

クロララクニオン藻における T7 フェージ型 DNA ヘリカーゼの局在と進化

青木 大地 (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)

【背景・目的】

ミトコンドリアと葉緑体は、それぞれ酸素呼吸と光合成を担う細胞小器官で、バクテリアに起源をもつ。ミトコンドリアと葉緑体は、バクテリア由来の独自の DNA をもち、それぞれミトコンドリア DNA と葉緑体 DNA と呼ばれている。これらの DNA の複製では、ウイルス由来のタンパク質など核 DNA の複製とは異なるものが利用されることが知られている。

DNA ヘリカーゼは、二本鎖 DNA をほどく酵素であり、DNA の複製において重要な役割を果たしている。ミトコンドリア DNA や葉緑体 DNA の複製では、様々な真核生物において T7 フェージ型ヘリカーゼである TWINKLE が関与すると考えられている。そのため、TWINKLE はミトコンドリア DNA と葉緑体 DNA の複製機構の進化を考えるうえで、重要なタンパク質の一つであると言える。

クロララクニオン藻は、スーパーグループリザリアのケルコゾア門に属し、緑藻を細胞内共生することで葉緑体を獲得した藻類である。陸上植物において TWINKLE がミトコンドリアと葉緑体の両方で機能することが示唆されているが^{1,2}、クロララクニオン藻では TWINKLE の局在は不明であった。そこで、本研究では、遺伝子導入系が確立されているクロララクニオン藻 *Amorphochlora amoebiformis* を用いて、TWINKLE の細胞内局在解析を行い、分子系統解析により TWINKLE の進化について考察した。

【方法】

(1) クロララクニオン藻の TWINKLE の配列データ取得

データベースに登録されている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と 1 種のゲノムデータを用いて、TWINKLE の相同配列を Blast 検索により探索した。

(2) クロララクニオン藻における TWINKLE の細胞内局在

細胞内局在予測ツール (TargetP v1.1, Predotar v1.04, iPSORT, PredSL) を用いて、完全長であるクロララクニオン藻 4 種の配列に対して *in silico* で細胞内局在予測を行った。

A. amoebiformis の TWINKLE の N 末端側の 60 及び 134 アミノ酸に GFP を融合させたコンストラクト (AaTWINKLE 1-60 +GFP, AaTWINKLE 1-134 +GFP) を作成した (図 1)。エレクトロポレーション法により *A. amoebiformis* に遺伝子導入し、共焦点レーザー顕微鏡で GFP 蛍光局在を観察した。

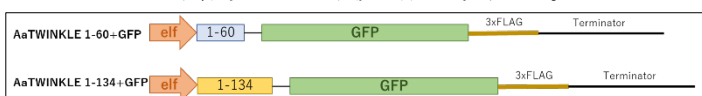


図 1 GFP 融合コンストラクト

(3) 分子系統解析

クロララクニオン藻 8 種を含むリザリア 11 種、緑色植物 11 種、紅藻 4 種、灰色藻 1 種、ストラメノパイル 10 種、オピストコン

タ 13 種、アモエボジア 5 種、クリプト藻 3 種、渦鞭毛藻 4 種を含むアルベオラータ 11 種と T7 バクテリオファージの計 72 の配列を用いて、最尤法により分子系統解析を行った。なお、系統樹は T7 バクテリオファージのヘリカーゼ gp4 を外群とした。

【結果・考察】

(1) クロララクニオン藻の TWINKLE の細胞内局在

8 種のトランスクリプトームデータから計 15 個の相同配列を、1 種のゲノムデータからは一つの相同配列を取得した。相同配列の多くは部分的な配列であったが、*A. amoebiformis* に関しては、PCR とシーケンシングにより完全長の遺伝子配列を決定した。これにより、クロララクニオン藻 4 種において完全長の配列が一つずつ得られた。これらの配列は、少なくとも 3 つのツールにおいてミトコンドリア輸送シグナルをもつことが予測された。また、葉緑体への輸送に必要なシグナルは予測されなかった。

A. amoebiformis の TWINKLE の蛍光局在解析では、GFP は葉緑体の自家蛍光とは異なる位置に確認され、顆粒状であった。この局在パターンは、ミトコンドリアの局在と類似していた。これらの結果から、クロララクニオン藻の TWINKLE はミトコンドリアに局在していると考えられる。

(2) TWINKLE の分子進化

TWINKLE は、緑色植物と渦鞭毛藻からなるクレードとそれ以外の真核生物からなるクレードの二つに分かれた。また、クロララクニオン藻とケルコゾア門に属する近縁な原生物は、高いブートストラップ値 (100%) で単系統群を形成した。このことから、クロララクニオン藻の TWINKLE は宿主のケルコゾア由来で、二次共生で取り込んだ緑藻に由来するものではないと考えられた。

クロララクニオン藻において TWINKLE は、ミトコンドリア DNA の複製に関与している一方で、葉緑体 DNA の複製には関与していないことが示唆された。

クロララクニオン藻の TWINKLE は、クロララクニオン藻の葉緑体獲得以前の祖先からミトコンドリア DNA の複製に関与していた可能性が示唆された。

シロイヌナズナの TWINKLE は葉緑体とミトコンドリアの両方に局在しているが³、クロララクニオン藻の TWINKLE とは大きく異なるクレードに含まれていた。ミトコンドリアのみで機能する TWINKLE と葉緑体でも機能する TWINKLE は、進化的な背景が異なるかもしれない。

【引用文献】

- [1] Diray-Arce et al. 2013. *BMC Plant Biology*, 13: 36
- [2] Carrie et al. 2009. *The Plant Journal*, 57(6): 1128-1139