

単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における CoA ジスルフィドレダクターゼ欠損株の解析

難波 勇人 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 蓑田 歩 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

細胞内のレドックスバランスは、一次代謝の方向と流量を変えることで、増殖を制御する。この制御には酸化還元酵素などのレドックス制御因子が関与しているが、その重要さゆえに、表現型が致死性であったり、複数の因子が関与する階層性の制御のため観察されないことも多い。そのため、光合成生物のレドックスバランスによる一次代謝の制御についての知見は限られている。

CoA ジスルフィドレダクターゼ (CoADR) は、CoA のチオール基の酸化還元を触媒する酵素である。グルタチオンのチオール基の酸化還元を触媒するグルタチオンレダクターゼ (GR) を持たない一部の嫌気性微生物に主に存在し、多くの生物が GR を介して行っている細胞内レドックスの調節を GR の代わりに行っていると考えられているが、その生理学的解析はない。私達は、ラン藻、緑藻、紅藻やクリプト藻の一部に CoADR が存在することを見出した。これらの藻類では GR と CoADR の両方が存在することから、CoADR は、GR と共に細胞内のレドックス制御に関与していると考えられた。

そこで、本研究では、CoADR をもつ光合成生物のうち、古くから生理学的知見が蓄積されており、全ゲノム配列も決定し、分子生物学的解析にも優れた光合成研究のモデル生物である単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いて、光合成生物における CoADR の生理学的役割の解明を目的として研究を行った。

【材料と方法】

培養: クラミドモナスライブラリープロジェクトから、*Chlamydomonas reinhardtii* の CoADR 遺伝子の異なる位置に CIB1 カセットが挿入された CoADR 欠損株 (CoA1, CoA2)、CIB1 カセットの挿入に利用された野生株を取得した。

C. reinhardtii は、光強度 90-100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、27°C で、試験管で通気しながら、光混合栄養条件、光独立栄養条件で培養した。

PCR: 光混合栄養条件で培養した *C. reinhardtii* の培養液 (1 mL) を遠心分離して上清を取り除き、DNA を Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (PCI) を用いて抽出した。CIB1 カセットが CoADR 遺伝子領域に挿入されているかを確かめるために、各 DNA 抽出液とコントロール領域とカセットが挿入されていると予想される CoADR 遺伝子の領域をそれぞれ増幅するプライマーセットを用いて KOD FX Neo (TOYOBO) により PCR を行った。また、CoA1、CoA2 にそれぞれ挿入されているカセットの配列と CoADR 遺伝子の配列をプライマーとして用い、同様に PCR を行った。

RT-PCR: 光混合栄養条件で培養した *C. reinhardtii* の培養液 ($\text{OD}_{750}=1.0$, 10 mL) を遠心分離し、上清を取り除いた。RNA を PureLink RNA Mini Kit (Life technologies) を用いて抽出し、polyA プライマーと Reveratrac Ace (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行った。作成した cDNA を鋳型として、One Taq (New

England BioLabs) を用いて PCR (40 cycle) を行い、野生株と CoA1 欠損株における CoADR 遺伝子の発現量を比較した。顕微鏡観察: 培養した細胞、および、でんぷん染色をおこなった細胞を、40 倍の対物レンズを用いて光学顕微鏡 (OLYMPUS BX53) により観察した。でんぷん染色は培養 200 μL を遠心分離し、上清を除去した後、90%エタノールを入れ再度遠心分離し、クロロフィルを取り除き、ペレットに $\text{I}_2\text{-KI}$ solution を加えた。

【結果と考察】

最初に、クラミドモナスライブラリープロジェクトから入手した CoADR 欠損株 (CoA1, CoA2) のカセット挿入位置を決定した。クラミドモナスライブラリープロジェクトの情報から CoA1 は第 13 エキソンに、CoA2 は第 3 エキソンに CIB1 カセットが挿入されていると考えられた。それぞれの株において、CIB1 カセットが挿入されていると予想される領域を増幅した時に、野生株では 1500 bp にバンドが観察されたのに対して、CoADR 欠損株では 4000 bp にバンドが観察された。また、CIB1 の配列をプライマーとして用いたとき、欠損株は CoA1、CoA2 とともに 1000 bp 付近にバンドができたのに対し、野生株ではバンドが観察されなかった。これらの結果から、二つの CoADR 欠損株は、それぞれ、CoADR1 は第 13 エキソンに、CoADR2 は第 3 エキソンにカセットが挿入されていることを確認した。RT-PCR を行った結果、野生株では CoADR の mRNA に由来するバンドが検出されたが、CoA1 では検出されず、CoA2 では微量にしか検出されなかったことから、CoA1、CoA2 とともに CIB1 カセットがゲノム上の CoADR 遺伝子に挿入されることにより、CoADR 遺伝子の発現レベルが顕著に低下した CoADR 機能欠損株であることがわかった。

次に顕微鏡観察を行ったところ、光独立栄養条件、光混合栄養条件で、CoADR 欠損株は、0 日目は野生株と同程度の大きさであったが、培養 4、5 日目には野生株に比べて、細胞サイズが増加していた。さらに、培養した細胞にでんぷん染色をおこない観察したところ、CoADR 欠損株は両培養条件において野生株に比べてでんぷんを過剰に蓄積していることがわかった。これらの結果から、CoADR 欠損株では、デンプンが過剰に蓄積することにより細胞の肥大化が起こっていることが示唆された。

さらに、CoADR の欠損が増殖にどう影響するのかを調べるために増殖曲線を作成した。それらの詳細な結果と考察は発表会にて報告予定である。今後、CoADR 欠損株の更なる表現型の探索や、過剰なデンプンの蓄積を引き起こす原因を探ることで、CoADR の生理学的役割の解明を目指す。