

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18824

研究課題名(和文) 網羅的解析手法およびゲノム編集技術による銅苔の重金属耐性・蓄積機構の分子基盤解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of heavy metal tolerance and accumulation in copper moss by transcriptome analysis and genome editing technology

研究代表者

野村 俊尚 (Nomura, Toshihisa)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：20722771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：環境負荷の少ない植物を用いた重金属浄化や回収技術の技術発展のためには、ハイパーアキュムレーター種の有する重金属耐性・蓄積機構の解明とその利用が鍵となる。本研究では、銅耐性・蓄積能を有するホンモンジゴケに着目し、トランスクリプトーム情報の収集およびゲノム編集などの実験技術を適用することで、未知である本種の高い銅耐性・蓄積能の背景にある分子機構の解明を目指した。その結果、銅輸送体であるSchMA5を介した細胞内から外への銅の排出機構が、ホンモンジゴケの有する高い銅耐性能に必須であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop technologies for heavy metal phytoremediation, it is important to elucidate the heavy metal tolerance and accumulation mechanism of the hyperaccumulator plants. In this study, we focused on copper mosses *Scopelophila cataractae* which has copper tolerance and accumulation ability. By using genomic editing technology and transcriptome analysis, we aimed to elucidate the molecular mechanisms underlying copper tolerance and accumulation in *S. cataractae*. As a result, we found that the mechanism of copper export from intracellular to extracellular via copper transporter SchMA5 is necessary for copper tolerance ability in *S. cataractae*.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：ホンモンジゴケ 重金属耐性 コケ植物 ゲノム編集 CRISPR/Cas9システム

1. 研究開始当初の背景

近年、産業活動による環境中への重金属汚染が世界的に増加している。重金属の多くが生体内に蓄積し、毒性を示すことから、汚染環境からの除去技術の開発が要請されている。特に、植物を利用した浄化法は、従来の物理化学的な方法に比べて環境負荷が少なく、技術開発が期待される。また、植物体内に蓄積させた重金属は回収が可能であり、希少金属の再利用技術にも利用できる。このような技術開発の鍵となるのがハイパーアキュムレーターと呼ばれる重金属耐性と蓄積能力を兼ね備えた植物種である。しかし、このような種は成長速度が遅い等の問題点があり、自体を利用することは不利益な点が多い。そこで、ハイパーアキュムレーター種の重金属耐性および蓄積に関する遺伝子の同定や作用機作を解明し、その機能を付加した高生産性植物の作出が目指されている。これまでのハイパーアキュムレーター種の研究は、主に高等植物を対象として為されてきた。例えば、アブラナ科のハクサンハタザオ () は、亜鉛輸送体 *HMA4* 遺伝子の恒常的発現化および重複により亜鉛耐性と蓄積能を獲得したことが報告されている (Hanikenne M. et al., 2008, *Nature*, 453:391-395)。しかしながら、このような植物種の重金属耐性・蓄積作用の生理学および分子メカニズムに関する知識基盤は未だ脆弱な部分が多く、有用植物作出への応用には、さらなる基礎的知見の集約が必要である。特に、コケ植物におけるハイパーアキュムレーターである銅苔と称される種に関する研究例は乏しく、その重金属耐性・蓄積の分子メカニズムに迫る知見は、殆ど得られていない。日本における銅苔の代表的な一種であるホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*) は、寺社仏閣の銅葺き屋根の下、銅鉾山周辺といった銅濃度の高い特殊環境にのみ生育し、銅を蓄積するという生態および生理学的に興味深いコケ植物である。殊に、ホンモンジゴケの持つ特徴として、通常植物種の数千倍 (乾燥重量の 3%) という高い銅蓄積能が挙げられる (Satake K. et al., 1988, *Journal of*

Bryology 15:353-376)。さらに、本種の銅耐性能は非常に高く、我々の行った試験では数 mM オーダーの銅添加にまで耐性を示すことを確認している。一方、主要作物を含む多くの植物種では、数 μM の銅の存在からでも生育に障害が生じる。農耕地への銅蓄積は、産業活動による銅の飛散、銅を主成分としたボルドー液や動物性肥料の使用により引き起こされる。このような銅汚染による農作物の栽培障害は問題視されており、我が国では農用地の土壤の汚染防止等に関する法律において、銅は特定有害物質に指定されている。従って、植物の銅耐性メカニズムの解明とその強化は、取り組むべき課題であると考えられる。

