができ、また、実際に分子系統解析の結果はシゾンが真核生物の起源に近い進化の基部に位置する生物であることを示唆しており、シゾンが脈々と極限環境下で生命活動を営んできた可能性を裏づけている。さらに強酸性の水棲環境では各種の金属塩がイオン化しやすくなり、その毒性効果も高くなっていることが考えられる。極限環境生物であるシゾンが獲得してきたこのような環境適応能力を遺伝子レベルで明らかにするため、はじめに遺伝子発現の解析よりストレス耐性植物の作出に資するための遺伝子の選抜が行われた。

EST解析とマイクロアレイ解析による
ストレス耐性遺伝子の探索

ゲノム情報が完全解読されたことから、シゾンを用いた研究にもポストゲノム解析の手法が利用できるようになった。きわめて単純な細胞の体裁かつ、真核生物として最小セットの遺伝子組成であるシゾンが、高温強酸性の環境にどのようにして適応しているのか、遺伝子の発現を調べることによってその手がかりを得ようと考えた。まずは、研究室での通常の培養条件下(42°C, pH 2.3)で発現している遺伝子を調べるためにEST解析を行った。通常培養下のmRNAから得られたESTクローン約33,000のシークエンスを行ったところ、シゾンの全遺伝子の86.3%に相当する遺伝子で転写産物が確認され、最小単位の遺伝子をフル回転させながら生命活動を営んでいることが明らかとなった。このEST解析で発現量の多かった上位20の遺伝子をリストしたものが表1である。これらはシゾンが高温酸性環境下で生きるために比較的大量にその遺伝子産物を必要としている遺伝子を示しており、言い換えればシゾンの細胞の維持、増殖に不可欠なハウスキーピングの遺伝子群である。多くの真核生物では細胞骨格系や糖代謝に関わる遺伝子、またリボソームの構築に関わる遺伝子などがハウスキーピング遺伝子

表1. EST解析で発現量の多かった上位20の遺伝子

Rank	Annotation	Number
1	Plasma membrane H ⁺ -ATPase	549
2	RuBisCo expression protein cfxQ (cbbX)	331
3	Alpha-tubulin	320
4	Chloroplast ascorbate hydrogen peroxidase, precursor	295
5	Hypothetical protein	228
6	Heat shock protein Hsp70	191
7	Phycocyanin-associated rod linker protein	161
8	Hypothetical transcript	158
9	DnaK-type molecular chaperone mortalin, mitochondrial precursor	157
10	Phosphoglycerate kinase	155
11	Serine-glyoxylate aminotransferase	151
12	Catalase	130
13	Enolase	126
14	Chloroplast chaperonin CPN60, precursor	125
15	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha (eEF-1a)	114
16	Mitochondrial ribosomal protein S1 precursor	113
17	Heat shock protein of Hsp90 family	109
18	Hypothetical protein	102
19	Fusion protein of AIR carboxylase and purC, cp or mt precursor	100
20	Chloroplast translation elongation factor P (EF-P)	97

Total genes, 4479; total clones, 32917.

として知られているが、シゾンの場合はヒートショックタンパク質や活性酸素の除去に働く遺伝子など、いわゆるストレス応答遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった。その中でも際立って高い発現量を示したのが細胞膜型のp-typeのプロトンATPase (PMA) 遺伝子であった。このタンパク質はATPの加水分解エネルギーを用いて細胞の中から外へプロトンを排出する働きをもつポンプタンパク質である。したがってシゾンのPMAはpH 2という強酸性、すなわち高プロトン濃度環境下にシゾンが適応するための鍵遺伝子である可能性が示唆された。次に着目したのが、4番目に発現量の多かった葉緑体（ストロマ型）アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) 遺伝子である。葉緑体のAPXは光化学反応で発生する活性酸素をアスコルビン酸の酸化反応と共役させることにより水へと変換し、無毒化する役割を担う。シゾン細胞の体積の大部分を占め、その独立栄養性を保証している葉緑体の酸化ストレス防御にAPX タンパク質が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

