

Title	ストレス耐性を有する海産性緑藻Chlamydomonas sp. W80株からの有用遺伝子分離に関する研究
Author(s)	田中, 聡
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49657
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	田中 聡
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 22596 号
学位授与年月日	平成21年2月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	ストレス耐性を有する海産性緑藻 <i>Chlamydomonas</i> sp. W80 株からの有用遺伝子分離に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 平田 收正 (副査) 教授 那須 正夫 教授 八木 清仁 教授 高木 達也

論文内容の要旨

砂漠や荒廃地の緑化、あるいはバイオエネルギーに用いられる植物の生産性向上のため、植物に耐ストレス遺伝子を導入することで、ストレス耐性が高い植物を作出することが試みられている。緑藻はこのような分子育種に適用できる遺伝子資源として有望視されている。その理由として、1) 波打ち際等の環境変化が激しい場所に生息する藻類は、高塩濃度、乾燥、強光等の環境ストレスに曝される機会が多く、これらのストレスに対する耐性を持つものがある。2) 緑藻と高等植物とは系統上近縁な関係にあるため、緑藻の遺伝子は植物で応用しやすい、といった点が挙げられる。和歌山県海岸域で採取された緑藻 *Chlamydomonas* sp. W80株 (*C*. W80) は、酸化的ストレス・重金属ストレスに対してきわめて高い耐性を示し、植物分子育種の遺伝子資源として有効活用することが期待できる。本研究では、高いストレス耐性を持つ緑藻のストレスに対する挙動を調べ、有用遺伝子の分離を試みた。

まず、発現スクリーニング法を用いて、緑藻 *C*. W80 からストレス耐性遺伝子を分離した。この方法は発現ベクターを用いて緑藻のcDNAライブラリーを作成し、形質転換した宿主のストレス耐性獲得を指標として耐ストレス遺伝子を選抜するというものである。大腸菌を宿主とし、塩ストレス耐性獲得を指標としたスクリーニング系を用いて、*C*. W80 からストレス耐性に関する遺伝子をいくつか得ることができた。そのうちの1つ *bbc1* (breast basic conserved) 遺伝子は植物で塩ストレス、低温ストレスで誘導されると報告されている。*C*. W80 由来の *bbc1* 遺伝子を導入した大腸菌では、コントロールに比べて耐塩性、耐低温性が向上した。また、大腸菌のカドミウムおよびNaCl 塩耐性獲得を指標に、機能未知の新規遺伝子 *scsr* (salt and cadmium related gene) 遺伝子を得た。N末端側が欠損したクローンでも塩ストレス、およびカドミウムストレスに耐性を示すことから、C末端側に耐ストレス活性があることが示唆された。その他にもアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) といった活性酸素消去系の遺伝子を得た。そのうちのいくつかは植物への導入により、ストレス抵抗性の向上が確認されている。

また、発現スクリーニングの宿主として淡水性のシアノバクテリア *Synechococcus*, PCC7942 を用いて、塩ストレス耐性獲得を指標としたスクリーニングを行ったところ、アミノ酸の相同性が27% (100アミノ酸オーバーラップ) 程度で低いものの、従来報告されている group3 Late Embryogenesis Abundant (*lea3*) 遺伝子に類似の新規な遺伝子を得た。*C*. W80 の *lea3* 類似タンパクは、植物の *lea3* タンパク同様親水性がきわめて高く、11merの繰り返し配列モチーフが存在した。また、*lea3* 遺伝子を導入した *S*. PCC7942 では、耐塩性の向上が見られた。*C*. W80 由来の *lea3* 遺伝子は他の植物同様、高塩濃度および低温ストレス下で mRNA レベルが増大し、これらのストレスで誘導されることが明らかになった。以上の結果から、シアノバクテリアを宿主とした発現スクリーニングの有効性が示された。発現スクリーニングの手法は簡便であるにもかかわらず、有用遺伝子の単離に極めて有効であるといえる。