上記の背景を踏まえ我々は、ホンモンジゴケの無菌培養株を樹立し、銅耐性と蓄積能の分子メカニズム解明に向けた実験技術の開拓に取り組んできた。これまでにホンモンジゴケを対象に、プロトプラスト PEG 法による外来遺伝子導入、ゲノムへのランダム挿入による安定形質転換株の作出といった基本的な実験手法の導入に成功している。従って、次のステップとして、トランスクリプトーム解析による転写産物情報の整備および候補遺伝子の探索や、ゲノム編集技術による標的遺伝子の破壊技術が確立できれば、ホンモンジゴケの重金属耐性・蓄積の分子メカニズム解明へのアプローチが可能となる状況であった。

2. 研究の目的

環境負荷の少ない植物を用いた重金属浄化や回収技術の技術発展の鍵となるハイパーアキュムレーター種の重金属耐性・蓄積メカニズムの解明が求められている。本研究では、銅耐性・蓄積能を有するホンモンジゴケを対象とし、トランスクリプトーム情報の収集およびゲノム編集などの実験技術を適用し、未知である本種の高い銅耐性・蓄積能のために機能する遺伝子の探索とその分子メカニズムを紐解くことを目的とする。

3. 研究の方法

第一に、ホンモンジゴケにおいて有効な CRISPR/Cas9 システムによる標的遺

伝子への変異導入法の確立を試みた。並行してホンモンジゴケ原系体培養株を対象に、通常培地条件および銅添加培地条件でのトランスクリプトーム情報を取得し、ホンモンジゴケ研究のための基盤情報を整備すると共に、銅耐性・蓄積に関与しうる候補遺伝子の探索を試みた。さらに、銅耐性・蓄積への関与が想定される候補遺伝子について確立したゲノム編集技術などを駆使して機能解析を進めた。

4. 研究成果

(1)ホンモンジゴケを対象としたゲノム編集技術の導入

まず、ホンモンジゴケ U6 snRNA プロモーター配列を用いたガイド RNA 発現ベクター並びにホンモンジゴケ由来の構成発現プロモーター (ScEF1 プロモーター) 制御の Cas9 発現ベクターを作出した。次に、葉緑体の分裂の為に機能するホンモンジゴケの *FtsZ2-1* 相同遺伝子を標的として、プロトプラストへの一過的な発現と薬剤耐性選抜により、標的配列への変異導入が可能かどうか検証した (図 1、上段図)。その結果、葉緑体の形態に影響が生じた株 (図 1、下段写真)

図 1

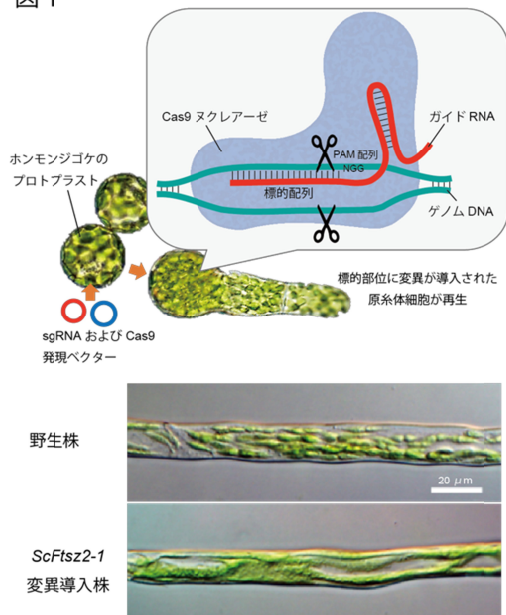


図 1. 本研究で確立したホンモンジゴケへの CRISPR/Cas9 システムによる標的遺伝子への変異導入法の概略 (上段)と、単離された *ScFtsZ2-1* 変異導入株における原系体細胞の表現型の例 (下段).

