

シズンの分子遺伝学的解析法の開発

大沼 みお^{1*}・吉田 大和¹・今村 壮輔²・田中 寛³・黒岩 常祥¹

シズンは、真核生物の成立後初期に分岐し、その太古の姿を高温温泉という変化の少ない環境下で維持して生き延びてきたと考えられている。シズンは独立栄養性単細胞紅藻であり、基本的な細胞小器官や細胞機能を担う遺伝子のほとんどをそろえているが、ゲノムサイズは真核生物のなかで最小クラスであり、重複した遺伝子がほとんどない。したがって、シズンを用いれば、基本的な細胞機能の解析が可能ばかりでなく、他の生物では重複して解析しにくい遺伝子の解析も効率よく行える。

最近、シズンの100%解読されたゲノム情報^{1,2)}を用いて、ゲノム科学を基盤にしたさまざまな生命現象を理解するための解析ツールが整備された。それらは、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析、MALDI-TOF-MSを用いたプロテオーム解析といった発現解析である。シズンは同調培養が可能で、細胞小器官の単離法が確立されているため、併せて用いれば、より特異的な条件での発現解析が可能である。一方、DNA導入技術を始めとする分子遺伝学的な解析手法は、ほとんど開発されていなかった。著者らは、DNA導入法、マーカー遺伝子と選択培養法、遺伝子破壊、一過的に遺伝子を発現または抑制する方法を開発し、ゲノム情報や発現解析から得られた多くの興味深い遺伝子の機能を、分子遺伝学的に解析することを可能にした。ここでは基盤となるPEGを用いた形質転換法と、その応用である遺伝子破壊、一過的遺伝子発現、一過的遺伝子抑制について述べた後、実際の解析例を紹介する。

シズンの形質転換法

シズン細胞へのDNA導入 一般に植物細胞は細胞壁を持つため、DNAの導入には、細胞壁を除去処理してプロトプラスト化するか、パーティクルガンを用いる。シズンは強固な細胞壁を持たないため、そのままプロトプラストとして扱うことができる³⁾。以下に、シズン細胞へのDNA導入プロトコルを簡単に記す。

- 1) シズン細胞を、OD₇₅₀=0.4に希釈して一晩培養する。
- 2) 20–24 時間後、50 ml チューブに培養液を移して、2000 × g 5 min 遠心する。
- 3) 上清を捨て、1 × MA-I (20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.3 ml/l H₂SO₄, 0.2% A6 salt) で洗い、1000 × g 3 min 遠心する。
- 4) 上清を捨て、細胞を150–200 倍濃縮になるよう1 × MA-I で懸濁する。
- 5) DNAにサケ精子 DNA (終濃度0.4 μg/μl in 250 μl),

- 10 × MA-I を加え200 μlにし、細胞を50 μl加える。
- 6) 1 × MA-I で溶解した60% (w/v) PEG 4000 溶液を250 μl加える。
- 7) すぐに3回転倒攪拌し、40 mlの培地へ移す。
- 8) 40°C, 5% CO₂, 連続明条件で一晩培養する。
- 9) 1000 × g 3 min 遠心して細胞を集め、選択培地にプレートニング、または発現の確認をする。

抗体染色後の顕微鏡観察によると、DNA導入効率は、約0.5–10%前後のことが多い。

シズンの選択マーカーと選択培養 シズン培地は強酸性であるため、多くの抗生物質が分解してしまう。そこで著者らは、すでに自然突然変異により取得されていた5-フルオロオロチン酸 (5-fluoroorotic acid, 5-FOA) 耐性、ウラシル要求生 (M4株⁴⁾) を親株とした (図1A)。5-FOAはUMP合成酵素によって、毒性のある5-フルオロウラシルに変換されるため、UMP合成酵素遺伝子に変異が入ると、5-FOA耐性、ウラシル要求性になる。シズンのUMP合成酵素は、orotate phosphoribosyltransferase (URA5 遺伝子産物) と orotidine-5'-phosphate decarb-