EST解析により、通常培養下でシゾンがどのような遺

伝子を発現させて高温酸性環境に適応しているかという基本情報が得られた。次にシゾンの培養環境を変化させ、環境の変化に伴って発現が誘導される遺伝子の探索を行った。具体的にはカスタムメイドのオリゴマイクロアレイを作製し、環境変動（ストレス環境）下のトランスクリプトーム解析により全遺伝子発現をモニターする方法を用いた。このマイクロアレイにはシゾンの細胞核にコードされる全タンパク質遺伝子4775のうち、重複や設計不可だった一部の遺伝子を除いた4586の遺伝子が載っており、さまざまな人為的環境変動に従って発現量に変化する遺伝子を網羅的に調べることが可能である。実験系を構築し、遺伝子発現のコントロールとなる細胞周期依存的なトランスクリプトーム解析がはじめに行われ、その精度と有用性が確かめられた。温度、pH、紫外線、NaCl、アルミニウムイオンなどの各種環境ストレス条件下におけるマイクロアレイ実験を行い、それぞれのストレスに固有な遺伝子発現プロファイルを明らかにして、ストレス耐性遺伝子の候補を複数選抜した。

特 集

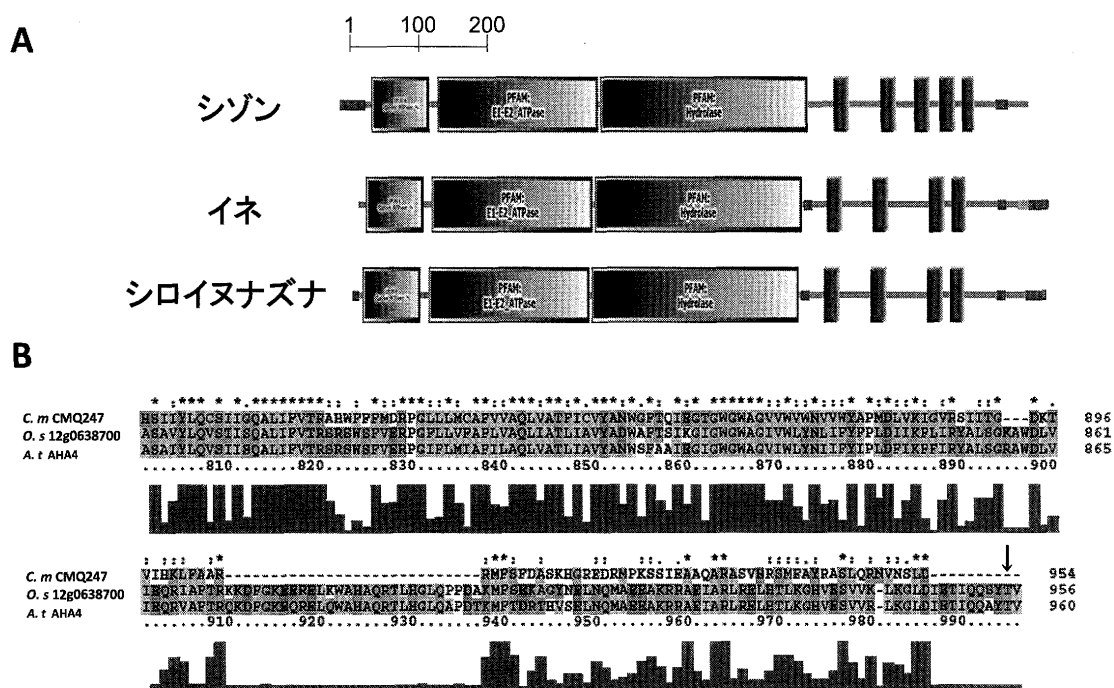


図1. (A) シゾン, イネ, シロイヌナズナの細胞膜型プロトンATPase (PMA) 遺伝子のドメイン構造と, (B) タンパク質のC末端のアミノ酸アライメント. シゾンの遺伝子には陸上植物に保存されているスレオニン残基 (矢印で示す) を含んだC末端の活性調節領域が存在しない.

