

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780197

研究課題名(和文) プロテオミクスを用いたシャトネラ赤潮消長関連タンパク質の探索

研究課題名(英文) A study on search of protein species which contribute to growth of a harmful alga *Chattonella*

研究代表者

島崎 洋平 (Shimasaki, Yohei)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40363329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：有害藻シャトネラの赤潮動態予察に資するため、増殖能力を推定可能なタンパク質指標をプロテオーム解析により探索した結果、シャトネラの増殖速度の増加と比例して発現量が増加する過酸化水素消去酵素2-cysteine peroxidoredoxin(2-Cys Prx)が検出された。本酵素は光合成過程で発生する有害な過酸化水素の消去に関与し、本酵素発現量の低下が増殖に悪影響を及ぼしていることが予想されたため、本酵素の発現量が増殖能力評価指標として有効であると考えられた。また、光合成の光化学系Ⅱの最大量子収率(Fv/Fm比)も、シャトネラ細胞の増殖能力評価に有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Present study aimed at identifying molecular markers reflecting physiological status response to *Chattonella marina* growth and investigating temporal variation in the potential maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm ratio) via a field survey and laboratory cultures. Proteome profiles obtained from 2-DE suggested that 2-cysteine peroxidoredoxin (2-Cys Prx) play a role in maintaining positive growth of *C. marina*. The Fv/Fm ratio gradually decreased from approximately 0.72 to 0.62, and the growth rate of *C. marina* also decreased from approximately 0.5 to <0 div/day during the bloom; there was a significant positive correlation between the two parameters. Our results suggest that the expression level of 2-Cys Prx and Fv/Fm ratio, combined with information about environmental factors, may be useful in evaluating the growth potential of *C. marina* during field blooms.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：シャトネラ プロテオミクス 2-Cys Prx 過酸化水素 増殖能力 赤潮

## 1. 研究開始当初の背景

ラフィド藻綱に属する単細胞藻類シャトネラは 1970 年代から西日本を中心に養殖魚をへい死させ、甚大な漁業被害を引き起こしてきた。シャトネラによる漁業被害軽減の対策として養殖生簀の移動や餌止めが一般的である。そのためにはシャトネラ赤潮の動態予測が極めて重要であるが、現場の水温・栄養塩類など物理化学的要因だけでは予測が困難な事象が発生しており、シャトネラ赤潮の消長予測に関する新規手法が望まれている。

## 2. 研究の目的

シャトネラによる漁業被害軽減を目的として、赤潮の増殖能力を予測可能なタンパク質または遺伝子指標を探索する。具体的にはシャトネラの増殖・衰退期特異的に変動する細胞内タンパク質群をプロテオミクスで網羅的に解析後、変動したタンパク質についてその遺伝子配列を解析し、さらにリアルタイム PCR などによる詳細な発現変動解析を行う。最終的に室内実験および実環境中データをもとに、シャトネラ細胞の増殖能力を予測できる分子種を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 室内培養株における候補分子の探索

シャトネラの室内培養株 (*Chattonella antiqua* NIES-1 株) を用いて、増殖段階 (増殖期、定常期、死滅期) 特異的に発現量が変動するタンパク質群の探索および同定を行った。タンパク質群の網羅的探索には二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析を実施した。各増殖段階間で変動し、発現量が高いタンパク質スポットを中心にタンパク質種の同定を N 末端アミノ酸配列解析により行った。同時に光合成活性として光化学系の最大量子収率 (Fv/Fm 比) も測定した。

### (2) 候補分子の遺伝子基礎情報の取得

各増殖段階で発現量が有意に変動し、且つ N 末端アミノ酸配列からタンパク質種が同定された過酸化水素消去酵素 2-cysteine peroxidoredoxin (2-Cys Prx) の mRNA 配列を RACE 法により解析した。また、過酸化水素を暴露したシャトネラ細胞内における 2-Cys Prx の遺伝子レベルでの発現変動をリアルタイム定量 PCR により解析した。

### (3) タンパク質発現量と活性酸素濃度

シャトネラ培養株 8 株を用いて、定常期初期段階における培養液中の活性酸素濃度 (過酸化水素、スーパーオキシド) とタンパク質群の発現解析を行い、活性酸素量に与ることが予想されるタンパク質群の探索を行った。

### (4) 現場赤潮細胞を用いた実証試験

2012 年の 9 月に有明海奥部で発生したシャトネラ赤潮期間中における、植物プランクトン細胞密度、栄養塩濃度、水温、塩分、赤潮細胞内におけるタンパク質 (2-Cys Prx) 発現量、光合成活性 (Fv/Fm 比) および増殖能力 (サンプリング日を含め 3 日目間培養した際の増殖速度) を調べ、増殖能力と 2-Cys Prx 量または光合成活性との関連性を解析し、「2-Cys Prx 量」と「光合成活性」の増殖能力評価指標としての有用性を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 室内培養株における候補分子の探索

