

クロララクニオン藻のピレノイドの複製に関する研究

諸見里 怜奈 (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】

ピレノイドは葉緑体内に見られる構造で、炭素固定を触媒する RubisCO タンパク質の集合体である。RubisCO は二酸化炭素との結合特異性が低く、反応速度が遅いため、水圏に生息する多くの藻類はピレノイドに二酸化炭素を集中的に送る炭酸濃縮機構をもつ。ピレノイドは膜に覆われておらず、その形状や位置は生物ごとに異なり、葉緑体内部に埋没するものや葉緑体から突出したものなど様々である。さらにピレノイドへのチラコイド膜の陥入の有無やピレノイドを覆う貯蔵多糖の有無などの多様性が知られている。この形態の多様性に加え、ピレノイドの複製様式にもいくつかのパターンがあることが知られている。例えば、二分裂する様式や葉緑体分裂前後に新生される様式がある (Meyer et al., 2017)。しかし、クロララクニオン藻における報告は無く、ピレノイドの複製様式は解っていない。

クロララクニオン藻は緑藻の細胞内共生により葉緑体を獲得した二次共生藻類である。本藻のピレノイドは二葉性の葉緑体の中央部で突出した形で局在している。ピレノイドへのチラコイド膜の陥入は見られず、葉緑体内膜がスリット状に陥入している。また、貯蔵多糖を含むキャップ小胞が葉緑体の外に局在する。クロララクニオン藻の一種 *Amorphochlora amoebiformis* では、RubisCO 小サブユニット (RbcS) を緑色蛍光タンパク質 GFP で標識した遺伝子導入株が作製されており、ピレノイドの蛍光顕微鏡観察が可能である。本研究では *A. amoebiformis* のピレノイドの複製様式をタイムラプス観察により明らかにすることを目的とした。

【結果①: RubisCO 遺伝子 (*rbcL* と *rbcS*) の転写時期の解析】

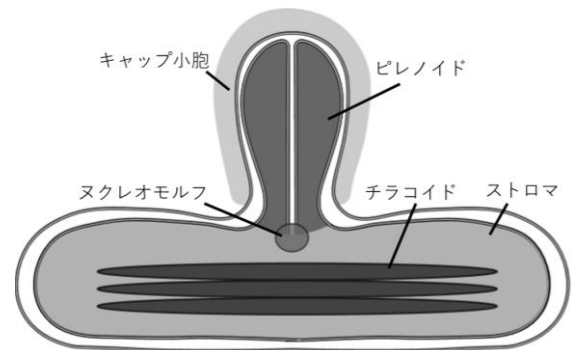
クロララクニオン藻の一種 *Bigelowiella natans* では *rbcS* の発現が概日周期に従って変動することが報告されている (Suzuki et al., 2016)。そこで、ピレノイドの複製時期を推測するために、明暗周期で培養した *A. amoebiformis* における *rbcS* と *rbcL* の転写量を定量的 PCR により 4 時間ごとに測定した。*rbcS* と *rbcL* の転写量は暗期に上昇し、明期開始頃にピークに達した。このことから、クロララクニオン藻の細胞内の RubisCO タンパク質は、暗期から明期前半にかけて増加することが予測された。

【結果②: タイムラプスによるピレノイドの個数の変化の観察】

ピレノイドの複製時期を推測するため、共焦点顕微鏡により明期後半や暗期において 1 時間ごとにタイムラプス観察を行った。各細胞あたりのピレノイドの個数の変化を調べた結果、暗期において連続的なピレノイドの増加が確認された。したがって、暗期においてピレノイドが複製されることが示唆された。暗期には多くの細胞が分裂し、その前後でピレノイドの増加が見られた。また、細胞分裂期のピレノイドは、明期のピレノイドに比べて小さく、平板なものが多く観察された。この形状変化がピレノイドの新生や分裂に伴う現象であるか、今後の詳細な観察が必要である。

【結果③: 細胞周期の同調実験】

タイムラプス観察により暗期にピレノイド増加と細胞分裂が観察されたが、その時期は疎らであった。より安定してピレノイドの複製を観察するため、薬剤添加による分裂同調を試みた。細胞周期阻害剤であるアフィジコリン、デメコルシン、ノコダゾール、ロスコビチンの添加実験を行ったところ、いずれも細胞増殖を抑制した。特に、アフィジコリンとノコダゾールは低濃度で阻害効率が高かった。また、阻害剤を除去することで細胞増殖は再開した。この実験系を用いることで、細胞分裂前後でのピレノイド観察を効率的に行える可能性がある。

図 1 A. *amoebiformis* の葉緑体の模式図

葉緑体からコブ状に突出したピレノイドに内側の葉緑体包膜 2 枚がスリット状に陥入する。

【今後の展望】

ピレノイドの増加・変形が観察された暗期においてより詳細なタイムラプス観察を行い、ピレノイドの複製の観察を試みる。

【参考文献】

Meyer, M. T., Whittaker, C. & Griffiths, H. (2017). The algal pyrenoid: key unanswered questions. *Journal of Experimental Botany*, 68(14), 3739–3749.

Suzuki, S., Ishida, K. I. & Hirakawa, Y. (2016). Diurnal transcriptional regulation of endosymbiotically derived genes in the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*. *Genome Biology and Evolution*, 8(9), 2672–2682.