

博士論文要旨

論文題目

Studies on duplication of *rbcS* and localization of a septin homolog

in the unicellular green alga *Nannochloris bacillaris*

単細胞緑藻 *Nannochloris bacillaris*における *rbcS* の遺伝子重複と

セプチンホモログの局在に関する研究

山崎 誠和

序論

緑色藻類の多様性は、シアノバクテリアとの細胞内共生により葉緑体を獲得した後の植物の進化を写像している。細胞内共生後、葉緑体にコードされていた遺伝子の多くは、細胞核ゲノムに遺伝子移行したと考えられている。核に移行した遺伝子には真核生物型のプロモーターや葉緑体移行シグナルが加わるだけでなく、イントロンの挿入や遺伝子重複も起こったと予測される。*ftsZ* は、細菌の細胞質分裂に関与するだけでなく、近年葉緑体の分裂にも関与していることが明らかになった。*rbcS* は、光合成の暗反応で炭酸固定に関わる RuBisCO の小サブユニットをコードする遺伝子で、紅色藻類や灰色藻類では葉緑体、緑色藻類と陸上植物では核にコードされている。*ftsZ* は葉緑体獲得直後、*rbcS* は緑色藻類が紅色藻類から分岐後、遺伝子移行したと考えられる。

植物は葉緑体獲得後に細胞質分裂の機構を劇的に変化させた。トレボウクシア藻綱と緑藻綱の細胞質分裂では陸上植物とは異なり細胞膜が環状収縮する。分裂溝にはファイコプラストと呼ばれる微小管からなる構造体が出現するが、細胞膜の環状収縮にファイコプラストが関与しているかどうかはわかっていない。菌類や動物の環状収縮にはアクトミオシン収縮環が関与している。出芽酵母では、セプチンは細胞質分裂位置で二重のリングを形成し、分裂位置の細胞膜を周辺領域から区画化する障壁と考えられている。セプチンにより区画化された領域でアクトミオシン収縮環が収縮する。セプチンは、菌類や動物に広く分布しているが、陸上植物では失われてしまっている。

緑色藻類における葉緑体から核への遺伝子移行と細胞質分裂機構の進化の理解を目指し、単細

胞の緑色藻類であるトレボウクシア藻綱ナノクロリス (*Nannochloris bacillaris*) の葉緑体由来の核遺伝子 *rbcS* と細胞質分裂に関与するセプチンの解析を行なった。今後、トレボウクシア藻での遺伝子機能を解析するためには、ゲノムへの遺伝子導入や遺伝子破壊、GFP などの蛍光タンパク質を用いた *in vivo* での観察が必須になろう。緑色タバコ培養細胞を用いた一過的な形質転換による解析に加え、ナノクロリスを用いたプロモーターアッセイや細胞内局在を観察するための一過的な発現系と GFP を用いたタンパク質の動態を解析するための形質転換系の開発を試みた。

結果と考察

1. *rbcS* のエクソン-イントロン構造と遺伝子重複

ナノクロリスのゲノムライブラリーを構築し、スクリーニングした結果、3 種類の *rbcS* (*NbrbcS1-1*, *NbrbcS1-2*, *NbrbcS2*) を同定した。3 種類の *rbcS* を含む約 10~13kb の領域の塩基配列をショットガンシーケンス法で決定した。近傍には 3~4 個の ORF が存在していたが、各領域間には全く類似性が見られなかった。パルスフィールド電気泳動法で分画したナノクロリスの 14 本の染色体に対してサザン解析を行なったところ、3 種類の *rbcS* は各々異なる染色体にマッピングされた。分子系統解析の結果、*NbrbcS1-1* と *NbrbcS1-2* は *NbrbcS2* から分岐した後に遺伝子重複したと考えられる。*NbrbcS1-1* と *NbrbcS1-2* のエクソン-イントロン構造は全く同一である。*rbcS* のイントロンの挿入と欠失は系統間と種内で独立に起こっていた。

