様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2015
課題番号：２５５５００６３

研究課題名（和文）環境再生・食糧増産への応用に向けた強ストレス耐性緑藻由来低温応答遺伝子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of a cold-inducible gene from stress tolerant green algae

研究代表者
平田　収正（Hirata, Kazumasa）

大阪大学・薬学研究科（研究院）・教授

研究者番号：３０１９９０６２

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）：　本研究では、植物に強い環境ストレス耐性を付与することができる、優れたストレス耐性遺伝子の単離とその機能解析を目指し、強ストレス耐性緑藻Chlamydomonas W80 (W80株)より見出した低温ストレス応答性機能未知遺伝子の機能解析を行った。本遺伝子は低温ストレスのみならず、過剰量の銅イオンにより引き起こされるストレスによっても転写産物量が著しく増加することを見出した。また、本遺伝子を大腸菌において発現させ、増殖試験や生菌数計測、形状解析などの様々な表現系解析を実施したところ、本遺伝子がコードするタンパク質が大腸菌内において細胞の分裂過程を阻害し形態変化を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a functional analysis of a unknown function cold-inducible gene from stress tolerant green algae, Chlamydomonas W80, in order to gain a novel stress tolerant gene that can useful for creating a stress tolerant plants. We found that the gene was inducible by high concentration of copper and low temperature. In addition, through a line of phenotypic analysis of E. coli strains expression the W80 gene, heterologous expression of the gene with the signal peptide deletion induced the inhibition of cell growth, change in cell shape, unusual distribution of its nucleoid in E.coli. These results suggest that the W80 gene is a stress-responsive gene encoding the protein that has property of inhibiting cell growth through a prevention of cell division process.

研究分野：環境薬学

キーワード：ストレス耐性　緑藻　機能未知遺伝子

## １．研究開始当初の背景

生物は、その進化の過程で様々な環境ストレスに適応することにより、自然淘汰に耐えて多様な環境条件における種の維持・繁栄を可能にした。特に光合成生物は、その生存戦略として、動物にはない非常に巧妙な環境ストレスを回避あるいは緩和する機能（環境ストレス耐性）を発達させた。高等植物と同じ『緑色植物門』に分類される緑藻は、光合成生物が約５億年前に水中から陸上に進出する際の直接的な進化の起源と考えられ、高等植物と同様あるいは非常に類似した代謝系を有している。しかし緑藻は、高等植物が誕生する以前の非常に過酷な環境条件においても種を維持し、また現在その分布は、極地から熱帯地域、光がほとんど届かず水圧も高い水域から強い太陽光・極度の乾燥に曝される高山域にまで及ぶことから、高等植物よりも広範かつ強力な環境ストレス耐性を持つと考えられる。

光合成生物由来の環境ストレス耐性遺伝子の探索と環境再生や食料増産への応用を可能とする環境ストレス耐性植物の作製を目指した研究は、国内外で活発に行われてきているが、応用に堪える優れた遺伝子はほとんど得られていないのが現状である。申請者は長年、強い環境ストレス耐性を有する微細藻類の探索と、当該藻類に由来する優れた環境ストレス耐性を担う遺伝子の機能解析研究を行ってきた。その中で、和歌山県の海岸において独自に単離した海産性緑藻 *Chlamydomonas* W80 (W80 株)が、塩、酸化及び重金属ストレスに対して非常に強い耐性を有することを見出した。さらに、W80 株由来のストレス耐性遺伝子の探索と機能解析を行い、酸化ストレス耐性を担う複数の遺伝子を見出してきた。

## ２．研究の目的

本研究では、地球規模の課題となっている環境破壊や食糧危機、エネルギー枯渇の解決に向けた光合成生物の有効活用の道を拓く上で重要な形質である低温ストレス耐性に着目し、過去に行った EST 解析と続く発現解析を通じて見出した、W80 株由来の低温ストレス誘導性遺伝子(cluster58 と命名)の機能の解析・評価を行うことを目的とした。

## ３．研究の方法

### (1) Cluster58 遺伝子の発現解析

高塩ストレス(1.5 M NaCl)、酸化ストレス(150 μM パラコートあるいは 1 mM $H_2O_2$)、過剰量銅イオンストレス(750 μM $CuSO_4$)、あるいは低温ストレス(4℃)条件下において 8 時間培養した W80 株より total RNA を抽出・精製し、TaqMan プローブを用いた定量的リアルタイム RT-PCR 法により、細胞内蓄積 cluster58 mRNA 量を解析した。GAPDH 遺伝子を内標準遺伝子とした。

