

Karenia 属渦鞭毛藻類のハプト藻類由来葉緑体への移行シグナル様配列に関する研究

松尾 恵梨子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

背景

光合成性渦鞭毛藻類の一種である *Karenia* 属の宿主核ゲノムには、進化的起源は異なるが機能的に相同だと考えられる 2 種類の葉緑体型 GAPDH がコードされている。GAPDH 系統樹中では、それぞれ典型的な光合成性渦鞭毛藻類の葉緑体で働く GAPDH タンパク (GapC1-p)、渦鞭毛藻類とは別系統の二次植物であるハプト藻類の葉緑体で働く GAPDH タンパク (GapC1-h) との近縁性が復元された。この進化的起源の異なる 2 種類の葉緑体型 *gapdh* 遺伝子を持つという特徴は、*Karenia* 属渦鞭毛藻類における特異な葉緑体進化を反映していると考えられる。

祖先渦鞭毛藻類は細胞内共生した紅藻類細胞から、渦鞭毛藻類特異的な補助色素であるペリディニンを含む「ペリディニン型葉緑体」を確立したと考えられている。光合成性渦鞭毛藻類の大多数はペリディニン型葉緑体を持つが、*Karenia* 属はハプト藻類を細胞内共生体として獲得し、元々持っていたペリディニン型葉緑体をハプト藻類細胞由来の葉緑体に置換した。したがって *Karenia* 属における進化的起源の異なる 2 種類の *gapdh* 遺伝子は、以下に述べる進化的背景を持つと考えられる: *gapC1-h* 遺伝子は *Karenia* 属の祖先細胞が持っていたペリディニン型葉緑体からハプト藻由来葉緑体へ置換した際、Endosymbiotic gene transfer (EGT) により獲得されたものであり、*gapC1-h* 遺伝子はかつてペリディニン型葉緑体で使用されていた *gapdh* 遺伝子の名残である。

ただし上述の仮説は配列データのみに基づき、2 種類の「葉緑体型」GAPDH が本当に葉緑体で働くかどうかは実験的な裏付けがない。

本研究では *Karenia* 属渦鞭毛藻類における 2 種類の「葉緑体型」GAPDH の細胞内局在を解明を目指す。そこでまず、それらのタンパクの N 末端プレ配列を GFP に付加した融合タンパクをコードしたプラスミドコンストラクトを作製した。このコンストラクトを渦鞭毛藻類の近縁生物であり形質転換系が確立されている *Toxoplasma gondii* (アピコンプレクサ類) 内で発現させ、GFP の蛍光により融合タンパク質の局在を観察することを目指している。

材料・方法

・GAPDH の N 末端プレ配列の取得

K. brevis 細胞からの RNA 抽出は Trizol を用いて行った。*K. brevis* の RNA を用いて、GapC1-p および GapC1-h の N 末端伸長配列を含む領域を逆転写 PCR によって得た。塩基配列決定後、データベースに基づいて入力したアミノ酸配列からシグナル配列を予測するプログラムである signalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) によりシグナル配列の有無を確認した。

・プレ配列を GFP と連結したコンストラクトの作製

GapC1-p および GapC1-h の N 末端プレ配列をコードした二

本鎖 DNA に対し、*EcoRI* の制限サイトを 5'末端に付加したフォワードプライマーと、GFP センス鎖 5'末端に相補的な配列を付加したリバースプライマーを設計して PCR を行った。また同様に、GFP をコードした二本鎖 DNA に対し GAPDH センス鎖 3'末端に相補的な配列を付加したフォワードプライマーと、*PacI* の制限サイトを付加したリバースプライマーを設計して PCR を行った。各 PCR 産物をアニーリングし、伸長反応によって各 GAPDH 遺伝子の N 末端プレ配列が付加された改変 GFP 遺伝子断片を作成した。これらの遺伝子断片を *EcoRI* および *PacI* で処理し、同様に処理した *T. gondii* 発現用 pBS ベクターに組み込んだ。作成されたプラスミドの塩基配列を決定し、フレームシフトや塩基配列に誤りがないことを確認した。

結果と考察

K. brevis GapC1-h の N 末端プレ配列を PCR 増幅後複数クローンの塩基配列を決定したところ、配列の違いから大きく 2 つのタイプに大別された。どちらのタイプもシグナル配列を持つと予想され、シグナルペプチド切断部位から成熟タンパク質領域にトランジットペプチド様配列と思われる数十アミノ酸残基の中間領域が認められた。それぞれのタイプから代表的なプレ配列を 1 つ選び、GFP 遺伝子の 5'末端配列に本配列を付加することで N 末端にプレ配列が融合した 2 種類の GFP 遺伝子 (hGFP) を作成できた。一方、GapC1-p の N 末端プレ配列にはシグナル配列が予測されなかった。しかし開始メチオニンから約 25 アミノ酸残基までの S-score (シグナル配列と非シグナル配列の比較によって導出された、あるサイトがシグナル配列である尤もらしさを示す尺度) は、いずれのサイトでも少なくとも 0.2 より上で、最大は 0.6 に達した。成熟タンパク質領域も含むそれ以降の配列の S-score は全てのサイトで 0.2 未満だったことから、この N 末端プレ配列がシグナル配列として機能しないとはまだ断定できない。また、GapC1-p の N 末端プレ配列はクローン間に有意な多型が認められなかったため、1 種類の N 末端プレ配列が融合した GFP 遺伝子 (pGFP) を作成した。それぞれの GFP 遺伝子をベクターに組み込むことにより、計 3 種類のプラスミドコンストラクトの作成に成功した。

今後作成したプラスミドコンストラクトにより *Toxoplasma* 細胞を形質転換し、蛍光により融合 GFP タンパク質の局在を観察することで、*Karenia* 属 GapC1 タンパクの N 末端プレ配列が葉緑体局在シグナルとして機能するかどうかを検討してゆく。