RT-PCR を用いて明条件と暗条件での発現を解析したところ、*NbrbcS1-1* は暗条件下で完全に発現が抑制されていたが、*NbrbcS1-2* と *NbrbcS2* はどちらの条件でも恒常的に発現していた。陸上植物と緑藻類では *rbcS* の発現は光に応答するので、光応答性のプロモーターは初期段階で獲得されていたと考えられる。クラミドモナスでも 2 種類ある *rbcS* の一方は、光応答性を示さない。遺伝子重複が起こると容易に光応答性のプロモーターが活性を失うと考えられる。

2. ナノクロリスにおけるセプチンの局在

1) NbSep はセプチンホモログである

ナノクロリスのゲノム上にあるセプチンと相同性のある ORF の転写産物を RACE 法で決定した。転写産物には 523 アミノ酸残基からなるタンパク質がコードされており、NbSep と名付けた。NbSep には約 300 アミノ酸残基からなるセプチンコアドメインが存在していた。NbSep のセプチンコアドメインの C 末側と N 末側は他の生物種のセプチンと相同性はなかった。NbSep と出芽酵母の CDC10、ショウジョウバエの Punt、ヒトの Sept2 のセプチンコアドメインを比較したところ、各々と 40% 以上の類似性があった。全てのセプチンで保存されているセプチンコアドメインを用いて分子系統解析を行なった。その結果、NbSep は分裂酵母の Spn5 に最も近縁で菌類型のセプチンに分類された。

2) NbSep は GTP の添加により集合する

セプチンはセプチンコアドメインを介して重合することが知られている。NbSep のセプチンコアドメインを含む C 末側 400 アミノ酸残基に HS タグを付加したリコンビナントタンパク質 HS-NbSep を作製した。GTP と HS-NbSep をインキュベート後、反応物を酢酸ウランでネガティブ染色し、電子顕微鏡観察した。低倍率での観察の結果、約 1 μ m から 4 μ m の巨大な繊維状の構造体が観察された。構造体を高倍率で観察したところ約 40nm の球状の構造体が数珠状に連なってい

るのが観察された。

3) NbSep は分裂する細胞の中央にリング状に局在する

NbSep の *in vivo* における局在を観察するために抗体を作製した。作製した抗体を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。対数増殖期の細胞を染色した結果、NbSep のシグナルが細胞の中央でリング状に観察された。次に、細胞周期を通して NbSep の挙動を観察した。ナノクロリスの細胞は、分裂直後半楕円形で（ステージ I）、長軸方向に成長していく（ステージ IIa）。細胞が分裂期に達する前後で細胞核が細胞端から細胞の中央に移動し（ステージ IIb, ステージ III）、細胞核の分裂後（ステージ IVa）、隔壁が形成される（ステージ IVb）。NbSep のシグナルは、ステージ I では細胞端に観察され、ステージ II から III で消失、ステージ IV で隔壁形成前に細胞の中央に局在し、隔壁形成後は片側の娘細胞に保持されていた。

4) NbSep は時期特異的に細胞質分裂位置に局在する

DNA 合成阻害剤ヒドロキシウレア（HU）を用いて細胞分裂期前後の NbSep の発現と局在を観察した。HU で処理すると、発現はやや抑制され、NbSep は細胞端に局在していた。HU 除去後 2 時間では発現が増大したが、シグナルの局在化は観察されず、HU 解除後 4 時間の分裂期の細胞では細胞中央に局在した。セプチンは、菌類や動物ではアクトミオシン収縮環と協調的に細胞質分裂に機能する。ナノクロリスにおける F-アクチンの動態をファロイジン染色法により観察した。ステージ I から II では、F-アクチンは細胞の成長に伴い長軸方向に伸長し、ステージ III で 2 つに分岐し、細胞の中央で陥入した。ステージ IV では F-アクチンは分裂面を挟む平行な 2 本のバンドを形成した。対数増殖期の細胞をサイトカラシン B で処理すると増殖阻害が起こり、時間の経過とともに F-アクチンが短小化した。NbSep は、F-アクチンの伸長阻害の影響を受けず分裂位置に局在した。ゴルジ小胞の輸送の阻害剤である Brefeldin（BFA）で処理すると細胞成長と細胞分裂が阻害された。BFA 処理しても F-アクチンは細胞の分裂面に 2 本のバンドを形成しており、隔壁の形成も見られた。BFA 処理した場合、ステージ III の細胞では NbSep は局在化せず、ステージ IV の細胞では細胞核の分裂位置に局在していた。NbSep は DNA 合成期に発現が増大し、細胞核分裂後、時期特異的に自立的に細胞分裂位置に局在すると考えられる。