酸性・アルミニウムイオン耐性植物

EST解析の結果より, シゾンでは細胞膜型プロトンATPase (PMA) 遺伝子の発現レベルがきわめて高いことが判ったが, 当該遺伝子に関しては, 東京理科大学の榎並らによってシゾンの近縁種, シアニジウムを使った細胞生理学的研究がすでに報告されている. シゾンと同じ環境に棲息するシアニジウムも, 細胞内外の大きなpH勾配を維持するために細胞内から細胞外へプロトンを排出する機構を持っていることが実験的に示され, 光合成, あるいは細胞呼吸により生産される細胞内のATP含量を光の条件や阻害剤を用いて調節すると, その細胞内のATP濃度に依存して, プロトンポンプの活性が変化し, 細胞質のpHも変動することが明らかとなった. そして細胞内のATPを枯渇させると細胞内に流入するプロトンの排出が行えなくなり, 細胞内pHは酸性になることが実証された³⁾. したがって, シアニジウムでは細胞膜に存在するATP依存性のプロトンポンプが活動することによりその細胞内が中性に保たれることが判り, 当該遺伝子がクローニングされている⁴⁾. シゾンではゲノム解析の結果よりPMA遺伝子は1コピーしか保持していないことが判った. したがってこの唯一の遺伝子に由来するポンプ活性により, シゾンは強酸性の環境下で細胞質を中性に保っていると考えられた. 陸上植物のシロイヌナズ

ナやイネでは, PMA遺伝子は10コピー以上ゲノム中に存在し, それぞれの組織・器官特異的に機能する遺伝子が異なることが判っている. 図1はシゾンとイネ, シロイヌナズナのPMA遺伝子のドメイン構造とC末端領域のアミノ酸配列のアライメントの比較を示している. シゾンのPMA遺伝子は全体的には典型的な植物型のPMA遺伝子の特徴を備えており, アミノ酸レベルでも陸上植物と7割程度の相同性を保持している. 陸上植物のPMA遺伝子ではC末端から2番目のスレオニン残基が高度に保存され, このC末端領域部分が通常状態では細胞質側でポンプを塞いで不活性化しており, その活性化にはスレオニン残基のリン酸化や14-3-3(アクチンタンパク質の「アクチン」に相当する名称)タンパク質(真核生物に遍在する細胞の情報伝達に関わる調節分子)の修飾を必要とすることが判っている. 一方, シゾンやシアニジウムのPMAにはこのポンプの不活性化に働くC末端領域がなく, 常に活性の高いタンパク質である可能性が示唆された.

このシゾンのPMA遺伝子をカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの下に置いて, ヒメツリガネゴケ, シロイヌナズナで形質転換体を作製し, 酸性環境下における耐性能を野生型と比較した. ヒメツリガネゴケではpH 4.8という恒常的な酸性環境下(通常はpH 6.7)で培養すると, 野生型は枯死してしまうのに対して, 形質導入株では緑色を保ち成長し続けた. シロイヌナズナ

では個体を一過的な酸処理 (pH 4.0 – 2.3, 48時間) の後、通常培養条件 (pH 5.8) に戻してその後の経過を調べると、野生型では pH 4.0 以下の処理で概ねどの個体も枯死してしまうのに対して、形質転換体では大部分が枯死せず成長し続けた。また、シロイヌナズナでは酸性土壌の問題であるアルミニウムイオンに対する耐性についても併せて調べたところ、その耐性も向上している可能性が示唆された (論文投稿準備中)。

シゾン固有のストレス耐性遺伝子が遺伝資源となるならば、従来の生物にない新規の形質を付加し、新たな特性を持った有用な形質導入植物を作出できる可能性がある。そこで、次はシゾンの金属イオン耐性能に着目して、特に各種金属の中でも最もシゾンが強い耐性能を示すアルミニウムイオンに対して応答する遺伝子の探索を行った⁵⁾。上述したようにアルミニウムイオンは酸性土壌環境下で植物の生育を阻害する最も主要な要因であることが判っており、100 mM という高濃度のアルミニウムイオン環境下でも生存可能なシゾンの形質は酸性土壌に生育可能な有用植物作出に役立つ可能性が考えられた。シゾンを通常培養している培地にはアルミニウムは一切含まれていないが、そこに最終濃度が 100 mM になるように塩化アルミニウムを添加し、応答する遺伝子をマイクロアレイ解析で探索した。その結果、アルミニウムに応答して転写産物量が増大するシゾン固有の機能未知な新規遺伝子 CmAlm-1, CmAlm-2 の 2 つの遺伝子を同定した。これらは今のところシゾンのゲノムにのみ見いだされる遺伝子であり、これまでに知られている他生物のどの遺伝子とも相同性が認められない。現在この遺伝子について解析を進めており、予備実験の段階であるがイネに導入した場合には、そのアルミニウム耐性が向上することが確認された。この結果は、今後同様にさまざまな環境ストレスに応答するシゾン固有の遺伝子が、有用な遺伝資源として利用できる可能性を示唆している。

