



Title	海産性緑藻Chlamydomonas sp. W80 を探索源とした環境ストレス耐性遺伝子の単離と機能解析
Author(s)	須田, 慶人
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49675
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	須田慶人
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第22882号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	海産性緑藻 <i>Chlamydomonas</i> sp. W80 を探索源とした環境ストレス耐性遺伝子の単離と機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 平田 收正 (副査) 教授 那須 正夫 教授 高木 達也 教授 八木 清仁

論文内容の要旨

温暖化、酸性雨、有害物質による環境破壊は現在も刻々と進行し、森林破壊や砂漠化、熱帯雨林の減衰などの例にみられるように植物が生育可能な土地は急速に減少している。一方で、それよって起こる植物生産性の減少は、人口増大に伴う食糧不足の問題をより一層深刻化するものと考えられる。このような問題を克服するためには、植生の拡大や植物生産性の向上が必要不可欠であり、遺伝子組換えに代表されるような植物工学的手法を用いて植物の環境適応能を強化した“ストレス耐性植物”を作成する技術に大きな期待が寄せられている。近年、こういったストレス耐性植物を作成するための遺伝子探索源として、ラン藻や緑藻などの微細藻類が注目されている。この理由として、微細藻類は、高等植物とは異なる環境に生育していることから、高等植物にはない優れた環境ストレス応答や反応調節機構を持っている可能性があげられる。また、微細藻類は、高等植物の進化の起源と考えられており、基本的な代謝系が高等植物と極めて類似しているため、当該遺伝子の植物への導入が植物本来の代謝を攪乱する可能性が低く、植物と同じ光独立栄養生物であるため、ヒトは多くの微細藻類について食経験を持つことなどから、細菌やカビ等よりも当該遺伝子の植物への導入について社会的コンセンサスが得やすいなどの利点を有している。そこで申請者らは、独自に単離した海産性緑藻である *Chlamydomonas* sp. W80 (*C. W80*)を探索源として、このような植物の環境適応能強化に応用できる優れた環境ストレス耐性遺伝子の探索とその機能解析を試みた。

和歌山県沿岸で採取された海産性緑藻 *C. W80* は同属の淡水性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C.*

reinhardtii) と比較して、塩、活性酸素及びカドミウムといった環境ストレスに対して強いストレス耐性を示すことが知られている。本研究で、新たに *C. W80* がヒ素、クロム、水銀及び銅といった種々の有害重金属に対する強い耐性を示すことを明らかにし、本株がストレス耐性遺伝子の探索源として非常に有用であることを裏付ける知見を得た。そこで、申請者は、*C. W80* の cDNA を導入したライプラリベクターを構築し、このライプラリベクターを用いて形質転換した大腸菌を塩化ナトリウム、ヒ素及びクロムストレスを負荷した寒天培地上で培養し、耐性を獲得したクローニングを試みた。その結果、塩化ナトリウム、ヒ素及びクロム負荷条件下で、それぞれ数種のクローニングを単離することに成功した。これらのクローニングについて、さらに液体培養によって塩化ナトリウム、ヒ素及びクロム負荷条件下での増殖能を比較したところ、すべてのストレス負荷条件で最も良好な増殖を示した 3 クローニングは、いずれもホウレンソウ由来の葉緑体に局在する CFo ATP synthase subunit II (CFo-II) と高い相同性を示した。そこで次に、優れた環境ストレス耐性遺伝子の候補として、*C. W80* 由来の CFo-II ホモログ (WCF II) の機能評価を行なった。