3. ナノクロリスを用いた形質転換系の開発

1) 緑色タバコ培養細胞を用いた GFP 融合タンパク質の一過的発現

ナノクロリスで同定した 2 つの FtsZ ホモログ NbFtsZ1 と NbFtsZ2, 3 つの RbcS ホモログ NbRbcS1-1, NbRbcS1-2, NbRbcS2 は N 末側に付加配列を持っていた。NbFtsZ1 と NbFtsZ2 の付加配列は各々 90 と 80 アミノ酸残基であり、葉緑体移行シグナルと予測されたが、相互に相同性がなかった。NbFtsZ1 と NbFtsZ2 の付加配列と GFP 融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、緑色タバコ培養細胞に一過的に形質導入すると、2 つの GFP 融合タンパク質が葉緑体に移行することが確認できた。NbRbcS1-1, NbRbcS1-2, NbRbcS2 の N 末側の付加配列は各々 41, 41, 39 アミノ酸残基だった。NbRbcS1-1 の付加配列は NbRbcS1-2 と 98% の相同性であったが、NbRbcS2 とは 42% しかなかった。これら 3 つの付加配列と GFP を融合したタンパク質を緑色タバコ培養細胞に一過的に形質導入し、局在を確かめた。その結果、全ての配列を付加した GFP が葉緑体に移行することが確認できた。

2) ナノクロリスへの遺伝子導入と一過的な遺伝子発現

緑色タバコ細胞で用いたコンストラクトの CaMV35S プロモーター（以下 35S）を *NbrbcS2* の上流約 600bp（以下 RBCS2pro）に置換した（pRS2）。さらに、RBCS2pro の下流に *gfp* と *NbSep* を融合した遺伝子を含むコンストラクト（pRS2-GSep）を作製した。プロトプラスト化した細胞にエレクトロポレーション法（EP 法）での遺伝子導入を試みた。一過的な遺伝子導入を試みた結果、pRS2-GFP で GFP の蛍光が観察できた。

結論

1. 単細胞緑藻ナノクロリスの *rbcS* は遺伝子重複が起こっている。遺伝子重複とエクソン-イントロン構造は対応しているが、光に対する遺伝子発現の応答性は *rbcS* の分岐とは独立に起こっている。
2. ナノクロリスには、菌類と動物で細胞質分裂に関与し、陸上植物で失われたセプチンが保存されている。ナノクロリスのセプチン NbSep は、細胞分裂期特異的に自立的に細胞分裂位置にリング状に局在する。
3. ナノクロリスの細胞分裂位置には、菌類や動物細胞で観察されるアクチンリングではなく、分裂位置で陥入する 2 本のアクチンバンドが形成される。
4. ナノクロリスを用いた形質転換系の開発を行なった。ナノクロリスの細胞への遺伝子の一過的な導入が可能である。

発表論文

- 1) Yamazaki T, Yamamoto M, Sakamoto W, Kawano S. Isolation and molecular characterization of *rbcS* in the unicellular green alga *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* in press
- 2) Koide T, Yamazaki T, Yamamoto M, Fujishita M, Nomura H, Moriyama Y, Sumiya N, Matsunaga S, Sakamoto W, Kawano S. Molecular divergence and characterization of two chloroplast division genes, FtsZ1 and FtsZ2, in the unicellular green alga *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta) *J. Phycol.* 40 (3): 546-556 (2004)