

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450253

研究課題名(和文) 沿岸性珪藻タネ細胞における光合成を介した発芽誘導機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of light-induced germination in resting spores of a coastal diatom

研究代表者

紫加田 知幸 (Shikata, Tomoyuki)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・研究員

研究者番号：40603048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、沿岸性珪藻の休眠期細胞が受光後にどのような細胞内の生化学反応を経て発芽誘導されるかを解析した。その結果、休眠孢子は受光直後に上昇すること、休眠孢子は受光前から主たる光合成関連タンパク質を有していて受光後も量的に変化しないこと、ATPaseは受光直後に増加すること、プロテオーム解析により、受光直後にクエン酸回路や糖代謝関連の酵素、その後シグナル伝達や栄養代謝関連の酵素が新たに発現することが明らかとなった。以上の結果より、休眠孢子は受光後、エネルギーを消費しながら栄養代謝等を活性化させて光合成を行い、伸長して脱殻するというシナリオが推察された。

研究成果の概要(英文)：We examined the molecular mechanism of light-induced germination in resting spore of a coastal diatom. Photosynthetic activity of resting spore increased just after light-on. Quantity of photosynthetic proteins scarcely changed after light-on, but ATPase increased. Furthermore, proteome analysis indicated that proteins involved in citric cycle, glycometabolism, signaling and nutritional metabolism are newly expressed after light-on. These results suggest a scenario that the resting spore used energy to activate nutritional metabolism and so on after light-on, and then photosynthesize to elongate and germinate.

研究分野：赤潮藻類の生理生態学

キーワード：赤潮 光 光合成 プロテオーム解析 発芽 休眠孢子

1. 研究開始当初の背景

珪藻類は海域における植物プランクトン群集の主体であり、海洋生態系において最も重要な一次生産者として機能している。多くの珪藻類は休眠期細胞を形成する。休眠期細胞は普段底泥中に存在し、陸上植物の種子と同様の役割を果たすことが知られている(図1)。よって、水中での珪藻類の動態を考える上で、休眠期細胞の発芽は個体群増大の初期過程として特に重要なイベントである。これまでの研究により、ほとんどの珪藻種の発芽は「光」によって誘導されることが明らかとなっている。また、発芽の作用スペクトルや薬理学的解析の結果から、発芽の誘導過程に光合成が関与すると考えられている。しかしながら、それを裏打ちする分子レベルでのストーリーは未だ解明されていない。

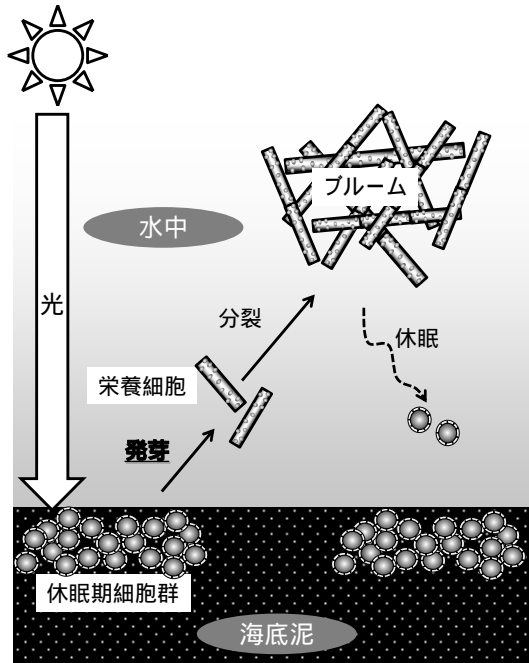


図1 珪藻類の生活史

2. 研究の目的

本研究では、実環境中における珪藻の発芽誘導の分子メカニズムに関する理解の深化を目的とする。具体的には、光合成系研究分野においてモデル生物として扱われている緑藻クラミドモナス等に適用される各種光合成解析法・分子解析手法を導入することにより、光合成を介した珪藻の発芽誘導機構の概要解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、沿岸性珪藻 *Leptocylidrus danicus* (レプトシリンドラス) の休眠期細胞を用い、受光後にどのように光合成系が活性化され、その後どのような細胞内の生化学反応を経て発芽誘導されるかを明らかにすることを旨とした。そのために、下に示す～の項目を実施した。なお、レプトシリンドラスの休眠期細胞は光を8時間以上受光し、その後1～2日かけて細胞を伸長させて脱殻

する(発芽)ことが知られている(図2)。

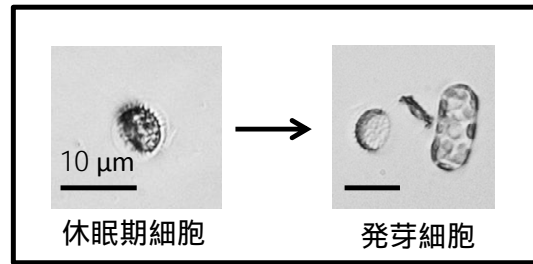


図2 レプトシリンドラスの発芽

[]クロロフィル蛍光変化測定による照射中の光合成系の電子伝達状態と発芽誘導との関係: 光合成蛍光誘導弛緩測定装置 FRe (Stlantic社製)を用いて、照射前後の休眠期細胞の光合成活性を計測した。

[]ウエスタンブロッティング法による照射中の光化学系タンパク質の動態解析: ウエスタンブロッティング法により、照射前後の休眠期細胞について、各種光合成関連タンパク質を定量した。