植物由来の CFo-II は、葉緑体局在性 F 型 ATP 合成酵素複合体の F₁ 部位と F₀ 部位とをつなぐサブユニットのひとつであることが知られている。これらのことから、CFo-II と相同性の高い WCF II も同様に ATP 合成酵素のサブユニットであると考えられ、WCF II は ATP 合成系に何らかの作用を及ぼすことによって大腸菌のストレス耐性を強化する可能性が考えられた。そこで、まず WCF II を強制発現させた大腸菌を用いて細胞内 ATP 含量及び様々な環境ストレスに対する耐性を評価した。その結果、塩化ナトリウム負荷条件下における WCF II 発現大腸菌の細胞内 ATP 含量は空ベクターを導入したコントロール株よりも高い値を示した。また、WCF II 導入による細胞内 ATP 含量の増大は、FoF1-ATPase の阻害剤である N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) 处理によって完全に抑制された。さらに、WCF II 発現大腸菌は、カドミウム、酸化ストレス、低温ストレス及び凍結ストレスなど様々なストレスに対して非常に強いストレス耐性を示した。以上、申請者は WCF II 遺伝子は ATP 合成系の強化に基づいて数多くのストレスに対する耐性の強化を達成できる優れた環境ストレス耐性遺伝子であることを初めて見出した。

次に、WCF II の環境ストレス耐性遺伝子としての有用性ならびにストレス耐性強化機構を解析するために、WCF II と *C. reinhardtii* 由来の CFo-II ホモログ (RCF II) との比較解析を行なった。まず WCF II あるいは RCF II 発現大腸菌における塩化ナトリウム、カドミウム及び酸化ストレス負荷条件での増殖能と塩化ナトリウム及びカドミウムストレス負荷における細胞内 ATP 含量を比較した。その結果、WCF II 発現大腸菌は、すべてのストレス負荷条件下において、RCF II 発現大腸菌よりも高い増殖能を示した。さらに、塩化ナトリウム及びカドミウムいずれのストレスを負荷した場合においても、細胞内 ATP 含量は RCF II 発現大腸菌よりも WCF II 発現大腸菌の方が高い値を示した。以上、申請者は大腸菌を用いた解析から、WCF II が ATP 合成強化能とそれを反映したストレス耐性能の点において RCF II よりも優れた分子であることを示した。

WCF II と RCF II は比較的高い相同性 (70%) を示すものの、膜移行領域である N 末端領域 (1-62 残基) は極めて低い相同性を示した。すなわち、WCF II と RCF II の ATP 含量上昇機能の差は、1-62 残基のアミノ酸

配列の違いに起因するものと考え、両遺伝子について WCFII と RCFII の 1-62 残基を欠損させた変異体を構築し、塩化ナトリウムストレス負荷における細胞増殖及び細胞内 ATP 含量の評価を行った。その結果、塩化ナトリウム負荷条件下において WCFII と RCFII の N 末端領域を欠損させた変異体の増殖能は著しく減弱し、さらに、これらの変異体における塩化ナトリウムストレス負荷時の胞内 ATP 含量は空ベクターを導入したコントロール株と同程度であることを確認した。これらのことから、WCFII の膜移行領域が大腸菌のストレス耐性の獲得及びストレス負荷時の細胞内 ATP 含量の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

以上、本研究では、WCFII はストレス負荷時の ATP 合成促進作用に重要な役割を果たすことで、様々な環境ストレスに対して耐性をもつ実用性の高いストレス耐性植物の作成に貢献できる非常に有望な環境ストレス耐性遺伝子である可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

博士論文「海産性緑藻 *Chlamydomonas* sp. W80を探索源とした環境ストレス耐性遺伝子の単離と機能解析」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、効率的に複数の環境ストレスに対する耐性を強化する新規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機能について、アミノ酸配列の相同性解析から ATP 合成に関連すると予測し、大腸菌を宿主として関連特性を調べることにより、これを検証した。次に、同属緑藻由来の同等機能を有するタンパク質との機能比較解析により、当該タンパク質が重金属や塩、酸化、凍結等の複数の環境ストレスに対して非常に強い耐性を付与できることを明らかにした。さらに、この優れた機能を担うアミノ酸配列を特定するために、N末端側配列の一部を欠損させたタンパク質の特性評価を元のタンパク質と比較し、当該配列が耐性を付与するために必須であることを明らかにした。

これらの研究成果は、学術的にも高いレベルにあり、さらに今後の環境浄化・再生、食料増産に有効な遺伝子組換え植物の作出にも応用可能な有用な知見と言える。また、本成果の一部は、原著論文としてすでに英文学術雑誌から受理されている。

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、大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程の博士論文に値するものと判断するに至った。