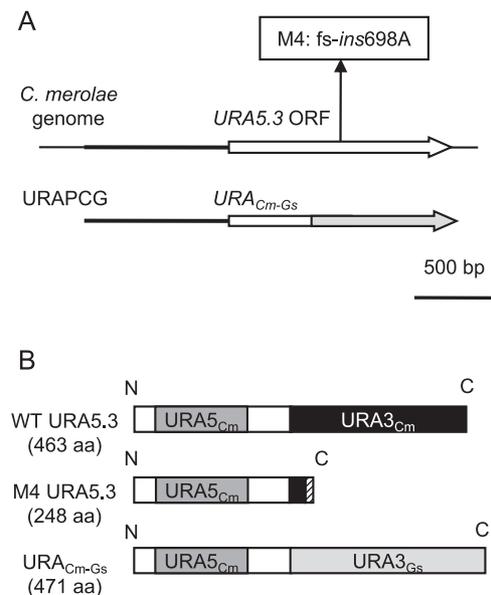


図1. シズンの選択系。(A) シズンの *URA5.3* 遺伝子と人工遺伝子 *URA5.3-URA3-Gs*。M4株の変異部位を、四角内に示した。*URA5.3* と *URA5.3-URA3-Gs* のプロモーター領域 (太線) を含む配列を、選択マーカー URAPCGとした。(B) 野生型、M4株の *URA5.3*、*URA5.3-URA3-Gs* の遺伝子産物。URA5.3のURA5_{cm}領域 (濃灰色)、URA3_{cm}領域 (黒) をそれぞれ示した。M4株はフレームシフトにより13アミノ酸 (斜線) は野生型とは異なる配列を持つ。URA5.3-URA3-GsはURA3_{cm}領域がガルドリアの相当領域 (URA3_{Gs}, 薄灰色) と置換されている。

*著者紹介 立教大学理学部生命学科極限生命情報研究センター (博士研究員) E-mail: mioohnuma@rikkyo.ac.jp

¹立教大学理学部生命学科、²中央大学理工学部生命学科、³千葉大学大学院園芸学部

oxylase (*URA3* 遺伝子産物) の融合タンパク質 (*URA5.3*) であるが, M4株のUMP合成酵素は, フレームシフト変異により *URA3* 領域が部分欠失している. 選択系では, 機能する *URA5.3* をマーカーとして, M4株を形質転換し, ウラシル非要求性で形質転換体を選択する. このとき, *URA5.3* 遺伝子のフレームシフト部位の組換えを避けるため, *URA3* 部分を, 近縁の紅藻ガルドリア (*Galdieria sulphuraria*) の *URA3* に置換した, キメラタンパク質 *URACm-Gs* をコードする遺伝子を持つマーカー *URAPCG* を構築した (図1B)⁵⁾.

マーカー *URAPCG* で形質転換した細胞は, 5-FOA, ウラシルを添加しないプレートで培養することにより選択する. プレーティングの際, シゾン細胞は物理的刺激に弱いので, 直接プレートにひろげるのではなくコーンスターチ法を用いる⁵⁾. まずプレートに培地で懸濁したコーンスターチを少量スポットし, 余分な水分を乾燥後, このコーンスターチの上に DNA 導入処理後の細胞をスポットする. 余分な水分を乾燥後, プレートを逆さまにして培養する.

相同組換えによる遺伝子破壊 多くの植物とは異なり, シゾンは非同末端結合 (nonhomologous endjoining, NHEJ) に関連する遺伝子をほとんど持っていない. そのため, シゾンは相同組換えが優先的に起こると考えられた. 実際, マーカー *URAPCG* の上下に, 標的遺伝子の配列 1.5–2 kb を付加した DNA の形質転換体を解析すると, 期待通り相同組換え体が得られた.

大腸菌ベクターを用いた一過的遺伝子発現 シゾンでは, 大腸菌のクローニングベクターを形質転換すると, シゾンの選択マーカーを持たなくても, 数日間は細胞内でプラスミドが維持され, コードする遺伝子が発現する. 著者らは, ヘマグルチニンタグ (HA-tag) の3回繰り返し配列を持つベクターに, 局在を調べたい遺伝子を挿入, 一過的に発現させ, 抗ヘマグルチニン抗体を用いて, 免疫蛍光顕微鏡法により細胞内局在解析に用いている³⁾. HA-tag を付加した β -Tubulin 遺伝子をコードするプラスミドを用いて形質転換を行ったところ, HA-tag 付加 β -Tubulin は内在性 β -Tubulin と同様の局在を示した.

