

## 海産紅藻スサビノリのアルカリ性ホスファターゼの cDNA クローニングと発現

三輪泰彦\*, 吉水正則, 飯島晋次郎, 山岸幸正, 中田篤男

海産紅藻スサビノリ葉状体から至適 pH を 7.5-8.0 に示すホスファターゼを見いだした。アルカリ性ホスファターゼはグリセロリン酸の欠乏によって誘導合成され、イオン強度に依存する。アルカリ性ホスファターゼをリン酸飢餓条件下で培養した葉状体から均一なタンパク質まで精製した。ホスファターゼは 76 kDa のサブユニットの 2 量体からなる。3'-RACE 法とオリゴキャップ法で単離したホスファターゼの cDNA クローン(2293 bp) は 687 アミノ酸残基からなる ORF をコードしている。成熟型は 658 アミノ酸残基(分子量 70,570)の長さである。ノーザン解析からグリセロリン酸飢餓状態で培養した葉状体にアルカリ性ホスファターゼ遺伝子の 2,600 base の転写産物が発現されることが明らかになった。

キーワード: クローニング, ホスファターゼ, *Porphyra yezoensis*

アマノリ属(*Porphyra*)は紅色植物門、紅藻綱に属する海産の多細胞性の藻類である。アマノリ属はアサクサノリ、スサビノリなど産業的に重要ないくつかの種を含む。スサビノリの生活環は、巨視的な葉状の配偶体と微視的な糸状の孢子体の2つの異なる形態の世代が交互に交代する。近年、スサビノリは以下に示すような利点から海洋植物のモデル生物として注目されてきた。1) 培養が容易で培養面積が少なくよい。2) 材料を大量かつ迅速に調製できる。3) 生活環の完結が短期間である(2-3ヶ月)。4) 染色体数が少ない(3本)。また、純系株の確立<sup>1)</sup>、遺伝地図、形質転換、EST 解析<sup>2)</sup>などに関する技術の研究開発が進められている。さらに魅力ある研究テーマとして形態形成と微生物共生があげられる。スサビノリの葉状の配偶体は無菌培養下では著しく成長力が減衰し、小型のカルス状の細胞塊となる。このことは成長や形態形成を誘導する要因が培地中に欠如していることを示唆する。嵯峨らの研究グループによってスサビノリに特異的に共生する微生物が判明しており、植物と微生物の相互関係を解析する系としても興味深い。

リンは生物にとって最も基本的な元素の一つである。リンは窒素とともに植物の主要な生育制限要素となっている。海水から吸収できるリン酸濃度は数  $\mu\text{M}$  と極めて低いため海洋植物は常にリン酸欠乏状態にある。筆者らは海洋植物がこのような低リン酸環境に対してどのように応答し、適応しているかという点に興味をもち、スサビノリを用いて環境適応機構の分子レベルでの解明を目指した。現在まで、栄養環境の適応機構は海洋植物ではリン酸に限らずほとん

〒729-0292 福山市学園町1番地三蔵 福山大学生命工学部海洋生物工学科.

\*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2459, E-mail: [yumiwa@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp](mailto:yumiwa@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp)

ど明らかにされていない。細菌では大腸菌の二成分制御系がリン酸環境の認識に関与していることが知られている。海産のラン藻では、リン酸飢餓条件下で発現誘導される大腸菌のリン酸結合タンパク質遺伝子と相同性を示す遺伝子が単離されている<sup>3)</sup>。さらに、酵母<sup>4)</sup>、アカパンカビ<sup>5)</sup>、シロイヌナズナ<sup>6)</sup>ではリン酸の吸収に関わる遺伝子が単離され、機能の解析が進められている。

植物細胞では一般にオルトリン酸イオン( $\text{PO}_4^{3-}$ )しか細胞内に取り込むことができないため、有機リン酸化合物はそのままでは利用することができない。そこで分泌されたホスファターゼによって有機リン酸化合物から無機リン酸を遊離することでリン酸供給量を増大させることができる。このことは植物だけでなく、酵母<sup>8)</sup>、アカパンカビ<sup>9)</sup>、大腸菌<sup>10)</sup>、ラン藻<sup>11)</sup>においてもリン酸の欠乏によってホスファターゼが誘導合成されることが明らかにされている。

本論ではリン酸飢餓状態で誘導合成される紅藻ササビノリ由来のホスファターゼを同定した。さらにアルカリ性ホスファターゼの cDNA のクローニングとその遺伝子の発現解析について述べる。

