

高濃度鉄存在下における単細胞性紅藻 *Galdieria sulphuraria* の細胞表層の構造変化

山口 幸大（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】

単細胞性紅藻 *Galdieria sulphuraria* が属するイデユコゴメ綱 (Cyanidiophyceae) は、紅藻の進化の初期に分岐したと考えられているグループであり、世界各地の高温強酸性の環境に生息する。そのような環境中には高濃度の金属が溶出しやすく、*G. sulphuraria* は様々な金属に対して他の多くの生物よりも高い耐性をもつが、金属耐性のメカニズムについてはほとんど分かっていない。

当研究室の先行研究から、高濃度鉄存在下において細胞の凝集が起こるとともに、 α -Man 及び α -Glc を認識するレクチンである ConA-FITC により染色される構造が *G. sulphuraria* の細胞表層に生じることが観察された。RNA-seq 解析からは細胞表層のタンパク質修飾に関わる N-グリコシル化経路などの遺伝子群の発現上昇が確認された。N-グリコシル化はアスパラギンの窒素原子に糖鎖を転移することで、細胞表層のタンパク質の正しい立体構造の形成と機能発現に関与している。

これらの結果から、高濃度の鉄への耐性には細胞表層の構造変化が重要な役割を果たしていると考えられた。そのため、本研究では、高濃度鉄存在下において生じる細胞表層の構造変化が、*G. sulphuraria* の鉄耐性に与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った。

細胞表層の糖鎖修飾は動物細胞において細胞間相互作用などに関係していることが知られているが、植物や藻類では糖鎖修飾の役割に関する知見は限られている。本研究結果は、植物や藻類における糖鎖修飾の新たな生物学的機能の一端を明らかにすることも期待される。

【材料・方法】

培養：

G. sulphuraria は 2×Allen's 培地 (pH 2.5) で 40°C、暗所で振盪培養した。

顕微鏡観察：

0 mM または 3 mM の FeSO₄ を含む培地を作製し、細胞を 24 時間培養した。ConA-FITC により細胞を染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【結果・考察】

1. N-グリコシル化経路の遺伝子破壊株の作製

1-1. 1 倍体の単離

G. sulphuraria の細胞を 2×Allen's 培地 (pH 0.5) に加え、96 well plate に分注して数日間静置培養した。顕微鏡下で細胞をピペットで吸い取り、新しい培地へ単離した。単離した細胞を培養したところ、生活環の一部において 2 倍体とは形態的に異なるオタマジャクシ様の細胞を生じた。先行研究 (Hirooka et al. 2022) において報告されていた形態との類似性から、*G. sulphuraria* の 1 倍体であると考えられた。

1-2. 遺伝子破壊コンストラクトの作製

RNA-seq 解析で発現が上昇していた N-グリコシル化経路の遺伝子のうち OST2 (Gasu_19630)、STT3 (Gasu_35460)、MOGS (Gasu_23130)、MGAT3 (Gasu_38070) をコードする遺伝子を欠損させるためのコンストラクトを作製した。*G. sulphuraria* のゲノム DNA を鋳型として用いて、標的遺伝子とその上流と下流の約 1000 塩基対を含む 3000 塩基対程度の領域を PCR により増幅した。標的遺伝子の全部または大部分を欠損するように、ブラストサイジン耐性遺伝子 (BSD) カセットと置き換えた。

1-3. PEG 法による形質転換

標的遺伝子の上流及び下流と相同な配列の間に BSD カセットを含む領域を PCR により増幅し、PEG 法による 1 倍体の形質転換を行った。これまでに数回ブラストサイジン添加培地によるスクリーニングを行ったが、相同組換えにより標的遺伝子が欠損した遺伝子破壊株は得られていない。引き続き形質転換を行い、遺伝子破壊株のスクリーニングを試みている。遺伝子破壊株を単離でき次第、高濃度鉄存在下における表現型の解析を行う予定である。

2. 細胞表層構造の酵素処理

高濃度鉄存在下において細胞表層に形成される構造が高濃度鉄耐性に及ぼす影響を調べるために *endo*-1,4- β -Mannanase 処理を行った。その結果、Mannanase で細胞を処理した際に、3 mM 鉄添加 24 時間後における細胞表層の ConA-FITC の蛍光強度の減少が観察された。このことから、鉄添加 24 時間後に細胞表層に形成される構造にはマンノースからなる糖鎖が含まれており、Mannanase によって分解されたため ConA-FITC の蛍光強度の減少が見られたと考えられた。

今後、Mannanase 処理により ConA-FITC で染色される細胞表層の構造を除いたときの、細胞内への鉄の流入や活性酸素種の発生について調べる予定である。また、*G. sulphuraria* のもつ糖鎖の構造についても詳細な解析を行う。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、1 倍体を単離して頂いた平川泰久先生 (筑波大学)、BSD カセットの提供ならびに形質転換操作をご教授頂いた宮城島進也先生 (国立遺伝学研究所)、山下翔大先生 (国立遺伝学研究所) に深くお礼を申し上げます。

【参考文献】

1. S. Hirooka et al. 2022. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119(41), e2210665119