

緑藻クラミドモナス*Chlamydomonas reinhardtii*のサイクリック GMP依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKG) の特徴

Feature for cyclic GMP dependent protein kinase (PKG)
from Green Alga, *Chlamydomonas reinhardtii*

南 森 隆 司^{1,2,3,*}、川 端 愛³、柏 尾 尚 宏³、櫻 井 厚 司³、
松 岡 大 介^{2,3,4}、久 保 雄 昭⁵、松 田 吉 弘⁵

1. 大手前大学健康栄養学部、2. 神戸大学遺伝子実験センター、3. 神戸大学農学研究科、
4. 甲子園大学栄養学部、5. 神戸大学理学研究科

Summary

Chlamydomonas belonging to a unicellular green alga seems to be one of the origin cells toward Plants. In this study, using *Chlamydomonas* as a material, we investigated signaling molecules such as A-kinase (PKA), G-kinase (PKG), and C-kinase (PKC) that are widely present in animal cells but not recognized in higher plants. A cDNA fragment (designated as PK1) was amplified from *Chlamydomonas* by RT-PCR using a set of oligonucleotide primers, corresponding to the conserved amino acid sequences of animal-type AGC kinases. A *Chlamydomonas* cDNA library was screened with the PCR-amplified fragment as a probe, we identified a partial sequence of PKA-like protein kinase gene (designated as partial CPK1). Furthermore, two open-reading frames of the protein kinase genes were obtained by the database analysis of *Chlamydomonas* EST libraries. Nucleotide sequence of each protein kinase has 100% or 66% similarities with the partial CPK1, respectively. These two protein kinase genes designated *CPK1* and *CPK2*, encode both regulatory domains of PKG in their N terminal region and catalytic domains of PKG in their C terminus. *CPK1* gene was expressed in vegetative cells of *Chlamydomonas*, whereas, *CPK2* gene was expressed in gamete cells. FLAG-tagged *CPK1* expressed in *E.coli* were harvested by immunoprecipitation using anti-

FLAG antibody. The immunoprecipitates reacted with three kinds of protein kinase substrates under cAMP or cGMP. As a result, *CPK1* phosphorylates most strongly the PKG specific substrate (BPDE tide) under the presence of cGMP. These results suggest that *CPK1* is a typical PKG and functions in vegetative cells of *Chlamydomonas*. Here we demonstrate animal type PKG in *Chlamydomonas*, a possible origin of Plants.

keywords: *Chlamydomonas*, PKG, cGMP,
G-kinase, Molecular Evolution,

要約:

*Chlamydomonas*は植物の起源といわれる単細胞緑藻であるが、鞭毛をもち動物的要素もとどめている。この研究では、*Chlamydomonas*を材料にして、動物細胞に広く存在するが高等植物には認められていない情報伝達分子のA-キナーゼ (PKA)、G-キナーゼ (PKG)、C-キナーゼ (PKC) などAGC系プロテインキナーゼの検索を行った。プロテインキナーゼドメインに広く保存されているサブドメインのアミノ酸配列に対するミックスマプライマーを作成し、RT-PCRによりえられたキナーゼドメインの断片 (PK1) をプローブとし、cDNAライブラリーからCPK1断片を得た。さらにこのCPK1断片配列と100% (CPK1)、66% (CPK2) 一致するESTクローンの挿入部位の全塩基配列を決定した。その結果、両キナーゼ遺伝子は、それぞれのN末端側にPKGの調節領域を、

学術論文 (査読済み)

投稿 2022年12月30日 改訂 2023年1月20日 受理 2023年2月1日

連絡先: 南森 隆司 nanmorit@helen.ocn.ne.jp

*corresponding author: Takashi Nanmori: nanmorit@helen.ocn.ne.jp

本実験はすべて神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の規則に準拠し承認を得て実施されたものである。

C末端側にはPKGの触媒領域(キナーゼ領域)をコードしていた。それぞれの発現解析の結果、CPK1は、栄養体細胞で発現し、CPK2は、配偶体での発現が確認された。さらに、FLAGタグを付加したCPK1タンパク質を回収し、活性を調べたところ、プロテインキナーゼCPK1は、PKGの一般的な基質ペプチド(BPDEtide)に対して、cGMP存在下でフルアクティビティを示したことから、*Chlamydomonas*の栄養細胞で発現しているcGMP依存性タンパク質キナーゼ(PKG)である。植物細胞の起源と考えられているこの緑藻には、高等植物や真菌類(Fungi)には存在しない動物型のPKGが機能していることが判明した。