### 実験方法

**培養条件** 純系株である *Porphyra yezoensis* TU-1<sup>1)</sup>株を実験株として使用した。*Porphyra yezoensis* TU-1 株の葉状体から放出された単胞子をクレモナ糸に付着させ、これらの単胞子から発芽した幼体を人工海水 (SEA LIFE, マリンテック社製) に  $\text{ESS}_2$  培地を添加した人工栄養強化海水培地で  $15^\circ\text{C}$ 、照度  $36 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 、短日条件 (10 時間 : 14 時間) で葉体の長さが約 3 cm になるまで培養した。グリセロリン酸 ( $92 \mu\text{M}$ ) を含む (+Pi) 合成培地  $\text{ASS}_2$  とグリセロリン酸を含まない (-Pi) 合成培地  $\text{ASS}_2$  に 2 房の葉状体をそれぞれ移し、 $15^\circ\text{C}$ 、照度  $36 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 、短日条件下 (10 時間 : 14 時間) で 1、4、7、10 日間培養した。

**粗抽出液の調製** +Pi 合成培地と -Pi 合成培地で 10 日間培養した葉状体 (1 g) に 4 倍量の可溶性緩衝液 (2% CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.31 M 2-mercaptoethanol, 8 mM PMSF) を加え、乳鉢で細胞を破碎した。破碎した懸濁液を遠心分離 ( $18,800 \times g$ , 30 分間,  $4^\circ\text{C}$ ) し、上清液を粗酵素液とし、 $-85^\circ\text{C}$  で保存した。

**酵素活性の測定** ホスファターゼ活性の測定には *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) を基質として用いた。4.5 mM pNPP, 0.9 M Tris-HCl, pH 8, 酵素溶液を含む反応液 1 ml をセルに入れ、 $37^\circ\text{C}$ 、10 分間反応を行い、経時的に 410 nm の吸光度を測定した。至適 pH の影響は反応液 1 ml 中に 4 mM pNPP, 0.8 M 緩衝液 (pH 5.0-10.0), 粗酵素液を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、60 分間反応を行った。1.5 M NaOH を 1 ml 添加し、反応を停止した後、410 nm の吸光度を測定した。NaCl によるイオン強度の影響は反応液 1 ml 中に 4 mM pNPP, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, NaCl (0-2.0 M), 粗酵素液を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、60 分間反応を行った。反応停止後、410 nm の吸光度を測定した。

**アルカリ性ホスファターゼの精製** グリセロリン酸を含まない合成培地  $\text{ASS}_2$  で 10 日間培養した葉状体 (0.3 g) に 4 倍量の 2% CTAB 可溶性緩衝液 (2% CTAB, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.31 M 2-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF) を加え、乳鉢で細胞を破碎した。破碎した懸濁液を遠心分離 ( $18,800 \times g$ , 30 分間,  $4^\circ\text{C}$ ) し、上清液を粗酵素液とし、 $-85^\circ\text{C}$  で保存した。粗抽出液を硫酸アンモニウム分画 (30%-50%飽和、遠心分離、 $18,800 \times g$ , 30 分間,  $4^\circ\text{C}$ ) した。50%飽和上清画分を溶出緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 0.3 M NaCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ) で平衡化した TOYOPEARL HW-55F ゲル濾過カラム ( $\phi 1.5 \text{ cm} \times 92 \text{ cm}$ ) のゲル表面にのせ、流速 12 ml/h で分画した。酵素活性を含む画分を限

## ホスファターゼの cDNA クローニング

外濾過 (MW:50,000) によって遠心濃縮した溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.3 M NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>) を精製標品とした。各精製段階のタンパク質の量および純度検定は 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) で解析した。

**RNA 抽出** +Pi 合成培地と -Pi 合成培地で 10 日間培養した葉状体 (1 g) から全 RNA を Apt<sup>13)</sup> の方法にしたがって調製した。全 RNA 調製液から Oligotex-dT30 を用いたバッチ法で polyA<sup>+</sup> RNA を精製した。

**PCR による cDNA の単離** -Pi と +Pi の合成培地で培養した葉状体から抽出した全 RNA を First strand cDNA 合成の鋳型とした。精製ホスファターゼの N 末端の 8 アミノ酸残基に基づいて合成した 23 mer の degenerate プライマーを用いて 3'-RACE 法を行った。増幅された DNA 断片 (2,100 bp) を TA クローニングし、5 つの独立したプラスミドクローンのヌクレオチド配列を決定した。続いてオリゴキャップ法<sup>12)</sup> によって cDNA の 5' 末端のクローニングを行った。

**ノーザンブロット法** 全 RNA (1.2 μg) を 1% のアガロースゲル電気泳動し、メンブレン (GeneScreen Plus, Perkin Elmer) にブロットし、42°C, 18 時間プレハイブリダイズ (0.02% formamide, 5 X SSC, 50 mM Na-phosphate, pH 6.7, 1% SDS, 2% Blocking reagent) した後、α-<sup>32</sup>P-dCTP で標識した 1,985 bp の DNA プロブ (塩基番号 +237 ~ +2221) を用いて 42°C, 18 時間ハイブリダイズ (0.02% formamide, 5 X SSC, 50 mM Na-phosphate, pH 6.7, 1% SDS) した。メンブレンを 10 X SSC, 0.1% SDS で室温、3 回洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。

