

海産紅藻スサビノリにおける一過的遺伝子発現系を用いた 分子生物学的研究

学位論文内容の要旨

海産紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は我が国において、海苔の原材料の 90%以上を占めていることから水産資源として極めて重要な種である。また近年では医薬品や健康食品の素材源としても注目されており、今後さらに本種の需要が伸びると予想されるが、近年の海洋環境の変動や沿岸の環境汚染のために、その収穫量が減少している。そのため、本種の効率的な育種が望まれているが、本種における生活環の制御機構や環境応答の分子機構といった分子生物学的な知見が不足しているため、それが困難な状況となっている。

スサビノリの分子生物学的研究が加速しない大きな原因の一つとして、分子生物学的な基盤技術である形質転換技術が確立されていないことが挙げられる。そこで筆者の所属研究室では、本技術に関する研究開発を進めており、最近コドン使用頻度をスサビノリのそれに適合させた改変 β -グルクロニダーゼ (PyGUS) 遺伝子をレポーターとしたパーティクルガン法による一過的遺伝子発現系を開発した (Fukuda et al. 2008)。本研究では、この系を利用した遺伝子産物の細胞内局在解析およびプロモーター解析を行うことにより、スサビノリにおける分子生物学的知見を得ることを目的とした。

一過的遺伝子発現系を利用した細胞内局在解析のため、まずスサビノリ遺伝子のコドン使用頻度に類似したコドンを持つ蛍光タンパク質 AmCFP、ZsGFP、ZsYFP および sGFP(S65T) をスサビノリ由来のアクチンプロモーターに連結させたコンストラクトを作製した。このコンストラクトをパーティクルガン法によりスサビノリ配偶体に導入したところ、これらの蛍光タンパク質がスサビノリ細胞で発現することを確認した。次に、スサビノリ由来の転写因子である PyElf1 および PyMBF1 の細胞内局在を明らかにするために、これらを AmCFP や ZsGFP に連結させたコンストラクトをスサビノリ細胞に導入し蛍光を観察した。その結果、融合タンパク質の核局在を可視化することができ、PyElf1 および PyMBF1 が核に局在していることが分かった。このことから、AmCFP や ZsGFP と

いった蛍光タンパク質がスサビノリの細胞内局在解析に利用可能なことが明らかになった。

一過的遺伝子発現系を利用したプロモーター解析に先立ち、まずスサビノリが細胞内の Na^+ を細胞外へと汲み出す働きのあるナトリウムポンプをコードする二つの遺伝子、*PyATP1A* および *PyATP1B*、を持つことを明らかにした。アミノ酸配列を用いた相同性検索の結果、これらはキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の Na^+K^+ -ATPase の α サブユニットと高い相同性を示した。構造解析の結果、真核生物のナトリウムポンプで保存されているリン酸化部位、ATP 結合領域および Na^+ 、 K^+ の結合に関与するアミノ酸が *PyATP1A* および *PyATP1B* においても保存されていた。また RT-PCR による発現解析の結果、*PyATP1A* は孢子体世代優占的に、*PyATP1B* は配偶体世代特異的に発現していたことから、世代によってナトリウムポンプ遺伝子が使い分けされていることが明らかとなった。さらに RT-PCR およびリアルタイム PCR を用いた発現解析により、配偶体世代特異的にアルカリおよび低温ストレス条件下で *PyATP1A* および *PyATP1B* の発現が変動することが分かり、*PyATP1A* および *PyATP1B* がアルカリや低温ストレス時における細胞内の Na^+ 濃度調節に重要な役割をしていることが示唆された。

上述したように *PyATP1A* は孢子体世代優占的に、*PyATP1B* は配偶体世代特異的に発現することが分かった。そこでスサビノリの生活環の制御機構解明の一環として、*PyATP1A* および *PyATP1B* における世代特異的な転写制御機構の解明を目指した。本研究では、*PyATP1A* の孢子体世代優占的な転写制御機構の解明に焦点を当て、一過的遺伝子発現系を用いた *PyATP1A* のプロモーター解析を行った。まず *PyATP1A* の 5' 上流領域を Inverse PCR 法により単離し、これを様々な長さで欠失させた *PyATP1A* の各種 5' デリションプロモーターを PyGUS レポーター遺伝子につないだコンストラクトを作製した。次いでそれらをパーティクルガン法により配偶体および孢子体に導入し、GUS 活性を比較した結果、孢子体世代特異的に機能するアクチベーター結合領域と配偶体世代特異的に機能するリプレッサー結合領域の存在が示唆された。そこで、これらの領域を *PyElf1* プロモーターの上流に連結させた PyGUS レポーターコンストラクトを作製し、同様の解析を行ったところ、*PyElf1* プロモーターのみの場合と比較して、アクチベーター結合領域を連結させた場合には、約 2 倍の GUS 活性の上昇が、リプレッサー結合領域を連結させた場合には、約 4 倍の GUS 活性の減少が認められた。このことから、*PyATP1A* の孢子体世代優占的な発現は、孢子体世代特異的に機能するアクチベーター結合領域と配偶体世代特異的に機能

するリプレッサー結合領域により制御されていることが明らかとなった。さらにリプレッサー結合領域に関して詳細なプロモーター解析を行った結果、配偶体世代において *PyATP1A* の発現を負に制御している配列として 20 bp の GC リッチな配列を同定することができた。これらのことから、一過的遺伝子発現系を利用したプロモーター解析がスサビノリの転写制御機構を解明するのに有効な手法であることが示された。