アンチセンスDNAによる遺伝子抑制導入 シゾンは Dicer など RNAi に関わる遺伝子を持たない. しかし, ORF 全体のアンチセンス鎖を発現させることによって, 一過的に標的遺伝子の発現抑制を起こすことができる⁶⁾. この手法は簡便, 迅速で, 遺伝子破壊が不可能な必須遺伝子に適応することができ便利である. この時の形質転換体のマーカーとしては sGFP が有効である. カタラーゼ遺伝子を, この方法を用いて抑制した場合, 形質転換体の中での標的遺伝子抑制率は約 50% であった⁶⁾.

例1. 窒素飢餓応答: 遺伝子破壊と一過的遺伝子発現

窒素は植物にとってきわめて重要な栄養素であり, 不

足すると著しい生長阻害を引き起こす. 植物は窒素栄養を, 主にアンモニアや硝酸の形で取り込むが, 植物における窒素の取り込みや同化に関する調節については不明であった. そこで, 植物の中で最も単純なシゾンを用いて, 窒素の取り込みや同化の調節についての解析を行った. シゾン細胞を窒素欠乏状態におくと, 窒素栄養を細胞内に取り込むアンモニアや硝酸のトランスポーター (*CmAMT*, *CmNRT*) や, 取り込んだ窒素栄養を同化する硝酸還元酵素 (*CmNAR*), 亜硝酸還元酵素 (*CmNIR*), グルタミンシンターゼ (*CmGS*) などの遺伝子の mRNA が増加する. この活性化を制御する転写因子を探索するため, マイクロアレイを用いて通常状態と窒素欠乏状態における mRNA 合成を網羅的に比較解析したところ, MYB型転写因子の1つである *CmMYB1* 遺伝子が窒素欠乏時に活性化されることを見いだした⁷⁾. 細胞粗抽出液を用いたゲルシフトアッセイでは, *CmMYB1* は窒素飢餓処理を行ったときのみ *CmAMT* や *CmNIR*, *CmGS* 遺伝子の転写上流領域に特異的に結合した. さらに相同組換えによって *CmMYB1* 遺伝子欠損変異体を作製し, 解析を行ったところ, *CmMYB1* 欠損株では, 窒素欠乏時における窒素飢餓応答遺伝子群の活性化がおこらなくなった (図2A). この変異体は, 窒素欠乏後の生存率が下がり, また硝酸のみを窒素源とした培地では生育できなかった (図2B). このことから, *CmMYB1* 遺伝子が生理的にも重

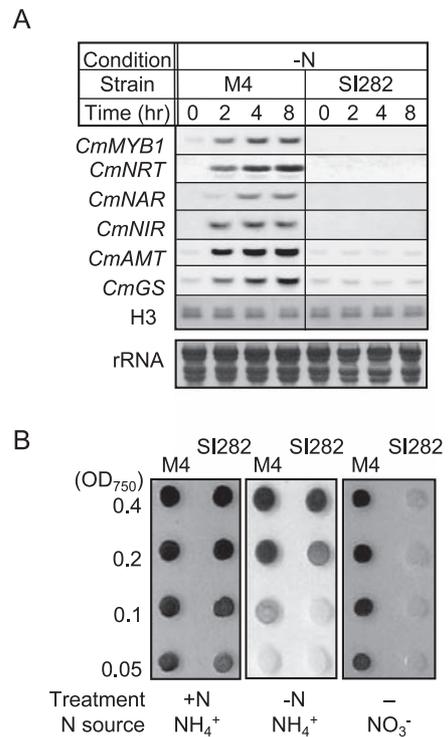


図2. *CmMYB1* 欠損株 (SI282) と親株 (M4) の窒素飢餓応答. (A) 窒素飢餓処理後, 0–8時間後の窒素飢餓応答遺伝子群の転写. (B) SI282とM4の生育. コントロール (左), 窒素飢餓処理8時間後, アンモニアを窒素源とする培地で培養した (中), 硝酸を窒素源とする培地で培養した (右). 文献7より許可を得て改変.