今回検出できた約 130 個のタンパク質スポットのうち、42 個の発現量が増殖段階で有意に変動した。同定できたタンパク質のなかでは、炭素固定反応等に参与していることが予想される glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が増殖時に低く、死滅期に近づくにつれ増加した。一方、光合成の際の水の酸化に与する oxygen-evolving enhancer 1 (OEE1) および過酸化水素消去酵素 2-Cys Prx は増殖が活発な時ほど発現量が多く、死滅期に近づくにつれ減少傾向にあった。

### (2) 候補分子の遺伝子基礎情報の取得

一般的に全ての生物細胞において活性酸素は有害であり、今回検出された 2-Cys Prx の発現量がシャトネラの細胞維持に重要な影響を及ぼしている可能性が高いと判断し、本課題では主に 2-Cys Prx に焦点をあて実験を行った。その結果、シャトネラ 2-Cys Prx は 585 塩基対の mRNA にコードされており、195 のアミノ酸残基から構成されていることが明らかとなった。

また、シャトネラに過酸化水素を人為的に暴露して 2-Cys Prx 遺伝子発現量の変化を調べた結果、2-Cys Prx 発現量が高い場合、細胞内過酸化水素濃度が低下し、2-Cys Prx 発現量が高い場合には細胞内過酸化水素濃度が上昇したため、2-Cys Prx がシャトネラ細胞内の過酸化水素消去に与し、ひいては細胞の維持に影響を及ぼしていることが示唆された。

### (3) タンパク質発現量と活性酸素濃度

シャトネラ培養株 8 株を用いて、細胞内活性酸素濃度 (過酸化水素、スーパーオキシド) とタンパク質群の発現量との関係を調べた結果、2-Cys Prx、OEE1 および ATP 合成酵素が過酸化水素濃度と有意な負の相関 (タンパク質量が多いと過酸化水素が低くなる関係) を示した。以上のことから、タンパク質レベルにおいても 2-Cys Prx がシャトネラ細胞内の過酸化水素濃度に影響を及ぼしていることが示唆された。一方、スーパーオキシド濃度と有意な関連性を示すタンパク質は検出されなかった。

#### (4)現場赤潮細胞を用いた実証試験

赤潮盛期における増殖速度、2-Cys Prx 量および光合成活性は相対的に高い値を示したが、赤潮の継続日数の経過とともに、上記3パラメータの値も徐々に減少していた。

現場赤潮細胞の増殖能力と2-Cys Prxまたは光合成活性(Fv/Fm比)との間に有意な正の相関(増殖能力が高いとそれぞれの値も高くなる関係)が観察されたため、実環境中のシャトネラ赤潮細胞中においても2-Cys Prxの発現量が増殖能力に影響を及ぼしており、発現量を調べることで増殖能力を評価できる可能性が強く示唆された。また、代表的な光合成活性指標であるFv/Fm比も増殖能力評価に極めて有用であることが示された。

#### (5)総括

赤潮の現場海域における動態は、細胞の増殖能力等の生物化学的要因、風向や海流による集積・逸散等の物理的要因が複雑に関連して変化していくため、増殖能力の評価だけでは、勿論赤潮動態予察は十分に成し遂げられない。しかしながら、増殖なくして集積・逸散も生じないため、まずは赤潮動態予察の前提として、増殖能力を何等かの指標をもとに評価する必要があり、それら指標の信頼性を科学的に十分に検討することは極めて重要である。

赤潮藻の増殖能力を、遺伝子レベルから生体レベル、さらに室内実験から現場実証試験に至る広範かつ体系的に調べた研究はおそらく本研究が初めてであり、さらに今後解析を進めることにより、赤潮藻の増殖能力評価法の信頼性が増し、漁業被害の軽減に繋がることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計6件)

Qiu X, Shimasaki Y, Yoshida Y, Matsubara T, Yamasaki Y, Kawaguchi M, Honda M, Muori K, Nakajima Y, Tasmin R, Kuno K, Kawamura Y, Honjo T, Oshima Y. Allelopathic Effects of *Skeletonema* spp. May Influence Interspecific Competition and Bloom Formation of Co-occurring Harmful Flagellates. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*.(in press).  
Shimasaki Y, Tsuyama M, Tasmin R, Qiu X, Shimizu M, Sato Y, Yamasaki Y, Kato-Unoki Y, Nukata A, Nakashima T, Ichinose H, Wariishi H, Honjo T, Oshima Y. Thiobencarb Herbicide Reduces Growth, Photosynthetic Activity, and Amount of Rieske Iron-Sulfur Protein in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*.

*Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 27(9): 437-444. 2013. DOI: 10.1002/jbt.21505.

Qiu X, Shimasaki Y, Tsuyama M, Yamada T, Kuwahara R, Kawaguchi M, Honda M, Gunjikake H, Tasmin R, Shimizu M, Sato Y, Kato-Unoki Y, Nakashima T, Matsubara T, Yamasaki Y, Ichinose H, Wariishi H, Honjo T, Oshima Y. Growth Phase Dependent Variation of Photosynthetic Activity and Cellular Protein Expression Profile in Harmful Raphidophyte *Chattonella antiqua*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 77(1):46-52. 2013. DOI: 10.1271/bbb.120543.

