

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870022

研究課題名（和文） 極限環境藻類を用いた真核細胞のストレス耐性遺伝子の探索と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of the stress

tolerance-related genes of the extreme environmental algae

研究代表者

三角 修己 (MISUMI OSAMI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90583625

研究成果の概要（和文）：極限環境藻類が高温、高濃度金属イオン、酸化ストレス環境下で発現誘導させる遺伝子群をトランスクリプトーム解析により明らかにした。真核生物である原始紅藻のシズンが、特に生存閾値に近い高温域における熱ストレスに対して、高熱性真正細菌由来のヒートショックタンパク質を発現させ、適応していることが明らかとなった。また、シズンの酸化ストレス時におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現様式も明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The transcriptome of an extreme environmental alga were performed under a high temperature, highly-concentrated metal ions, and oxidative stress environment. As a result, the candidates of many stress responsive genes have been identified. The primitive eukaryotic red alga *Cyanidioschyzon merolae* have adapted by the expression of heat shock protein derived from thermophile against heat stress range close to the threshold temperature. The expression patterns of energy metabolism-related genes were also analyzed under oxidative stress environment by using the alga.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,240,000	372,000	1,612,000
2011年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能

1. 研究開始当初の背景

Cyanidioschyzon merolae (以下シズンとする) は研究代表者の在籍していた研究グループによって1992年にイタリアのナポリの温泉水から独自に採種、純化された生物材料であり、同グル

ープによって真核藻類としては世界で初めてゲノムが完全解読された生物である。ポストゲノム解析を通して、真核細胞に共通するミトコンドリアや植物に含まれる葉緑体などの細胞小器官の分裂増殖の分子機構や細胞周期における遺

伝子発現様式などが明らかにされ、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析の有用性が示されてきた。このようなシズンを取り巻く研究環境の進展により、シズンの高温・強酸性という過酷な極限環境への適応機構についてゲノム情報を基盤に様々な手法を用いて解析をすることが可能となった。

2. 研究の目的

シズンは高温(40-50℃)、高硫黄、強酸性(pH 1-3)のいわゆる極限的な環境の温泉に棲息する単細胞の真核紅藻である。シズンは細胞の直径がおおよそ2ミクロンで、核、ミトコンドリア、葉緑体、など真核生物を特徴づける細胞小器官を1つずつ含む最も単純な体裁をしており、核、ミトコンドリア、葉緑体の3ゲノムの塩基配列が100%完全に決定されている。本研究の目的は、シズンのこのような単純な細胞の体裁、極限環境下への適応、また完全解読されたゲノム情報等の研究対象としての特徴を生かし、シズンから環境適応に関わる遺伝子を見だし、その機能を調べることにより真核細胞の極限環境への適応機構の基本原則を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、シズンを生物材料とし、各種環境ストレス条件下でトランスクリプトーム解析(マイクロアレイ解析)をおこない、ストレスに反応する遺伝子群を研究対象候補として選抜する。選抜された遺伝子のなかから、目的のストレスに特異的に反応(転写発現)している遺伝子をRT-PCR等で再選抜し、研究対象とする。選定された遺伝子については遺伝子産物(タンパク質)の経時的变化や細胞内局在等を調べ、その分子の働きを推定する。

4. 研究成果

研究期間の前半で研究室培養環境下

(42℃、pH2.3)における通常状態の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより解析した。この、シズンが最もよく増殖する条件下において既に熱ショックタンパク質や活性酸素分子種の除去に関わる遺伝子など、いわゆるストレス応答に関わるものが多く発現していることが明らかとなった。次に、シズンにそれぞれ高温、酸化ストレス、高濃度金属イオンストレス(鉄、亜鉛)を与え、各々のストレス添加時における遺伝子の発現プロファイルを同様に解析した。まず得られたプロファイルより、転写産物の増加する遺伝子に着目し、RT-PCRやノザン解析によりその発現量変化の再現性を確認し、候補遺伝子の絞り込みを進めた。その結果、高温ストレスに関しては多くのヒートショックプロテイン(HSP)遺伝子がコントロールの42℃の通常培養下で発現しているなかで、高温ストレス(48℃以上)添加時のみ、特異的に発現量が増大する2つのHSP遺伝子を見出した。この2つの遺伝子は22℃の培養から42℃へと20℃の温度差で高温条件にしても発現は誘導されず、48℃以上という絶対温度を感知して発現が誘導されることが判った。高濃度金属イオンストレスに関しては、鉄、亜鉛の何れの添加でも、葉緑体の光呼吸系で機能することが知られている、セリングリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ(SGAT)という遺伝子の発現が特異的に上がることが判った。このタンパク質に対する抗体を作製してその局在性を調べたところ、金属イオンストレスの無い条件では細胞質に大部分が存在する一方で、金属イオンストレス環境下においてはタンパク質量が増加し、ペルオキシソームに集積することが明らかとなった。金属イオンストレス下で他の光呼吸系の遺伝子の誘導が見られなかったことから、この酵素が光呼吸ではなく、金属イオンストレス

