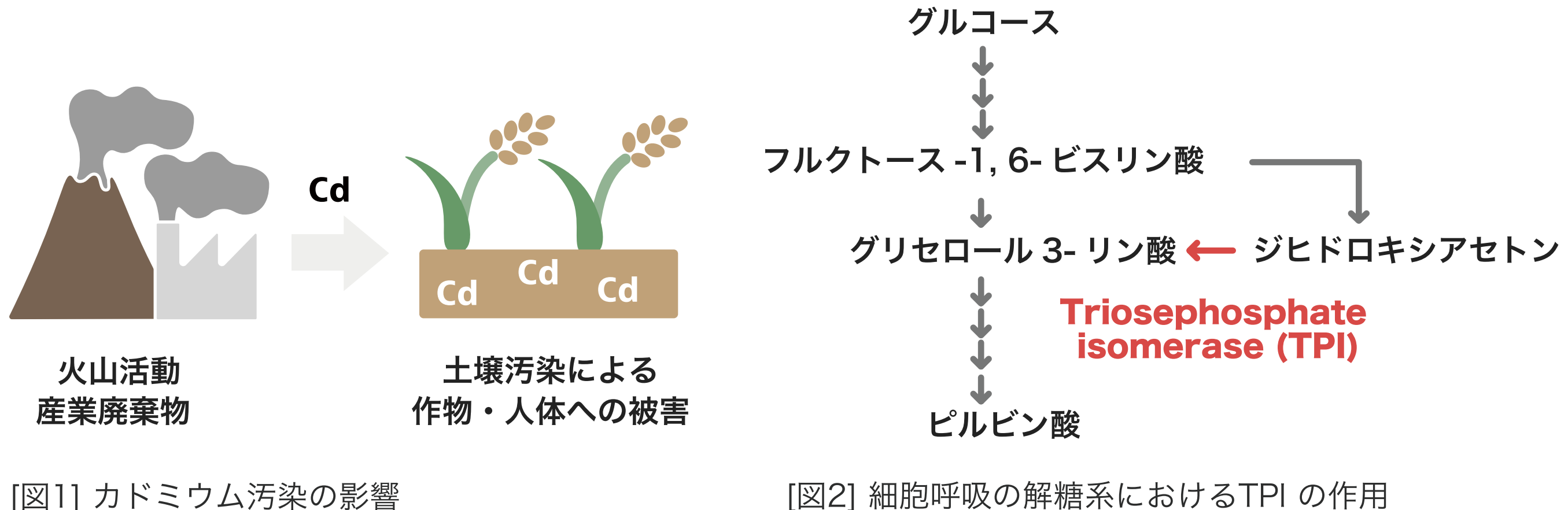


ゼニゴケにおける *TPI* 遺伝子とカドミウム耐性の関連性

広尾学園高等学校 2年 谷有咲

背景・目的

カドミウムとは、人体に有害な重金属である⁽¹⁾。火山活動や工場からの廃棄物により土壌が汚染され、人体や農作物に被害を与えることが社会問題となっている。そのため、カドミウムなどの重金属に耐性があり、汚染された土壌でも生育できる農作物の開発が必要とされる。しかし、このような技術は実現しておらず、植物のカドミウム耐性機構をより詳細に解析する必要がある。先行研究で、モデル植物シロイヌナズナにおいて、細胞呼吸の解糖系で働く細胞質局在の *Triosephosphate isomerase (TPI)* 遺伝子 (図2) *AtTPI* が破壊された変異株は、野生型と比べ極端にカドミウム耐性が下がることが示された^(2, 3)。しかし、詳細な作用機序は未だ明らかになっていない。本研究では、もう一つのモデル植物であるゼニゴケを用いて、ゼニゴケ *TPI* (Mp*TPI*) 遺伝子のゲノム編集ラインと過剰発現体を作成し、カドミウムストレス下での生育の違いを観察することにより、*TPI* 遺伝子とカドミウム耐性の関連性を明らかにすることを目的とする。



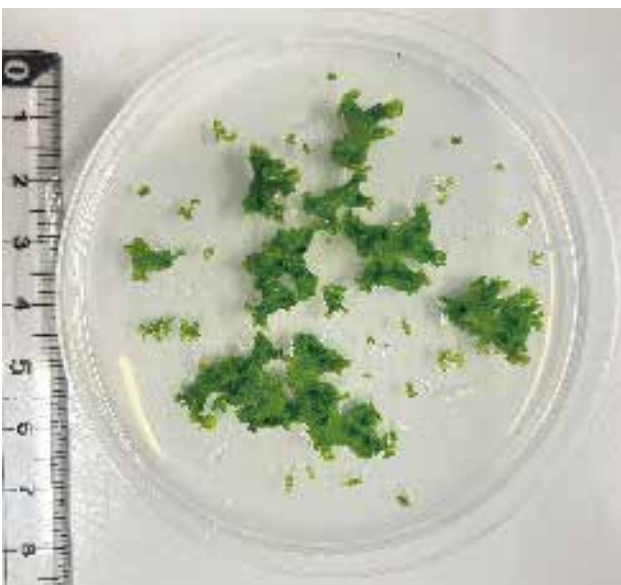
[図1] カドミウム汚染の影響

[図2] 細胞呼吸の解糖系におけるTPI の作用

材料・方法

実験材料

コケ植物タイ類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*)
・単相の世代が優勢
・無性生殖
形質転換が容易で、モデル植物として広く使用されている⁽⁴⁾。

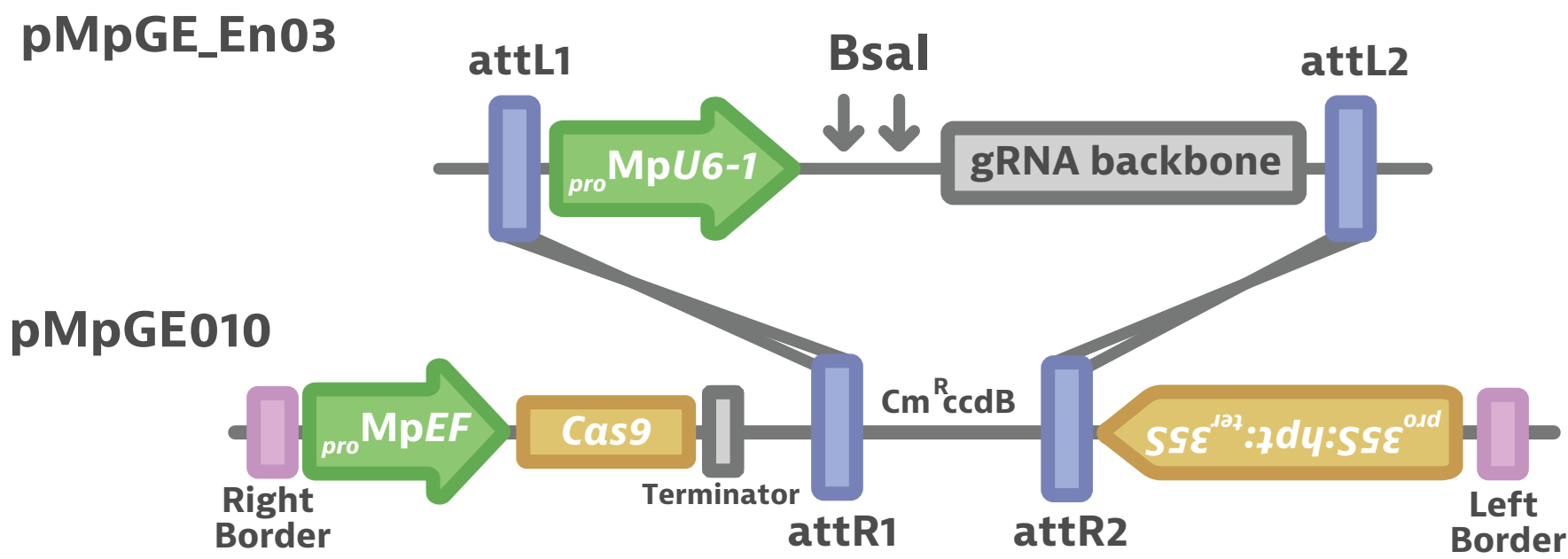


[図3] ゼニゴケ

方法

・CRISPR-Cas9 によるゲノム編集ベクターの作製

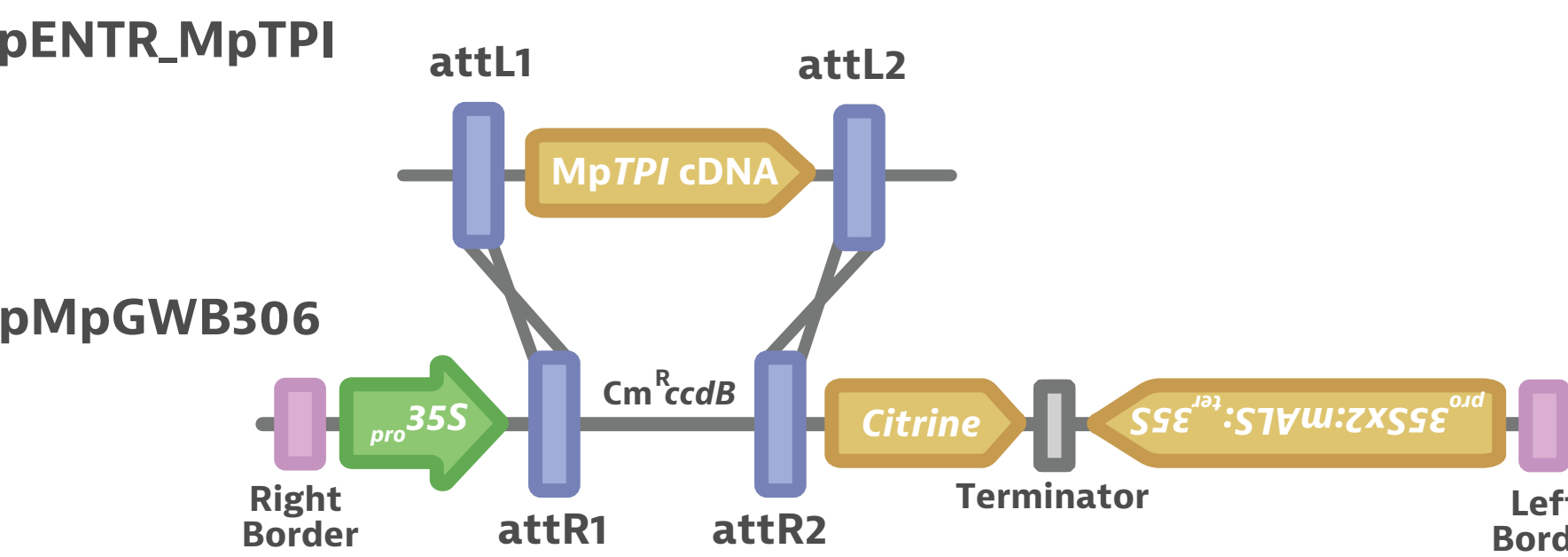
Mp*TPI* 遺伝子のゲノム編集ラインを作製。
4 箇所のガイド RNA (gRNA) を設計。エントリーベクター (図4) に導入。LR クロナーゼによりデスティネーションベクター (図4) に組み込んだ⁽⁵⁾。



[図4] 使用したベクターのマップ。hpt: ハイグロマイシン耐性遺伝子、ccdB: ccdB致死遺伝子

・過剰発現体用ベクターの作製

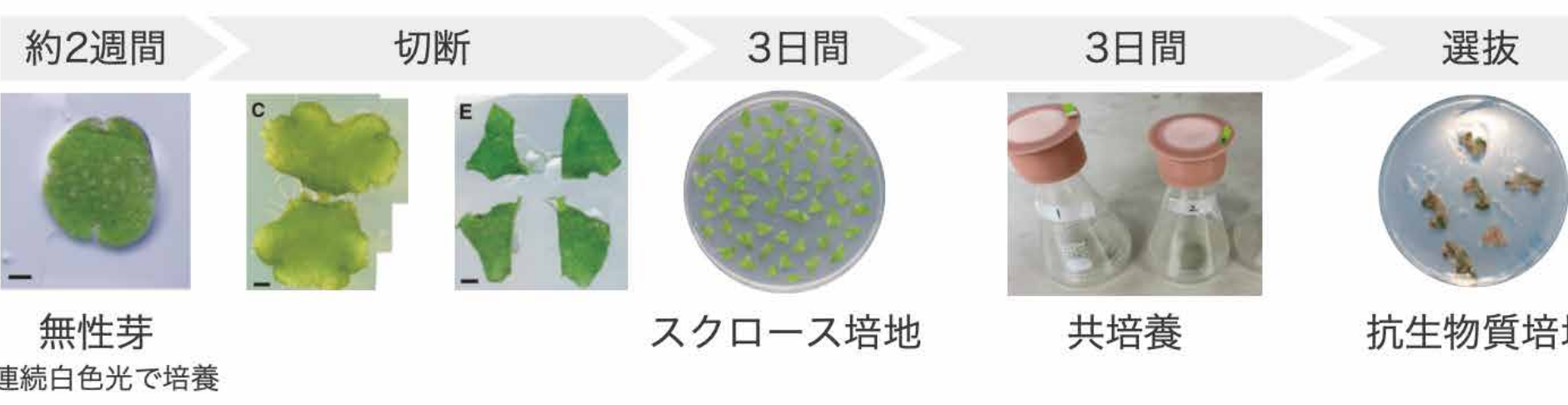
Mp*TPI* のカルボキシ末端に蛍光タンパク質である Citrine を融合した過剰発現ベクター (図5) を使用⁽⁶⁾。



[図5] 使用したベクターのマップ。mALS: クロロスルフロン耐性遺伝子

・ベクターの導入

各ベクターを導入したアグロバクテリウムとの共培養により野生型のゼニゴケに導入 (図6)。



[図6] ゼニゴケ形質転換の手順 (Kubota et al. 2013 Biosci. Biotechnol. Biochem. を改変⁽⁷⁾)

・カドミウムに対する成長への影響の観察

野生型と、得られたゲノム編集ラインと過剰発現体を、カドミウムを含まない培地、硫酸カドミウム (CdSO_4)あるいは塩化カドミウム (CdCl_2) を5、8、20、50 μM の濃度で含んだ培地に植え、2 週間培養した。2 週間後、植物体の面積を計算し、通常の培地と比較して成長阻害度を計算した。

結果・考察

・BLAST検索によるゼニゴケのホモログ MpTPI の同定

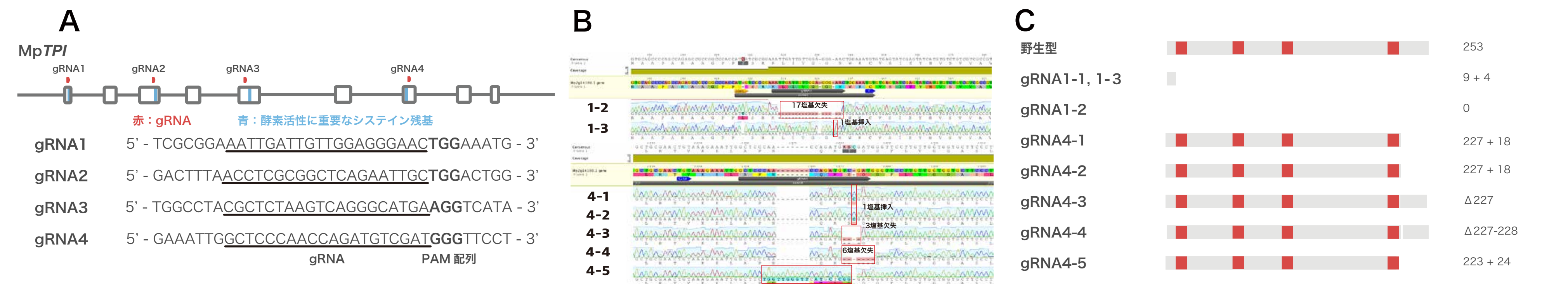
*AtTPI*の酵素活性に重要とされている4つのシステイン残基⁽⁸⁾は Mp*TPI* でも保存されていた (図7)。



