

令和元年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18740

研究課題名(和文)海苔の有用品種作出に向けたスサビノリのエチレン応答機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the ethylene response mechanism of *Pyropia yezoensis* for production of useful varieties of nori seaweed

研究代表者

宇治 利樹(Uji, Toshiki)

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：00760597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海苔の原料であるスサビノリの有性生殖や酸化ストレス応答にエチレンではなく、その前駆物質である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)が関与していることを明らかにし、海藻において初めて、ACC依存的なシグナル伝達系の存在の可能性を示した。またその応答にはNADPHオキシダーゼ由来の活性酸素種(ROS)が関与していることも見出した。さらにACC応答性遺伝子として、小胞体輸送や細胞分裂、抗酸化に関連する遺伝子を同定し、これらの遺伝子が本種の有性生殖や抗酸化獲得に関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海藻類においては陸上植物で知られている幾つかの植物ホルモンが同定されているものの、それらの生理作用や応答機構は不明である。本研究において海苔の原料であるスサビノリの有性生殖やストレス応答においては、エチレンではなく、その前駆物質が関与していることが明らかとなったため、海藻においては陸上植物で知られているようなエチレンの作用ではなく、その前駆物質の作用が海藻の生活環やストレス応答において重要である可能性が示された。この知見は、現在不明な点が多い海藻の植物ホルモンの役割を理解する上で重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The physiological actions of plant hormones and the response mechanisms are still unknown in seaweeds. In this study, we have shown that the possibility of a role for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), ethylene precursor, as a signaling molecule independent from ethylene to regulate sexual reproduction and oxidative stress tolerance through reactive oxygen species (ROS) produced by NADPH oxidase in *Pyropia yezoensis*. We also revealed that genes involved in the regulation of vesicular-trafficking, cell division, and antioxidant were up-regulated in the gametophytes treated with ACC.

研究分野：水産植物学

キーワード：アマノリ 有性生殖 エチレン 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸上植物においては植物ホルモンの生理作用およびその応答機構が解明されつつあり、その知見が農業において利用されている。例えば、植物ホルモンの1種であるエチレンは陸上植物においては、果実の成熟、老化促進や環境ストレス耐性獲得など様々な生理作用が報告されており、特にエチレン量をモニターすることによる果実の成熟の制御は、農業において重要な技術の1つとなっている。一方、海藻類においては陸上植物で知られている幾つかの植物ホルモンが同定されているものの、それらの生理作用や応答機構は不明である。申請者は、エチレンの前駆物質である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)をスサビノリの葉状体に処理することによって、酸化ストレス耐性が付与されると共に有性生殖が促進されることを明らかにしている。またACC処理により、エチレンの生成がスサビノリ藻体内において促進されることを確かめている。しかしながら、エチレンがスサビノリ葉状体において、どのような機構により、酸化ストレス耐性や有性生殖を制御しているかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、エチレン生合成阻害剤やACC類縁体がスサビノリの有性生殖に与える影響を調べることで、本種の有性生殖におけるエチレンやACCの役割を明らかにすること、またRNA-seq解析により明らかとなったACC応答性遺伝子群の中から、環境ストレス耐性や有性生殖に関与する遺伝子を詳細な発現解析を行うことで同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エチレン合成阻害剤やACC類縁体がスサビノリの有性生殖に与える影響

葉長20mmの未成熟スサビノリ葉状体をエチレンの前駆物質であるACCとエチレン発生剤であるエテフォンをそれぞれ50、500 μ Mの濃度に調整した培地で7日間培養し、その後、通気培養にて3日間培養後、生長率、造精器の形成個体率および果孢子放出数を測定した。またACC合成酵素の阻害剤であるアミノエトキシビニルグリシン(AVG)、 α -アミノオキシ酢酸(AOA)、ACC酸化酵素の阻害剤である α -アミノイソ酪酸(AIB)をそれぞれ50、500 μ Mの濃度に調整した培地で10日間通気培養後、同様の計測を行った。さらにはACCの類縁体である1-アミノシクロブタン-1-カルボン酸(ACBC)と、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸(ACPC)に関しても同様の計測を行い、DPPHラジカル消去法による抗酸化活性の測定も行った。なおACCはシクロプロパンの1つの炭素がカルボキシル基とアミノ基を持つ構造をしており、ACBCはシクロプロパンがシクロブタンに、ACPCはシクロプロパンがシクロペンタンに置き換わった構造をしている。

(2) ACC応答性遺伝子の発現解析

スサビノリの未成熟葉状体に対して、ACC処理を行い、0、3、7、14日目のACC処理藻体からRNA抽出、cDNAの作製を行い、これを鋳型としリアルタイムPCR法による発現解析を行った。また酸化ストレスとして1mM過酸化水素に暴露したスサビノリ葉状体からRNAを抽出し、cDNAを合成し、同様な発現解析を行った。

