

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：23780215

研究課題名（和文） 渦鞭毛藻における増殖の分子機構に関する研究

研究課題名（英文） Studying the molecular mechanisms underlying growth in dinoflagellates

研究代表者

小檜山 篤志 (ATSUSHI KOBIYAMA)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：60337988

研究成果の概要(和文):本研究は麻痺性貝毒の原因となる有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖に関する分子機構を明らかにすることを目的とした。増殖に関与する成分は細胞外にあると考えられることから、初めに渦鞭毛藻の分泌タンパク質に関して調べた。その結果、約 20kDa のタンパク質が主成分であることを示した。次に、渦鞭毛藻の推定分泌タンパク質をコードする遺伝子の単離を試み、得た遺伝子を *AtCRP* と名付けた。さらに、*AtCRP* が分泌タンパク質である可能性を示すことが出来た。最後に、*A. tamarense* の増殖を阻害する珪藻を調べた結果、*Chaetoceros didymus* の近縁種が増殖を阻害し、その成分は珪藻の細胞膜上に存在するものと推測された。

研究成果の概要(英文): We aimed to clarify the molecular mechanisms underlying growth in dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, the causative organism of paralytic shellfish poisoning, in this study. As molecules may participate in the growth, we investigated the proteins secreted by the dinoflagellate. An aliquot of the conditioned medium used for cultivating *A. tamarense* was investigated, the main component was a 20-kDa protein. Next, we performed cDNA cloning of the gene that encodes the secretory protein. The gene was named as *AtCRP*. The *AtCRP* protein secreted in the conditioned medium was identified. Finally, we found that the related species of *Chaetoceros didymus* inhibited the growth of *A. tamarense*, and predicted that the molecule participating in this inhibition was existed on the cell membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：渦鞭毛藻, 増殖, 競合, 珪藻, 分泌タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

麻痺性貝毒は有毒渦鞭毛藻を貝類が摂取、毒成分を蓄積することによって生じる。貝毒の発生は公衆衛生ならびに貝類養殖業にとって脅威となっていることから、有毒渦鞭毛藻の増殖に関して様々な研究が行われている。しかしながらこれまでは現象面に関する研究が多く、分子レベルでの研究が少ない。

このことから、増殖の分子機構に関してはほとんど明らかにされておらず、有毒渦鞭毛藻の大量発生に対する根本的な解決策は見出されていないのが現状であり、その早急な対応が望まれる。

## 2. 研究の目的

現在不明なままである麻痺性貝毒原因渦

鞭毛藻の増殖機構を分子レベルで明らかにし、有毒渦鞭毛藻の大量発生の予防や予察の一助となる知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず初めに、岩手県大船渡湾より単離した麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の培養上清中に、自己増殖の促進あるいは他生物種の増殖に影響を与えるタンパク質成分を分泌しているか否かを調べるために、培養液を限外濾過膜を用いて濃縮した後、SDS-PAGE および糖鎖染色に供した。また、同成分を *A. tamarense* および複数種の珪藻に添加して与える影響を調べた。

次に、*A. tamarense* の増殖に影響を与える可能性のあるタンパク質成分を得るために、N 末端にシグナルペプチドを有するタンパク質をコードする遺伝子の単離を試みた。この際、*A. tamarense* の EST データベースには 3' 末端側のデータのみが登録されていることから、近縁種であり、5' 末端側の塩基配列が登録されている *A. catenella* のものを用いて調べ、*A. tamarense* の cDNA クローニングを行った。本遺伝子のクローニングには cDNA ライブラリーを鋳型とした 3' -および 5' -RACE 法を用いた。また、推定アミノ酸配列から抗ペプチド抗体を作製し、細胞抽出タンパク質および培養上清につき、ウェスタンブロット解析を行った。さらに、得た cDNA を酵母 *Kluyveromyces lactis* を用いた発現系に供し、分泌タンパク質として培養液中に組換え体を発現させることを試みた。なお、発現ベクター構築の際には推定シグナルペプチドを除いた部分を用い、コドンの最適化を行った。

最後に、*A. tamarense* と珪藻との競合関係を調べるために、大船渡湾より単離した珪藻数種を用いて共培養を行い、増殖に影響を与えるものを探索した。影響が認められた種につき、rDNA の塩基配列を決定して同定を試みた。さらに、珪藻の *A. tamarense* の増殖に影響を与える成分について調べるために、培養上清、細胞の被殻あるいは抽出タンパク質を添加して観察を行った。

### 4. 研究成果

*A. tamarense* の培養上清を限外ろ過膜を用いて濃縮し、SDS-PAGE に供した結果、複数の成分が認められたものの、約 20kDa の成分が主成分として存在することが示された(図 1)。本 20kDa 成分につき N 末端アミノ酸配列および内部配列の解析を試みたものの、決定するには至らなかった。培養上清タンパク質について糖鎖染色を行った結果、20kDa 成分は糖タンパク質である可能性が示唆された(図 1)。また、濃縮培養上清について *A. tamarense* に添加して増殖へ与える影響を調べた。複数