[図7] *AtTPI* と *MpTPI* のアラインメント。青い印が重要とされているシステインの場所を示している。

・CRISPR-Cas9 によるゲノム編集

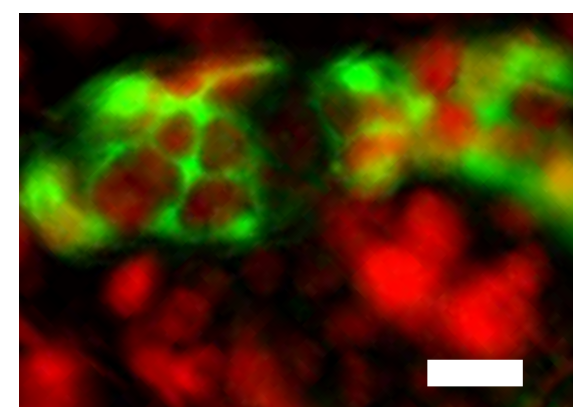
4 箇所のシステインを含む領域をそれぞれ編集できるように gRNA を設計 (図8)。ハイグロマイシンで選抜した形質転換体からそれぞれゲノム DNA を抽出し、Mp*TPI* の該当部分を PCR にて増幅し、シーケンスを行った。gRNA1 から 3 ライン、gRNA4 から 5 ラインのゲノム編集ラインを取得した (図9)。



[図8] Mp*TPI* ゲノム編集ラインの取得。A. Mp*TPI* 遺伝子構造と gRNA の箇所。(上図)白四角はエクソンで、間の線がイントロンを示す。青：gRNA、赤：酵素活性に必要なシステイン残基。(下図)gRNA付近の配列。下線部分がgRNAの配列、太字がPAM配列を示す。B. ゲノム編集ラインのシーケンス結果。1-1は1-3と同じ変異を持つ。C. ゲノム編集ラインの予測される翻訳産物。赤の部分はgRNAの部分を示す。数字は予想アミノ酸数を示す。

・MpTPI-Citrineの細胞内局在の顕微鏡観察

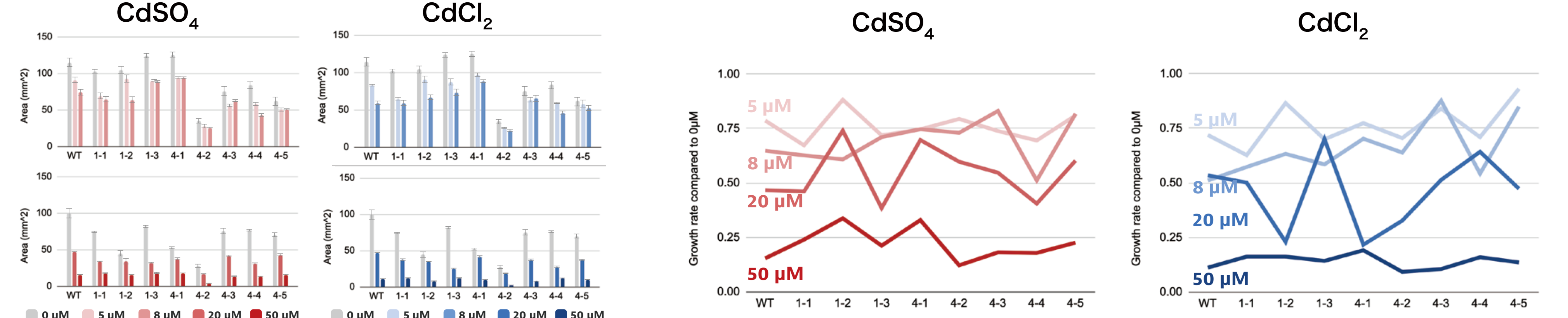
クロロスルフロン耐性を持つ35S:Mp*TPI-Citrine*を5ライン (ox-1 ~ 5) 取得し、蛍光顕微鏡でシトリン蛍光を確認した。MpTPI-Citrine の蛍光は主に細胞質で検出されたため、MpTPI は細胞質局在であることが示された (図9)。