## 結果および考察

### リン酸飢餓状態で誘導合成される葉状体のアルカリ性ホスファターゼ

スサビノリの生育培地にリン源としてグリセロリン酸のみを添加することからホスファターゼの作用でグリセロリン酸が無機リン酸に分解されることが予想される。そこで葉状体にリン酸の飢餓に応答して誘導合成されるホスファターゼが存在するかどうか調べた。人工栄養強化海水培地で成長した葉状体をグリセロリン酸のない合成培地 (-Pi) とグリセロリン酸を含む (92 μM) 合成培地 (+Pi) にそれぞれ移し、10 日間培養した。各葉状体から界面活性剤 CHAPS を含む緩衝液中で細胞を破碎し、得られた粗抽出液のホスファターゼの活性を発色基質の pNPP を用いて pH 5-10 の緩衝液中 (0.8 M) で測定した。その結果、-Pi の培地で培養した葉状体の粗抽出液中にのみ pH 7.5 付近に至適 pH をもつアルカリ性ホスファターゼ活性が検出され、+Pi の培地で培養した葉状体の粗抽出液中にほとんど検出されなかった (Fig. 1)。データに示さないが、イオン強度 50 mM の緩衝液を用いた場合、-Pi の培地で培養した葉状体の粗抽出液のホスファターゼ活性を検出できなかった。そこでホスファターゼ活性の NaCl のイオン強度の影響について調べた。1 M 以上の NaCl 存在下でホスファターゼ活性がプラトーに達し、0 M の NaCl の酵素活性と比較すると約 10 倍増加した (Fig. 2)。このことからホスファターゼ活性は NaCl のイオン強度に依存することが明らかになった。次にホスファターゼがリン酸の飢餓に応答して誘導合成されるかを調べた。-Pi と +Pi の合成培地でそれぞれ 1、4、7、10 日間培養した。各葉状体素抽出液を調製し、pH 7.5 でホスファターゼ活性を測定した結果、-Pi の条件でホスファ

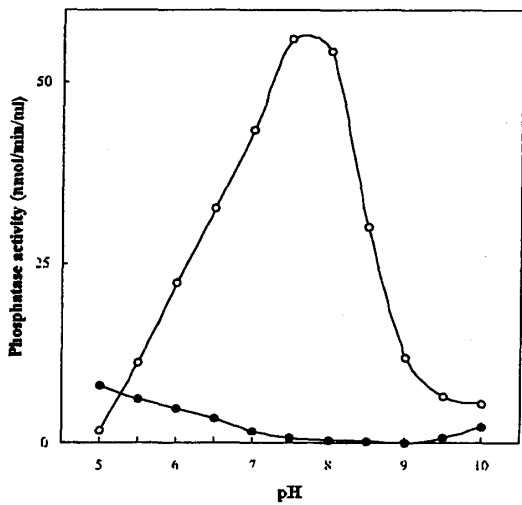


Fig. 1. Effect of pH on phosphatase activity in phosphate-starved thalli. Aliquots (10  $\mu$ l) of a crude extract from thalli grown for 10 days in a synthetic medium containing 92  $\mu$ M (●, closed circle) or no (○, open circle) glycerophosphate were assayed for phosphatase activity in *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate and the indicated pH range (5-10) of 0.8 M buffer solutions at 37°C.

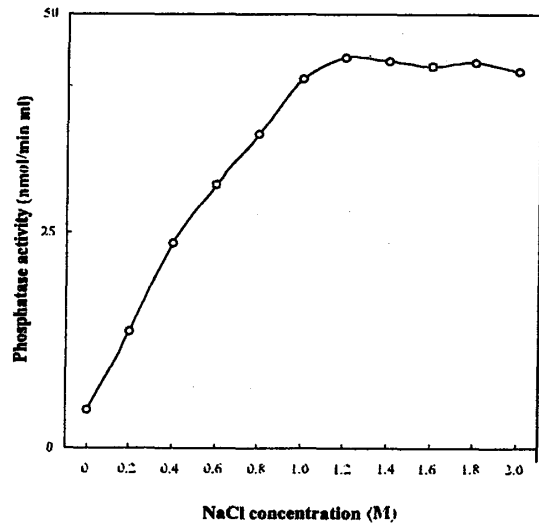


Fig. 2. Effect of ion strength on alkaline phosphatase activity in phosphate-starved thalli. Aliquots (5  $\mu$ l) of a crude extract from thalli grown for 10 days in a synthetic medium without (○, open circle) phosphate were assayed for phosphatase activity in *p*-nitrophenyl phosphate, 100 mM Tris-Cl, pH 7.5, and the indicated concentration (M) of NaCl at 37°C.