### (2) Cluster58 遺伝子発現大腸菌の作製と増殖試験

Cluster58 遺伝子を組み込んだ pQE2 プラスミド等、各種 pQE2 プラスミドを構築し、大腸菌株 BL21(DE3)に導入した。OD (optical density)測定の際は、96 穴マイクロプレートを用いて大腸菌株を培養し、OD 測定はマイクロプレートリーダーを用いて行った。組換えタンパク質の発現誘導は、IPTG を用いて行った。

### (3) Cluster58 遺伝子発現大腸菌の蛍光顕微鏡観察

Cluster58 遺伝子を発現させた大腸菌株を含む各種大腸菌株を CFDA (6-Carboxyfluorescein diacetate)及び DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)を用いて染色した。蛍光染色した細胞は、蛍光顕微鏡(BZ-X700, KEYENCE)を用いた細胞数解析や細胞形状解析に供した。蛍光顕微鏡画像の解析には KEYENCE の BZ-X analyzer を用いた。

### (4) Cluster58 遺伝子強制発現クラミドモナス株の作製と選抜

Cluster58 遺伝子強制発現クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)株を作製するため、cluster58 遺伝子を pGenD プラスミドに組み込んだ cluster58 発現プラスミド等を構築した。構築した発現ベクターは、エレクトロポレーション法を用いて *C. reinhardtii* C9 株に導入し、抗生物質を含む TAP 寒天培地を用いて形質転換体の選抜を行った。続いて、コロニーPCR により cluster58 発現カセットがゲノムに挿入された形質転換株を選抜した。続いて、候補株より total RNA を抽出・精製し、RT-PCR 法により cluster58 遺伝子のコーディング領域全長を含む mRNA が存在する形質転換株を選抜した。

## ４．研究成果

### (1) Cluster58 遺伝子の配列解析

Cluster58 遺伝子の全長 cDNA 配列をクローニングし、その塩基配列を解析したところ、cluster58 遺伝子は 163 アミノ酸残基長のタンパク質をコードしていることが推定された(図 1)。Cluster58 遺伝子の推定アミノ酸配列を、BLAST を用いたホモロジー解析に供したところ、cluster58 タンパク質には CHRD

図１．Cluster58タンパク質のアミノ酸配列の特徴

と呼ばれる機能未知ドメインが含まれていることが見出された。CHRD ドメインは Bone morphogenic protein を抑制する機能を持つ chordin という、ヒトやアフリカツメガエルが持つ遺伝子に存在するドメインであるが、その機能は未だ明らかとなっていない。CHRD ドメインを有する遺伝子が存在する生物種には、藍藻や土壌細菌などがあげられるが、植物や古細菌、酵母には存在しない。機能既知のタンパク質の中には、cluster58 タンパク質と高い相同性を示すものは見出されなかった。また、WoLF PSORT 等の細胞内局在予測プログラムにより、cluster58 タンパク質の N 末端側には分泌シグナルが存在することが推定された。

(2) Cluster58 遺伝子の配列解析

Cluster58 遺伝子の機能解析の一環として、高塩ストレス、活性酸素ストレス、過剰量銅イオンストレス、低温ストレス処理による、cluster58 mRNA の細胞内蓄積量の変化を、定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、過剰量銅イオン及び低温ストレスにより、W80 株内の cluster58 遺伝子の転写産物量がそれぞれ 5.1 倍もしくは 11 倍増加することが明らかとなった。高塩もしくは活性酸素ストレスでは、著しい転写産物量の増加は認められなかった。これらの結果は、cluster58 遺伝子が過剰量銅イオンや低温ストレスに対する応答反応に関与する機能を担っている可能性が考えられる。

(3) Cluster58 発現大腸菌の増殖試験

Cluster58 遺伝子をノックアウトもしくはノックダウンした W80 株の作製は、技術的に現状難しいため、大腸菌を宿主とした異種細胞発現系を用いて cluster58 遺伝子の機能推定を行った。まず、各種発現ベクターを大腸菌に導入し、cluster58 タンパク質の発現が大腸菌の増殖に当てる影響を培養液の濁度($OD_{600}$)を測定することにより調べた。その結果、cluster58 遺伝子の推定分泌シグナル領域を除いた領域(cluster58-S と命名)を発現させた大腸菌は、その他の各種コントロール大腸菌株と比較して、培養 8 時間後以降の OD 値が高くなることが解った。