[図9] Mp*TPI-Citrine* ox-2 の蛍光顕微鏡写真。赤色が葉緑体のクロロフィル自家蛍光で、緑色がシトリンの蛍光を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

・カドミウムの成長阻害度への影響

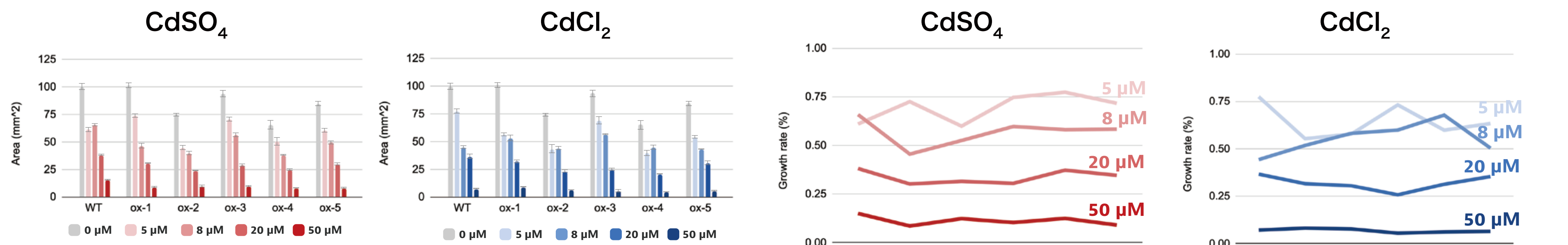
CdSO_4 、 CdCl_2 両方において野生型ではカドミウム5、8 μM ではカドミウムを加えていない培地と比べて 7 割程度、20 μM では 5 割程度、50 μM では 9 割程度の成長が観察された。ゲノム編集ラインは全て野生型同様のカドミウムに応答した成長阻害を示した。



[図8] ゲノム編集ラインのカドミウム環境下での生育。一回の実験がn=4で、グラフは3回実験の平均である。エラーバーは標準誤差である。各濃度での成長の割合を示す。

[図9] ゲノム編集ラインのカドミウム環境下での成長の度合い。0 μM の成長に対する

同様に、過剰発現体は全て野生型と同様のカドミウムに応答した成長阻害を示した。



[図10] 過剰発現体のカドミウム環境下での生育

[図11] 過剰発現体のカドミウム環境下での成長の度合い

以上の結果からゼニゴケにおいて *TPI* 遺伝子はシロイヌナズナの *TPI* 遺伝子とは異なり、カドミウムに対する耐性には関与しない可能性が示唆された。そのため、*TPI* によるカドミウム耐性のメカニズムは陸上植物全てに共有されているわけではなく、陸上植物進化の過程で獲得された可能性が示唆された。

謝辞

本研究は、JSTグローバルサイエンスキャンパス事業において東京大学グローバルサイエンスキャンパスの一環として行われたものである。東京大学大学院総合文化研究科末次研究室の末次憲之先生にご指導をいただき、片岡玲希さんには実験の補助をしていただいた。東京理科大学・名誉教授の島田浩章先生、東京大学大学院新領域創成科学研究科の石田萌音さんにアドバイスをいただいた。



(1) 厚生労働省。「米に含まれるカドミウム」に関するQ & A (2003)
(2) 石田萌音。バイテク情報普及会 (2018)
(3) Goto et al. Mutagenesis, 22: 135–142 (2007).
(4) Bowman et al. Plant Cell, 34: 3512–3542 (2022).
(5) Sugano et al. PLoS ONE, 13: e0205117 (2018).
(6) Ishizaki et al. PLoS ONE 10(9): e0138876 (2015).
(7) Kubota et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 77: 167–172 (2013).
(8) Castro-Torres et al. Plant J., 99: 950–964 (2019).