回行った際に、添加区において増殖を促進した場合、および非添加区と差が認められない場合が確認出来た。したがって、受容するであろう *A. tamarense* の状態も本試験において重要である可能性、およびより詳細な検討が必要とも考えられた。また、珪藻に *A. tamarense* の濃縮培養上清を添加した場合において、珪藻の増殖に影響は与えなかったが、本件に関しても対象種を増やす等の必要性が考えられた。

次に、自己の増殖あるいは周囲の生物の増殖の阻害等に関与する成分は細胞外に分泌されていることが考えられることから、*A. tamarense* の分泌タンパク質の cDNA クローニングを試みた。3' -および 5' -RACE 法を行った後、決定した塩基配列から新たにプライマーを作製して翻訳領域の増幅を試みた。その結果、欠損部分以外の塩基配列がほぼ一致する 960, 894 および 510bp のクローンを得ることが出来た。また、これらの塩基配列がコードする推定アミノ酸は、それぞれ 319, 297 および 169 残基であり、欠損によるアミノ酸の変化も認められなかった(図 2)。さらに、cDNA およびゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った結果、cDNA を鋳型としたものでは 500 および 1,000bp 付近に PCR 産物が確認出来たのに対して、ゲノム DNA を鋳型とした場合には 1,000bp のみの増幅であったことから

(図 3)、これら 3 種の mRNA は選択的スプライシングによって生じた可能性が考えられる。また、最も長い 960 アミノ酸残基から成る成分では、推定シグナルペプチドおよび推定 N 結合型糖鎖付加配列を有し、システイン残基が 44 個存在することから、*A. tamarense* cysteine rich protein (AtCRP) と名付けた。AtCRP のアミノ酸配列には、CCX<sub>3</sub>CX<sub>6</sub>CC が 6 回繰り返される構造が存在した(図 4)。また、対数増殖期および定常期の *A. tamarense* における AtCRP の mRNA 量を半定量 RT-PCR によって調べた結果、両者において大差は認められなかった。また、AtCRP が分泌タンパク質か否かを調べるために、抗 AtCRP ペプチド抗体を用いたウェスタンブロット解析およびシステイン残基を染色する N-(7-dimethylamin-4-methylcoumarinyl)-maleimide (DACM) 染色を行った。その結果、細胞抽出タンパク質においてもシグナルが確認出来たものの、培養上清中のタンパク質成分において、DACM 染色およびウェスタンブロット解析両者において検出された成分が存在したことから(図 5)、AtCRP は細胞外へ分泌されている可能性が強く示唆された。さらに、AtCRP の機能解析を目的として *K. lactis* を用いた組換え体の発現を試みた。推定シグナルペプチド領域を除いた翻訳領域のコドンを最適化した後、発現ベクターへ組み込んでその発現を試み、ウェスタンブロッ

ト解析で組換え体の検出を行った結果、*K. lactis* の培養上清成分でシグナルが確認出来た (図 6)。現在、組換え体を用いた機能解析を試みている。

最後に、*A. tamarense* と珪藻との競合関係を確認するために、大船渡湾より新たに珪藻 3 種を単離した。これら珪藻と *A. tamarense* の共培養を行った結果、*C. didymus* の近縁種を添加した区のみにおいて、*A. tamarense* の増殖を示す 2 連鎖の細胞が減少することが確認出来た (図 7)。さらに、*C. didymus* 近縁種の培養上清が *A. tamarense* の増殖に与える影響を確認した結果、培養上清では *A. tamarense* の連鎖細胞の減少は認められなかった。そこで次に、*C. didymus* 近縁種よりタンパク質を抽出してその影響を調べた。水溶性タンパク質および膜抽出タンパク質へ分画した後、*A. tamarense* に添加して影響を調べた結果、膜抽出タンパク質を添加した試験区において連鎖細胞が減少する傾向が確認された (図 8)。さらに、本珪藻の細胞を破碎し、水溶性タンパク質を除いた後の被殻を添加した結果、*A. tamarense* の連鎖細胞が減少した。したがって、本珪藻の *A. tamarense* の増殖を阻害する成分は細胞膜上に存在し、接触することによってその阻害能が発現するものと推測される。

以上の結果から、有毒渦鞭毛藻の自己増殖に関与する可能性を有する成分および珪藻の渦鞭毛藻の増殖に影響を与える成分を見出すことが出来た。増殖は自分自身および周囲の生物から様々の影響を受けているものと推測されるが、本研究の成果は、その分子機構を明らかにするための大きな一助となるものと考えられる。

