

クロララクニオン藻の葉緑体に局在する機能未知なタンパク質の発見

松田 向平 (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】

植物や緑藻、紅藻のもつ葉緑体がシアノバクテリアの細胞内共生により誕生したことは広く知られている。この葉緑体を一次葉緑体と呼ぶ。その後、一次葉緑体をもつ緑藻や紅藻を細胞内に取り込む二次共生により、多様な藻類が誕生したと考えられている。

本研究で用いたクロララクニオン藻類は海産の単細胞性藻類で、緑藻起源の二次葉緑体をもつグループである。本藻の二次葉緑体は4枚の包膜に囲まれており、膜間領域に共生緑藻の核の痕跡であるヌクレオモルフをもつ。一次葉緑体と二次葉緑体では包膜数が異なり、核コードの葉緑体タンパク質の輸送機構も大きく異なる。一次葉緑体に輸送されるタンパク質は細胞質で合成され、トランジットペプチド (TP) と呼ばれる輸送シグナル配列により、2枚の包膜を通過して葉緑体内へ輸送される。一方、二次葉緑体に輸送されるタンパク質はシグナルペプチド (SP) をもち、小胞体上のリボソームで合成され、二次葉緑体へと輸送される。

クロララクニオン藻の一種 *Bigelowiella natans* の核ゲノムには、約 22,000 個のタンパク質がコードされている (Curtis et al 2012)。その中で、約 7,700 個の遺伝子は概日周期で発現変動する DEG (differentially expressed gene) であり、発現量の高い DEG の多くは二次葉緑体へ輸送されるタンパク質をコードしていると推定されている (Suzuki et al 2016)。本藻の二次葉緑体の真の機能を理解するため、本研究では、*B. natans* の高発現 DEG の中から、二次葉緑体に局在すると推定される機能未知なタンパク質の1つに着目し、解析を行った。

【結果①: 高発現・機能未知な葉緑体タンパク質の探索】

本研究では、*B. natans* の DEG の中で、機能未知なものとしては最大の発現量を誇る遺伝子に着目した。DEG 全体の中で 25 番目に発現量が高いことから、この遺伝子を *hep25* (Highly Expressed Protein 25) と呼称する。*hep25* の発現変動パターンは他の光合成関連タンパク質と類似しており、暗期後半から明期前半にかけて発現上昇するものであった。*HEP25* タンパク質の全長は 122 アミノ酸で、SignalP による解析の結果、N 末端に SP をもつことが予測された。さらに TMHMM による解析の結果、SP の C 末端側には既知のチラコイド膜輸送タンパク質に見られるような 2 つ目の疎水性領域が予測された。以上のことから、*HEP25* は、二次葉緑体のチラコイドで機能するタンパク質であると考えられる。

【結果②: 相同性検索】

HEP25 に相同なタンパク質が他の生物に存在するのか調べるために Blast 解析を行った。まず、クロララクニオン藻 9 種のトランスクリプトームデータに対して BlastP

検索を行った。その結果、6 種において *HEP25* と高い相同性を示すタンパク質が見つかった。一方、その他の真核生物やバクテリアにおいては、相同な配列は見つからなかった。このことは、*HEP25* がクロララクニオン藻で独自に獲得された新規の二次葉緑体タンパク質である可能性を示唆している。

【結果③: GFP による細胞内局在の解析】

GFP 融合タンパク質を用いて、*HEP25* の細胞内局在を確かめた。まず、*HEP25* の DNA 断片を GFP ベクターに組み込み、*HEP25+GFP* の融合タンパク質を発現するベクターを作成した。パーティクルガン法により、クロララクニオン藻の一種 *Amorphochlora amoebiformis* へ遺伝子導入し、GFP 蛍光を観察した。その結果、*HEP25* は二次葉緑体内に局在していることが分かったが、チラコイドでの局在を明らかにすることはできなかった。

【まとめ】

本研究により、*HEP25* はクロララクニオン藻で独自に獲得された高発現な二次葉緑体タンパク質であることが示唆され、本藻の二次葉緑体において重要な機能を果たしていると考えられる。現在、*HEP25* の輸送シグナル配列を除いた成熟タンパク質部分 (分子量約 3.5 kDa) の N 末端および C 末端の十数アミノ酸を用いてペプチド抗体を作成し、この抗体を用いて免疫電子顕微鏡による詳細な局在解析を進めている。

【引用文献】

Curtis, B. A., Tanifuji, G., Burki, F., Gruber, A., Irimia, M., Maruyama, S., Arias, M. C., Ball, S. G., Gile, G. H., Hirakawa, Y. et al. (2012) Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature*, 492, 59-65.

Suzuki S, Ishida K, Hirakawa Y (2016) Diurnal transcriptional regulation of endosymbiotically derived genes in the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*. *Genome Biol. Evol.* 8; 2672-2682.