キーワード: *Chlamydomonas*, PKG, cGMP, G-kinase, Molecular Evolution,

緒論

すべての生物は取り巻く環境変化を受容し、細胞内に伝達し、変化に应答し恒常性を保ち生命を維持する機能(細胞内情報伝達)を有している。この機能にかかわる種々の分子の中でも、タンパク質リン酸化酵素(PK、プロテインキナーゼ)が、一般的に重要な役割を演じる。しかし、生物の各々の分類群間でPKの分子種は、共通性を示すものと特異性を示すものが知られている。原核生物の細菌では主としてヒスチジンキナーゼが機能している¹⁾。真核生物の動植物、原生生物などには共通して、Mitogen Activated Protein kinase (MAPK) カスケードが機能している²⁾。また、動物細胞では重要な機能を発揮するA-キナーゼ(PKA)、G-キナーゼ(PKG)、C-キナーゼ(PKC)などのAGC系プロテインキナーゼは、植物などの光合成生物では報告されていなかった。

一方、原生生物のタマホコリカビ(*Dictyostelium discoideum*)や、真菌に属する酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)などではPKAが報告されている^{3,4)}。

著者らは、光合成単細胞生物であるユーグレナ(*Euglena gracilis* z)にAGC系プロテインキナーゼのPKAが存在することを光合成生物では最初に示した⁵⁾。一方で、高等植物でもPKAやPKC遺伝子の検索を行ったが当該遺伝子は認められなかった。また、その後のシロイヌナズナのゲノム解析結果においても当該遺伝子ホモログは認められていない。そこで、我々は、高等植物の始原と考えられている光合成単細胞緑藻クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)に注目し、動物型と考えられるAGC系のタンパク質リン酸化酵素の存在を検索した⁶⁾。その結果、PKA様のタンパク質リン酸化酵素遺伝子の存在を認めた^{6,7)}。一般的にPKAの調節

領域は異なるサブユニットで構成されるが、*Chlamydomonas*にあつては、著者らの発見当時、一個の遺伝子のN末端側に調節領域が存在し、C末端側のキナーゼドメインと融合した形で存在する特徴的なPKAと考えていた^{6,7)}。引き続き上述のPKA様キナーゼの構造とリン酸化機能の再検討を行い、当該プロテインキナーゼ(CPK1)がPKGである可能性を示した⁸⁾。その後、Snellらも、クラミドモナス配偶子の鞭毛で発現するPKG様のタンパク質リン酸化酵素遺伝子の存在を報告し、それがチロシンリン酸化を受け、配偶子接合の過程で機能することを示唆した⁹⁾。ここでは、当該プロテインキナーゼ(CPK1)がクラミドモナスの配偶子ではなく、主として栄養細胞で発現し、そのFLAGタグ発現タンパクは、cGMPの共存下でプロテインキナーゼとしてのフルアクティビティを発揮することを示す。よって、CPK1は、典型的な動物型のPKGに相当することを考えられる。*Chlamydomonas*は単細胞緑藻で、その細胞が集合したものが緑藻*Volvox*(オオヒゲマワリ)となり、これが多細胞緑藻の始原となり、陸上植物に進化していったものと考えられている。この報告で、光合成単細胞緑藻*Chlamydomonas*の段階においては少なくとも動物型のPKGが存在し、機能を発揮していたことを示すものである。

材料と方法

実験材料、CPK1とCPK2遺伝子のクローニングと塩基配列決定

本実験材料として*Chlamydomonas reinhardtii* C239(+)株を用いた。本株をあらかじめTAP培地で、3000ルクスの照射下、25°C、4日間の前培養液を1Lの培地に接種し、48時間同様に培養した対数増殖期にある細胞からPharmacia社製のRNA抽出キットを用いて全RNAを抽出した。回収したRNAに対する1st strand cDNAの合成は、宝酒造社のRNA PCR kit (AMV) Ver.2のマニュアルによりおこなった。合成cDNA鋳型に対するPCR反応は、キアゲン社のHotStart Taq™ PCR Kitを使用した。Forward Primerは、5'-GG (TCAG)GG (TCAG)GA (TC) (TC) T (TCAG)ATG-3' (PKCのサブドメインVのアミノ酸配列GGDLMに相当)を、Down Primerは、3'-TG (AGTC)AA (AG)AC (AG)CC (AGTC)TG (AGTC)GG-5' (PKCのサブドメインVIIIのアミノ酸配列TFCGTPに相当)を用いてPCR増幅した断片(317bp)の塩基配列を決定した。その結果、シヨウジョウバエ、線虫、タマホコリカビなどのPKAとの相同性が高かった。この断片を³²Pで標識し、*Chlamydomonas* cDNAライブラリーに対