酸化・高温ストレス耐性植物の作出

シゾンは真核光合成生物としては最も高温の環境に棲息し、光合成を行うことによって独立栄養的に生存している。したがって、代謝系をはじめとした細胞内で機能するすべての酵素や構造タンパク質が、いわゆる常温環境に棲息する光合成生物よりも耐熱性を持ち、酸化的なストレスに対してより耐性を持つと考えられた。特に EST 解析より見いだされたシゾンの葉緑体ストロマ型 APX 遺伝子は高温環境下における光合成の酸化ストレス除去に中心的な役割を果たしていると考えられたため、まずその特性を調べることにした。植物細胞には細

胞質型、ペルオキシソーム型、葉緑体のチラコイド膜局在型、ストロマ局在型の 4 種類の APX の遺伝子のタイプが存在する。陸上植物はこの 4 種のすべてのタイプを保持し、ゲノムに全部で約 10 コピー程度の APX 遺伝子がコードされるが、シゾンには細胞質型と葉緑体のストロマ型の遺伝子それぞれ 1 つずつコードされるのみであった。特に EST が多かったストロマ型の APX は分子系統解析を行うと耐塩性のクラミドモナスの APX と近縁であることが示され、ストレス耐性に関わる可能性が示唆された。そこでシゾンのストロマ型 APX 遺伝子を 35S プロモーターで過剰発現させたシロイヌナズナ形質転換体、さらには同様にシロイヌナズナの内在性のストロマ型 APX 遺伝子を過剰発現させた形質転換体を作製し、野生型と共にその個体の性質を比較した。個体の破碎液における可溶性 APX 活性を調べたところ、シゾンの APX を導入した株では野生型の約 10 倍、内在性の APX を過剰発現させた株では野生型の約 3 倍の APX 活性を示し、シゾンの APX タンパク質の触媒能力が高いことが示唆された (図 2A)。これらの各株のリーフディスクを、葉緑体内で活性酸素を過剰に発生させるメチルビオローゲン (MV) で処理したところ、APX の酵素活性の強さに比例して、メチルビオローゲンに対する耐性 (葉の白化の抑制) が強くなっていることが判った (図 2B)。したがって、シゾンの APX 遺伝子が陸上植物の葉緑体内で機能し、酸化ストレス耐性を向上させていることが示された。また、酸化ストレスは高温によっても増大することが考えられたことから、形質転換植物の高温耐性についても調べてみた。常温 (23°C) で生育させていた個体を高温 (33°C) に一定期間曝して、その後常温に戻して経過観察をしたところ、芽生えや成体のいずれにおいても、野生型ではほとんどが白化して枯死したのに対して、シゾンの APX を導入した個体では緑色を保ち、成長し続けたことから (図 2C)、個体レベルで高温耐性が上がっていることが明らかとなった。高温処理した個体について、その細胞の微細構造を電子顕微鏡で詳細に検証してみると、野生型では葉緑体のチラコイド膜が損傷し、葉緑体が完全に崩壊していたのに対して、シゾンの APX 導入株ではチラコイド膜の損傷は見られず葉緑体が正常に機能していることが示唆された (図 2D)。APX による活性酸素の除去が、葉緑体の構造と機能の維持に重要な役割を果たしていることが示され、それが高温耐性の向上に寄与している可能性が示唆された。シロイヌナズナの内在性の APX を過剰発現させた株では高温耐性はまったく向上せず、野生株と同様に枯死した。