を、5 割以上の効率で得ることができた。

さらに、単離した葉緑体の形態変化株では、ゲノム DNA 上における標的配列の近傍部にランダムな欠損および挿入変異が引き起こされていることを確認した。加えて、確立した手法では、2 種類のガイド RNA を組み合わせた数千 bp の欠損変異や多重変異導入も可能であった。

一方、本実験系は、目レベルで系統の異なるセン類であるヒメツリガネゴケにおいても効率を保ったままで適用可能であった。従って、本手法は、セン類に広く適用できる可能性が高く、例えば非モデルコケ植物種を材料に用いた環境ストレス耐性や進化に関する研究などの発展に大きく貢献できるものと考えられる。

(2)銅輸送体遺伝子への変異導入株の取得と銅耐性および蓄積試験

上記で確立したゲノム編集技術を用いて、ホンモンジゴケの銅耐性への関与が想定される候補遺伝子として着目した銅輸送体 Heavy Metal ATPase 5 ホモログ遺伝子 (*ScHMA5*) の変異体株を取得した。取得した *schma5* 変異体株の解析を進めた結果、野生型のホンモンジゴケと比較して、*schma5* 変異体株では銅耐性能が顕著に低下していることが明らかになった (図 2)。また、*schma5* 変異体株が死滅しない程度の銅添加条件において、*schma5* 変異体株では、野生株と比較して銅含有量が上昇することを確認した。他方で、ScHMA5 の細胞内局在を調べるため、蛍光タンパク質を融合した ScHMA5 (Citrine-ScHMA5) を、ScHMA5 遺伝子のプロモーター制御下で安定的に発現するホンモンジゴケ形質転換体を作成し、観察を行った。その結果、ScHMA5 は小胞体に局在している可能性が見出された。また、銅添加処理による細胞内局在の影響を調べたが、顕著な変化は観察されなかった。上記の ScHMA5 の細胞内局在解析の結果について、その真偽を検証するため、蛍光タンパク質融合 ScHMA5 発現ベクターを用いた *schma5* 変異体株の相補試験を実施した。その結果、小胞体に Citrine-ScHMA5 の蛍光シグナルが観察

される相補株において、*schma5* 変異体で生じた銅耐性能の低下、並びに銅蓄積の上昇が回復することが確認された。これらの結果より、小胞体膜に局在する ScHMA5 が、細胞質から細胞外への銅の排出メカニズムに関与し、本機構がホンモンジゴケの高い銅耐性能に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

図 2

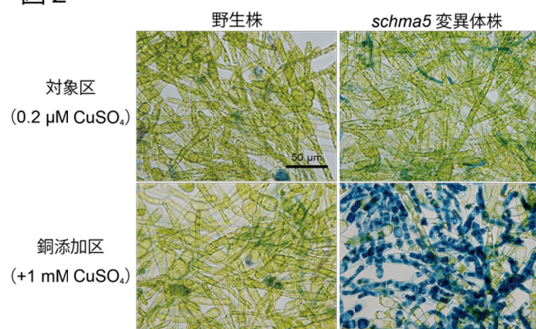


図 2. 本研究で取得した *schma5* 変異体株の銅耐性能試験の結果の一例。エバンスブルーで染色された青色の部分が死滅した原系体細胞を示す。

(3) ホンモンジゴケ原系体培養株におけるトランスクリプトーム解析

コントロール区 (0.2 μM CuSO_4) および本種の生育に悪影響が出ないレベルの銅添加培養条件 (800 μM CuSO_4) で培養したホンモンジゴケ原系体を対象に RNA-Seq 解析を実施したが、本銅添加条件で顕著に発現量が亢進している重金属耐性・蓄積関連遺伝子は見出されなかった。一方、銅添加の有無に関わらず構成的に発現量の高い転写産物群の中に、重金属結合能が推定されるメタロチオネン様タンパク質コード遺伝子が見出された。さらに追加解析として、より高濃度の銅処理条件 (2 mM CuSO_4 、24 時間) での RNA-Seq を実施した。この結果については、現在進めているホンモンジゴケの高精度なドラフトゲノム情報が整備でき次第、解析を進める計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nomura T, Sakakibara H (2017) Targeted Mutagenesis using RNA-guided endonucleases in mosses, *Bio-protocol*, 査読有、7(12): e2359. DOI:10.21769/BioProtoc.2359

Nomura T, Sakurai T, Osakabe Y, Osakabe K, Sakakibara H (2016) Efficient and heritable targeted mutagenesis in mosses using the CRISPR/Cas9 system, *Plant & Cell Physiology*, Vol.57, 査読有、No.12, 2600-2610.

