

モデル生物として注目される緑藻クラミドモナス

高橋裕一郎・福澤秀哉

緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は、核、葉緑体そしてミトコンドリアのゲノムの形質転換が可能で唯一の生物である。また、核遺伝子の EST の大規模解析による遺伝子のカタログづくりが進行中である。ここでは、“緑の酵母 (green yeast)” もしくは “光合成をする酵母 (photosynthetic yeast)” とよばれ注目されるクラミドモナスを用いた研究の現状について、光合成に関連した分野を中心にまとめた。

Key words 【緑藻クラミドモナス】【形質転換】【EST 解析】

はじめに コナミドリムシという和名をもつクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は、べん毛を 2 本もつおよそ 10 μm の楕円形の単細胞緑藻である (図 1)。実験室で現在使われている株は、1945 年に Smith がジャガイモ畑の土壌から単離した雌雄一対の株に由来している。少ないスペースで簡単に、速く、かつ安価に培養でき、遺伝学、分子生物学、生化学、細胞生物学などのさまざまな手法が使えるため、光合成、べん毛運動、オルガネラの生合成、配偶子分化などの研究に優れた材料として知られている^{1,2)}。酢酸を炭素源として従属栄養的に生育するため、これまでに光合成や運動などの変異株が数多く得られている。とくに 1960 年代には、遺伝学的手法を用いた光合成電子伝達系の研究に大きく貢献した。米国の Duke 大学には野生株・変異株のコレクションが維持されており、研究者に株を配布している (<http://www.botany.duke.edu/chlamy/>)。

この十年足らずの間に、核、葉緑体そしてミトコン

ドリアのゲノムの形質転換系をはじめとしてさまざまな分子生物学的ツールが開発されてきた。また、ミトコンドリア DNA のすべて、および葉緑体 DNA の大部分の塩基配列が決定されており、1999 年からは遺伝子のカタログづくりを目指して大規模な EST (expressed sequence tag) 解析が始まった。このような理由から、クラミドモナスはゲノムやポストゲノム研究にも有利なモデル生物として、これまで以上に注目されつつある。

1. 遺伝学的解析

クラミドモナスがモデル生物として研究に利用されるようになった理由のひとつは、交配が可能で遺伝学的な解析ができるからである¹⁾。栄養細胞は、一般に半数体 (haploid) で、雌雄異株で 2 つの接合型 (mating type) mt^+ と mt^- が存在する。図 2 にクラミドモナスの生活環を模式的に示した。栄養増殖した細胞は窒素

Yuichiro Takahashi, 岡山大学大学院自然科学研究科 (〒 700-8530 岡山市津島中 3-1-1) [The Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushimanaka, Okayama 700-8530, Japan] E-mail: taka@cc.okayama-u.ac.jp
Hideya Fukuzawa, 京都大学大学院生命科学研究所 (〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町) [Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan] E-mail: fukuzawa@lif.kyoto-u.ac.jp
The Green Alga Chlamydomonas reinhardtii as an Attractive Model System

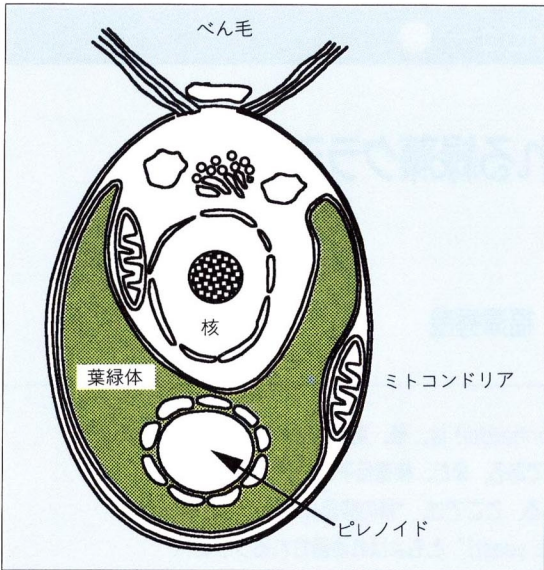


図1 クラミドモナスの細胞の模式図

源が欠乏すると、配偶子 (gamete) を形成する。異なる接合型の配偶子を混ぜると、最初は凝集し、次に対合を形成し、融合が始まる。そして、接合子 (zygote) を形成したのち、減数分裂し4つの娘細胞が分離される。クラミドモナスは酵母より大きいので、マイクロ

マニピュレーターを使わず実体顕微鏡下で4つの娘細胞を分離できる(四分子分析)。 mt^+ と mt^- の細胞の核の遺伝形質は、4つの娘細胞に2:2の比で分離する。一方、葉緑体とミトコンドリアの遺伝形質はそれぞれ mt^+ と mt^- の親細胞から移行する。したがって、四分子分析を行えば、変異遺伝子が核、葉緑体あるいはミトコンドリアのいずれにあるかを決定できる。以下に述べる形質転換の手法を利用した研究でも、この四分子分析は重要である。

II. 核ゲノム

1. 核の形質転換手法の発達

細胞機能の解析にとって最も強力な手法のひとつが、核の形質転換である。クラミドモナスの核ゲノムのサイズは100~160 Mb程度である¹⁾。葉緑体(196 kb)とミトコンドリア(16 kb)は独自の遺伝情報をもつが、その蛋白質の大部分は核にコードされている。