要であることが明らかになった。また、一過的にHA-tagを付加した*CmMYB1* 遺伝子を導入し、*CmMYB1* 欠損株の相補実験を行った。その結果、HA-tagが付加された*CmMYB1*が窒素飢餓応答遺伝子群の転写を活性化し、確かに*CmMYB1* 遺伝子が窒素飢餓応答の制御因子であることを明らかにした⁷⁾。

例2. ミトコンドリア分裂のしくみ： 分裂装置の一過的遺伝子抑制

ミトコンドリアは、酸化的呼吸により細胞に必要なエネルギーのほとんどを供給しているほか、細胞死、細胞内カルシウム濃度、酸化ストレスなどの制御にも主要な役割を果たしている細胞小器官である。ミトコンドリアは、葉緑体と同様に、細胞内共生によって誕生したことから、新たに合成されることはなく、分裂によってのみ増殖し、その分裂過程は色素体の分裂過程と類似している。まずミトコンドリアまたは色素体の真中にリング状の分裂装置が形成され、それが分裂過程の進行とともに収縮し、最後にくびり切られる。分裂装置はFtsZリング、MDリングまたはPDリング、ダイナミンリングからなるダイナミックトリオと呼ばれる3種類のリングを含み、ミトコンドリアと色素体で基本的に同じ構造をしている。著者らのグループは以前、色素体の分裂装置を無傷のまま抽出することに成功した⁸⁾。シズンのミトコンドリアと色素体の分裂装置は、分裂期初期では結合しているが、分裂後期では分離している。このことを利用して、色素体の分裂装置よりもさらに小さなミトコンドリア分裂装置の構成タンパク質を同定した。シズンを同調培養し、分裂初期と分裂後期の細胞から、それぞれミトコンドリアと色素体の分裂装置複合体と、色素体分裂装置を無傷のまま抽出した⁹⁾。これらの抽出した分裂装置を、質量分析装置MALDI-TOF-MSを用いて解析し、ミトコンドリアと色素体の分裂装置複合体の構成タンパク質から、色素体分裂装置構成タンパク質を差し引くことで、約20種類のミトコンドリア分裂装置の構成タンパク質を得た。

このミトコンドリア分裂装置構成タンパク質群の中から、新規の内膜側のミトコンドリア分裂タンパク質を探した。得られたハイポセチカルタンパク質のアミノ酸配列を、トランジットペプチド予測ソフトを用いて解析し、高スコアでミトコンドリアへ移行すると予測されるものを抽出した結果、*CMQ228* 遺伝子を同定した。*CMQ228*は611アミノ酸からなり、N末端領域にミトコンドリア移行シグナル、中央領域とC末端領域に2つのコイルドコイルドメインを持っていた(図3A)。同様のコイルドコイルドメインは、細菌で広く保存されているZapA(FtsZ associated protein)に見られ、*CMQ228*との配列相同性は25.8%であった。*CMQ228*は以下に述べる機能から、ZED(Z ring extended device)と名づけた。

ZEDの機能を解析するため、細胞周期のマイクロアレイデータを用いてZEDの転写時期を解析したところ、ZEDの転写量は細胞分裂初期に増加していた。その発現の様子は、ミトコンドリアのFtsZの発現プロファイルと一致していた。ZEDの抗体を作製し、同調した細胞の総タンパク質を用いてウェスタン解析を行うと、分裂期に大きさの異なる2つのシグナルが得られた(L-ZED, S-ZED)。L-ZEDは分裂開始直前から発現が見られ、S-ZEDはL-ZEDよりも少し後から発現し、量はL-ZEDよりも多かった。詳細な生化学的解析の結果、ZEDはミトコンドリア移行後L-ZEDとしてマトリックスに存在し、そこで切断を受けS-ZEDに成熟することにより重合し、分裂装置複合体として機能することが明らかになった。

