

クオララクニオン藻におけるオルガネラ DNA 複製酵素の起源と輸送シグナル解析

渡辺 ありさ (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

葉緑体とミトコンドリアは、それぞれシアノバクテリアと α プロテオバクテリアが従属栄養性真核生物に細胞内共生することで生じたオルガネラであり、現在も共生バクテリア由来のオルガネラ DNA を保持している。しかしこれらのオルガネラには DNA 複製に関わる遺伝子がほとんどなく、オルガネラ DNA の複製は宿主核にコードされたタンパク質に依存していると考えられる。細胞内共生の過程で、共生者から宿主核へのゲノムの移行や宿主核からオルガネラへのタンパク質輸送機構が確立したことは共生者がオルガネラ化するための重要なイベントである。したがって、核によるオルガネラ DNA の複製制御機構の進化を知ることは、細胞内共生によるオルガネラ化を理解するうえで重要なカギとなると思われる。

本研究で用いるクオララクニオン藻は、シアノバクテリア起源の葉緑体を持つ緑藻をケルコゾアに属する原生物が再度細胞内共生(二次共生)することで葉緑体を獲得した藻類(二次植物)である。クオララクニオン藻は共生緑藻の核の名残であるヌクレオモルフを持ち、そのため本藻は3つの異なるオルガネラ DNA (葉緑体 DNA、ミトコンドリア DNA、ヌクレオモルフ DNA) を保持していることから、オルガネラ DNA 複製機構を研究するうえで非常に興味深い生物である。

これまで、オルガネラ DNA 複製酵素に関しては、モデル紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* や陸上植物 *Arabidopsis thaliana* で研究が進められてきたが、二次植物ではほとんど報告がない。本研究では、クオララクニオン藻のオルガネラ DNA 複製酵素のひとつである DNA ポリメラーゼについて、クオララクニオン藻 *Bigeloviella natans* の全ゲノム配列を用いた相同性検索、緑色蛍光タンパク質 GFP を用いた細胞内局在解析、細胞周期を通じた遺伝子発現解析を行った。また分子系統解析の結果から、DNA ポリメラーゼ遺伝子の進化についても考察を行った。

手法

先行研究で報告されている *C. merolae* と *A. thaliana* のオルガネラ DNA ポリメラーゼ (POP) の配列に相同性のある遺伝子配列を *B. natans* の核ゲノムから BLASTp 相同性検索により取得した。得られた配列 (BnPOP) のタンパク質 N 末端を推定するために 5' RACE を行った。BnPOP タンパク質の細胞内局在を知るため、N 末端シグナル配列の *in silico* での予測解析と、GFP 融合タンパク質の遺伝子導入系を用いた *in vivo* での蛍光局在解析を行った。遺伝子導入には、クオララクニオン藻 *Amorphochlora amoebiformis* の細胞とパーティクルガン法を用いた。

BnPOP 遺伝子の起源の推定には、データベースより集めた他の生物の DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列を用いて、DNA ポリメラーゼドメインを基に最尤法とベイズ法により分子系統解析を行った。

BnPOP 遺伝子の発現時期とオルガネラ DNA の複製時期の関係を調べる実験では、12 時間明期: 12 時間暗期で同調培養させた *B. natans* の細胞よりインターバル抽出した RNA と DNA を用いて定量的 PCR を行った。

結果と考察

既知の POP の配列を用いて *B. natans* のゲノムに相同性検索した結果、POP と推定される2つのアミノ酸配列 (BnPOP1 と BnPOP2) が見つかった。この2つの BnPOP 配列は系統的に明らかに区別され、BnPOP1 は、ストラメノパイルの POP と近縁であり、BnPOP2 に関しては系統的なサポートは得られなかった。N 末端シグナル予測プログラムを用いて BnPOP の細胞内局在を予想した結果、BnPOP1 はクオララクニオン藻において葉緑体輸送シグナルの一部であるシグナルペプチドを含んでおり、BnPOP2 については、ミトコンドリア輸送シグナルを持っていた。GFP 融合タンパク質を用いて生体内における細胞内局在を観察した結果、BnPOP1 は葉緑体に局在し、BnPOP2 はミトコンドリアに局在することが明らかになった。以上のことから、BnPOP1 は宿主起源であり、二次共生前は従属栄養性真核生物に存在していたことからミトコンドリアで機能していたと考えられるが、現在は葉緑体のみで機能していることが示唆される。代わりに、ミトコンドリアには起源不明の BnPOP2 が輸送されているようだ。

C. merolae と *A. thaliana* では POP 遺伝子はゲノム中に1種類しか存在せず、葉緑体とミトコンドリアの両方で機能している。細胞内共生による葉緑体の獲得後に、ミトコンドリアで機能していた POP が葉緑体とミトコンドリアへ共輸送されるようになったと考えられている。このことから、クオララクニオン藻と他の光合成生物では、異なる POP 遺伝子の進化が起きたと推察される。

BnPOP の RNA 発現時期とオルガネラ DNA 複製時期の関係を調べる実験では、葉緑体に局在する BnPOP1 は細胞分裂する暗期より前に発現し、ミトコンドリアに局在する BnPOP2 は常に発現していることが分かった。それに対して、葉緑体とミトコンドリアの DNA は両方とも暗期に複製されていることが分かった。葉緑体に関しては BnPOP1 の発現時期と DNA 複製時期に相関性が見られたが、ミトコンドリアに関しては、BnPOP2 が常に発現するのにも関わらず暗期に DNA 複製が限定されていたので、BnPOP2 以外にミトコンドリアの DNA 複製を制御する因子があることが示唆された。