

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15907

研究課題名(和文) エチレン前駆物質による紅藻スサビノリの有性生殖の制御機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on the sexual reproduction via an ethylene precursor pathway in the marine red alga *Neopyropia yezoensis*

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を制御する植物ホルモンであるエチレンの前駆物質1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)のシグナル伝達系やその応答に關与する遺伝子発現制御機構の解明を行ったものである。研究の結果、ACCの受容体がグルタミン酸受容体である可能性があること、ACCのシグナル伝達には、ホスホリパーゼDを介したリン脂質代謝による情報伝達が關与していること、DNAのメチル化やヒストンのアセチル化やメチル化といったエピジェネティックな制御がACCの応答に重要であることなどが明らかとなり、海藻において初めて、ACC応答の分子機構を解明した。

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を制御する植物ホルモンの分子機構の一端が明らかとなった。これらの知見は、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共に、海苔の品種作出のための有用な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The study revealed that the signaling pathway of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), a precursor of ethylene, a phytohormone that regulates sexual reproduction and oxidative stress response in the marine red alga *Neopyropia yezoensis*. ACC signaling is mediated by phospholipid metabolism via phospholipase D (PLD), which is involved in intracellular signal transduction, and that epigenetic regulation such as DNA methylation, and histone acetylation and methylation are important for ACC response. This is the first elucidation of the molecular mechanism of ACC response in seaweeds.

研究分野：海藻分子生理学

キーワード：海苔 スサビノリ 植物ホルモン リン脂質代謝 シグナル伝達 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

海藻の持続的な生産のためには、これらの繁殖戦略を理解した上で、藻場の保全や増養殖を適切に行っていく必要がある。繁殖が成功するためには、最適なタイミングで生殖することが重要であるため、海藻は外界の環境の変化を感知することで、成長から生殖の転換を厳密に調節していると考えられるが、これらの制御機構は不明である。申請者は、植物ホルモンの1種である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)を水産重要種であるスサビノリ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。またこの応答はエチレンではなく、ACC 自体のシグナルによるものである可能性が示唆されている。しかしながら、ACC がスサビノリ藻体内において、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

本研究では、有性生殖が促進される環境条件下における ACC の生成量や ACC のシグナル伝達系、さらには ACC 応答性遺伝子の発現制御機構を調べることによって、スサビノリのストレス応答や有性生殖の制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 異なる環境条件や発生ステージにおける ACC 含有量の測定

通常の培養条件(15・短日条件)と有性生殖が促進される環境条件下(25・長日条件下あるいは15・高光量条件下)で培養した藻体の ACC 含有量を測定し比較することで、細胞内の ACC 含有量と有性生殖の関連性を調べた。また異なる発生ステージにおける ACC 含有量を比較した。ACC の測定はガスクロマトグラフィーを用いて行った。

(2) ACC 受容体候補の探索

以前から哺乳類のグルタミン酸受容体に ACC が結合することが知られていたが、近年植物においてもグルタミン酸受容体に ACC が結合しシグナルを伝達する可能性が考えられている。そこで、動植物のグルタミン酸受容体のアンタゴニストと、ACC をスサビノリ藻体に同時処理した場合に、ACC の効果が抑制されるのかどうかを観察することで、ACC とグルタミン酸受容体の関連性について調べた。また、グルタミン酸受容体はグルタミン酸などのアミノ酸を受容することでカルシウムイオンなどを流入させることで下流にシグナルを伝達するため、グルタミン酸などのタンパク質を構成するアミノ酸を処理することで、スサビノリの有性生殖が誘導されるかどうかを調べた。さらに、ACC 処理時における細胞内のカルシウムイオン濃度変化をカルシウム結合蛋白であるエクオリンの発光を利用することで解析するために、エクオリンをスサビノリ細胞内で発現可能な遺伝子コンストラクトを作製し、これをパーティクルガン法により導入し発現させた株を作製した。この藻体を発光基質であるセレンテラジン添加培地で培養後、ACC 処理あるいは無処理の場合の細胞内のカルシウムイオン濃度変化を測定し比較した。エクオリンの発光はフォトメーターにより検出した。

(3) ACC のシグナル伝達系の解析

RNA-seq 解析の結果から、ACC 処理により、細胞内情報伝達に關与するホスホリパーゼ D(PLD)の遺伝子発現が増加することが分かっていた。そこで、PLD の酵素活性と PLD の生成物でシグナル伝達物質として知られているホスファチジン酸 (PA) の含有量を測定するとともに、PLD 特異的阻害剤である 1-ブタノールを用いて ACC 応答性の影響を調べた。

(4) ACC 応答性遺伝子の発現制御機構

ACC 応答性遺伝子の発現制御の知見を得るために、代表的なエピジェネティックな制御であるヒストン修飾と DNA メチル化に注目し、実験を行った。ヒストン修飾に関しては、クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)を DNA メチル化解析に関しては、一塩基レベルのメチル化シトシンを検出できるバイサルファイトシーケンス法を用いて行った。