初期の核の形質転換の研究では、DNAを付着させたタングステン微粒子を、粒子銃でクラミドモナスの細胞に撃ち込んだ。この方法では一度に多くのDNAが細胞へ導入されるが、形質転換効率が高くなかった²⁾。その後、細胞懸濁液にDNAと直径0.5 mmのガラスビーズ

を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌することで細胞表面に傷をつけてDNAを細胞内へ導入する方法が開発された³⁾。このガラスビーズ法は、形質転換効率が高く($10^4 \sim 10^5$ 細胞/ μg DNA)、特殊な装置を必要としないので、現在では多くの研究室で用いられている。ガラスビーズ法では、細胞壁を酵素により消化したり、細胞壁を欠損した変異株 (*cw15*) を宿主細胞に用いる必要がある。

クラミドモナスでは、相同組換え頻度が低いので(0.1%程度)、導入されたDNAは核ゲノムにランダムに組み込まれる。ガラスビーズ法では、形

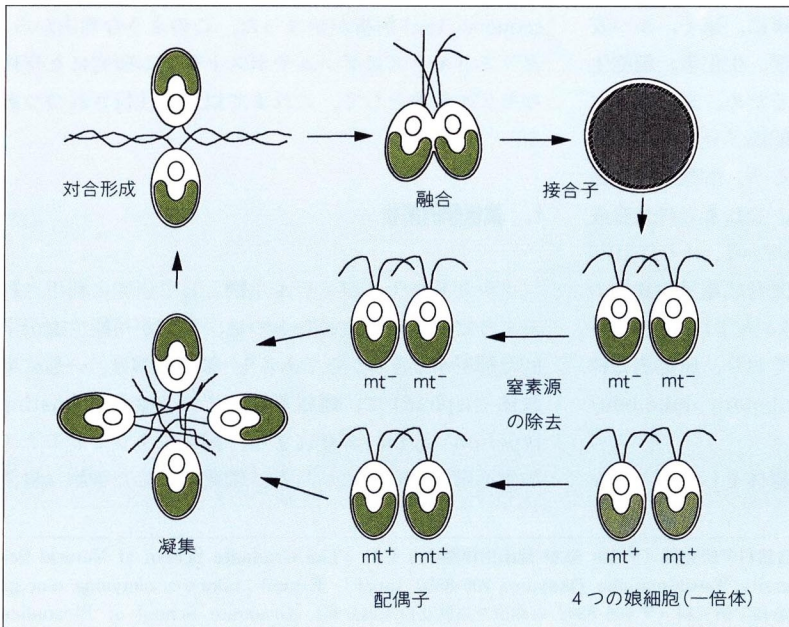


図2 クラミドモナスの生活環

質転換に用いる DNA 量を調節すれば、DNA が 1~2 コピーしかゲノムに組み込まれない条件が見つかる。この条件を用いることにより、あとで述べる遺伝子タギングによる変異原因遺伝子の単離が可能になった。さらに 1998 年には、エレクトロポレーションによる高効率の形質転換法が報告され、変異の相補実験が容易になった⁵⁾。

核の形質転換体の選択に利用できる薬剤耐性マーカーは、フレオマイシン耐性を与える *ble* 遺伝子などが開発されているが (フレオマイシンはブレオマイシンの類縁化合物で、Zeocin® の名で入手可能)⁶⁾、最も効率と信頼性が高い方法は、栄養要求株を野生型の遺伝子で相補する方法である。たとえば、硝酸還元酵素欠損株 (*nit1-305*) に、硝酸還元酵素遺伝子 *NIT1* をもつ DNA を導入し、変異が相補した形質転換体をアンモニアを含まず硝酸塩を含む培地で選択する方法である⁷⁾。もう一つは、アルギニン要求株 (*arg7-8*) に、アルギニン合成系のアルギニノコハク酸リアーゼ遺伝子 *ASL* を導入し、形質転換体をアルギニンを含まない培地で選択する方法である³⁾。核の形質転換には、栄養要求性と細胞壁欠損変異 (*cw15*) をもつ二重変異株 (*nit1-305, cw15*) と (*arg7-8, cw15*) がよく使用されている。

また、遺伝子の転写調節領域を同定するには、発現を簡便に検出できるレポーター遺伝子が用いられる。クラミドモナスでは、アリルスルファターゼ遺伝子 *ARS* がレポーター遺伝子として使われている。たとえば培養中の CO₂ 濃度変化に応じて転写が調節を受ける炭酸脱水酵素遺伝子 *CAH1* では、転写抑制にかかわるサイレンサー領域と転写活性化にかかわるエンハンサー領域が同定された⁸⁾。また、クラゲの発光蛋白質 (GFP) 遺伝子がクラミドモナスのコドン使用頻度を考慮して全合成され、実際に細胞中で発現し発光することが報告された⁹⁾。フレオマイシンによる DNA 鎖切断を阻害する *ble* 遺伝子産物は、核に移行して機能する。この *ble* 遺伝子と GFP 遺伝子の融合遺伝子を細胞に導入すると、その遺伝子産物は確かに核に移行し、核が緑色の蛍光を発することが示された。今後は、この GFP 遺伝子を使って、遺伝子産物の細胞内局在性や発現調節を調べる研究が急展開することになるだろう。

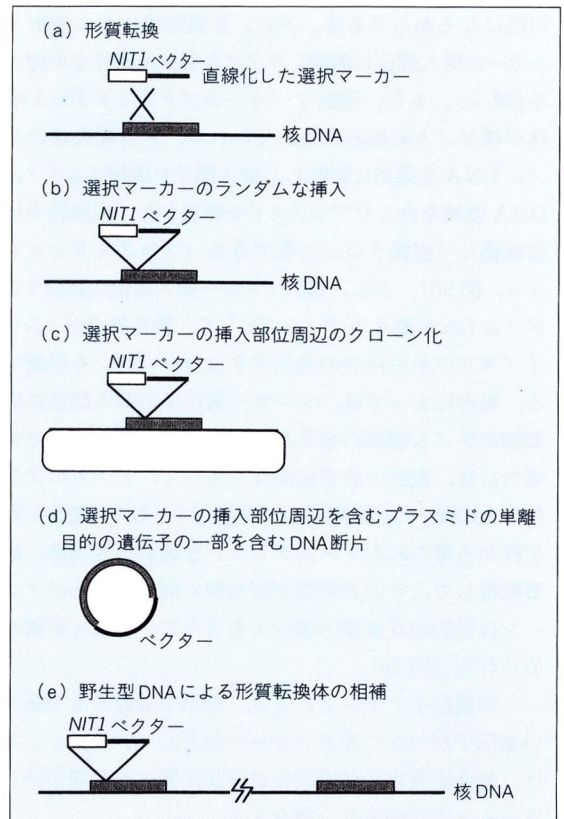


図 3 遺伝子タギング法の手順

2. タギング法による遺伝子の単離

変異体を作製するとき、通常は化学物質や紫外線を利用して、遺伝子に突然変異を導入する。一方、遺伝子タギング法では、形質転換に用いる選択マーカー遺伝子自体を変異剤として利用する。マーカー遺伝子が核ゲノムにランダムに挿入されることを利用して、遺伝子を破壊し、変異株を得る¹⁰⁾。この方法で得られた変異株では、破壊された遺伝子にマーカー遺伝子で目印 (タグ) がつくので、クローン化が容易になる (図 3)。まず *NIT1* 選択マーカー遺伝子を硝酸還元酵素欠損株の核ゲノムに導入して硝酸還元活性を回復した形質転換体を得て、さらに自分の目的の表現型を示すコロニーを選別する (図 3 a, b)。得られた変異株は野生株と交配し、娘細胞に目的の表現型と選択マーカーが同時に分離する株を、以後の実験に用いることが重要である。なぜなら選択マーカーの挿入によって変異が誘発されている場合のみ、タグを使った遺伝子の同定が

可能になるからである。次に、形質転換体から選択マーカーの挿入部位に隣接したゲノム DNA 断片を単離する(図 3c)。もし、選択マーカーのプラスミド DNA 全体が核ゲノムに組み込まれていれば、形質転換体のゲノム DNA を適当に切断し、挿入部位に隣接するゲノム DNA 領域を含んだプラスミドを環状化し、大腸菌を形質転換して直接クローン化できる(プラスミドレスキュー、図 3d)。次に、選択マーカー挿入部位に隣接するゲノム DNA 断片をプローブにして、野生株のゲノムライブラリーから目的の遺伝子を含むクローンを単離する。場合によっては、マーカー遺伝子の挿入部位に広範囲のゲノム領域の欠失が起こることがあるが、その場合には、複数の形質転換体を用いて、ゲノムの欠失部分を比較すれば原因遺伝子を推定できる¹¹⁾。最後に野生株から得られたゲノムクローンを最初の変異株に形質転換して、その表現型が野生型に戻れば、そのクローンは目的の変異原因遺伝子を含んでいることが確かめられる(図 3e)。

この遺伝子タギングにより、重要な機能をもつ新しい遺伝子がつぎつぎとクローン化されている。ここでは、光合成器官の構成成分の合成に関与する遺伝子のクローン化の例を 2 つ紹介する。

葉緑体の光合成器官には光合成電子伝達系で機能する 2 つの *c* 型シトクロム Cyt. *f* と Cyt. *c₆* が存在する。Inoue らは 4 つのシトクロム *b₆f* 複合体を欠損した株を、遺伝子タギングにより作製した 2,500 の形質転換体から選抜した¹²⁾。興味深いことに、そのうちの 1 つ *abf3* 株は Cyt. *c₆* も欠損することがわかった。この場合、選択マーカーの挿入部位の上流に 200bp の欠損が認められたただけだったので、タグされた領域をクローン化したところ、褐藻 *Odontella sinensis* および紅藻 *Porphyra purpurea* の葉緑体ゲノムの *ycf44* と相同性がある遺伝子が見いだされた。この遺伝子産物は *c* 型ヘムのアポ蛋白質への結合に必須の成分で、CCSI(*c*-type cytochrome synthesis)遺伝子と名前がつけられた。この遺伝子の欠損株は、表 1 で示した葉緑体 *ccsA* 遺伝子欠損株と表現型が同じである。

陸上植物や緑藻がもつクロロフィル *b* (Chl*b*) は、光合成反応に必要な光エネルギーを捕集する色素である。異なる光環境に光合成機能を適応させるため、植物は Chl*b* の量を変動させる。このような植物の光環境への適応に重要な Chl*b* 生合成系は不明であった。Tanaka

らは、遺伝子タギングにより Chl*b* の合成が欠損した可能性がある薄緑色のコロニーを、1,000 形質転換体あたり 1 つ単離し、このなかから Chl*b* をまったく含まない形質転換体を 6 つ選抜した¹¹⁾。Chl*b* 欠損株のゲノム DNA の選択マーカー挿入部位には、数 kbp~数十 kbp の欠損が生じていたので、各形質転換株に共通の欠損領域に相当する野生株のゲノム DNA 断片をクローン化した。このゲノム DNA 断片を *ble* 遺伝子と一緒に Chl*b* 欠損株に形質転換 (cotransformation) したところ、Chl*b* 合成能が回復した。この領域に同定された遺伝子は、CAO (chlorophyll *a* oxygenase) 遺伝子と命名され、Chl*a* のメチル基を酸化して Chl*b* を合成する酵素をコードすることが明らかにされた。

3. コンプリメンテーションクローニング

クラミドモナスには興味深い表現型を示す変異株がこれまでに多数報告されている。これらを野生株のゲノムライブラリーで相補 (コンプリメンテーション) して、変異を受けた遺伝子をクローン化する手法も開発されている。核の形質転換の効率が高くなったことで、変異の原因遺伝子を、整列化したゲノムライブラリー (indexed library) から同定できるようになった¹³⁾。整列化したライブラリーとは、独立したゲノムクローンを百数十枚のマイクロプレートに保存しておき、DNA プールをつくってグループごとに形質転換を行なって変異が相補するかどうかを順にテストする手法である(図 4)。まず、マイクロプレート 1 枚分の整列化クローンを混合した DNA プール (No. 1~120) を作り、それぞれを変異株に導入して、どの DNA プールで変異が相補するかを調べる(図 4a)。変異を相補する DNA プールが判明すれば、そのマイクロプレート上のいずれかのクローンに原因遺伝子が含まれることから、今度は、そのプレートの縦 1 列もしくは横 1 列のクローンを混合して DNA プールを作製し(この場合、縦 12 行、横 8 列)、それぞれを変異株に導入する(図 4b)。もし、第 3 行の DNA プールと第 C 列の DNA プールで変異が相補したら、両者に共通して含まれるクローン 3-C が目的の変異原因遺伝子を含むはずである。実際に 3-C を変異株に導入し、表現型が相補されることを確認する。このように、形質転換を 3 回くり返すことにより目的の遺伝子を含む DNA が迅速にクローン化できる。この方法により高 CO₂ 要求株 *ca-1* から炭酸脱水酵素をコ

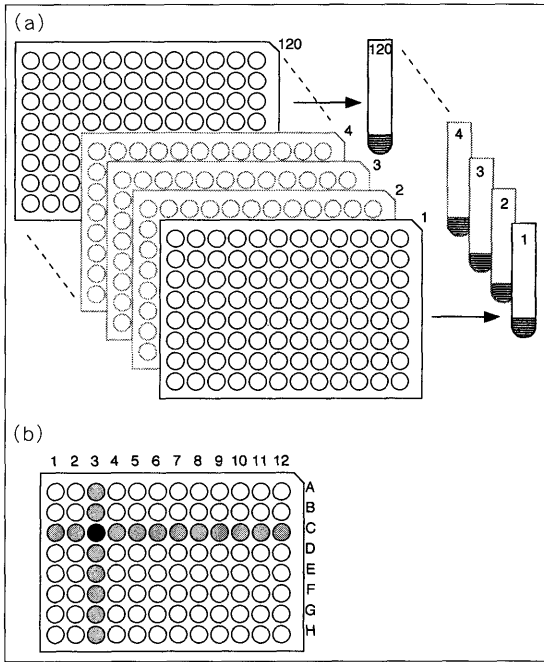


図 4 整列化ライブラリーを用いた遺伝子のクローン化

ードする *CAH3* 遺伝子がクローン化された¹⁴⁾。すでに葉緑体から炭酸脱水酵素は精製され、cDNA からそのアミノ酸配列は推定されていたが、この酵素の機能的な重要性は、変異の相補実験で初めて証明された。

4. EST 解析による核遺伝子のカタログづくり

1999 年からクラミドモナスの EST 解析が始まり、今後の核遺伝子の解析に大きな進展をもたらすものと期待されている。EST は cDNA クローンの末端の塩基配列を決定して得た配列データで、mRNA レベルで発現している遺伝子の配列情報を含むので、その生物の遺伝子カタログとみなすことができる。発現レベルの高い遺伝子は mRNA 量が多いので、配列データも重複してデータベースに登録されることになる。場合によっては、同一遺伝子から由来する cDNA を減らすため、均一化処理を加えることもある。

かずさ DNA 研究所と京都大学のグループは、光独立栄養条件で生育した細胞から mRNA を調製し、合成した cDNA の 5' 末端配列 11,571 個を決定した¹⁵⁾ (www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/)。100 bp 以上の領域で 95% 以上の相同性をもつクローンを 1 つのグループとみなすと、EST 配列は 3,433 種類のグ

ループに分類された。データベースに対する相同性検索により、817 グループは既知の配列と有意な相同性を示し、このうち 140 グループはクラミドモナスの既知遺伝子に相当した。残りの 2,616 種類は新規な配列であった。また、ホームページ (www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/blast.html) で EST クローンとの相同性検索が可能で、EST クローンの分与も受けられる [問合せは、かずさ DNA 研究所まで (E-mail: chlamy@kazusa.or.jp)]。また、米国の研究グループも EST 解析を開始しており、今後の国際協力体制の確立が待たれる。

EST データベースには、以下のような利用方法が考えられる。① 遺伝子地図を作成する際にゲノム上の遺伝子マーカーとして用いる。これには遺伝子に固有の塩基配列が 1 カ所存在する可能性が高い cDNA の 3' 末端の配列が必要である。② 他の生物で知られている遺伝子と相同な遺伝子 (ホモログ) の単離に用いる。これには cDNA の 5' 末端の配列が有用である。配列が少し異なる EST クローンが複数存在する場合には、遺伝子ファミリーが存在することになる。ただし、似た配列をもっている、遺伝子産物の機能が同じであるとは限らないので注意が必要である。③ 配列決定したゲノム DNA 上でエクソンの位置を判定するために利用する。④ 蛋白質の部分アミノ酸配列がわかれば、EST データを検索して cDNA クローンを迅速に得ることができる。解析法の進歩により蛋白質の分離やアミノ酸配列決定が少量の試料で可能となり、細胞に微量にしか存在しない蛋白質の cDNA クローンも多数単離されるようになる。⑤ EST クローンから cDNA アレイを作製すれば、数千の遺伝子の発現を一度に網羅的に調べることが可能となり、ゲノムレベルで遺伝子の発現解析が可能となる。

III. 葉緑体ゲノム

1. 葉緑体形質転換

植物細胞に特徴的な細胞内小器官である葉緑体は、二重の包膜に囲まれ、内膜系としてチラコイド膜をもつ。葉緑体には独自の遺伝情報とその発現系があるが、葉緑体 DNA はクラミドモナスで最初に発見された。これまでにいくつかの陸上植物や藻類の葉緑体 DNA の全塩基配列が決定された結果、そこには共通する遺伝子

はおよそ 120 しか存在しないことが明らかになった^{16,17)}。したがって、葉緑体蛋白質のほとんどは核ゲノムにコードされ、細胞質で前駆体として合成されたのち、葉緑体へ輸送される。葉緑体 DNA がコードするのは、遺伝情報の発現に関与する成分、光合成器官を構成する成分、光合成器官の合成に関与する因子などで、それと種間で保存された機能不明な読み取り枠 (*ycf*; *hypothetical_chloroplast_open_reading_frame*) がいくつか残されている^{18,19)}。

クラミドモナスの葉緑体 DNA のサイズは 196 kb で、高等植物にある葉緑体遺伝子のほとんどを含むが、遺伝子の配置は大きく異なっている。高等植物は細胞あたり数多くの葉緑体があり、条件によっては DNA は 10,000 コピーも存在する。これに対して、クラミドモナスは細胞体積の 40 % ほどを占める葉緑体を一つしかもたず、DNA も 80 コピーほどである。

葉緑体へ DNA を導入するには、細胞壁、細胞膜それと二重の包膜を通過させなければならないため粒子銃を用いる。1988 年に最初の葉緑体形質転換がクラミドモナスで成功したのは、大きな葉緑体を 1 つもつ単細胞生物であること、さらに重要なことに宿主細胞として利用できる葉緑体変異株(この場合、ATP 合成酵素の β サブユニットをコードする葉緑体の *atpB* 遺伝子欠損株)が利用できたからである。選択マーカーを新たに開発する時間がなかった最初の形質転換では、この光合成的に生育できない変異株へ野生型の *atpB* 遺伝子を含む葉緑体 DNA を導入し、光合成的生育条件下で形質転換体を選択した²⁰⁾。

葉緑体に導入された DNA は相同組換えにより葉緑体ゲノムに組み込まれる。したがって、特異的に遺伝子を失活させる遺伝子の標的破壊や部位特異的突然変異の導入が可能である。後者は、遺伝子発現を制御するシス因子の解析や蛋白質のエンジニアリングなどに応用される。また、他の蛋白質などと複合体を形成する蛋白質にヒスチジン 6 残基から構成されるヒスチジンタグなどを融合させ、アフィニティークロマトグラフィーにより複合体を精製する方法にも応用されている²¹⁾。形質転換に用いる選択マーカーは、葉緑体蛋白質合成を阻害する抗生物質に対する耐性を与える *aadA* カセットが使われている²²⁾。これを用いると、形質転換体はスペクチノマイシンを含む寒天プレート上で容易に選択できる。現在では、クラミドモナスの場合と基本的に

同じ方法で、高等植物のタバコの葉緑体形質転換も可能である²³⁾。

すでに述べたように、クラミドモナスに葉緑体 DNA は 80 コピー存在するので、形質転換後のしばらくの間は、形質転換型と野生型のコピーが共存するヘテロプラスミックな状態となる。選択圧をかけた状態でシングルコロニーを 2~3 回ほど拾えば、すべてのコピーが形質転換型に置き換わり、ホモプラスミックな状態となる。しかし、細胞の生存に必須の葉緑体遺伝子の破壊は不可能で、選択圧をかけてもヘテロプラスミックな状態が維持される。この場合、選択圧を除くと速やかに形質転換型のコピーは失われ、野生型のコピーだけに戻ってしまう。

複数の遺伝子を破壊したい場合は、*aadA* カセットの両端に 483 もしくは 832bp の同じ塩基配列をもつ DNA 断片を同方向につないだものを利用し、マーカーを再利用する方法を用いる²⁴⁾。目的の遺伝子の破壊にこのマーカーを利用したのち、選択圧を除くと同じ塩基配列の DNA 領域で組み換えが起こり *aadA* カセットが取り除かれる。このとき、カセットの両端につけ加えた 483 もしくは 832bp の DNA 断片の一方は残されたまま形質転換体は薬剤感受性を回復する。したがって、次の遺伝子破壊も *aadA* カセットを用いて行なうことができる。

2. 葉緑体遺伝子の機能解析

これまでに破壊された葉緑体遺伝子を表 1 にまとめた。RNA 合成酵素遺伝子の *rpoB1*, *rpoB2*, *rpoC2* および *clpP*, *ycf1* 破壊株は完全に分離できず、ヘテロプラスミックな状態の形質転換体しか得られなかった^{25~27)}。これらの遺伝子は細胞の生育に必須であると考えられ、その解析により葉緑体がクラミドモナスの生存に必須である理由を明らかにするヒントが得られると期待される。ところで、RNA 合成酵素遺伝子破壊株では、葉緑体で *aadA* カセットも発現できなくなると考えられる。これに対して、タバコでは *rpoB* 遺伝子破壊株が得られた²⁸⁾。タバコには核にコードされた RNA 合成酵素があり、葉緑体の遺伝子発現系の遺伝子の転写をおもに担っている。一方、葉緑体にコードされた RNA 合成酵素は、光合成遺伝子などを転写している。クラミドモナスには、核にコードされた RNA 合成酵素はないのかもしれない。

表 1 クラミドモナスの葉緑体遺伝子破壊株

遺伝子	遺伝子産物の性質および機能	遺伝子破壊株の表現型	形質転換体の分離
<i>rpoB1</i>	RNA 合成酵素の β サブユニットの N 末端領域		不可
<i>rpoB2</i>	RNA 合成酵素の β サブユニットの C 末端領域		不可
<i>rpoC2</i>	RNA 合成酵素の β'' サブユニット		不可
<i>clpP</i>	Clp プロテアーゼの活性サブユニット	光合成的生育の損傷(ヘテロプラスミックな形質転換株)	不可
<i>ycf1</i>	1995 コドンの読み取り枠	野生型(ヘテロプラスミックな形質転換株)	不可
<i>ycf3</i>	系 1 の合成, チラコイド膜蛋白質	系 1 の欠損	可
<i>ycf4</i>	系 1 の合成, チラコイド膜蛋白質	系 1 の欠損	可
<i>ccsA (ycf5)</i>	c 型シトクロムの合成	シトクロム b_6f と c_6 の欠損	可
<i>petN (ycf6)</i>	シトクロム b_6f の小型の疎水性サブユニット	シトクロム b_6f の欠損 (タバコの形質転換株の場合)	可
<i>petL (ycf7)</i>	シトクロム b_6f の小型の疎水性サブユニット	シトクロム b_6f の活性低下および蓄積量の減少	可
<i>psbT (ycf8)</i>	系 2 の小型の疎水性サブユニット	系 2 の強光感受性の増大	可
<i>cemA (ycf10)</i>	包膜蛋白質	H ⁺ の排出または無機炭素の取り込みの欠損	可
<i>chlB</i>	光非依存性プロトクロロフィリド還元酵素	暗所で黄化	可
<i>chlL (frxC)</i>	光非依存性プロトクロロフィリド還元酵素	暗所で黄化	可
<i>chlN</i>	光非依存性プロトクロロフィリド還元酵素	暗所で黄化	可
<i>psaC (frxA)</i>	系 1 の鉄硫黄蛋白質 (F _A と F _B)	系 1 の失活および蓄積量の減少	可
<i>psaJ</i>	系 1 の小型の疎水性サブユニット	系 1 還元電子伝達速度の減少	可
<i>psbH</i>	系 2 のリン酸化される小型の疎水性サブユニット	系 2 の欠損	可
<i>psbI</i>	系 2 の小型の疎水性サブユニット	系 2 の蓄積量の減少	可
<i>psbK</i>	系 2 の小型の疎水性サブユニット	系 2 の欠損	可

葉緑体には光合成器官の形成に関与する 3 つの遺伝子 *ycf3*, *ycf4* および *ccsA* が同定されている。たとえば, *ycf3* と *ycf4* 遺伝子をそれぞれ破壊すると, 葉緑体にコードされた光化学系 1 (以下, 光化学系 1, 2 をそれぞれ系 1, 系 2 とする) 反応中心蛋白質の発現は影響されないが, 系 1 複合体がまったく蓄積されなくなる。これらの遺伝子は系 1 反応中心蛋白質の翻訳後の過程, おそらく系 1 複合体の分子集合に関与するらしい²⁹⁾。これらの遺伝子産物の解析が光合成器官の形成に関与する分子シャペロンの解明の突破口になることが期待される。

これまでに最も数多くつくられてきたのは, 光合成器官の超分子複合体である系 1, 系 2 および Cyt. b_6f の構成サブユニットの遺伝子の形質転換体である。補欠分子族を結合する主要なサブユニットのエンジニアリングにより, 複合体の構造と機能の解析に多大な成果が得られている。一方, 数 kDa 程度の小型で機能不明のポリペプチドがこれらの超分子複合体に数多く存在することが知られている¹⁹⁾。これまでに, 葉緑体ゲノムにコードされた系 1 の *psaJ*³¹⁾, 系 2 の *psbH*³²⁾, *psbI*³³⁾, *psbK*³⁴⁾, *psbT*³⁵⁾ および Cyt. b_6f の *petG*³⁶⁾, *petL*³⁷⁾ 破壊株がそれぞれ作出されている。これらの遺伝子産物は, 複合体の安定性もしくは合成に関与する