DOI:10.1093/pcp/pcw173

野村 俊尚, 馳澤 盛一郎, 榎原 均 (2016) コケ植物におけるニッチ戦略のための細胞分化-銅苔における無性芽の分化-, *BSJ-Review*, 査読有、Vol. 7D, 153-160.

〔学会発表〕(計 9 件)

野村俊尚, 井藤賀操, 檜垣匠, 櫻井哲也, 馳澤盛一郎, 榎原均 ホンモンジゴケにおける銅輸送体を介した銅耐性機構 第 59 回日本植物生理学会年会 札幌コンベンションセンター (札幌市) 2018 年 3 月 28 日

野村俊尚, 櫻井哲也, 井藤賀操, 馳澤盛一郎, 榎原均 銅輸送体遺伝子は、ホンモンジゴケの銅耐性に関する 日本蘚苔類学会第 46 回群馬大会 水上公民館 (群馬県利根郡みなかみ町) 2017 年 8 月 29 日

野村 俊尚, 櫻井 哲也, 刑部 祐里子, 刑部 敬史, 馳澤 盛一郎, 榎原 均 ゲノム編集技術で紐解くホンモンジゴケの銅耐性機構 シンポジウム:植物機能の解明を目指すゲノム編集技術 第 58 回日本植物生理学会年会 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市) 2017 年 3 月 16 日

野村俊尚, 榎原均 CRISPR/Cas9 システムによる蘚類の高効率ゲノム編集 日本植物学会第 80 回大会 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) 2016 年 9 月 16 日

野村俊尚, 櫻井哲也, 刑部祐里子, 刑部敬史, 榎原均 CRISPR/Cas9 システムによる蘚類 (ホンモンジゴケおよびヒメツリガネゴケ) の高効率ゲノム編集 日本ゲノム編集学会第 1 回大会 広島国際会議場 (広島県広島市) 2016 年 9 月 6 日

野村俊尚, 榎原均 蘚類へのゲノム編

集技術 CRISPR/Cas9 システムの導入
日本蘚苔類学会第 45 回屋久島大会 屋
久島町安房総合センター（鹿児島県熊毛
郡屋久島町）2016 年 8 月 29 日

野村俊尚、井藤賀操、櫻井哲也、馳澤
盛一郎、榊原均 ホンモンジゴケにおける
Copper-transporting P-type ATPase の
銅耐性能への貢献 日本植物生理学会第
57 回年会 岩手大学上田キャンパス（岩
手県盛岡市） 2016 年 3 月 18 日

野村俊尚、若崎眞由美、上原由紀子、
吉田拓広、小嶋美紀子、豊岡公德、持田
恵一、櫻井哲也、馳澤盛一郎、榊原均 コ
ケ植物にみられるニッチ戦略のための細
胞分化 日本植物学会第 79 回大会 朱鷺
メッセ新潟コンベンションセンター（新
潟県新潟市）2015 年 9 月 6 日

野村俊尚、馳澤盛一郎、榊原均 ホン
モンジゴケの無性芽に関する基礎的な解
析 日本蘚苔類学会第 44 回北八ヶ岳大会
佐久穂町生涯学習館花の郷・茂来館（長
野県佐久穂町）2015 年 8 月 4 日

〔その他〕

ホームページ等

Precise gene editing in mosses

-Gene-editing technology could reveal
how some mosses can flourish in
extreme environments-

RIKEN Research, Research Highlights,
January 13, 2017.

[http://www.riken.jp/en/research/rikenr
esearch/highlights/8312/](http://www.riken.jp/en/research/rikenresearch/highlights/8312/)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

野村俊尚 (NOMURA, Toshihisa)

国立研究開発法人理化学研究所・環境
資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：20722771