4 . 研究成果

(1) 異なる環境条件や発生ステージにおける ACC 含有量の測定

異なる発生ステージの藻体における ACC 含有量を測定した結果、ACC 含有量は、未成熟藻体と成熟藻体では顕著な違いは見られなかった。また通常の培養条件 (15 ・短日条件)と有性生殖が促進される環境条件下 (25 ・長日条件下あるいは 15 ・高光量条件下)で培養した藻体の ACC 含有量を測定したところ、培養条件に関わらず、ACC 含有量の変動はあまり見られなかった。その一方で、スサビノリの糸状体では、葉状体と比較して、ACC 含有量が約 2 倍高いことが分かった。ACC 処理したスサビノリ葉状体においては、窒素代謝の中心的役割を担うグルタミン合成酵素 (GS) や窒素と炭素代謝の仲介役を担うグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の遺伝子発現量が変動することを明らかとしたが、葉状体と糸状体でも、これらの発現量が異なることから、ACC が炭素と窒素のバランスを制御し生活環をコントロールしている可能性が示唆された。

(2) ACC 受容体候補の探索

動植物のグルタミン酸受容体のアンタゴニストと、ACC をスサビノリ藻体に同時処理した場合に、ACC の効果が抑制されるのかどうかを調べたが、アンタゴニスト処理により、ACC 応答が抑制されることは観察されなかった。また、ACC シグナル伝達にカルシウムイオンが関与するかどうか調べるために、作製したエクオリン発現株に ACC 処理し、カルシウムイオンの変化が見られるか調べたが、顕著な変動は見られなかった。

以上の結果から、スサビノリにおいて ACC の受容体として、グルタミン酸受容体が機能しているかどうかは不明であるが、スサビノリの有性生殖の促進が ACC 以外に、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸など他の生物でのグルタミン酸受容体のリガンドとして報告されているアミノ酸でも起きることが明らかとなったため、今後も ACC 受容体としてグルタミン酸受容体が機能するかどうかの検証が必要である。

(3) ACC のシグナル伝達系の解析

細胞内情報伝達に關するホスホリパーゼ D(PLD)の遺伝子発現と酵素活性が、ACC 処理時において上昇することを明らかにした(図 1 a)。また、PLD の生成物である PA においては ACC 処理藻体で増加した(図 1 b)。そこで PLD 特異的阻害剤である 1-ブタノールを用いて ACC 応答性の影響を調べたところ、阻害剤処理によって ACC 応答時に見られる生長の抑制や有性生殖の促進が阻害されることが分かった(図 2)。これらの阻害効果は、1-ブタノールの異性体である t-ブタノール処理時には見られなかったことから、PLD を特異的に阻害した結果起きたものと判断された。さらに、PLD 阻害剤が ACC 応答性遺伝子の発現に与える影響を調べたところ、1-ブタノール処理により、ACC 処理により発現が上昇する遺伝子については抑制され、ACC 処理により発現が減少する遺伝子についてはそれが緩和されていた。これらのことから、ACC シグナルの一部として PLD を介したリン脂質シグナリングが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