してプライクハイブリダイゼーションを行った^{6,8)}。その結果、陽性ローンを1種類（CPK1）得て、配列決定を行った、このCPK1は、明らかにプロテインキナーゼをコードしているものであったが、5'-末端が欠損しており、開始コドンが読み取れなかった⁸⁾。そこで、*Chlamydomonas* (*Chlamydomonas reinhardtii* C9-株)のEST (expression sequence tag)情報検索を行った。その結果、CPK1と100%一致する未知のクローン（CL10g0_2r）と66%位置するクローン（CL05h_02）が存在した。そこで、それぞれのクローンを得て、それぞれ全塩基配列をLI-COR社Model 4000DNA Sequencerにより決定し、CPK1、CPK2とした。シークエンス反応は、Epicenter Technology社のSequiTherm™ Cycle-Sequence Kit-LCを用いた。

遺伝子転写産物の検出と発現タンパク質のリン酸化活性の測定

窒素源を含む培地で培養した*Chlamydomonas* 栄養細胞、窒素源を除いた培地で形成される配偶子、+株と-株の凝集・融合細胞から、それぞれRNAを抽出し、ラベルしたCPK1及びCPK2遺伝子を鋳型にし、ノーザンプロットにより対応するmRNAの発現解析を実施した⁸⁾。また、細胞の増殖時期をそろえるため光照射期と暗黒期を循環させる同調培養を行い、それぞれ静止期及び増殖期にある細胞からRNAを抽出し、同様にノーザンプロットにより発現解析を行った。

次に、発現ベクターであるFLAG-MACベクターにCPK1遺伝子のオープンリーディングフレームを導入した組換え大腸菌を培養し、超音波処理でその大腸菌を破壊後、FLAG抗体を加え反応させた。生じた免疫複合体をProtein A Sepharose 4Bに吸収させFLAG融合タンパク質を回収した⁸⁾。得られた免疫沈降融合タンパク質のタンパク質リン酸化活性は、酵素反応液中の、 γ -³²P ATPから基質タンパク質への放射活性の移行を測定した。酵素反応液をホスホセルロース紙にスポットし、洗浄液で5回洗浄後、イオン交換水の入ったバイアル瓶に入れ、液体シンチレーションカウンターでチェレンコフ検出により放射活性を測定した⁸⁾。基質として、一般的なプロテインキナーゼの基質であるMBP、PKAの特異的基質ペプチドであるKemptide、さらにPKGの特異的基質ペプチドのBPDEtideを用いた。また、活性へのcAMP、cGMP、PKI（PKA インヒビター）添加効果を測定した。

CPK1、CPK2の分子系統解析

種々のPKAとPKGの触媒領域並びに調節領域のアミノ酸配列のアラインメントを作成し、近隣接合法（Neighbor-

Joining Method）により分子系統解析を実施した。

結果と考察

図1はCPK1及びCPK2のアミノ酸配列を比較したものである。二つの配列間での相同性は60%であった。CPK1のN末端サイトには、129E、158R、及び251E、260Rのアミノ酸が並ぶ2か所のcGMP結合配列が認められた。なお、CPK2の相当する部位にも同一のアミノ酸の存在が認められる。一方、両タンパク質のC末端サイトはタンパク質リン酸化酵素ドメインの配列が存在する。なお、当該プロテインキナーゼ断片をRT-PCRで増幅した際に用いたフォワード断片とダウン断片は矢印で示している。

図2はCPK1及びCPK2の触媒ドメインの配列のNJ法による分子系統解析を示している。この結果より、クラミドモナスのCPK1及びCPK2は、ショウジョウバエなどのPKGの触媒ドメインの配列のクラスターの近隣に位置することが示された。

図3にCPK1及びCPK2の調節ドメインの配列のNJ法による分子系統解析の結果を示す。CPK1とCPK2は同一のクラスターに属し、触媒ドメイン同様ショウジョウバエなどのPKGの調節領域の配列に最も近隣にあることが分かる。そこで、これらの解析から、当該プロテインキナーゼはPKGにもっとも近縁であることが示唆された。

