

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450283

研究課題名(和文) 尿素輸送体アイソフォームの機能特性からスサビノリ窒素代謝の分子機構を探る

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism for nitrogen metabolism in *Pyropia yezoensis* based on functional characteristics of the PyDUR3 isoforms associated with urea transport

研究代表者

柿沼 誠 (KAKINUMA, Makoto)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：60303757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：紅藻スサビノリの窒素代謝において、機能特性の異なる3種類の尿素輸送体遺伝子(PyDUR3.1/3.2/3.3遺伝子)が重要な役割を果たしていると考えられる。各遺伝子発現は世代間や栄養環境で大きく変化し、その発現調節に關与する上流領域の部分塩基配列を明らかにした。また、貧栄養環境下でスサビノリ葉状体の尿素・アミノ酸・核酸代謝が大きく変化するが、尿素施肥により各代謝は基底状態に回復すること、一部の代謝物質が生理状態評価に有効であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Three DUR3-like genes (PyDUR3.1/3.2/3.3) with different functional properties, which may be involved in uptake and transport of urea and play important roles in nitrogen metabolism in *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta), have been identified. In this study, expression characteristics of PyDUR3.1/3.2/3.3 depending on the life history phase as well as the nutrient conditions, and partial nucleotide sequences of the upstream regions associated with the regulation of their expression were clarified. Although urea, amino acid, and nucleic acid metabolic pathways in *P. yezoensis* thalli were greatly influenced by nutrient starvation, each metabolism was restored by chemical fertilization using urea. These results indicate that some metabolites involved in the metabolic pathways mentioned above, are effective in evaluating physiological condition of *P. yezoensis* thalli.

研究分野：農学

キーワード：紅藻 スサビノリ 尿素 輸送体 窒素代謝 DUR3遺伝子 色落ち 施肥

## 1. 研究開始当初の背景

食用海藻の中で産業的に最も重要な紅藻スサビノリの生活環は、有性世代である葉状体(配偶体)と無性世代である糸状体(孢子体)の2つの世代からなり、各世代の形態・生理学的特徴は大きく異なっている。食用となるスサビノリ葉状体の養殖(ノリ養殖)は、日本の海面養殖業の重要な位置を占め、その生産量は糸状体から放出させた殻孢子をノリ網に付けて養殖を行う人工採苗法の確立をはじめとした近年の養殖技術の発達・改良、多収種性品種の選抜育種、摘採・加工工程の機械化により飛躍的に増大した。しかしながら、ノリ養殖は気象、海況、水質に大きく影響されるため、依然としてノリ養殖期には多くの病障害が発生し、生産量や品質(商品価値)は不安定なものとなっている。

特に近年、日本各地のノリ養殖場において生産量や品質を著しく低下させる色落ち現象が頻発し、ノリ養殖業に甚大な被害をもたらしている。色落ちは、海水中の栄養塩類(特に溶存無機態窒素)の減少によりスサビノリ葉状体が退色・黄褐色化する現象で、色落ち葉状体では色調に関わるタンパク質色素(フィコビリタンパク質)含量や、品質に関わる生体成分(遊離アミノ酸、ヌクレオチドとその関連化合物)含量の著しい低下が認められ、スサビノリ葉状体は貧栄養環境下での生存・生長に、これら生体内の含窒素成分を分解・利用していると考えられる。しかしながら、葉状体の窒素代謝機構と色落ち発症の生理・分子機構のみならず、形態・生理的特徴が葉状体と大きく異なる糸状体の窒素代謝特性も未だ十分に理解されていない。したがって、ノリ養殖場における色落ち発症の早期予測、効果的な色落ち回復手法の開発、貧栄養耐性品種の効率的な選抜育種や特性評価などの抜本的な色落ち対策や、ノリ養殖種苗(ノリ網)の品質や有用品種の種苗管理の高度化を進めるためには、スサビノリ各世代(葉状体および糸状体)の窒素代謝特性、色落ち発症・回復の分子機構を理解する必要がある。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、海水中の溶存無機態窒素の変化に応答して発現変動するスサビノリ葉状体の遺伝子について調べ、2種類の尿素輸送体遺伝子(*PyDUR3.1/3.2*遺伝子)が貧栄養環境下におけるスサビノリ葉状体の窒素代謝や適応・生存戦略に重要な役割を果たしている可能性を示した。また、スサビノリの発現配列タグ(EST)データと*PyDUR3.1/3.2*遺伝子配列データの比較により、第3の尿素輸送体遺伝子(*PyDUR3.3*遺伝子)の存在を見出した。さらに、cDNAクローニングによる一次構造解析や判定量PCRによる遺伝子発現解析により、*PyDUR3.1/3.2/3.3*アイソフォームの構造が大きく異なること、各*PyDUR3*遺伝子発現がスサビノリの世代間で異なる可能

