

クロララクニオン藻のルビスコリンカータンパク質の進化

高田 あかり（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）

【背景と目的】

地球上の二酸化炭素は光合成生物のもつルビスコ酵素により有機炭素へと固定化されている。しかし、この酵素は基質との親和性が低いため、効率が悪いことが知られている。二酸化炭素固定は陸上と水中の両方で行われているが、とりわけ海洋の二酸化炭素濃度は低く、溶存無機炭素の多くは重炭酸イオンの状態で存在している。こうした水中環境で効率的に二酸化炭素を固定するため、多くの藻類はルビスコ酵素を一か所に集約した構造体である「ピレノイド」を形成している。藻類は水中から吸収した重炭酸イオンを細胞内のピレノイド近傍で二酸化炭素に変換する機能を備えており、この機能は「二酸化炭素濃縮機構」と呼ばれている。これにより、ルビスコ酵素に基質である二酸化炭素を効率的に供給している。藻類の二酸化炭素濃縮機構の研究は、モデル緑藻クラミドモナスやモデル珪藻フェオダクチュラムで進められている。これらの先行研究から、ピレノイドがルビスコ酵素の液-液相分離（水と油のような関係）により形成されていることが明らかになっている。この現象はルビスコ酵素に結合する「ルビスコリンカータンパク質」により引き起こされていることが知られている。既知のルビスコリンカータンパク質には、立体構造をとらない天然変性領域やアミノ酸の繰り返し配列が共通して見られるが、一次配列の保存性は低く、遺伝的に無関係な分子であると考えられている。そのため、ピレノイドの形成機構は藻類系統群ごとに独立して進化した可能性が示唆されている。

わたしはピレノイドの収斂進化を理解するために、海洋の単細胞性藻類であるクロララクニオン藻を対象に、ピレノイドの形成に関わるルビスコリンカータンパク質の解明を目指して研究を進めた。クロララクニオン藻は緑藻を細胞内共生することで二次葉緑体を獲得した二次共生藻類であり、本藻のピレノイドは葉緑体からコブ様に突出している形状をとる。所属研究室の先行研究で、本藻の一種 *Amorphochlora amoebiformis* から単離したピレノイドを用いたプロテオーム解析が行われた。その結果、複数のピレノイドに局在するタンパク質が同定され、その中には、天然変性領域とアミノ酸の繰り返し配列をもつ機能未知のタンパク質も含まれていた。しかし、このタンパク質がルビスコリンカータンパク質として機能するかは不明である。そのため、*A. amoebiformis* のルビスコリンカータンパク質の解明に向けた第一歩として、ルビスコリンカー候補タンパク質がピレノイドに局在するために必要なアミノ酸配列を明らかにすることにした。

【材料と方法】

ルビスコリンカー候補タンパク質を断片化したものに、Green Fluorescent Protein (GFP) を融合させたタンパク質を藻類細胞内で発現させ、その蛍光局在を観察することで、ピレノイドに局在するために必要なアミノ酸領域を明らかにした。核コードのルビスコリンカー候補タンパク質は、全長が2209アミノ酸で、N末端から、葉緑体への輸送シグナル配列、立体構造領域、C末端に立体構造領域をもつことが予測されている（図1）。今回、C末端側からアミノ酸配列を段階的に欠失させた断片遺伝子に *gfp* 遺伝子を

融合した配列を発現用ベクターに組み込み、13種類のプラスミドを作製した。エレクトロポレーション法により *A. amoebiformis* 細胞に作製したプラスミドを遺伝子導入して、GFPを一過的に発現させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてGFPの細胞内局在を観察した。

【結果と考察】

予想と異なり、繰り返し配列を含む天然変性領域を全て欠失させてもピレノイドへの局在は阻害されなかった。つまり、C末端側から段階的にアミノ酸を欠失させていき、全長の9割近くを欠失させても、ルビスコリンカー候補タンパク質はピレノイドに局在できた（図2）。一方、N末端の葉緑体への輸送シグナル配列のみをGFPに融合した場合、葉緑体ストロマ全体に局在した。このことから、ルビスコリンカー候補タンパク質のピレノイド局在に関わる配列は、葉緑体への輸送シグナル配列に加えてN末端側の立体構造領域を含む約300アミノ酸の中に存在していることが示され、この領域がルビスコ酵素と結合する可能性が考えられた。興味深いことに、この領域には複数の短い繰り返し配列が存在しており、この一部にモデル緑藻クラミドモナスのルビスコリンカータンパク質との配列保存性が見られた。今回わたしが発見した一次配列の保存性が、二次共生により緑藻から引き継がれたものであるのか、独立に類似した配列を獲得した結果であるのかはわからないが、系統的に離れた藻類群間でも共通するピレノイド形成機構がはたらいっている可能性を示唆している。

【今後の展望】

今回、*A. amoebiformis* がもつルビスコリンカー候補タンパク質のピレノイド局在に関する領域を特定することができた。今後は、ルビスコリンカー候補タンパク質の機能を明らかにするため、ルビスコ酵素の結合領域をアミノ酸レベルで特定し、組換えタンパク質を用いた *in vitro* でのピレノイド構築実験を進めていく。

N-SP Order Disorder Order-C

図1 *A. amoebiformis* のルビスコリンカー候補タンパク質。葉緑体への輸送シグナル配列 (SP)、立体構造領域 (Order)、天然変性領域 (Disorder) を模式的に表す。



図2 GFP融合タンパク質を発現する *A. amoebiformis* の細胞。左から、微分干渉画像、ピレノイドに局在するGFP、葉緑体の自家蛍光。スケールバーは5μm