次に、酸化ストレスに対して高い耐性のある海産性の*C. W80*と、*C. W80*に比べるとやや耐性が低い海産性の*Chlamydomonas* sp. HS5(以下*C. HS5*)、およびきわめてストレス感受性が高い淡水性の*C. reinhardtii*(いずれも*C. W80*と系統的に近縁な*Chlamydomonas*属緑藻)との間で比較生物学的な検討を行い、*C. W80*のストレス耐性メカニズムの情報を得ることを試みた。また、*C. W80*のESTデータとストレス感受性株のESTデータとを比較することにより、*C. W80*に特異的な遺伝子の分離を行った。

細胞内の活性酸素消去系酵素の活性について調べた結果、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)およびH₂O₂を分解するカタラーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)のうち、*C. W80*の活性酸素消去にはAPXが重要な寄与をしていることが示された。

また、細胞抽出物についてDPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)による有機ラジカルの消去能力およびβカロテン退色法による脂質の抗酸化力の2つの評価を行ったが、*C. W80*が極めて高い酸化ストレス耐性を持つことへの細胞内抗酸化物質の寄与は小さいと考えられた。

遊離プロリンは活性酸素の消去作用があると報告されているため、緑藻細胞内の遊離アミノ酸の分析を行ったところ、海産性の*C. W80*および*C. HS5*では明らかに細胞内遊離アミノ酸量が淡水性の*C. reinhardtii*に比べて高い上、遊離アミノ酸の多くがプロリンであり、酸化的ストレスであるmethyl viologen(MV)によって短時間で遊離プロリン量が上昇した。したがって*C. W80*および*C. HS5*といった酸化ストレスに耐性を示す緑藻ではプロリン含量の高さが酸化ストレス耐性に寄与していると考えられた。

次に、これら3種の*Chlamydomonas*属緑藻のEST(expression sequence tag)を比較することにより、*C. W80*特異的な遺伝子の抽出を試みた。*C. W80* 1,617クローン、*C. HS5* 1,439クローンのESTを解析し、*C. reinhardtii*の公的データベースの184,975クローンと比較した。その結果、27個の*C. W80*特異的な遺伝子が見つかった。これらの*C. W80*特異的遺伝子についてマイクロアレイ、RT-PCRによる解析を行い、4遺伝子についてMVによる誘導を確認した。

本研究において、極めて高い酸化ストレス耐性、重金属ストレス耐性を持ち、遺伝子資源として有望な海産性緑藻*C. W80*について発現スクリーニング法を適用した。その結果、*bcd*遺伝子、*scsr*遺伝子、新規*lea3*遺伝子、APX、GPX等の有用遺伝子が単離され、この手法の有効性が示された。また、*C. W80*と近縁な*Chlamydomonas*属緑藻との間で比較した結果、*C. W80*の酸化的ストレス耐性にはAPX活性の高さと細胞内遊離プロリン含量の多さが寄与していると考えられた。比較ESTの手法を用いて*C. W80*特異的な遺伝子を抽出し、マイクロアレイ、RT-PCRを用いて、いくつかの遺伝子がストレス下で誘導されることを確認した。比較生物学的な手法が、ストレス耐性に関与すると考えられる遺伝子を得るために有効であることを示した。

論文審査の結果の要旨

博士論文「ストレス耐性を有する海産性緑藻*Chlamydomonas* sp. W80株からの有用遺伝子分離に関する研究」では、新規の遺伝子探索方法を用いて、様々な優れた環境ストレス耐性を持つ海産性緑藻*Chlamydomonas* sp. W80株から、効率的に複数の有用遺伝子を探索することに成功している。当該遺伝子がコードするタンパク質の同定・機能解析も精緻な実験計画により達成されており、また近縁種から得られた遺伝子との機能比較や他生物への導入による機能確認も十分に行われている。主論文の質および数も論文博士として十分に整っている。

また、得られた事象に対する多角的な解析やそれに基づく的確な考察が行なわれており、新たな知見として学術的な価値も非常に高い。さらに本研究は、当該遺伝子の導入による環境ストレス耐性植物作出についても、これまでになかった新たな観点からのアプローチとして注目され、環境修復や食料増産に向けた実用的な技術開発への発展も十分に期待できる成果が得られている。

以上、論文審査により、本論文は学術的な観点および今後広範な応用が期待できる実用的な応用研究という観点から、非常に優れた研究であることを確認し、論文博士に値する業績と判断するに至った。