(3) ACC応答における活性酸素種(ROS)とNADPHオキシダーゼの活性化

0、1、3、7 日目の ACC 処理藻体を、5 μ M のジクロロジヒドロフルオロセイン (DCFH₂-DA) 添加海水にて 1 時間インキュベートした後、液体窒素を用いて乳棒と乳鉢によって粉碎し、Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)により抽出した。これらのサンプルにおいて、励起光 488 nm による 525 nm の蛍光波長を測定することで ROS の生成量を定量した。また ACC 処理により、ROS の生成を引き起こすことが知られている NADPH オキシダーゼ RBOH (respiratory burst oxidase homolog) 遺伝子の発現量が誘導されるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) エチレン合成阻害剤や ACC 類縁体がスサビノリの有性生殖に与える影響(図 1)

エテフォンでスサビノリ藻体を処理した結果、ACC 処理で見られた成熟促進効果は認められなかったことから、ACC 処理で見られた成熟促進効果はエチレンの効果ではなく、ACC 自体の効果である可能性が示唆された。そこでこれらのことをさらに解析するために、エチレン合成阻害剤の影響を調べた結果、ACC 合成酵素の阻害剤である アミノエトキシビニルグリシン (AVG)、 γ -アミノオキシ酢酸 (AOA) 処理において、スサビノリの有性成熟を顕著に抑制する効果は見られなかった一方、ACC 酸化酵素の阻害剤である γ -アミノイソ酪酸 (AIB) 処理により、ACC と同様に本種の有性成熟が促進されることが明らかとなった。そのため、AIB は ACC の類縁体として、ACC のシグナル伝達を誘導している可能性が考えられた。そこでこれを検証するために、ACC の類縁体である 1-アミノシクロブタン-1-カルボン酸(ACBC)と、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸(ACPC)処理の影響を調べることにした。有性生殖と酸化ストレス耐性に対する影響を観察した結果、ACBC 処理区については、ACC 処理と同様に有性生殖促進効果が見られたが、ACPC 処理区においては、未処理区と差は認められなかった。酸化ストレス耐性に関しては、ACBC 処理において抗酸化物質や抗酸化系遺伝子の発現量が増加し、酸化ストレス耐性獲得が引き起こされた一方で、ACPC 処理については、ACC と比較して抗酸化活性の増加が遅く、抗酸化物質含有量の増加も低かった。以上の結果から、スサビノリの有性生殖および酸化ストレス耐性獲得は、エチレンではなく ACC 自体がシグナル分子として機能することで引き起こされることが明らかとなった。



図 1 スサビノリにおける ACC 依存的な有性生殖促進効果
ACC 処理では有性生殖が促進されたが、エテフォン処理では、その効果は認められなかった。このことからエチレンではなく ACC 自体が有性生殖を制御している可能性が考えられる。

(2) ACC 応答性遺伝子の発現解析(図 2)

リアルタイム PCR による発現解析の結果から、スサビノリは有性生殖に向かうと、Flotillin (FLOT) や Charged multivesicular body protein (CHMP) といった小胞

輸送関連因子の発現量が増加し、次に High mobility group (HMG)、Cell division cycle protein 20 (CDC20)、Aurora kinase (AURK)、サイクリン U (CYCU)といった、有性生殖器官の形成のための細胞分裂や細胞周期の制御因子の発現量が増加することが分かった。またエクспанシン (EXPA) 遺伝子の発現により、細胞壁が軟化することに加えて、Glycosyltransferase (GT)等の糖修飾酵素によって生殖細胞の防御や接着に必要な多糖および糖タンパク質が合成され、精子の放出の準備が整えられることが推察された。また ACC 処理および酸化ストレス処理の両方においてグルタチオン-S-トランスフェラーゼやヘムペルオキシダーゼ遺伝子の発現が誘導されたことから、これらが本種の ACC における抗酸化能獲得に寄与している可能性が示唆された。