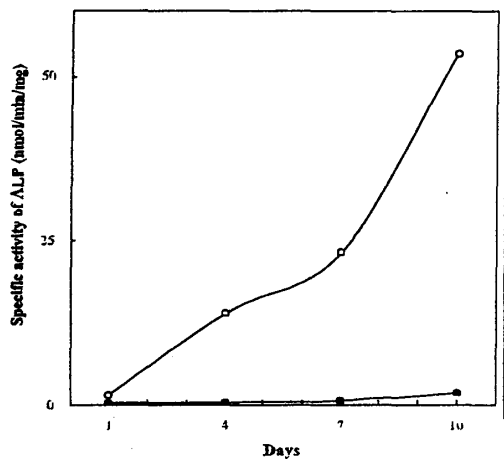


Fig. 3. Phosphate-starvation-induced accumulation of alkaline phosphatase activity in thalli. Aliquots (25  $\mu$ l) of a crude extract from thalli cultured for 1, 4, 7, and 10 days in a synthetic medium containing 92  $\mu$ M (●, closed circle) or no (○, open circle) glycerophosphate were assayed spectrophotometrically for phosphatase activity in 4.5 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 900 mM Tris-HCl, pH 7.5 at 37°C for 10 min. The amounts of protein in cell crude extracts were determined with bovine serum albumin as a standard.

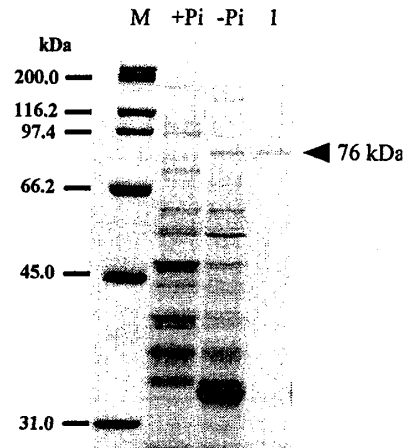


Fig. 4. The alkaline phosphatase purified from phosphate-starved thalli in *Porphyra yezoensis*. Crude extracts solubilized by CTAB buffer from thalli cultured for 14 days in a synthetic medium containing 92  $\mu$ M (+Pi) or no (-Pi) glycerophosphate were applied on 10% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue. The purified alkaline phosphatase (0.6  $\mu$ g) was loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel (lane 1). Lane M contained standard proteins as molecular mass markers.

ターゼ活性は経時的に蓄積され、10日間培養した葉状体のホスファターゼの比活性は、+Piに比べて約25倍に達した (Fig. 3)。以上の結果からリン酸の飢餓に応答して誘導合成されるアルカリ性ホスファターゼの存在が明らかになった。

#### アルカリ性ホスファターゼの精製

リン酸飢餓状態で誘導合成されるホスファターゼの精製を行った。グリセリン酸を含まない合成培地で約3 cmの葉状体を10日間培養した。葉状体に含まれるホスファターゼ以外のタンパク質があまり可溶化されないように2% CTABを含む緩衝液で破碎して得た懸濁液を遠心分離し、粗抽出液とした。粗抽出液を硫酸アンモニウム(30%-50%飽和)で分画した結果、大部分の色素タンパク質は硫酸アンモニウム沈殿画分に存在し、50%飽和上清画分に大部分のホ

## ホスファターゼの cDNA クローニング

スファターゼ活性が回収された。50%飽和上清画分をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (TOYOPEARL HW-55F) で分離・精製を行った。ホスファターゼ活性を含む画分を限外濾過法によって遠心濃縮した。精製したホスファターゼ標品を SDS-PAGE で解析した結果、ホスファターゼをほぼ均一なタンパク質まで精製することができ、ホスファターゼは分子量 76 kDa のポリペプチドであることが明らかになった (Fig. 4)。ゲル濾過法によって精製ホスファターゼの分子量を推定すると 160 kDa という値が得られ、SDS-PAGE で推定した分子量と比較するとホスファターゼは二量体を形成していることが明らかになった。

