

## クロララクニオン藻のダイナミン様タンパク質と葉緑体分裂

鳥居 尚矢 (筑波大学 生物学類)

指導教員：平川 泰久 (筑波大学 生命環境系)

## 【研究の背景】

藻類が細胞分裂で増殖する際、保有する葉緑体などのオルガネラも分裂させなければならない。植物や緑藻、紅藻における一次葉緑体は2重の包膜を持つが、それらは分裂面でリング状構造が収縮することで分裂が起こる。2枚の包膜のうち、外膜側の分裂リングを構成するタンパク質の一つとして、ダイナミン様タンパク質 DRP5B (Dynamin-related protein 5B) が知られている。クロララクニオン藻は緑藻の二次共生により獲得した4重の包膜の二次葉緑体を持つが、クロララクニオン藻からは DRP5B に相当する配列が見つかっておらず、二次葉緑体の分裂様式に関してほとんど分かっていない。

ダイナミン様タンパク質は、GTPアーゼドメインを持つ自己集合型の、真核生物に広く保存されたタンパク質である。このタンパク質はオルガネラ分裂や小胞輸送など、多くの生体機能に関与している。クロララクニオン藻の一種 *Bigelowiella natans* では全ゲノムの解読がされており、5つのダイナミン様タンパク質 (BnDnm1A, BnDnm1B, BnDnm2, BnDnm3, BnDnm4) をコードする遺伝子が見つまっているが、それらの機能は分かっていない。本研究では、クロララクニオン藻におけるこれらのダイナミン様タンパク質の機能推定を目的として、細胞内局在の解析を行った。

## 【方法】

*B. natans* から抽出した RNA を用いて、逆転写 PCR によりダイナミン様タンパク質の遺伝子を単離した。得られた配列を用い、ダイナミン様タンパク質と GFP の融合タンパク質を発現するプラスミドを作成した。各プラスミドをエレクトロポレーション法により、クロララクニオン藻の一種 *Amorphochlora amoebiformis* に導入し、GFP 局在を蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

## 【実験 I : 逆転写 PCR による遺伝子の単離と GFP 融合タンパク質を発現するプラスミドの作成】

5つのダイナミン様タンパク質遺伝子のうち、BnDnm2 遺伝子は予備実験により単離済みである。よって、逆転写 PCR により、BnDnm2 遺伝子を除く4つのダイナミン様タンパク質遺伝子の単離を試みた。BnDnm1A, BnDnm3, BnDnm4 の3つに関しては問題なく遺伝子の単離に成功した。しかし、BnDnm1B に関しては、プライマーの設計や DNA ポリメラーゼを変えるなど複数の条件で遺伝子の単離を試みたが、いずれにおいても単離できなかった。よって、単離に成功したダイナミン様タンパク質について、GFP 融合タンパク質を発現するプラスミドを作成した。

## 【実験 II : 蛍光顕微鏡と共焦点顕微鏡による細胞内局在の解析】

ダイナミン様タンパク質+GFP を発現するプラスミドを、エレクトロポレーション法によりクロララクニオン藻 *A. amoebiformis* の細胞内へ導入し、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕

微鏡により細胞内局在の解析を行った。BnDnm1A+GFP、BnDnm2+GFP、BnDnm3+GFP は細胞質に点状または大きな塊として集合するものも多く見られた。BnDnm2+GFP は主に葉緑体周辺に蛍光が見られた。また、BnDnm2+GFP、BnDnm3+GFP において、仮足に分布しているものも多く見られた。一方、BnDnm4+GFP の蛍光は観察できなかった。

## 【考察】

現在までの GFP 融合タンパク質の細胞内局在解析において、ダイナミン様タンパク質が葉緑体分裂に関与することを支持するような局在は観察されなかったが、観察した細胞の葉緑体が分裂期ではなかった可能性もあるため、GFP 融合タンパク質を用いた解析は引き続き行う必要がある。BnDnm1A+GFP、BnDnm2+GFP、BnDnm3+GFP において見られた点状に集合する局在から、これら3つのダイナミン様タンパク質は自己集合能力を有することが示唆された。また、本実験で見られた大きな塊のような蛍光は、高発現プロモーターによる過剰発現を原因とした不自然な局在である可能性がある。

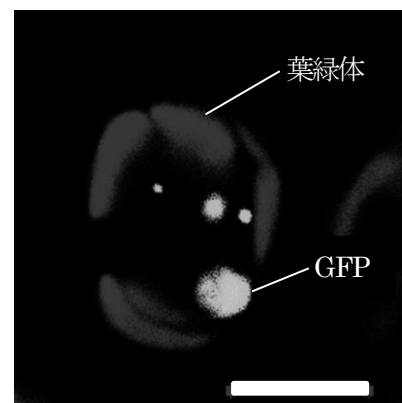


図 1. BnDnm1A+GFP を発現するクロララクニオン藻の一種 *Amorphochlora amoebiformis* の共焦点画像。BnDnm1A+GFP と同様、BnDnm2+GFP、BnDnm3+GFP においても、図のような集合型の局在を示すものが多かった。スケールバー：5 μm

## 【今後の展望】

GFP 融合タンパク質の局在が観察された BnDnm1A、BnDnm2、BnDnm3 について、よりネイティブな局在を見るため、各ダイナミン様タンパク質に特異的な抗体を作成し、免疫電子顕微鏡観察を行う。