性を示した。

スサビノリを含む藻類や陸上植物が主に利用する窒素源は、無機態窒素の硝酸イオンとアンモニウムイオンであり、これらは細胞膜に存在する特定の輸送体によって細胞内に輸送(吸収)される。一方で我々は、スサビノリ葉状体が無機態窒素のみならず一部の有機態窒素も効率よく吸収・利用すること、色落ち葉状体の色調・生理状態の回復には尿素や特定のアミノ酸による施肥が有効であることを明らかにしている。したがって、スサビノリは無機態窒素と同様に特定の有機態窒素を代謝し、その分子機構には尿素輸送体(*PyDUR3*)アイソフォームの機能特性が深く関与していると考えられる。スサビノリ尿素代謝の分子機構の把握、すなわち生長・生存戦略の基幹となる窒素化合物輸送・代謝の分子機構や、色落ち発症と施肥による色落ち回復の生理・分子機構の解明には、*PyDUR3*アイソフォームの細胞内機能や、栄養環境特異的ならびに世代特異的な*PyDUR3*遺伝子の発現調節機構を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、リアルタイムPCRシステムを利用した*PyDUR3.1/3.2/3.3*遺伝子の発現特性解析、各種遺伝子導入・発現系を利用した*PyDUR3*アイソフォームの細胞内機能解析、各*PyDUR3*遺伝子上流領域の配列・構造解析、メタボローム解析(代謝物質解析)を主軸とし、スサビノリの尿素代謝特性に関わる3種類の*PyDUR3*遺伝子の細胞内機能や発現調節機構を明らかにすると共に、色落ち発症の予測・抑制・回復法の開発や種苗管理の高度化に繋がる分子マーカーを特定することを目的として本研究を実施した。

## 3. 研究の方法

(1)スサビノリ葉状体および糸状体における*PyDUR3*遺伝子の発現特性解析

栄養補強海水培地(PES培地)を用いて通常培養した葉状体と糸状体を、窒素源を除いたPES培地(PES-N培地)に移して色落ちを誘導した。さらに、色落ち葉状体に対しては無機態窒素(硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム)や色落ち回復効果が認められる有機態窒素(尿素、アルギニンなど)を施肥し、色落ち回復培養を行った。

培養調製した各試料(通常、色落ち、色落ち回復)から全RNAを抽出し、ランダムプライム法によりリアルタイムPCR用cDNAを調製した。リアルタイムPCR用cDNAを鋳型とし、*PyDUR3.1/3.2/3.3*遺伝子発現を特異的に検出するプライマー・プローブセットを用いてリアルタイムPCR解析を行い、各*PyDUR3*遺伝子の世代間や各種栄養条件における発現特性を調べた。

(2)遺伝子導入・発現系を利用した*PyDUR3*アイソフォームの細胞内動態解析

一次構造解析の結果から、各*PyDUR3*アイソフォームは構造の異なる膜局在型タンパ

ク質であると推測されているが、スサビノリ細胞内のどの膜構造に局在して機能しているかは不明であった。そこで、各 *PyDUR3* 遺伝子 cDNA と緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*GFP* 遺伝子) cDNA を連結後、酵母、陸上植物、スサビノリ葉状体内で構成発現する遺伝子プロモーター (酵母・アルコール脱水素酵素遺伝子プロモーター *ScADH1-Pro*, 植物感染カリフラワーモザイクウイルス・35S RNA 遺伝子プロモーター *CaMV35S-Pro*, スサビノリ・アクチン遺伝子プロモーター *PyAct-Pro*) 下流に挿入し、*GFP* 融合 *PyDUR3* 発現ベクターを構築した。

酵母用 *GFP* 融合 *PyDUR3* 発現ベクターについては酢酸リチウム法により出芽酵母に、植物用およびスサビノリ用 *GFP* 融合 *PyDUR3* 発現ベクターについてはパーティクルデリバリー法によりタマネギ表皮細胞あるいはスサビノリ葉状体・栄養細胞に導入した。各細胞内で発現させた *GFP* 融合 *PyDUR3* の蛍光を蛍光顕微鏡下で観察し、各 *PyDUR3* アイソフォームの細胞内動態を調べた。