次に、CPK1をFLAG tag 発現ベクターで発現させ生成されたFLAGtagCPK1タンパク質の免疫沈降物の、cAMPやcGMP存在下での、タンパク質リン酸化活性を測定した。基質として、三種類の基質を用いた。結果を図4に示す。ここで、MBPは一般的なタンパク質リン酸化酵素の基質で、KemptideはPKAの特異的基質、BPDEtideはPKG特異的基質である。この図より、CPK1はcGMP存在下で、BPDEtideに対してもっとも強いリン酸化活性を示している。これらの結果より、当該プロテインキナーゼは、当初想定していた特徴的なPKAではなく^{6,7)}、むしろ一般的なPKGに属するプロテインキナーゼであることが判明した。一方、Snellらによって報告されたCrPKGについて⁹⁾、ここで示したようなcGMP存在下での特異的基質のリン酸化は示されていないが、CPK2同様、PKG分子種に属するものと考えられる。

続いて図5に、*Chlamydomonas*の栄養体、配偶体、接合体の各々の細胞でのCPK1及びCPK2のmRNAの発現状況を示す。Vは栄養体、Gは配偶体、Zは接合体の細胞を表す。CPK1遺伝子はVの栄養体細胞で、2.9kbの

[61.2% / 708 aa]

```

CPK2 1'      MGADNSKYADGEGGQVAYIAQRTQVGRAKAITANKVLGGATKLDIKLPPKASR
          *****
CPK1 1''     MGNTQQKGDGAMTGRAKAITGGAVKGGKAT-LP-KLPTNAVK

54' ADATDYEFIKSSLVNLFFFRLDRITANRIVAEMYALPVQAGEILIQQGDSDAATKLFV
          *****
40'' SQPEDYAFIENALGRLLFFGKLDLSQVQRKIVSEMYERTVPAGDILIKEGDTGLAACELYV

114' VRSGKFEVLERRKDVMFKVNTKERGDVFGEISLMYDCPRSATVAATTDASVWVLERDVFR
          *****
100'' VKSGKFEVLRQKRQGNVVRVNIKERGDCFGEISLMYDSPRTATVAATMDAVVWALDRQVFR
          129 138
174' HFVQASVEDEKGGIQLFLNSVPLSSLRPDEKMLLVDAFQEEAFVAGARVIMEGDVGDKF
          *****
160'' FFFVRELQETQVSQVELFLNSVPILANLSREERIRLVDAFEENTYQAGQKVIVEGDKGDLF

234' YIIKEGEA---QVTF-GRQKVNKLFERSDFEGEQALLQDEPRXATVRALTPLVCLTLNRRT
          *****
220'' YIVKEGEAIVYQNTFGGQRKVNHLFKADFFSERALLKDEPRMATVEAYTKLVCLTLKRET
          251 260

290' FVAVLGLPLQD IMARRRAREVVNORMAKLKPQGSAAHRRPVAEVI IKYDAAR----RSIV
          *****
280'' FQEILGPLEQLMAREKSNQVVAQMAKLPQRGSHVHRPPAEVLIKRKNGRNGNTIEVVR

345' CDGHLDEVVELRRGGQK---MAELRDAE-RKLVLVEGELLGEGAFSRVCKVTEETTGRV
          *****
340'' ARGHLDEVLELRKGGTKLEGMDFGASGKEANTLVLTGCTVLGGGAFSRVSIIVTEESTGRT

402' FALKRMKSAALQCEPVFCEQHITRNIAHPECLRQYASFQDKANLYMLFDLMPGGDLMD
          *****
400'' FALKRMKSAVVCPEHVFCQAITKNVAHPFCIRQYASFQDKYHLYFLFDLMPGGDLMD

462' VLVAEAKVIKYPVADKNSLRKGCLAPKMKMWOGMEEPMSKIFYIASIVLALAYLHDNSIAF
          *****
460'' VLVAEAKVIKRRVPQ-GTWRIGCCLAPKVKMLQMSDILARFYIGSIVLALAYLHNNIVY

522' RDLKPNVLIDGQGYVKLGDDFGFAKQVDLGGRTYTFCGTPGYVAPENVMGRGYNHSVDWW
          *****
519'' RDLKPNVFIDASGYVKLGDDFGFAKVLENGRNTYTFCGTPGYVAPENVLAHGYNYSVDWW

582' TLGVLMYVLLTARQPFTSPKTQDPMEVMRRIVDDRWPIKYPPYMSDEARDLISHLLEKPK
          *****
579'' GLGVLMYVLLTGRQPFTSTKTDDPMVVMRRIVDENYQIKYPPYLSPAAKDLISRLLEKPK

642' VKRIGMLQKARDIKMHPWAGFDWXRLAARRMDPPRKPKEADSAKRKTELAERTAREPR
          *****
639'' AKRMGMLNARMDIKNHKWENLAWEELEARRMAAPRKPKEADSAKRVKEMIENEKKTAG

702' ELQTISPQEAAEWDRVFKDF
          *****
699'' KTPKETPEELQCEMVFADF
    
```

図1 Chlamydomonas CPK1及びCPK2のアミノ酸配列の比較

黄色(I及びII) 調節領域(CPK1の129Eから138R及び251Eから260Rの配列)
 ピンク色(III) プロテインキナーゼ領域

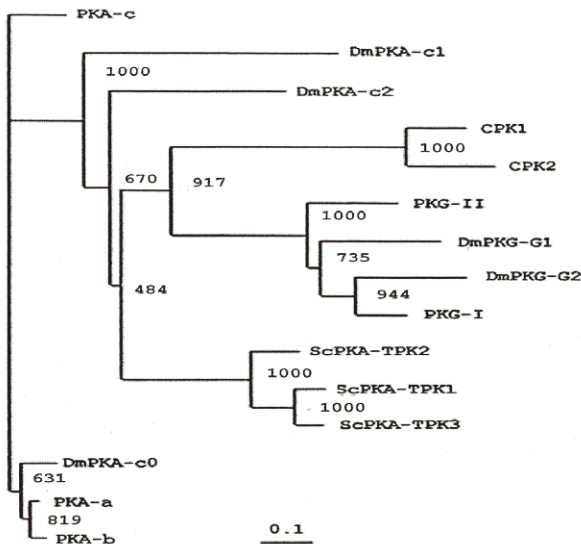


図2 PKA,PKGのキナーゼドメインアミノ酸配列から推定される分子系統樹(Neighbor-joiningツリー)。

0.1: 距離ユニット、分岐点での数値は1000回試行中のブートストラップ値を示す。
 DmPKG G1,G2: D.melanogaster PKG G1,G2
 PKG-I及び-II: Bovin PKG アイソフォームI及びII
 その他はPKAを示す。(The Protein Kinase Facts Book,ed. by Hanks et.al 1995 by Academic Press)

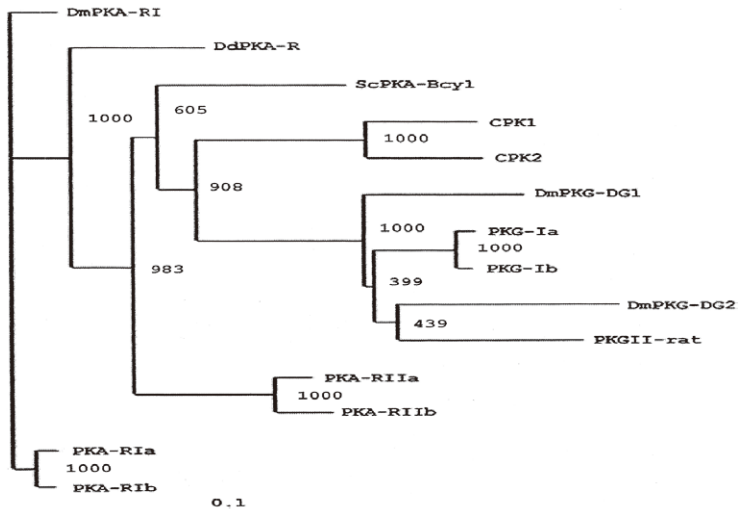


図3 PKA,PKGの調節ドメインアミノ酸配列から推定される分子系統樹(Neighbor-joiningツリー)。

0.1: 距離ユニット、分岐点での数値は1000回試行中のブートストラップ値を示す。
 DmPKG DG1,DG2: D.melanogaster PKG DG1,DG2
 PKG-Ia及び-Ib: Bovin PKG アイソフォームIa及びIb
 PKG II-rat: ラットPKGII,その他はPKAを示す。
 (The Protein Kinase Facts Book,ed.byHanks et.al 1995 by Academic Press)