特 集

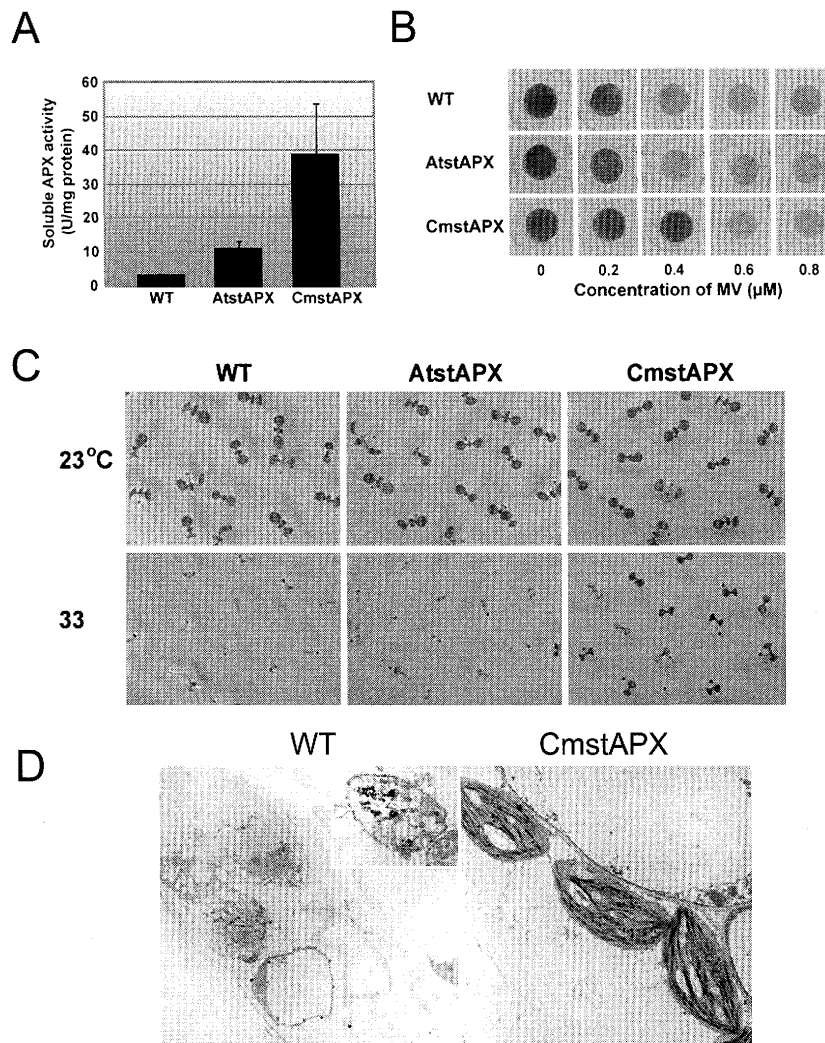


図2. (A) 野生型 (WT), シロイヌナズナの葉緑体ストロマ型 APX 遺伝子導入株 (AtstAPX), シゾンの葉緑体ストロマ型 APX 遺伝子導入株 (CmstAPX), における可溶性 APX の酵素活性. シゾンの APX を導入した株では野生株の約 10 倍の酵素活性を示した. (B) 各株のリーフディスクに対するメチルビオローゲン (MV) の影響. MV が $0.4 \mu\text{M}$ 濃度で野生型, 内在性 APX 導入株が白化したのに対して, シゾンの APX 導入株は緑色を保っている. (C) 各株を常温 (23°C), 高温 (33°C) で発芽させ, 7 日後の芽生えの様子. 高温条件下で正常に発芽・生育できたのはシゾンの APX 導入株のみ. (D) 常温 (23°C) で栽培後, 高温 (33°C) に 7 日間曝した後の葉肉細胞の葉緑体の電子顕微鏡像. 野生型ではチラコイド膜が損傷し葉緑体自体も崩壊しているが, シゾンの APX 導入株ではほぼ正常の構造を保っている. (いずれも文献 6 の図を一部改変して使用).

おわりに

これまで, 極限的な環境に棲息する生物の特性や遺伝子を用いた応用的な研究は専ら原核生物が対象であったが, 著者らの研究は, シゾンが極限的な環境に棲む真核生物の研究対象や遺伝資源としてこれから幅広く用いられ得る可能性を提示した. しかしながら, シゾンの遺伝子やタンパク質を応用的, 工学的に利用しようという研究はスタート地点に立ったばかりであり, 今後, 生物物理学, 生物工学, 農学, 医学などの多角的な視点で研究が進められれば, さらにその有用性が明らかとなること

が期待される. 将来, わずか 1 ミクロン程度の極小の細胞が環境, 食糧, 医学などの諸問題に対しても大きく貢献する時が来るのではないかと考えている.

文 献

- 1) Matsuzaki, M. *et al.*: *Nature*, **428**, 653 (2004).
- 2) Nozaki, H. *et al.*: *BMC Biol.*, **5**, 28 (2007).
- 3) Enami, I. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **27**, 1351 (1986).
- 4) Ohta, H. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 9 (1997).
- 5) Misumi, O. *et al.*: *Cytologia*, **73**, 437 (2008).
- 6) Hirooka, S. *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **28**, 1881 (2009).