[]プロテオーム解析による照射中のタンパク質の動態解析: 照射前後の休眠期細胞を回収し、凍結保存(-80℃)した。その後、タンパク質を抽出し、SDS-PAGEにて分離・銀染色し、ゲルの上端から下端まで均等に12分割した。各画分をゲル消化後、質量分析に供した。その後、別途取得したレプトシリンドラスの全 mRNA 配列データを用いて、タンパク質を同定した。

4. 研究成果

まず、休眠期細胞の光合成活性と発芽の関係を明らかにするために、基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用いて、休眠期細胞に波長の異なるいくつかの単色光を8時間(ほとんどの細胞が発芽誘導される)照射し、光合成の各種パラメータの経時変化を調べた。その結果、青色光(440 nm)や赤色光(680 nm)の照射により、照射開始から2～4時間後に LEF で示される光合成活性が急激に

上昇した(図3)。また、もっとも高い光合成活性が認められた青色光下では高い発芽率が得られた。よって、発芽に有効な波長の照射直後に光合成の活性化が起こることが示された。

次に、レプトシリンドラスの休眠期細胞について効率よくタンパク質を抽出する方法を確立した。その後、主要な光合成関連タンパク質について、照射前後の発現量の変化を調べた。暗条件で保存した休眠期細胞に光を照射し、0、0.5、1、2、4、8時間後にサンプリングし、ウエスタンブロッティング法によって各タンパク質を定量した。その結果、休眠期細胞は照射前から主たる光合成関連タンパク質(Fucoxanthin-Chlorophyll a/c Protein [FCP], 光合成反応中心タンパク質[D1, D2], ルビスコタンパク質[RBCL])を有していて、受光後も量的にほとんど変化しないことが判明した(図4)。また、FCPのリン

酸化レベルも計測したが、光照射前後でほとんど変化しなかった。一方で、ATPaseは光照射直後(0.5時間後)に急激に上昇した。

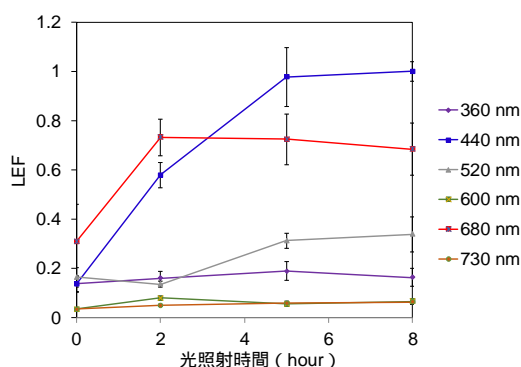


図3 光合成活性の経時変化

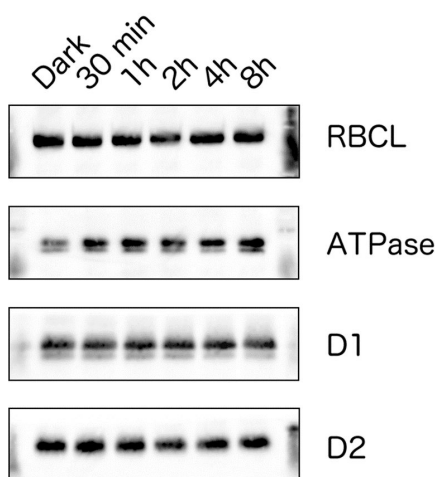


図4 光合成関連タンパク質の経時変化

さらに、プロテオーム解析を実施し、光照射前後でどのようなタンパク質が変動するかを調べた。その結果、光照射1時間後にはクエン酸回路や糖代謝関連の酵素、光照射5時間後にはRNAヘリカーゼ、カルシウムシグナリング、脱リン酸化やリン酸化といったシグナル伝達関連の酵素および硝酸還元酵素が新たに発現していた。

以上の結果を踏まえると、以下のようなストーリーが推察された。「休眠胞子は受光後、光合成活性や栄養塩代謝を活性化させて光合成を行い、エネルギーを産生する。産生したエネルギーを消費しながら転写やシグナル伝達を活発に行って細胞を伸長させ、脱殻する。」ただし、プロテオーム解析で光照射によって変動したタンパク質のほとんどは機能不明であったので、今後、各タンパク質の機能解析を進め、解析結果の全体像を見直す必要がある。

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4件)

Shikata T et al. (2017) Relationships

between light environment and subsurface accumulation during the daytime in the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. Mar Biol 164:18.

Shikata T et al. (2016) Light spectrum regulates cell accumulation during daytime in the raphidophyte *Chattonella antiqua* causing noxious red tides. J Photochem Photobiol B Biol 160: 128-133.

Shikata T et al. (2015) Effects of temperature, salinity, and photosynthetic photon flux density on the growth of the harmful diatom *Asteroplanus karianus* in the Ariake Sea, Japan. Fish Sci 81: 1063-1069.

Onitsuka G, Shikata T et al. (2016) Factors influencing maintenance and decline of a diatom bloom in the Yatsushiro Sea, Japan. J Oceanogr 72: 617-627.

[学会発表](計0件)

[図書](計1件)

紫加田知幸 (2016)「赤潮藻類の生理生態に及ぼす光環境の影響」, 有害有毒プランクトンの科学(今井一郎ほか編) 恒星社厚生閣, 東京. 103 - 109.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紫加田 知幸 (SHIKATA TOMOYUKI)

国立研究開発法人水産研究教育機構・瀬戸内海区水産研究所・研究員

研究者番号: 40603048

(2) 研究分担者

得津隆太郎 (TOKUTSU RYUTARO)
大学共同利用法人自然科学研究機構・基礎
生物学研究所・助教
研究者番号： 60613940