ZEDの細胞内局在を免疫蛍光顕微法によって解析した。ミトコンドリアのマトリックスに局在する伸張因子EF-Tuの抗体を用いて二重染色すると、ZEDは、G1期ではミトコンドリアマトリックス全体に散らばって存在した。G2期になるとミトコンドリアの中心へ集合し、ミトコンドリア分裂面でリング構造を形成した。分裂が進むにつれて、ミトコンドリア分裂面でリングが収縮していき、最後には分裂した両方の娘ミトコンドリアへ分割された(図3B左)。次に抗ZED抗体と抗FtsZ抗体を用いて二重染色を行った(図3B中)。ミトコンドリア分裂の初期では、ZEDとFtsZはともに分裂面の収縮前にリングを形成した。ミトコンドリア分裂過程を通してZEDとFtsZの2つのリングは共局在した。免疫電顕による解析の結果、ZEDはミトコンドリア内膜の下側、マトリックス領域の分裂面に局在した(図3B右下)。

実際にZEDがミトコンドリア分裂に必須であるか否かを検証するため、アンチセンス法を用いてZED遺伝子を抑制した。DNA導入処理後24時間後に免疫蛍光顕微法により観察したところ、ZEDのプロモーター領域のみを持つプラスミドを形質転換した場合は、ミトコンドリア分裂に異常は見られなかった(図4A)。一方、ZEDのプロモーター領域の下流に、ZEDのORFのアンチセンス配列を挿入したプラスミドの形質転換体では、ミトコンドリアの分裂異常が見られた(図4B上)。さらにこの細胞を、抗FtsZ抗体を用いて染色すると、FtsZはミトコンドリア内部に散らばって存在し、FtsZリングの形成が阻害されていた(図4B中)。FtsZがリングを形成した後、ミトコンドリアの外側にリングを形成するMda1は、発現さえも見られなくなっていた(図4B下)。以上の結果から、ZEDはFtsZリングの形成に必須であることが明らかになった⁹⁾。

また、詳細は省くが、もう1つの例として、リソソームは、細胞分裂のときミトコンドリアと結合して娘細胞へ分配される。これと同様の挙動を示す新規遺伝子VIG1をアンチセンス法で抑制すると、リソソームはミトコンドリアへの結合が阻害され、正常な分配が阻害さ