Yamasaki Y, Ohmichi Y, Hirose M, Shikata T, Shimasaki Y, Oshima Y, Honjo T. Low molecular weight allelochemicals produced by the diatom, *Skeletonema costatum*. *Thalassas* 28: 9-17. 2012. URL:

[http://webs.uvigo.es/thalassas/thalassas\\_marco%20principal.htm](http://webs.uvigo.es/thalassas/thalassas_marco%20principal.htm)

Qiu X, Yamasaki Y, Shimasaki Y, Gunjikake H, Honda H, Kawaguchi M, Matsubara T, Nagasoe S, Etoh T, Matsui S, Honjo T, Oshima Y. Allelopathy of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* against the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* is mediated via allelochemicals and cell contact. *Marine Ecology-Progress Series*. 446:107-118. 2012. DOI: 10.3354/meps09476.

Qiu X, Yamasaki Y, Shimasaki Y, Gunjikake H, Matsubara T, Nagasoe S, Etoh T, Matsui S, Honjo T, Oshima Y. Growth interactions between the raphidophyte *Chattonella antiqua* and the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Harmful Algae*. 11: 81-87. 2011. DOI: 10.1016/j.hal.2011.08.001.

##### [学会発表](計8件)

Xuchun Qiu・島崎洋平・松原 賢・本城凡夫・大嶋雄治。赤潮海中におけるシャトネラ細胞の増殖速度、光合成活性および関連タンパク質群の変動。平成26年度日本水産学会春季大会，平成26年3月27-30日，北海道。

寺本彩乃・島崎洋平・溝口直洋・Qiu Xuchun・鶴木陽子・津山孝人・中島 悠・本城凡夫・大嶋雄治。ラフィド藻 *Chattonella marina* 細胞中の過酸化水素消去酵素 peroxidoredoxin の遺伝子解析。平成25年度日本水産学会春季大会，東京海洋大学，平成25年3月27-30日，東京。

Qiu Xuchun・島崎洋平・津山孝人・本田

匡人・溝口直洋・松原 賢・本城凡夫・大嶋雄治。有害ラフィド藻 *Chattonella* の光合成活性と増殖との関係 平成 25 年度日本水産学会春季大会，平成 25 年 3 月 27-30 日，東京。

Shimasaki Y, Tasmin R, Tsuyama M, Qiu X, Shimizu M, Ichinose H, Kato-Unoki Y, Kang IJ, Honjo T, Oshima Y. Effects of herbicide thiobencarb on growth, photosynthetic activity and protein expression of centric diatom *Thalassiosira pseudonana*. SETAC Asia Pacific 2012, 11.24-27, Kumamoto, Japan.

Qiu X, Shimasaki Y, Tsuyama M, Yamada T, Honda M, Kato-Unoki Y, Nakashima T, Yamasaki Y, Honjo T, Oshima Y. Temporal variations in photosynthetic activity and phase-dependent cellular protein expression during growth of harmful raphidophyte *Chattonella antiqua*. 15th International Conference on Harmful Algae 2012, 10.28-11.2 2012, Changwon, Korea.

Shimasaki Y, Qiu X, Yamasaki Y, Honda M, Matsubara T, Honjo T, Oshima Y. Allelopathy of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* against the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* is mediated via allelochemicals and cell contact. 15th International Conference on Harmful Algae 2012, 10.28-11.2 2012, Changwon, Korea.

Qiu X, Shimasaki Y, Tsuyama M, Shimizu M, Yamada T, Kuwahara R, Kawaguchi M, Sato Y, Kato-Unoki Y, Nakajima T, Matsubara T, Yamasaki Y, Ichinose H, Wariishi H, Honjo T, Oshima Y. Maximum Quantum Yield of Photosystem II and Photosynthesis Related Protein Expression Levels as Possible Bio-indicators of Growth Potential in Harmful Raphidophyte *Chattonella antiqua*. The 8th International AFAS Joint Symposium between Japan and Korea. 11.16. 2011. Tottori, Japan.

山田拓・島崎洋平・津山孝人・邱旭春・松原賢・本城凡夫・大嶋雄治。ラフィド藻 *Chattonella marina* var. *antiqua* の増殖に及ぼす強光の影響。平成 23 年度日本水産学会秋季大会，平成 23 年 9 月 27-30 日，長崎。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島崎 洋平 (SHIMASAKI Yohei)  
九州大学大学院・農学研究院・准教授  
研究者番号：40363329

### (2) 研究分担者

なし ( )

### (3) 連携研究者

大嶋 雄治 (OSHIMA Yuji)  
九州大学大学院・農学研究院・教授  
研究者番号：70176874

中島 崇 (NAKASHIMA Takashi)  
九州大学大学院・農学研究院・助教  
研究者番号：20380553