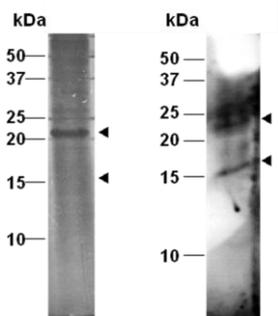


図 1. *A. tamarense* の濃縮培養上清 (左) および糖鎖染色の結果 (右)。

```

AtCRP-1  MSAP  4
AtCRP-2  ....  4
AtCRP-3  ....  4
AtCRP-1  S I M H A L F G A S V A L F L F A F A L F S E I C H G D G C A S E A D A R L I Q V P I Q K L D T D G E F L F P F F W L F W Q T G T E I C E R H D G L I T Q C S F G  88
AtCRP-2  .....  88
AtCRP-3  .....  88
AtCRP-1  S T C C D I C W A P G G T C C E R T L G H R F V C A K D T C C G F T C S A P G H E C C T W T L G D K Y P V A P G T A C A T D V D K S I Q C T R H G V F P C G E G  172
AtCRP-2  .....  150
AtCRP-3  .....  28
AtCRP-1  S S C C D I C W A P G G T C C E R T L G H R F V C A K D T C C G F T C S A P G H C C C S S A G Y K Y A V T A T L C P D E W D S H V C T R H G A K F Q C S F D  256
AtCRP-2  .....  234
AtCRP-3  .....  197
AtCRP-1  S S C C D I C W S G G A C C K H E Y G H F A C G K S S C C G D V C A M P G S K C C V K H G T H Y F P V K A T C V G  319
AtCRP-2  .....  297
AtCRP-3  .....  160

```

図 2. 3 種の *AtCRP* の推定アミノ酸配列。ドットおよびハイフンは同一アミノ酸および欠損を示す。

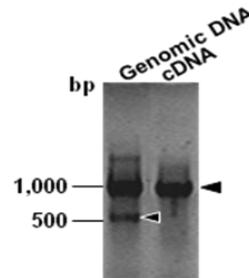


図 3. ゲノム DNA および cDNA を鋳型とした *AtCRP* の PCR の結果。

```

89  S T C C D I C W A P G G T C C E R T L G H R F V C A K D T C C G F T C S A P G H E C C T W T L G D K Y P V A P G T A C A T D V D K S I Q C T R H G V F P C G E G  172
173  S S C C D I C W S G G A C C K H E Y G H F A C G K S S C C G D V C A M P G S K C C V K H G T H Y F P V K A T C V G  256
257  S S C C D I C W S G G A C C K H E Y G H F A C G K S S C C G D V C A M P G S K C C V K H G T H Y F P V K A T C V G  319

```

図 4. *AtCRP* の繰り返し構造。赤いボックスはシステイン残基を示す。

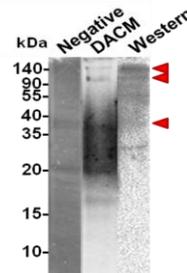


図 5. *A. tamarense* の培養上清のネガティブ染色、DACM 染色および抗 *AtCRP* 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果。

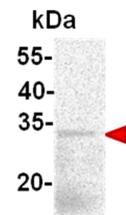


図 6. *K. lactis* で発現させた *AtCRP* 組換え体のウェスタンブロット解析の結果。

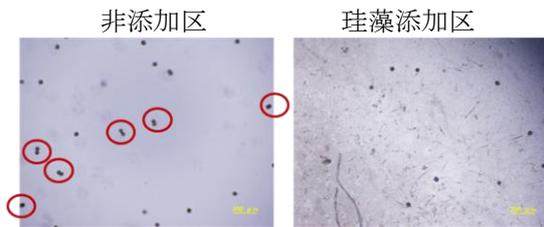


図7. *C. didymus* 近縁種と共培養を行った結果. 円内の細胞は2連鎖細胞を示す.

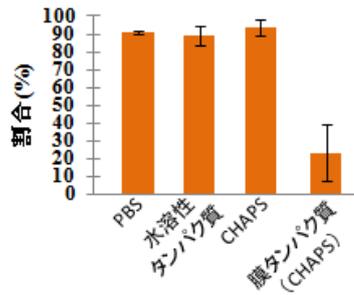


図8. 珪藻の抽出タンパク質を添加して培養した際の *A. tamarense* 連鎖細胞の割合.

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

- ① 金澤理絵・西澤孝太郎・小檜山篤志・山田雄一郎・緒方武比古, 渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* のシステインリッチタンパク質 AtCRP に関する研究, 平成24年度日本水産学会東北支部大会, 2012年11月02日~2012年11月03日, 青森県青森市ウエディングプラザアラスカ B1F サファイア.
- ② 金澤理絵・西澤孝太郎・小檜山篤志・山田雄一郎・緒方武比古, 渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* AtCRP の発現解析と組換え体の作製, 平成25年度日本水産学会春季大会, 2013年3月26日~2013年3月30日, 東京海洋大学品川キャンパス.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小檜山 篤志 (KOBIYAMA ATSUSHI)  
北里大学・海洋生命科学部・准教授  
研究者番号: 60337988

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし