

ペディノ藻におけるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子の探索

内山 珠希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

背景

渦鞭毛藻類は、2本の鞭毛を持つ単細胞藻類であり、多様な形態や生活様式を持つ。多くの渦鞭毛藻類は、細胞内共生した紅藻類に由来する褐色の葉緑体(ペリディニン型葉緑体)を持つが、中にはさらに緑藻を細胞内共生させ、ペリディニン型葉緑体を緑藻由来の葉緑体に置換した緑色渦鞭毛藻も存在する。これまでの研究において、緑藻由来葉緑体への置換は渦鞭毛藻の系統内で複数回起きたことが示唆されているが、これらの葉緑体の起源となったのは、単細胞緑藻ペディノ藻に近縁な生物であるという共通点を持つ。

ペリディニン型葉緑体を持つ典型的な渦鞭毛藻類のゲノムには、細胞質型および葉緑体型の GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) がコードされており、それぞれ GapC2、GapC1-p と呼ばれる。対して、これまでの研究から複数の系統の緑色渦鞭毛藻類が、細胞質型 GAPDH (GapC2) の他にハプト藻類に見られる葉緑体型 GAPDH (GapC1-fd) に類似したタンパク質を持つことが明らかとなっており、この GapC1-fd が葉緑体で機能していると考えられている。このことは、これら複数の緑色渦鞭毛藻において葉緑体の由来となった緑藻が GapC1-fd を持ち合わせていた可能性を示す。

一般に緑藻類は、シアノバクテリアに由来する GAPDH (GapA) を葉緑体型 GAPDH として使用しており、GapC1-fd をもつ緑藻類は報告されていない。しかし、緑色渦鞭毛藻類の葉緑体の祖先に近縁とされるペディノ藻がどのような GAPDH を持っているかは未知である。本研究では、ペディノ藻ゲノムにおける GAPDH 遺伝子の探索を行い、緑色渦鞭毛藻に見られるような GapC1-fd が存在するか否かを検証した。

材料・方法

ペディノ藻 *Pedinomonas minor* [NIES-363] 細胞から全 RNA を抽出し、アダプター付オリゴ (dT) プライマーを用いた逆転写を行った。得られた cDNA をテンプレートとし、GAPDH のユニバーサルプライマーセット (Fast et al., 2001)、GapC1 に特異的なプライマーセット、および細胞質型 GapC2 に特異的なプライマーセットそれぞれを用いて PCR を行い、GAPDH 遺伝子配列の増幅を試みた。目的の長さの DNA 断片が増幅された場合、この産物をクローニングし、シーケンスを行なった。

結果と考察

ペディノ藻 *P. minor* の細胞から全 RNA を抽出し、オリゴ (dT) プライマーを用いて逆転写を行うことで cDNA を得た。この cDNA を鋳型として、様々な GAPDH 遺伝子配列を増幅するために、まず GAPDH のユニバーサルプライマーセットを用いて PCR を行なった。目的の長さの DNA 断片が増幅されたため、この産物のクローニングを行い、23 クローンをシーケンスした。得られた配列をクエリとして BlastX による相同性検索を行ったところ、このうち 1 クローンが緑藻類の GapA に高い相同性を示した。しかし残り 22 クローンは培養株にコンタミしたバクテリアの GAPDH や、まったく異なるタンパク質のコード領域であることが示唆された。

次に、意図しない配列の増幅を避け、効率的に GAPDH 遺伝子を探索するため GapC1 に特異的なプライマーセット、および GapC2 に特異的なプライマーセットそれぞれを用いて PCR を行なった。その結果、GapC1 に特異的なプライマーセットによる PCR では DNA 断片の増幅が認められなかった一方、GapC2 特異的なプライマーセットを用いた PCR では予想される長さの DNA 断片が増幅された。この産物の塩基配列を決定したところ、2 種類の配列が得られた。得られた 2 種類の配列を用いて BlastX による相同性検索を行なった結果、一方の配列は真核生物の細胞質型 GAPDH (GapC2) と高い相同性を示した。もう一方の配列は既に取得されていた GapA に類似した配列と同一であり、これはプライマーのミスアニーリングによって増幅されたものと考えられる。これらの結果から、*P. minor* のゲノムには、一般的な緑藻と同様に葉緑体型 GapA 遺伝子および細胞質型 GapC2 遺伝子がコードされていると考えられる。加えて、GapC1 特異的なプライマーセットを用いた PCR において DNA の増幅が起こらなかったことから、*P. minor* は GapC1-fd を持たないことが予想される。もし、複数の緑色渦鞭毛藻系統の葉緑体となった祖先生物が *P. minor* のように GapC1-fd を持たなかったと仮定すると、現存の緑色渦鞭毛藻系統は、独立に GapC1-fd を獲得した事となる。しかし、GapC1-fd を持つペディノ藻が *P. minor* 以外に存在し、そのような系統が緑色渦鞭毛藻の葉緑体祖先となった可能性もある。このため、今後の研究においては *P. minor* のみならず他のペディノ藻における GAPDH 探索が必要であると考えられる。