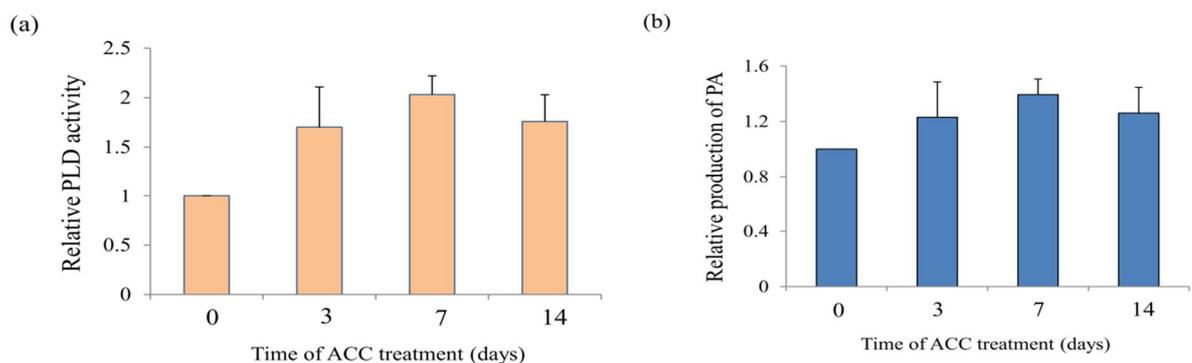


図 1 ACC 処理におけるスサビノリ葉状体での PLD の活性と PA の生成

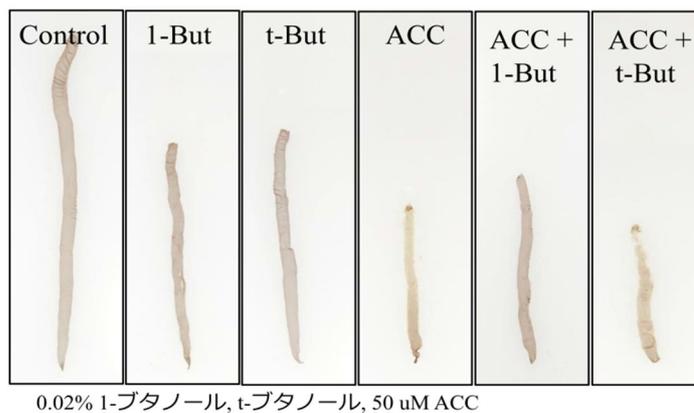


図 2 PLD 特異的阻害剤による ACC 応答の抑制

(4) ACC 応答性遺伝子の発現制御機構

他の真核生物で転写活性に關与していることが知られているヒストン H3 の 9 番目リジンに対するアセチル化 (H3K9ac) および、ヒストン H3 の 4 番目リジンに対するトリメチル化 (H3K4me3) の修飾レベルが、ACC 応答性遺伝子である NyRWP-RK および NyASPO2608 遺伝子の発現量の間に関連性が見られたことから、ヒストン修飾が ACC 応答性遺伝子の転写制御に關与している可能性が示唆された。また、これらの遺伝子において ACC 処理藻体と未処理藻体でのシトシンメチル化パターンを比較したところ、

ACC 処理藻体では、遺伝子コーディング領域においてシトシンのメチル化が蓄積されていた。これらの結果から、DNA メチル化とヒストン修飾の相互作用と ACC 応答の関連性が示唆された。

(5) 研究のまとめと今後の展望

研究の結果、ACC のシグナル伝達経路に、PLD を介したリン脂質代謝による情報伝達が関与していることが明らかとなった。また、ACC 応答性遺伝子の発現制御機構を調べたところ、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化やメチル化といったエピジェネティックな制御が ACC の応答に重要であることが明らかとなった。本研究期間内にスサビノリの ACC 受容体を同定することはできなかったが、本種の有性生殖がグルタミン酸などのアミノ酸でも促進されることが分かったため、陸上植物と同様にスサビノリでも ACC 受容体がグルタミン酸受容体である可能性が示唆された。今後は、ACC の受容体を明らかとすることに加えて、生活環における ACC の役割や ACC のシグナル伝達機構をさらに詳しく調べることで、スサビノリの植物ホルモンの分子機構が明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Endo Harune, Mizuta Hiroyuki, Uji Toshiki	4. 巻 33
2. 論文標題 -aminoisobutyric acid mimics the effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to promote sexual reproduction in the marine red alga <i>Pyropia yezoensis</i> (Rhodophyta)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Phycology	6. 最初と最後の頁 1081 ~ 1087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10811-020-02326-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 宇治 利樹	4. 巻 69
2. 論文標題 紅藻類の有性生殖に関わる制御機構 - アマノリ類における1-アミノシクロプロパンカルボン酸の役割を中心に -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 藻類	6. 最初と最後の頁 14 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uji T, Endo H, Mizuta H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Sexual reproduction via a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent pathway through redox modulation in the marine red alga <i>Pyropia yezoensis</i> (Rhodophyta).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00060.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uji, T., Mizuta, H.	4. 巻 52
2. 論文標題 Treatment with heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors induces asexual life cycle in the marine red alga <i>Neopyropia yezoensis</i> (Rhodophyta).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 6814 ~ -6817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/are.15520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uji T, Ueda S, Mizuta H.	4. 巻 2
2. 論文標題 Identification, Characterization, and Expression Analysis of Spondin-Like and Fasciclin-Like Genes in <i>Neopyropia yezoensis</i> , A Marine Red Alga.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phycology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/phycolgy2010003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uji, T., Mizuta, H.	4. 巻 In press
2. 論文標題 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its analogs alleviate heat stress damage in the marine red alga <i>Neopyropia yezoensis</i> (Rhodophyta)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Phycology	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10811-022-02727-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kominami S, Mizuta, H., Uji, T.	4. 巻 In press
2. 論文標題 Transcriptome profiling in the marine red alga <i>Neopyropia yezoensis</i> under light/dark cycle.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mar. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-022-10121-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uji, T.,Kandori T., Konishi S., Mizuta H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Phospholipase D activation is required for 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid signaling during sexual reproduction in the marine red alga <i>Neopyropia yezoensis</i> (Rhodophyta)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC plant biology.	6. 最初と最後の頁 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12870-022-03575-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野寺 翔太 ・ 宇治 利樹
2. 発表標題 海苔の原料であるスサビノリにおけるアミノ酸シグナルの存在の検証
3. 学会等名 第6回 北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小南彩夏・水田浩之・宇治利樹
2. 発表標題 紅藻スサビノリのトランスクリプトーム解析による日周性遺伝子の同定
3. 学会等名 令和3年度 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇治 利樹
2. 発表標題 海苔の原料であるアマノリ属の有性生殖における制御に関する研究
3. 学会等名 第5回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野寺 翔太, 宇治 利樹
2. 発表標題 海藻にアミノ酸シグナルは存在するのか？
3. 学会等名 第5回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇治 利樹
2. 発表標題 海苔の原料である紅藻スサビノリにおけるエチレン前駆物質の役割
3. 学会等名 2021年度北海道植物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------