### アルカリ性ホスファターゼをコードする cDNA クローン単離

グリセリン酸を含まない合成培地で 10 日間培養した葉状体から単離した全 RNA を 3'-RACE アダプタープライマーを用いて first strand cDNA を合成するための鋳型として用いた。精製したアルカリ性ホスファターゼの N 末端の最初の 9 残基のアミノ酸配列は LQKPERHFG であった。2-9 番目のアミノ酸配列に基づいて 23 mer の degenerate プライマーを合成した。この degenerate プライマーと first strand cDNA を用いて 3'-RACE を行った。約 2,100 bp の PCR 断片が増幅され、精製した後、プラスミドベクターに連結した。この DNA 断片は 201 番目から 2,293 番目のヌクレオチドをカバーし、ポリ(A)配列をもつことが確認できた。また、翻訳した配列が単離したホスファターゼの 9 残基のアミノ酸配列と完全に一致したことから アルカリ性ホスファターゼをコードする cDNA クローンの一部を単離することができた。翻訳開始コドンおよびシグナル配列は検出するためにオリゴキャップ法を用いて cDNA の 5'末端を決定した。3'-RACE 法とオリゴキャップ法でそれぞれ得られた cDNA 断片の塩基配列を完全に決定した結果を Fig. 6 に示す。取得した 290 bp の 5'末端の断片内には開始 ATG コドンと推定上のシグナルペプチドが含まれていた (Fig. 6)。完全長の cDNA は 2,293 bp からなり、5'末端領域に 3 箇所の ATG が存在しており、第 3 番目の ATG コドン周辺の塩基配列は Kozak<sup>13)</sup>によって提唱された翻訳開始コドンのコンセンサス配列 5'-(A/G)XXAUGG-3'と一致したことから塩基番号 107 の ATG コドンが翻訳開始コドンであると仮定した。この cDNA は塩基番号 107 番目の ATG コドンから 2,168 番目の TAA コドンで終止する 687 アミノ酸残基 (分子量 73,203) の open reading frame (ORF) をコードしていた。

シグナル予想サーバー SignalP による真核生物の分泌シグナル配列の予想からアミノ酸残基数 29 (Ala) と 30 (Leu) の間に切断部位が存在することが推定された<sup>14)</sup>。決定した N 末端のアミノ酸配列 (9 残基) から 76 kDa のアルカリ性ホスファターゼは疎水性アミノ酸から成る 29 残基のシグナル配列が切断されることがわかった。しかしながら cDNA 配列から予想される成熟型の分子量 (70,570) と精製アルカリ性ホスファターゼ (76 kDa) の分子量との間に大きな差異が認められた。このことは推定上の N-グリコシル化の部位が 4 箇所存在することからホスファターゼに糖鎖が付加していることが示唆される。データに示さないが、687 アミノ酸残基からなる ORF の疎水性プロフィールから N 末端の疎水性領域からシグナル配列の存在が、一方 C 末端の疎水性領域から細胞膜のアンカードメインの存在が示唆されたことからホスファターゼは細胞膜および細胞壁のいずれかの画分に GPI アンカーで局在するものと予想される。ポリ(A)上流の 3'非コード領域内にポリ(A)付加シグナル 5'-AATAA-3'は存在しなかった。