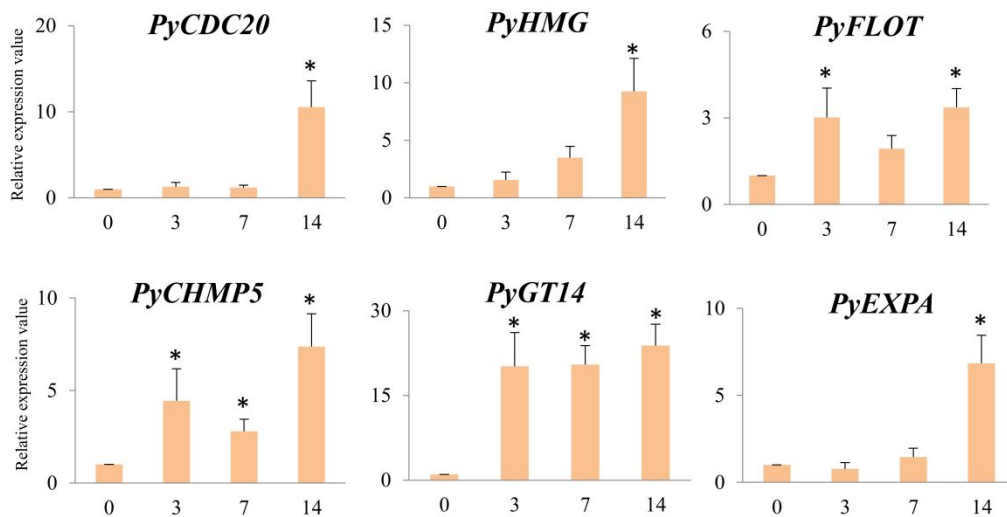


図2 スサビノリにおける ACC 応答性遺伝子の発現

(3) ACC 応答における活性酸素種 (ROS) と NADPH オキシダーゼの活性化 (図3)

ROS の生成量を測定した結果、ACC 処理後、1日目から増加し、3日目でピークを示した後、7日目においても ACC 未処理区よりも高い値を示した。フェノール類の含有量においては、ACC 処理3日目から徐々に増加し、7日目において有意に増加した。また ACC 処理により、NADPH オキシダーゼである RBOH 遺伝子の発現量が増加することが分かった。

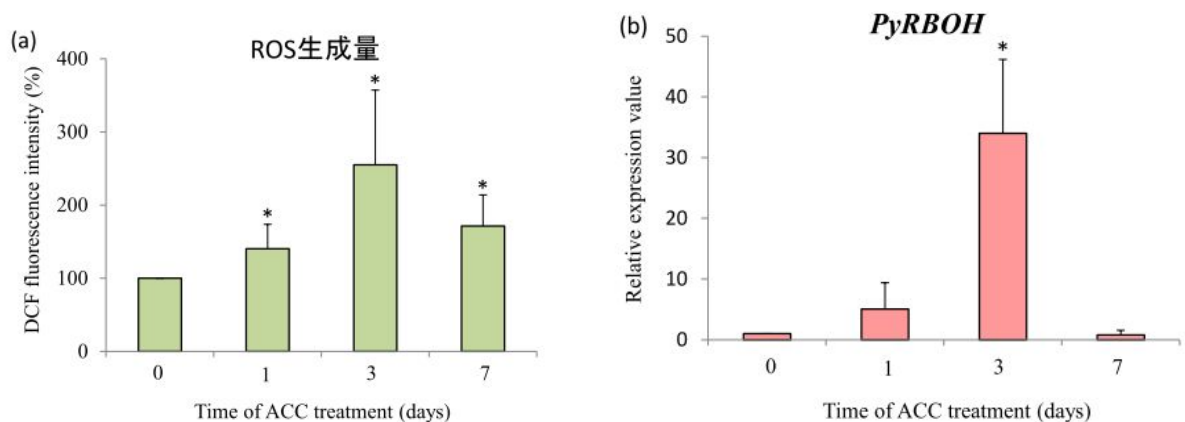


図3 ACC 処理による ROS の生成促進 (a) と RBOH 遺伝子の発現誘導 (b)

(4) 研究のまとめと今後の展望

本研究により、スサビノリの有性生殖および酸化ストレス応答は、エチレンではなく、その前駆物質である ACC が制御している可能性が示唆された。これは海藻においてもモデル植物で近年報告されている ACC 依存的なシグナル伝達系の存在を示唆するもので興味深い。また ACC のシグナル伝達系に ROS の関与が示され、さらに ACC 応答性の遺伝子として、細胞周期や細胞分裂、抗酸化に関連する遺伝子が同定された。今後は、これらの遺伝子の機能解析とともに、ACC 依存的なシグナル伝達系の解明が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Yanagisawa R, Sekine N, Mizuta H, Uji T. Transcriptomic analysis under ethylene precursor treatment uncovers the regulation of gene expression linked to sexual reproduction in the dioecious red alga *Pyropia pseudolinearis* (Ueda) J Appl Phycol (in press) (査読有)

Uji T, Gondaira Y, Fukuda S, Mizuta H, Saga N. Characterization and expression profiles of small heat shock proteins in the marine red alga *Pyropia yezoensis*. Cell Stress and Chaperones 24, 223–233 (2019) (査読有)

Uji T, Matsuda R, Takechi K, Takano H, Mizuta H and Takio S. Ethylene regulation of sexual reproduction in the marine red alga *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). J Appl Phycol 28: 3501-3509 (2016) (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

小野寺翔太、水田浩之、宇治利樹、グリシンによるスサビノリの有性生殖の促進効果、平成 31 年度日本水産学会春季大会

遠藤晴音、水田浩之、宇治利樹、スサビノリの有性生殖は、エチレンではなく、その前駆物質によって制御される、平成 31 年度日本水産学会春季大会

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。