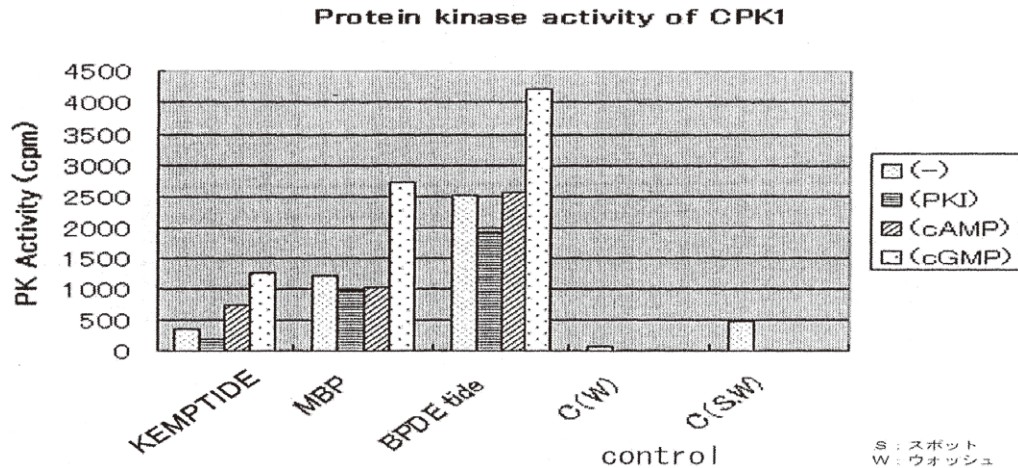


図4 PKGの活性測定

KEMPTIDE; PKAの特異的な基質ペプチド
 MBP; キナーゼの一般的な基質タンパク質
 BPDE tide: PKGの特異的な基質ペプチド
 control反応で、W(ウオッシュ)は、酵素と基質を入れず反応液セルロース紙につけ洗浄。
 S.W(スポット、ウオッシュ)反応液に酵素液のみをセルロース紙にスポットし、洗浄したもの。

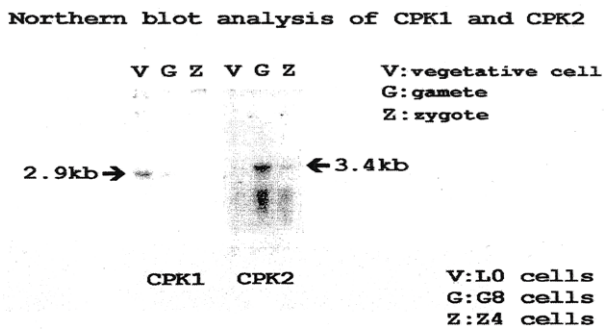


図5 ノーザンブロットによるChlamydomonasの栄養細胞(V)、配偶体(G)、融合体(Z)細胞でのCPK1及びCPK2の発現解析
 L0は、栄養体細胞の窒素欠乏培地に移す前の細胞
 G8は、配偶体形成培地(窒素欠乏培地)に移して8時間後の配偶子細胞
 Z4は、プラス、マイナス細胞の融合過程4時間後の融合細胞

位置に発現バンドが検出され、CPK2遺伝子は主にGの配偶体細胞で発現(3.4kb)していることが分かる。また、ここではデータは示さないが、CPK2は、とくに配偶体が融合を開始する初期の段階で発現がもっとも強く、その後融合が進行する過程で減少することが示唆された。そこで、CPK2は、Snellらの示す、CrPKGとはほぼ同様の発現パターンを示すと考えられる⁹⁾。

次に、Chlamydomonasの細胞分裂周期をそろえるため光周期に同調させ、細胞周期をそろえた培養細胞からmRNAを抽出し、放射性同位元素でラベルしたCPK1と

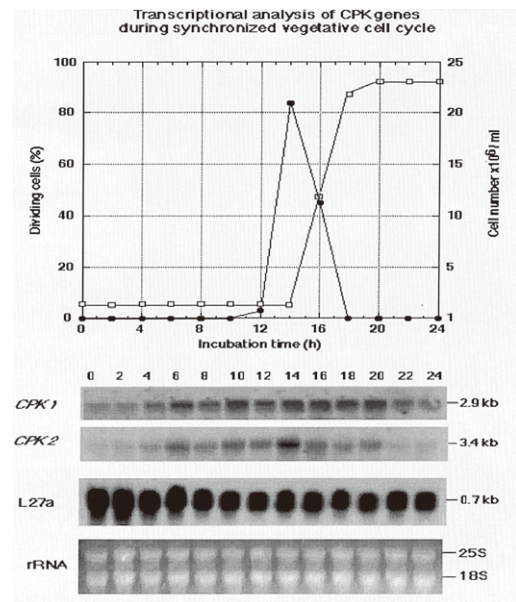


図6 細胞周期をそろえる同調培養でのCPK1遺伝子とCPK2遺伝子の発現解析
 L27a: 60S リボゾームタンパク質遺伝子(ローディングコントロール)

CPK2をプローブとしてノーザンブロットを行った。結果を図6に示す。CPK1は、分裂前後の細胞を含め比較的広範囲の細胞に発現しているのに対して、CPK2は、細胞分裂時において最もその発現が増強されていることが分かり、両PKGが、細胞周期における発現様態についても異なるパターンを示すことが分かる。