三輪, 吉水, 飯島, 山岸, 中田

GTGCTGCCCGTGTAGTTGTGCTAGCTGCCCCCGCTGGCAGTGTGTATCTCCATGGCTCCCCCTCCCCCGCCCCGTACACTACGCC	90
GGCCATGTCGGTACCC <u>ATG</u> GGCCTGTCTGCCCGGCCTGGTTGCCCGCCCGCTCGCCTTCGCTGTCATTGTGGCCCGCGGTTC	180
M G P V C R G L V A A A A V A F A V I V A A A V A	25
GCCAGCGTTGGCGTTGCAAAGCCGAGCGCCACTTTGGGTGCCCCCTCGGAAAGAATGTGTGCATCTACCTGTGACACGGTGGCGT	270
P A L A <u>L Q K P E R H F G C P L G K N V C I Y P V D T V A L</u>	55
GCA GTGCGAGTCGCTCTTTGACTTTCAAGTTCGAACTACACGTGTAGCCAATCAGTCTGTGGCCACACCCGTACGAAGGAGTGGCCAT	360
Q C E S L F D F Q V E L H V L A <u>N Q S</u> V A T P V T K E L A I	85
CACCTCACGCTGCCGTCTGGGAAGGCCATCACTCCCGCCAAGCTCTGGGGGGCACCCCGAGTACCGCACGTGGTCACTGCAGCGCTT	450
T L T L P S G K A I T P A K L W G G T P E Y R T W S L Q A F	115
TAAGACATGTCGGATGAGAACCAGCGGCTATGACGCTTATGACGACGCTGGCGCAACGTGTTCTGCTCGGGCGGCGAGGCAAGGG	540
K D M S D E N P T G Y D A Y A A T W R N V F V P R A A G K G	145
CTCTTTCACCGTCCGCTGTGCATGCGCGGGGGTGACCACGACGCTGGCGTACGACATCCGCGAGCCAACGCGACGCAAGCCAAAGAACGT	630
S F T V R V H A R G V T T T V A Y D I R E P T R R Q A K N V	175
GGTCTGTGATTGGGGACGGCATGAGCCTCCCGTGTAGCGCGGGGACTGGTGTCCCGGGTATGTACCAGGGAAAATACAAGGA	720
V L L I G D G M S L P L M T A A R L V S R G M Y Q G K Y K D	205
CACGCTTCATATGCAGGCTCTTGACCACGTGGCTCTCATGTGACGAGTGGCATTGACTCGATCATACCGACTCTGCCAATAGCGCCAG	810
T L H M Q A L D H V A L M S T S G I D S I I T D S A N S A S	235
TACTTTTATGACCGCCACAAGTCATCGGTCACTGCGCTGGGGTCTACGCCGACAGCGGGGACGATGTTTTGCCACCCGAAGCAGGA	900
T F M T G H K S S V S A L G V Y A D S G D D V F A H P K Q E	265
GCTGATCACAGATATGTTAAGAACGGATGGGCATGAGCCTCGCGCTCGTACGACTGCCGAGTGCAGATGCCACCCCGCGTCTGC	990
L I T E Y V K K R M G M S V G V V T T A E V Q D A T P A S A	295
GTGGCGCATGTCGGCAGCGGGGAGAAAGCGGCCATCACAGCGAGGCCATCAACGGGTGCCCTCAACTGCGTGAAGCGCGTGGTGCC	1080
W A H V R Q R A E K A A I T A Q A I N G C L N C V K A V V P	325
GGACGTGCTGATGGGTGGCGGGCATGTTCTTCTCCCAACAACCTCGGTGATGGCAGCAATATGTACGAAAATACACTACCAAGGG	1170
D V L M G G G G M F F L P <u>N N S</u> V D G S N M Y E <u>N Y T</u> T K G	355
CTACACGTTGACGCACACCAAGGACAGATGATAGCGCGGCCAAGGACCCGCAACCAAGAGATTGCTCA CCATCACACACGCGGCAAA	1260
Y T V T H T K D Q M I A A A K D P A T K R L L T I T H A A N	385
CATGGAGTTTGGCTGGACCGTAATAGGTACAAGGACAACATGGACGTTCCGGAGAACGCCATTGGCGGGTGGCGTTGGCCAAACGGA	1350
M E V W L D R N R Y K D N M D V P E N D P L G G G V A P T E	415
GCAGCCCACTGGACGAGATGACGATGGCTGCCATTGACGCTGTCTCGAATGACGAGGGCTTCTTCTTACTGGTGGAGGCGGCAAG	1440
Q P N L D E M T M A A I D V L S R N D E G F F L L V E A A S	445
CATTGACAAGAGCGCCACCCCTGGATATACCGGAGCGCTTAGCGACCTGTGGAGCTTGATAACACTGTGGCCAAGGTGATCGCGTG	1530
I D K S A H P L D I P R A L S D L L E L D N T V A K V I A W	475
GGCCACGGCCACGGCGACAACACGCTGGTGTGGCGAGGCTGACCACGCCACGGTTTTGACGTGTTGGCACCGTCGACACCCATCT	1620
A T A H G D N T L V M A T A D H A H G F D V F G T V D T H L	505
GTGGGGCAGCGGTGGCCGCTCCCGTCCAAGCCGTGCGGACAGGACAACACTGTGCGCGGTGACAGACAACGAGGCGAGGGA	1710
W G D A V A A S P S K P V R D Q D N Y C A A V T D N E G R E	535
GTTCCGCTCTCTTTGGCGCGGCAACACGAGCGCCCGGGCGGCAATGTGGCGCGCGGGCGGATTGGCACCTATGCTAAGCGGG	1800
F P S S F A A G <u>N T S</u> A R A A N V A R R G A I G T Y A K A G	565
TTACCCGACTATGCCGACTCCGACGGCGACGGCTTCCCGACAGTGGGAGTGGCAGGCTCGCATCGGGATGAACAACCTTTC	1890
Y P D Y A D S D G D G F P D T W D V R T T L A S G M N N F P	595
CGACCACACCACGACTACACCGTGTGAGGTCGCTCAAGTGCCCGCCACCGCGTTGACGAGTGTGTTGCAATACGGACGACGACGA	1980
D H T T S Y T V S R S L K V P A T A V D E V F V N T D D D D	625
CCCCAACGGGCTCTCCAGTCTGTAATCTGCCGCGTCCGGCTCCACAGCGTTCACACGCTGCAGGATG TGGCGTCTTCGCGTGGG	2070
P N G L F Q S G N L P P S G S T G V H T L Q D V G V F A S G	655
GCCGGCTCGGAGCGGTGCGGGCATTCGACAACACGCGGTGTACCACATTATGGCGAGTCCCTGGGCTTGGGATGGACGGGGA	2160
P G S E R V R G I L D N T A V Y H I M A S A L G L G M D G E	685
GGATCGC <u>AAA</u> TGAGGACGACAACGGGAGTGGGAAGGGGGGAGGGCGCGCTTGTGTGGGGCCGCTGGGAGCTCGCGGAGGTT	2250
D R	687
GTCCTCCGTGACTTTAACTCGGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2293