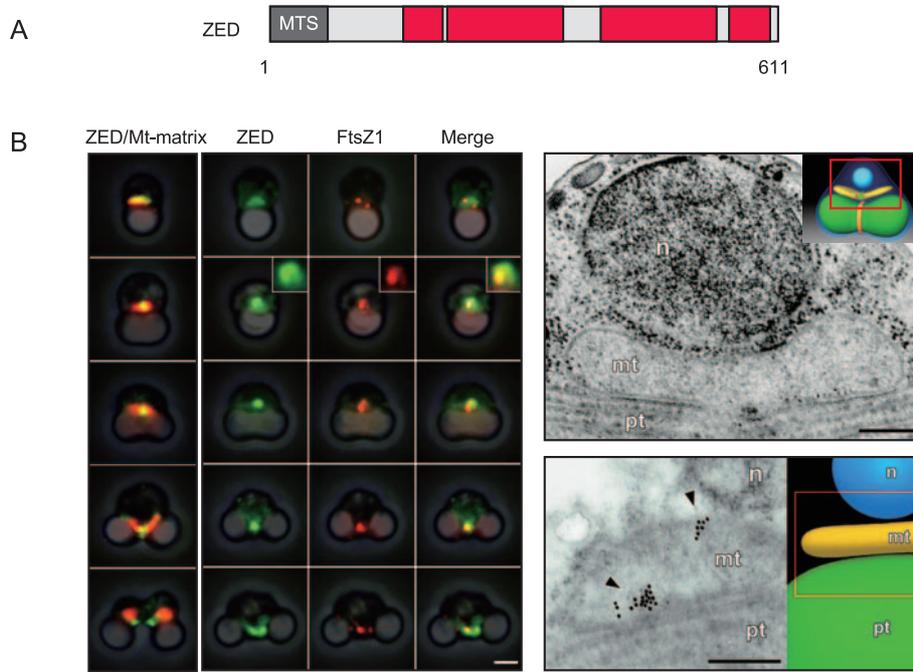


図3. 新規ミトコンドリア分裂装置タンパク質ZED. (A) ZEDのドメイン構造. ミトコンドリア移行シグナル (濃灰色), コイルドコイルドメイン (赤). (B) ZEDの細胞内局在. 抗体染色像. ZED, 緑; Mt-マトリックス (EF-Tu), 赤 (左). ZED, 緑; FtsZ1, 赤 (中). 分裂初期のシゾン細胞の電顕像 (右上). n, 核; mt, ミトコンドリア; pt, 色素体. ZEDの免疫電顕像 (右下). 金粒子 (矢頭) はミトコンドリア分裂面のマトリックス側に局在した. 文献9より許可を得て改変.

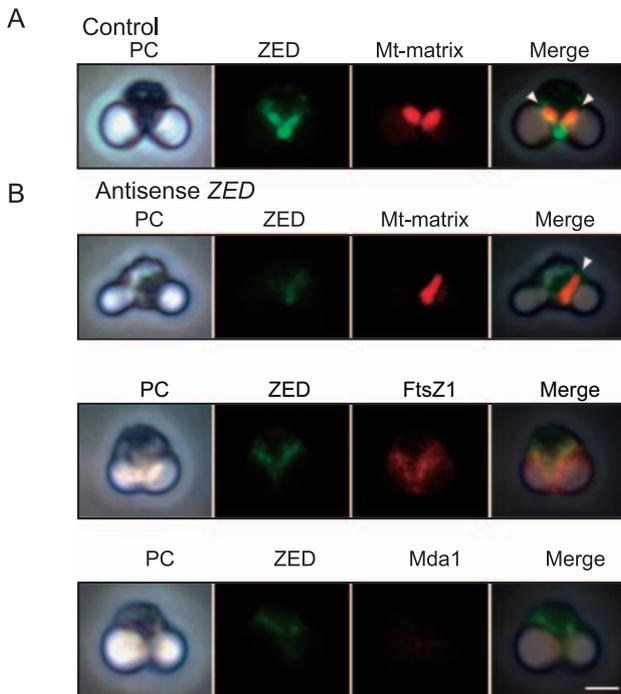


図4. ZED遺伝子のアンチセンス抑制. (A) コントロール. ZEDのプロモーター領域のみを持つプラスミドの形質転換体. ZED, 緑; Mt-マトリックス (EF-Tu), 赤. (B) ZEDのプロモーター領域の下流にZEDのORFのアンチセンス配列を持つプラスミドの形質転換体. (上) ZED, 緑; Mt-マトリックス (EF-Tu), 赤. (中) ZED, 緑; FtsZ1, 赤. (下) ZED, 緑; Mda1, 赤. 文献9より許可を得て改変.

れた¹⁰⁾. VIGI がリソソームをミトコンドリアへ結合させ, 分配するのに重要な役割を果たしていることが明らかになった.

まとめ

シゾンの形質転換法の開発によって, プロテオーム解析やトランスクリプトーム解析によって得られたさまざまな生命現象に関係する未知遺伝子の機能を解析することが可能になった. 形質転換効率の改善や, 新たなマーカー遺伝子の開発を行うことにより, より高効率で汎用性の高い系ができると考えられる.

文 献

- 1) Matsuzaki, M. *et al.*: *Nature*, **428**, 653 (2004).
- 2) Nozaki, H. *et al.*: *BMC Biol.*, **5**, 28 (2007).
- 3) Ohnuma, M. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **49**, 117 (2008).
- 4) Minoda, A. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **45**, 667 (2004).
- 5) Imamura, S. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 707 (2010).
- 6) Ohnuma, M. *et al.*: *Protoplasma*, **236**, 107 (2009).
- 7) Imamura, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12548 (2009).
- 8) Yoshida, Y. *et al.*: *Science*, **313**, 1435 (2006).
- 9) Yoshida, Y. *et al.*: *Curr. Biol.*, **19**, 1491 (2009).
- 10) Fujiwara, T. *et al.*: *Plant Cell*, **22**, 772 (2010).