以上のことから、本研究で行った一過的遺伝子発現系を利用した細胞内局在解析およびプロモーター解析は、スサビノリの遺伝子機能を解明する上で重要な実験系であることが明らかとなった。現在、本種では全ゲノム解読や完全長 cDNA ライブラリー解析が進められていることから、今後大量の遺伝子情報が得られると予想される。そのため、本研究で試みた手法をこれらの遺伝子に関して適用することにより、スサビノリの生活環制御や環境応答機構が分子レベルで明らかになると考えられる。今後は、一過的遺伝子発現系を用いた RNAi 法やアンチセンス法による遺伝子発現のノックダウン系および安定的形質転換技術を用いた遺伝子破壊や遺伝子過剰発現系の開発が必要である。本研究で試みた手法に加えて、これらの手法が開発されることにより、本種の分子生物学的研究が進展し、これらの知見を育種に応用していくことで海苔の優良品種開発のより一層の進展が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	荒井克俊
副査	教授	嵯峨直恆
副査	教授	安井 肇
副査	准教授	三上浩司
副査	准教授	水田浩之

学位論文題名

海産紅藻スサビノリにおける一過的遺伝子発現系を用いた 分子生物学的研究

海産紅藻スサビノリは我が国において、海苔の原材料であることから水産資源として極めて重要な種である。そのため、本種の効率的な育種が望まれているが、分子生物学的な知見が不足しているため、それが困難な状況となっている。本研究は、一過的遺伝子発現系を用いた細胞内局在解析およびプロモーター解析がスサビノリの分子生物学的な基盤技術として有用であることを明らかにしたものである。

まず始めに、細胞内局在解析を行うため、蛍光タンパク質である AmCFP や ZsGFP などをスサビノリ由来のアクチンプロモーターに連結させたコンストラクトを作製した。このコンストラクトをパーティクルガン法によりスサビノリ配偶体に導入したところ、これらの蛍光タンパク質がスサビノリ細胞で発現することを確認した。次に、スサビノリ由来の転写因子である PyElf1 および PyMBF1 の細胞内局在を明らかにするために、これらを AmCFP や ZsGFP に連結させたコンストラクトをスサビノリ細胞に導入し蛍光を観察した。その結果、PyElf1 および PyMBF1 が核に局在していることを観察し、AmCFP や ZsGFP といった蛍光タンパク質がスサビノリの細胞内局在解析に利用可能なことを明らかにした。

また、プロモーター解析に先立ち、スサビノリが細胞内の Na⁺を細胞外へと汲み出す働きのあるナトリウムポンプをコードする 2 つの遺伝子、PyATPIA および PyATPIB を持つことを明らかにした。これらの遺伝子について RT-PCR による発現解析を行ったところ、PyATPIA は孢子体世代優占的に、PyATPIB は配偶体世代特異的に発現していることを発見し、世代によってナトリウムポンプ遺伝子が使い分けされていることを示唆した。この結果を踏まえ、スサビノリの生活環の制御機構解明の一環として、PyATPIA の孢子体世代優占的な転写制御機構の解明に焦点を当て、PyATPIA のプロモーター解析を行った。PyATPIA の 5'上流領域を様々な長さで欠失させた DNA 領域を PyGUS レポーターにつないだコンストラクトを作製した。次いでそれらを配偶体および孢子体に導入し、GUS 活性を比較した結果、孢子体世代特異的に機能するアクチベーター結合領域と配偶体世代特異的に機能するリプレッ

サー結合領域の存在を示唆した。そこで、これらの領域を *PyElf1* プロモーターの上流に連結させた *PyGUS* レポーターコンストラクトを作製し、同様の解析を行ったところ、*PyElf1* プロモーターのみの場合と比較して、アクチベーター結合領域を連結させた場合には、GUS 活性の上昇を、リプレッサー結合領域を連結させた場合には、GUS 活性の減少を認めた。この結果により、*PyATPIA* の胞子体世代優占的な発現は、胞子体世代特異的に機能するアクチベーター結合領域と配偶体世代特異的に機能するリプレッサー結合領域により制御されていることを明らかにし、さらにリプレッサー結合領域に関して詳細な解析を行った結果、配偶体世代において *PyATPIA* の発現を負に制御する配列として 20 bp の GC リッチな配列を同定することができた。これらのことから、プロモーター解析がスサビノリの転写制御機構を解明するのに有効な手法であることを示した。以上の結果から、一過的遺伝子発現系を利用した細胞内局在解析およびプロモーター解析は、スサビノリの遺伝子機能を解明する上で重要なツールであることが明らかとなり、本種の分子生物学的研究に大いに貢献するものと期待される。

主論文は、平成 24 年 1 月 19 日 10 時から 11 時まで第 2 研究棟特別講義室において、審査員および関連教員 11 名および一般聴講 23 名のもと発表された。一般聴講においては遺伝子の転写結合領域についての質問がなされた。また審査員および関連教員からは、プロモーター解析手法、遺伝子の発現量の表現法とその意味および育種と分子生物学的研究の相互関係についての質問がなされた。また、分子生物学的研究の育種への具体的応用に関する展望についてのコメントがあった。得られた知見は、本種の分子生物学の充実のみならず、今後の海産藻類の応用研究の発展に大いに寄与するものと評価できる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。