ことが明らかにされ, その機能の重要性が再認識されつつある。葉緑体形質転換はこれら小型のサブユニットの機能解析に強力な研究手段を提供しているといえる。

IV. ミトコンドリア形質転換

クラミドモナスのミトコンドリアの形態と数は, 栄養成長の過程で大きく変化し, 小さなミトコンドリアが 50 も存在したり, 大きな球状もしくは分枝したミトコンドリアが 1 つしかない場合がある。ミトコンドリアの DNA は 15.8 kb の直線状の分子で, 細胞あたりおよそ 50 コピー存在し, 両端の 3' に一重鎖の延長配列 (39~41 塩基) が存在する。このゲノム上に 13 の遺伝子が存在する。それらは, 複合体 I のサブユニット 1, 2, 4, 5, 6 (*nd1*, 2, 4, 5, 6), 複合体 III のシトクロム *b (cob)*, 複合体 IV のサブユニット 1 (*cox1*), 逆転写酵素のホモログ (*ntl*), 3 つの tRNA, 2 つの rRNA 遺伝子である。したがって, ミトコンドリアでは 3 種の tRNA しか合成されないのので, 蛋白質合成のためには細胞質から tRNA が輸送されなければならない²⁾。

複合体 I, III, IV の遺伝子が失活しても, 細胞は光独立栄養条件下で生存できる。しかし, クラミドモナ

スの生存にはミトコンドリアは必須で、ミトコンドリアを欠損した変異株を単離することはできない。ミトコンドリアが細胞の生存に必須である理由は明らかでないが、これは酵母と大きく異なる性質である。

ミトコンドリアのゲノムの形質転換は、効率率は高くないが可能である。これまでに、*cob* 遺伝子の領域を欠損する *dum1* 変異株に、部分的に精製したミトコンドリア DNA を粒子銃で撃ち込み、呼吸活性を回復した形質転換体を従属栄養条件下で単離することに成功した³⁸⁾。導入された DNA は相同組換えによりミトコンドリア DNA に組み込まれる。葉緑体の形質転換より効率率がかなり低いのは、サイズが小さいミトコンドリアが複数存在することが原因であると考えられる。クラミドモナスのミトコンドリアの形質転換系は、植物細胞におけるミトコンドリアの機能について分子遺伝学的な手法で解析できる唯一の貴重な系である。

おわりに 核、葉緑体、ミトコンドリアの3つのゲノムについて形質転換系が確立している唯一の生物であるクラミドモナスは、EST データベースや GFP 遺伝子などの分子生物学的ツールが新しく整備されてきたことから、ますます多くの研究者を魅了するモデル生物として利用されると期待される。ここでは誌面の都合でふれなかったが、クラミドモナスは、べん毛運動・生殖・行動(走光性・走化性)などの研究分野では、原生動物からヒトに至る動物のモデルとしても研究に使われている。今後は、光合成・細胞生物学・ゲノム生物学などの異分野の研究者どうしの交流がさらに新しい発想を生みだし、新しい機能をもつ遺伝子の発見に結びつくことが期待される。このためには、これまで以上に変異株から変異原因遺伝子を容易かつ迅速に単離できるよう手法の改善が必要である。今後、EST のみならず核ゲノムの構造解析が進めば、新規な遺伝子の同定が加速化されるであろう。また、葉緑体の遺伝子破壊と同じく、核遺伝子の破壊や改変が容易になれば、研究材料としての有用性はますます大きくなるであろう。

文 献

1) Harris, E. H. : The *Chlamydomonas* Sourcebook,

- Academic Press, San Diego (1988)
- 2) Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. : The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1998)
 - 3) Debuchy, R., Purton, S., Rochaix, J.-D. : *EMBO J.*, **8**, 2803-2809 (1989)
 - 4) Kindle, K. L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1228-1232 (1990)
 - 5) Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H. : *Genetics*, **148**, 1821-1828 (1998)
 - 6) Stevens, D. R., Rochaix, J.-D., Purton, S. : *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 23-30 (1996)
 - 7) Kindle, K. L., Schnell, R. A., Fernandez, E., Lefebvre, P. A. : *J. Cell Biol.*, **109**, 2589-2601 (1989)
 - 8) Kucho, K., Ohshima, K., Fukuzawa, H. : *Plant Physiol.*, **121**, 1329-1337 (1999)
 - 9) Fuhrmann, M., Oertel, W., Hegemann, P. : *Plant J.*, **19**, 353-361 (1999)
 - 10) Fukuzawa, H., Ishizaki, K., Miura, K., Matsueda, S., Inoue, T., Kucho, K., Ohshima, K. : *Can. J. Bot.*, **76**, 1-6 (1998)
 - 11) Tanaka, A., Itoh, H., Tanaka, R., Yoshida, K., Okada, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12719-12723 (1998)
 - 12) Inoue, K., Dreyfuss, B. W., Kindle, K. L., Stern, D. B., Merchant, S., Sodeinde, O. A. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 31747-31754 (1996)
 - 13) Zhang, H. : *Plant Mol. Biol.*, **24**, 663-672 (1996)
 - 14) Funke, R. P., Kovar, J. L., Weeks, D. P. : *Plant Physiol.*, **114**, 237-244 (1997)
 - 15) Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Fukuzawa, H., Tabata, S. : *DNA Res.*, **6**, 369-373 (1999)
 - 16) Ohshima, K. et al. : *Nature*, **322**, 572-574 (1986)
 - 17) Shinozaki, K. et al. : *EMBO J.*, **5**, 2043-2049 (1986)
 - 18) Rochaix, J.-D. : *Trends in Plant Science*, **2**, 419-425 (1997)
 - 19) Takahashi, Y. : *J. Plant Res.*, **111**, 101-111 (1998)
 - 20) Boynton, J. E. et al. : *Science*, **240**, 1534-1538 (1988)
 - 21) Svab, Z., Maliga, P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 913-917 (1993)
 - 22) Sugiura, M., Inoue, Y., Minagawa, J. : *FEBS Lett.*, **426**, 140-144 (1998)
 - 23) Goldschmidt-Clermont, M. : *Nucl. Acid. Res.*, **19**, 4083-4089 (1991)
 - 24) Fisher, N., Stampacchia, O., Redding, K., Rochaix, J.-D. : *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 373-380 (1996)
 - 25) Rochaix, J.-D. : *Annu. Rev. Genet.*, **29**, 209-230 (1995)
 - 26) Huang, C., Wang, S., Chen, L., Lemieux, C., Otis,

- C., Turmel, M., Liu, X. Q. : *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 151-159 (1994)
- 27) Boudreau, E., Turmel, M., Goldschmidt-Clermont, M., Rochaix, J.-D., Sivan, S., Michaels, A., Leu, S. : *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 649-653 (1997)
- 28) Allison, L. A., Simon, L. D., Maliga, P. : *EMBO J.*, **15**, 2802-2809 (1996)
- 29) Boudreau, E., Takahashi, Y., Lemieux, C., Turmel, M., Rochaix, J.-D. : *EMBO J.*, **20**, 6095-6104 (1997)
- 30) Xie, Z., Merchant, S. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 4632-4639 (1997)
- 31) Fisher, N., Boudreau, E., Hippler, M., Drepper, F., Haehnel, W., Rochaix, J.-D. : *Biochemistry*, **38**, 5546-5552 (1999)
- 32) Summer, E. J., Schmid, V. H. R., Bruns, B. U., Schmidt, G. W. : *Plant Physiol.*, **113**, 1359-1368 (1997)
- 33) Künstner, P., Guardiola, A., Takahashi, Y., Rochaix, J.-D. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 9651-9654 (1995)
- 34) Takahashi, Y., Matsumoto, H., Goldschmidt-Clermont, M., Rochaix, J.-D. : *Plant Mol. Biol.*, **24**, 779-788 (1994)
- 35) Monod, C., Takahashi, Y., Goldschmidt-Clermont, M., Rochaix, J.-D. : *EMBO J.*, **13**, 2747-2754 (1994)
- 36) Berthold, D. A., Schmidt, G. L., Malkin, R. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 29293-29298 (1995)
- 37) Takahashi, Y., Rahire, M., Breyton, C., Popot, J.-L., Joliot, P., Rochaix, J.-D. : *EMBO J.*, **15**, 3498-3506 (1996)
- 38) Randolph-Anderson, B. L. *et al.* : *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 235-244 (1993)

高橋裕一郎

略歴：1985年 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了（理学博士），岡山大学理学部助手，助教授を経て2000年より現所属（岡山大学大学院自然科学研究科・助教授）。研究テーマ：葉緑体光合成遺伝子の機能解析。

福澤秀哉

略歴：1986年 京都大学大学院農学研究科博士課程修了（農学博士），東京大学応用微生物研究所助手，京都大学農学部助手，助教授を経て1999年より現所属（京都大学大学院生命科学研究所・助教授）。研究テーマ：CO₂輸送機構，光合成の順化に伴う遺伝子発現制御，光合成生物のゲノム解析。

お知らせ

バイोजパン2000 第18回 バイオテクノロジーシンポジウム

日時：平成12年9月28日(木) 9:30~17:30

場所：京王プラザホテル [42F 富士(講演会), 5F エミネンスホール(ポスター)] / 東京・西新宿

招待講演：

完全長cDNAプロジェクトとヒトゲノムドラフトシーケンス
菅野純夫（東大医科研）
Gene Expression Pattern Recognition in Cancer
Todd Golub (MIT Center for Genome Research)

一般講演：

戦略的ヒトcDNAゲノム応用技術開発
二宮 健（日立製作所）
単一分子の識別に基づくDNAシーケンシング
石川 満（アトムテクノロジー研究体）
遺伝子発現解析へのマイクロマシン技術の応用
牧野 徹（オリンパス）
遺伝子ネットワーク解析のためのプラットフォーム
深川浩志（インテック・ウェブ・アンド・ゲノム・インフォマティクス）
薬剤標的分子検索用アフィニティピーズの作製とその応用
長谷川 慎（バイオテクノロジー組合）

遺伝子の試験管内進化 原山重明（海洋バイオ研）
動物細胞を用いて糖鎖をつくる 榎野 正（三井化学）
天然ゴム、イソプレノイドの創成 中沢慶久（日立造船）
光誘導型ジンクフィンガー転写因子を利用した光ストレス耐性植物の作出 大江田憲治（住友化学）

ポスターセッション：

DNA解析・情報処理技術/DNA等構造観察操作技術/ゲノムインフォマティクス技術/戦略的ヒトcDNAゲノム応用技術/微粒子利用型生体結合物質等創製技術/加速型生物機能構築技術/複合糖質生産利用技術/植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術/植物細胞の砂漠地域適応化技術/機能性生体分子解析・合成システム開発

参加費：無料

申込み・問合せ先：〒105-0003 東京都港区西新橋2-3-9
バイオテクノロジー開発技術研究組合
Tel. 03-3595-0371 FAX 03-3595-0374