Fig. 5. Nucleotide and deduced amino acid sequences from a cDNA encoding the alkaline phosphatase from *Porphyra yezoensis*. The potential signal peptide cleavage site is shown by an arrow. The amino acid of alkaline phosphatase obtained by automated Edman degradation are double-underlined. The potential initiation codon and stop codons for translation are boxed. The double-overlined bases indicate the putative ribosome-binding sequence. The underlines indicate the potential *N*-glycosylation sites. The Ser residue at aa position 230 that is indicated by asterisk is considered to be the enzymatic active site for phosphate transfer.

## ホスファターゼの cDNA クローニング

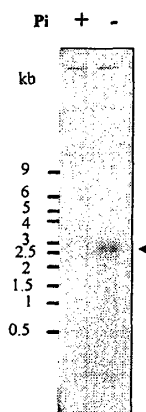


Fig. 7. Northern blot analysis of the expression of the alkaline phosphatase gene. Total RNA (1.2  $\mu$ g) from thalli grown with a synthetic medium containing 92  $\mu$ M(+) or no(-) glycerophosphate for 10 days was hybridized with P-labeled DNA probe (nucleotides position 237-2221) from cDNA. The blot was exposed to X-ray film in the presence of intensifying screen for 3 days. RNA size standards are indicated on the left.

Table 1. Phosphate-starvation induction ratio of the ALP expression.

	+Pi	-Pi
ALP relative ratio	1	23.1
Actin relative ratio	1	0.80
ALP / Actin	1	28.8

FASTA の検索の結果、687 アミノ酸残基からなる推定アミノ酸配列は *Neurospora crassa* (36%), *Scizophyllum commune* (35%), *Bos Taurus* (31%), *Escherichia coli* (34%) のアルカリ性ホスファターゼとそれぞれ有意な相同性を示した。特に酵素の活性中心が同定されている大腸菌のアルカリ性ホスファターゼのアミノ酸配列<sup>15)</sup>との比較解析からスサビノリのアルカリ性ホスファターゼの活性中心は 230 番目のセリン残基であると推定される (Fig. 6)。

### アルカリ性ホスファターゼ遺伝子の転写発現解析

グリセリン酸を含む合成培地 (+Pi) とグリセリン酸を含まない合成培地 (-Pi) で 10 日間培養した葉状体から調製した全 RNA を DNA プロブ (塩基番号+237~+2221) とハイブリダイゼーションを行った結果、-Pi の条件下でのみ 1 本の約 2,600 base の mRNA を検出した (Fig. 7)。この mRNA の大きさは単離し、塩基配列を決定した cDNA クローン全体をカバーしている。cDNA と mRNA の大きさの違いはおそらく約 300 base の polyA が付加しているためと考えられる。また、Real time PCR 法を用いて解析した結果、リン酸欠乏によってアルカリ性ホスファターゼ遺伝子の転写産物が約 28.8 倍、誘導合成されることが明らかとなった (Table 1)。

発現解析からスサビノリのアルカリ性ホスファターゼ遺伝子の転写産物がリン酸の欠乏に応答して誘導されることが明らかとなった。これはスサビノリのアルカリ性ホスファターゼ遺伝子が転写レベルで制御されていることを示す。大腸菌<sup>16)</sup>や *Neurospora crassa*<sup>17)</sup> では正の制御因子が関与して、アルカリ性ホスファターゼ遺伝子の発現調節を転写レベルで行っていることが明らかになっている。一方、ゲルシフト法による *In vitro* の解析からシロイヌナズナやトマトのリン酸トランスポーター遺伝子は負の制御を受けていることが示唆されている<sup>18)</sup>。今後、紅藻スサビノリのアルカリ性ホスファターゼ遺伝子がどのようなしくみで発現調節されるのか興味もたれるが、プロモーターの構造と機能を解析するシステムを早急に構築することが課題である。

今回、我々が発見したスサビノリ由来のリン酸飢餓で誘導合成されるアルカリ性ホスファターゼは遺伝子工学のツ-

ルとして非常に有用である。紅藻を宿主としたベクター系が開発されればアルカリ性ホスファターゼ遺伝子は酵素学のおよび免疫学的に検出可能なレポーター遺伝子として利用することができる。将来、筆者らの遺伝子解析の情報や技術から大型海藻類の基礎研究と応用研究への道が拓けることを期待したい。