クラミドモナスのmt+とmt-の配偶子の間での接合にかかわるシグナリングイベントの要因に、チロシンキナーゼ、PKG、adenyl cyclase、cAMPの上昇などがあげられている^{9,10)}。しかし、それぞれの正確な作用順序・

機作などの詳細は今後の課題と考えられる。*Chlamydomonas*において、in vitro系でAdenylyl Cyclaseの活性は検出されているがその構造は不明である¹¹⁾。同様に、典型的なPKAの存在は知られていないが、緑藻*Chlamydomonas*にはGuanylyl Cyclaseの存在が指摘されている^{12,13)}。一方、同じ光合成鞭毛単細胞生物であるユーグレナにおいて、我々は、典型的なPKAの存在を報告している⁵⁾。同じ光合成鞭毛生物にあっても、それぞれのプロテインキナーゼの存在分布は不連続であることが理解される。

ユーグレナにあっては、青色受容体タンパクドメインとAdenylyl Cyclaseドメインの融合遺伝子が発現し、光照射に応答してAdenylyl Cyclaseが活性化しcAMPの生成がなされる¹⁴⁾。この特徴的なAdenylyl CyclaseによりcAMPが生成され、ユーグレナPKAが活性化されることが予想される。また、PKAが細胞分裂の引きがねとしての働きを担っていることが示唆されている¹⁵⁾。

興味あることに、動物にもっとも近縁であるといわれる真菌類(Fungi)はGuanylyl Cyclaseを欠いているが¹³⁾、原生動物のタマホコリカビ(Dictyostelids)にはGuanylyl Cyclaseが存在する¹³⁾。

高等植物は有しないといわれているPKGが、その起源となるといわれている緑藻*Chlamydomonas*で存在し、機能している。この単細胞生物が、原生動物(Protista)にも属しているとする見解¹⁶⁾からすれば、PKGが存在することは理解できる。植物に進化する過程で、これらのPKGやPKA遺伝子が消失または他のものに転換させたと考えられる。一方、動物細胞の始原と認められている襟鞭毛虫類や動物細胞にもっとも近縁と考えられている真菌類(Fungi)にはPKC様遺伝子が報告され^{17,18,19)}、その後の動物への進化過程でも保存されてきたと考えられる。単細胞である襟鞭毛虫類が集合し多細胞化した生物がカイメン動物とされていて、*Chlamydomonas*と*Volvox*(オオヒゲマワリ)の関係に相似するものと想定される。そこで、互いに近縁度が高いPKA、PKG、PKCなどのAGC系のプロテインキナーゼ分子からみた場合、当該遺伝子の分子進化は、保有する祖先生物の分岐点での存在様態とその後の適応進化の様相に影響されるものと考察される。一方、著者らは、*Chlamydomonas*のプロテインキナーゼの検索の過程で、植物に特異的と考えられていたCDPK(Calcium Dependent Protein Kinase、カルシウム結合タンパク質領域とタンパク質リン酸化領域の融合タンパク質)とホモロジーが高い遺伝子断片の配列を決定していた⁶⁾。その後、*Chlamydomonas*のCDPKの全構造が明らかになり、それが高等植物に特

徴的なCDPKに近縁分子であることが報告されている²⁰⁾。当該CDPK分子から見た場合は、*Chlamydomonas*が植物の始原細胞であることと矛盾しない。そこで、このCDPK遺伝子は、*Chlamydomonas*のPKGとは違って、その後の高等植物への進化過程で保存され続けたものと考察される。一方で、動物型のPKGやPKA遺伝子は、ここで示したように、*Chlamydomonas*や*Euglena*⁵⁾のような原生動物にまで遡れるが、動物型の受容体チロシンキナーゼの特異的なドメイン構造は、襟鞭毛虫類と動物細胞の中で特異的に分子進化を遂げたものと考えられている²¹⁾。