への適応に参与していることが示唆された。酸化ストレスに関しては、葉緑体で活性酸素を発生されるメチルビオローゲンを添加した際に、光化学系の遺伝子発現が抑制されカルビン回路の遺伝子発現が増加することが判った。この結果から遺伝子の転写レベルで、葉緑体内の酸化還元状態を調節している可能性が示唆された。

真核生物でこれほどの高温や強酸性環境下で生息できる種はきわめて少なく、シズンを用いることで今回初めて、高温・強酸性環境に真核生物が適応するための遺伝子レベルの知見が得られ、その細胞内における役割の一端を明らかにすることができた。シズンは光合成独立栄養の真核生物としては最も遺伝子数が少なく、限られた遺伝資源のなかで、環境適応や各種エネルギー代謝などの生命活動を行っている、従って、本研究で得られたストレス耐性遺伝子の中には真核生物に共通して機能する普遍的な遺伝子も含まれていると考えられる。藻類は光合成を行って二酸化炭素を固定し、糖や脂質などの物質生産を行うことから、食料生産と競合しない環境に優しいバイオマス生産者として注目を集めている。今回シズンより見つかったストレス耐性関連遺伝子が、今後、有用遺伝資源として光合成生物の環境耐性や物質生産など、応用的な研究にも役立つ可能性が考えられる。

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)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Ohnuma M, Misumi O, Kuroiwa T. Phototaxis in the unicellular red algae *Cyanidioschyzon merolae* and *Cyanidium caldarium*. *Cytologia* 76: 295-300 2011 (査読有)
- ② Yoshida M, Yoshida Y, Fujiwara T, Misumi O, Kuroiwa H, Kuroiwa T.

Proteomic comparison between interphase and metaphase of isolated chloroplasts of *Cyanidioschyzon merolae* (Cyanidiophyceae, Rhodophyta). *Phycol. Res* 59: 1-15 2011 (査読有)

- ③ Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Yoshida M, Ohnuma M, Fujiwara T, Yagisawa F, Hirooka S, Imoto Y, Matsushita K, Kawano S, Kuroiwa T. Chloroplasts divide by contraction of a bundle of nanofilaments consisting of polyglucan. *Science*. 329: 949-953. 2010 (査読有)
 - ④ 三角修己 「シズンゲノムを遺伝資源とした有用植物作出の試み」 生物工学会誌 88巻 p468-472 2010 (査読無)
- [学会発表] (計4件)
- ① 三角修己 「硫化水素泉から採種された新規原始紅藻類の特性について」 日本植物学会第75回大会 2011.9.18 東京大学 (東京 目黒区)
 - ② 三角修己 「硫黄泉から採種した新規シアニジウム藻類の特性について」 日本植物学会中国四国支部第68回大会 (香川大会) 2011.5.14 香川大学 (高松市)
 - ③ 三角修己 「シズンのゲノム情報と環境適応特性に基づくストレス耐性遺伝子の同定とその発展的利用」 日本植物学会第74回大会 2010.10.9 中部大学 (春日井市)
 - ④ 三角修己 「100%完全解読されたシズンのゲノム情報を遺伝資源としたストレス耐性植物の作出」 日本植物学会中国四国支部第67回大会 2010.5.16 山口大学 (山口市)

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

- ①
名称: METHOD FOR PRODUCTION OF TOLERANT PLANT USING CYANIDING-DERIVED PROTON ATPASE GENE, AND USE OF THE GENE
発明者: Kuroiwa T, Misumi O. et al.
権利者: Rikkyo Gakuin et al.
種類: WO
番号: 2011052621
取得年月日: H23.5.5
国内外の別: 外国

②

名称：METHOD FOR PRODUCING RESISTANT PLANT USING CA²⁺/H⁺ ANTIporter GENE DERIVED FROM CYANIDIUM, AND USE FOR SAID GENE

発明者：Kuroiwa T, AsanoK, Misumi O. et al.

権利者：Rikkyo Gakuin et al.

種類：WO

番号：2011052622

取得年月日：H23.5.5

国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.yamaguchi-u.ac.jp/edu/highlight>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三角 修巳 (MISUMI OSAMI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90583625