#### 文 献

- 1) Kuwano, K., Aruga, Y. and Saga, N.: Cryopreservation of clonal gametophytic thalli of *Porphyra* (Rhodophyta). *Plant Sci.*, **116**, 117-124(1996).
- 2) Nikaido, I., Asamizu, E., Nakajima, M., Nakamura, Y., Saga, N., and Tabata, S.: Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red algae, *Porphyra yezoensis*. *DNA Res.*, **7**, 223-227(2000).
- 3) Scanlan, D. J., Mann, N. H., and Carr, N. G.: The response of the picoplanktonic marine cyanobacterium *Synechococcus* species WH7803 to phosphate starvation involves a protein homologous to the periplasmic phosphate-binding protein of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **10**, 181-191(1993).
- 4) Persson, B. L., Berhe, A., Fristedt, U., Martinez P., Pattison, J., and Weinander, R.: Phosphate permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1365**, 23-30(1998).
- 5) Mann, B. J., Bowman, B.J., Grotelluechen, J., and Metzenberg, R. L.: Nucleotide sequence of *pho-4<sup>+</sup>*, encoding a phosphate-repressible phosphate permease of *Neurospora crassa*. *Gene*, **83**, 281-289(1989).
- 6) Muchuual, U. S., Pardo, J. M., and Raghothama, K. G.: Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10519-10523(1996).
- 7) Onishi, H. R., Tkacz, J. S., and Lampen, J. O.: Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. Formation of active enzyme in the presence of tunicamycin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11943-11952 (1979).
- 8) Nyc, J. F., Kadner, R. J., and Crocken, B. J.: A repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Cem.* **241**, 1468-1472 (1966).
- 9) Torrani, A., Ludtke, D. N.: The Pho regulon of *Escherichia coli*. In : The Molecular Biology of the Bacterial Growth, Shaechter, M., Neidhardt, F. C., Ingraham, J., Kjeldgaard, N. O. (eds), pp. 224-242, Jones and Bartlett, Boston, (1985).
- 10) Ray, J. M., Bhaya, D., Block, B. A., and Grossman. A. R.: Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J. Bacteriol.*, **173**, 4297-4309 (1991).
- 11) Apt, K. E., Clendennen, S. K., Powers, D. A., and Grossman, A. R.: The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol. Gen. Genet.*, **246**, 455-464(1995).
- 12) Maruyama K. and Sugano S.: Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eucaryotic mRNAs with oligonucleotides. *Gene*, **138**, 171-174(1994).
- 13) Kozak, M.: An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. *J. Cell Biol.*, **115**, 887-903(1991).
- 14) Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and Heijine, G.: Identification of prokaryotic and eucaryotic signal peptides and production of their cleavage sites. *Protein eng.* **10**, 1-6(1997).
- 15) Bradshaw, R. A., Cancedda, F., Ericsson, L. H., Neumann, P. A., Piccoli, S.P., Schlesinger, M.J., Shriefer, K. and



- walsh, K. A.: Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline phosphatase.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3473-3477(1981).
- 16) Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M. and Nakata, A.: Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. In Torriani, A , Yagil, E., and Silver, S.(ed.), pp5-12, *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washinton, D.C. (1994).
- 17) Kang, S. and Mettzenberg, R. L.: Molecular analysis of *nuc1+*, a gene controlling phosphorous acquisition in *Neurospora crassa* . *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 5839-5848(1990).

.....

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (3), 39-48 (2004)

**Cloning and expression of alkaline phosphatase  
in the red algae *Porphyra yezoensis***

Yausuhiko Miwa, Masanori Yoshimizu, Shinjiro Iijima, Yukimasa Yamagishi  
and Atsuo Nakata

Department of Marine Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology  
Fukuyama University,  
Fukuyama, Hiroshima 729-0290, Japan

We have found phosphatase giving a pH optimum between 7.5 and 8.0 in the red algae *Porphyra yezoensis* thalli. The alkaline phosphatase is synthesized in response to glycerophosphate starvation and is ion strength-dependent. The phosphatase has been purified to homogeneity from glycerophosphate-starved thalli. The phosphatase is comprised of two subunits, each having an apparent molecular mass of 76 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A cDNA clone of the alkaline phosphatase has been isolated by a combination of 3' rapid amplification of cDNA ends and oligo-capping method from thalli grown under glycerophosphate-deficient conditions. The cDNA contained a 2,293 bp open reading frame encoding 29 residues for signal peptide and 658 residues for the mature form of phosphatase. Northern blot analysis revealed that a single 2,600 base transcript is expressed only in total RNA from glycerophosphate-starved thalli.

**Key words:** cloning, phosphatase, *Porphyra yezoensis*