文 献

- 1) Parkinson J.S. Genetic Approaches for Signaling Pathway and Protein in Two-component signal transduction. Edited by J.A.Hoch and T.J.Silhavy(1995) ISBN 1-55581-089-6, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.20005
- 2) Avruch J., MAP kinase signaling cascade in Arabidopsis innate immunity. J. Biochim Biophys Acta. Aug;1773 (8), 1150-60 (2007)
- 3) Buerki, E., Anhard,C.,Scholder,J.C.,Reymond, C.D. Isolation of two genes encoding putative protein kinases regulated during Dictyostelium discoideum development. Gene. 102, 57-65 (1991)
- 4) Toda,T., Cameron,S.,Sass,P.,Zoller,M., and Wigler,M. Three different genes in S.cerevisiae encoding the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. Cell 50,277-287. (1987)
- 5) Kiriyaama,H.,Nanmori,T.,Hari,K.,Matsuoka,D.,Fukami,Y., Kikkawa,U.,Yasuda,T. Identification of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from the photosynthetic flagellate, *Euglena gracilis* Z. FEBS Letter 450, 95-100, (1999)
- 6) 川端 愛, 緑藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)における新規なプロテインキナーゼ遺伝子に関する研究 I. 修士学位論文、神戸大学大学院自然科学研究科博士前期課程 2000年 3月
- 7) Kawabata, U., Nanmori,T., Matsuda, Y., Azuma,T., Tasuda, T. Identification of a novel AGC-protein kinase(PKA-like) from *Chlamydomonas*. Plant Cell Physiol. Vol. 41, Supplement (2000)
- 8) 柏尾 尚宏, 緑藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)における新規なプロテインキナーゼ遺伝子に関する

- 研究II. 修士学位論文、神戸大学大学院自然科学研究科博士前期課程 2001年 3月
- 9) Wang,Q.,Pan,J., and Snell,W.J. Intraflagellar Transport Particles Participate Directly in Cilliu-Generated Signaling in Chlamydomonas. Cell 125,549-562, May 5, (2006)
- 10) Awasthi,M.,Ranjan,P.,Kelterborn,S.,Hegemann,P., and Snell,W.J. A cytoplasmic protein kinase in Chlamydomonas couples engagement of ciliary receptors to rapid cellular responses. bioRxiv preprint doi: <http://doi.org/10.1101/2021.09.03.458889>
- 11) Zhang,Y., and Snell,W.,J. Flagellar adhesion-dependent regulation of Chlamydomonas Adenylyl Cyclase in vitro: A possible role for protein kinase in sexual signaling.The Journal of Cell Biology,125(3),617-624, (1994)
- 12) Tian,Y.,Nagel,G., and Gao,S. An engineered membrane-bound guanylyl cyclase with light-switchable activity. BMC Biology, 19:54, <http://doi.org/10.1186/s12915-021-00978-6> (2021)
- 13) Pauline Schaap, Guanylyl cyclases across the tree of life. Front Biosci 2005 May 1;10:1485-98, doi:10.2741/1633
- 14) Iseki,M.,Matsunaga,S.,Murakami,A.,Ohno,K.,Shiga,K.,Yoshida,K., Sugai,M.,Takahashi,T.,Hori,T., Watanabe,M. Nature, 2002 Feb 28;415(6875),1047-51. Doc:10.1038/4151047a.
- 15) 木村 晴子, 光合成生物ミドリムシ (*Euglena gracilis* Z) のcAMP依存性プロテインキナーゼの機能解析 修士学位論文、神戸大学大学院自然科学研究科博士前期課程 2001年 3月
- 16) Peter H.Raven, Ray F.Evert,Susan E. Eichhorn Biology of Planys sixth edition, Chapter 16(Protista I and Chapter17(Protista II), 1999 W. H.Freeman and Company
- 17) Nicole King et.al. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. Nature, vol.451 14 February (2008), doi:10.1038/nature06617
- 18) Kruse,M., Gamulin,V.,Cetkovic,Z.,Pancer,I. M.,Muller,M.,Muller,W.E., Molecular evolution of the metazoan protein kinase C multigene family. L.Mol.Evol., Oct;43(4):378-83(1996), doi:10.1007/BF02339011
- 19) Heinisch,J.J.,and Rodicio, R., Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity. FEMS Microbiology Revies, fux051,42,22-39, (2018)
- 20) Li,Y.,Fei,X.,Dai,H.,Li,J.,Zhu,W., and Deng,X.,Genome-Wide Identification of Calcium-Dependent Protein Kinases in *Chlamydomonas reinhardtii* and Functional Analyses in Nitrogen Deficiency-Induced Oil Accumulation. Front Plant Aci.10:1147 (2019) Published online 2019 Oct 22. doi:10.3389/fpls.2019.01147
- 21) Suga,H.,Sasaki,G.,Kuma,K.,Nishiyori,H.,Hirose,N.,Su,Z.,Iwabe,N., Miyata,T., Ancient divergence of animal protein tyrosine kinase genes demonstrated by a gene family tree including choanoflagellate genes. FEBS Letters Vol. 582,Issue5 p.815-818 (2008) <http://febs.onlinelibrary.willey.com/doi/10.1016/j.fwbslet.2008.02.002>