この結果から cluster58-S タンパク質の合成により当該大腸菌株の増殖が促進されたことが示唆されたため、培養 8 時間後の培養液を寒天培地(IPTG を含まない)に播種し、colony forming unit (CFU)を計数した。cluster58-S 発現大腸菌株の CFU 値は、OD 値の場合と異なり、その他コントロール株と比較して小さくなった。すなわち、cluster58-S 発現により大腸菌数が減少している、もしくは寒天培地上での増殖が著しく阻害される状態になっている可能性が示唆された。

cluster58-S 発現が大腸菌に与える影響をさらに詳細に解析するため、生細胞を染色する蛍光色素である CFDA を用いて大腸菌を染色した。蛍光顕微鏡を用いて生菌数(CFDA 染色細胞数)を計数したところ、各種コントロール大腸菌株と比較して、cluster58 発現大腸菌の生菌数が約 30%程度に減少していることが解った。

(3) Cluster58-S 発現大腸菌の形状解析

上記顕微鏡解析の過程で、cluster58-S 発現大腸菌の形状がその他コントロール大腸菌株の形状と異なる傾向が認められた。そこで、上述の CFDA 染色細胞を用いて、詳細な細胞形状解析を行った。形状の評価は、長軸と短軸の比(AR 値)を個々の細胞について計測することにより実施した。AR 値は、その値が大きいほど細長い形をしていることを示す指標値である。CFDA 染色した大腸菌株の蛍光像を用いて各種大腸菌株の AR 値を計測したところ、cluster58-S 発現大腸菌の AR 値は、その他コントロール株と比較して、AR 大きい傾向にある、すなわちより cluster58-S 発現大腸菌は細長い形状をしている傾向があることが解った。さらに、CDFA 染色像と共に、DNA 染色剤である DAPI で染色した細胞の蛍光像も同時に観察したところ、cluster58-S 発現株では、約 30%の細胞において DNA が細胞の両端に、約 40%の細胞において DNA が細胞の片側に偏在していることが見出された。

これらの結果から、cluster58-S タンパク質は大腸菌内において、細胞分裂時の DNA 分配や伸長後の細胞の分裂過程に干渉し、細胞分裂の進行を阻害するため、CFU の減少、生菌数の減少、細胞の伸長、DNA の異常分配が引き起こされている可能性が示唆された。Cluster58-S 発現により OD が増加したのは、細胞形状が変化したためではないかと推測される。

(4) Cluster58 強制発現クラミドモナス株の作製

本研究では、W80 株の近縁種である淡水性緑藻 *C. reinhardtii* を異種細胞発現系として用いた cluster58 遺伝子の機能解析に取り組んだ。淡水性緑藻 *C. reinhardtii* は、世界中で広く研究に利用されているモデル生物の一つである。クラミドモナス用の cluster58 遺伝子発現用プラスミドを構築し、C9 株に形質転換した。抗生物質を用いた選抜及びコロニーPCR による選抜に続いて、RT-PCR 法により全長 cluster58 mRNA の存在が確認された株のみを選抜した。以上の選抜過程を通じて、cluster58 遺伝子のコーディング領域全長を含む mRNA が転写されている、5 株の cluster58 遺伝子強制発現クラミドモナス株が得られた。今後、これら形質転換株

のストレス環境下における増殖試験など、詳細な表現系解析を実施することにより、cluster58 遺伝子の機能の更なる解明が期待される。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 4 件）

① 田中聡，宮坂均，松浦秀幸，平田收正．海産性緑藻 Chlamydomonas W80 由来のストレス誘導遺伝子の解析，植物細胞分子生物学会，(2014)，いわて県民情報交流センター．

② 野澤紗彩，松浦秀幸，石西諒，棚田恵介，宮坂均，田中聡，原田和生，平田收正．海産性緑藻 *Chlamydomonas* W80 由来新規ストレス応答遺伝子の機能解析，第 38 回日本分子生物学会，(2015)，神戸ポートアイランド

③ 野澤紗彩，松浦秀幸，石西諒，棚田恵介，宮坂均，田中聡，原田和生，平田收正．海産性緑藻 *Chlamydomonas* W80 由来新規ストレス応答遺伝子の機能解析，第 33 回日本植物細胞分子生物学会，(2015)，東京大学農学部

④ 石西諒，松浦秀幸，野澤紗彩，棚田恵介，宮坂均，田中聡，原田和生，平田收正．強ストレス耐性緑藻由来新規ストレス応答遺伝子の機能解析，第 12 回クラミドモナス研究会，(2015)，中央大学

６．研究組織
(1)研究代表者
平田　收正（HIRATA KAZUMASA）
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30199062

(2)研究分担者
田中　聡（TANAKA SATOSHI）
関西電力株式会社研究開発室電力技術研究所・その他部局等・研究員
研究者番号：90451294