#### (3) 酵母発現系を利用した *PyDUR3* アイソフォームの細胞内機能解析

細胞内動態解析に用いた酵母用 *GFP* 融合 *PyDUR3* 発現ベクターを出芽酵母の野生株 (BY4742) および *DUR3* 遺伝子欠損株 (YHL016c) に導入し、得られた形質転換酵母を唯一の窒素源として硫酸アンモニウムまたは尿素を含む培地上で生育させ、遺伝子相補試験を行った。

#### (4) *PyDUR3* 遺伝子上流領域の塩基配列解析

スサビノリ葉状体からゲノム DNA (gDNA) を抽出・精製し、GenomeWalker Universal Kit を用いて GenomeWalker ライブラリー (GWL) を構築した。また、*PyDUR3.1/3.2/3.3* 遺伝子の塩基配列情報を基に、第 1 エクソン内で各 *PyDUR3* 遺伝子特異的な PCR プライマーを設計した。構築した GWL を鋳型とし、各 *PyDUR3* 遺伝子特異的な PCR プライマーを用いて PCR を行い、各 *PyDUR3* 遺伝子上流領域をコードする gDNA のクローニングを行った。gDNA クローンの塩基配列を決定後、NNPP v2.2 プログラム、PlantRegMap プログラムなどを利用して、プロモーター領域や転写因子結合領域などのシスエレメントについて調べた。

#### (5) メタボローム解析によるスサビノリ尿素代謝機構の解明

スサビノリ葉状体は無機態窒素のほか、尿素や特定のアミノ酸などの有機態窒素も効率よく吸収・利用すること、有機態窒素の中で特に尿素が色落ち葉状体の色調や生理状態の施肥回復に有効であることが示されているが、スサビノリ葉状体の尿素代謝機構の詳細は不明であった。そこで、PES 培地を用いて通常培養した葉状体を、PES-N 培地に移して色落ち誘導した。さらに、色落ち葉状体に対して尿素を施肥し、色落ち回復培養を行った。

培養調製した通常、色落ち、色落ち回復葉

状体につき、含水有機溶媒抽出、除タンパク・除多糖処理、限外濾過処理を行い、各葉状体の無細胞抽出液を調製した。各無細胞抽出液をキャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析 (CE-TOF MS) システムを利用したメタボローム解析に供し、葉状体の尿素代謝経路、生理状態の把握・評価や色落ち発症・回復評価に有効な分子マーカー (代謝物質マーカー) について調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) スサビノリ葉状体および糸状体における *PyDUR3* 遺伝子の発現特性解析

リアルタイム PCR により、通常培養、色落ち誘導培養した葉状体および糸状体における *PyDUR3.1/3.2/3.3* 遺伝子の発現変化を調べた。18S rRNA を内部標準とし、検量線法により通常培養葉状体における *PyDUR3* 遺伝子発現に対する相対発現量を調べたところ、*PyDUR3.1* 遺伝子は両世代で発現しているが、葉状体よりも糸状体で発現レベルが高く、いずれの世代においても貧栄養環境で発現誘導される傾向 (通常培養葉状体の 1.5~3.0 倍) が認められた。一方、*PyDUR3.2* 遺伝子は貧栄養環境下の葉状体で著しく発現誘導されるが (通常培養葉状体の 27.6 倍)、糸状体での発現は認められなかった。また、*PyDUR3.3* 遺伝子については栄養環境に関わらず、糸状体特異的な発現性 (通常培養葉状体の 340~480 倍) が認められた。

*PyDUR3* アイソフォームの演繹アミノ酸配列を基にした分子系統解析や *PyDUR3* 遺伝子の部分塩基配列解析の結果、*PyDUR3.1* 遺伝子と *PyDUR3.2/3.3* 遺伝子の間に明らかな系統的差異が認められている。したがって、*PyDUR3.1/3.2/3.3* 遺伝子の機能は大きく異なり、特に *PyDUR3.2/3.3* 遺伝子は機能的あるいは世代特異的に分化したパラログ遺伝子であると考えられた。

次に、栄養環境に応じて葉状体で発現変動する *PyDUR3.1/3.2* 遺伝子につき、色落ちと各種窒素源の施肥による色落ち回復過程における発現応答性について調べた。その結果、貧栄養条件下の葉状体で発現誘導された *PyDUR3.1/3.2* 遺伝子は、無機態窒素や尿素的施肥によって概ね基底発現レベルに戻ることが確認されたが、アミノ酸 (アルギニンなど) の施肥では比較的高い発現レベルに維持されていた。したがって、葉状体における *PyDUR3.1/3.2* 遺伝子発現は栄養環境 (特に無機態窒素や尿素) に応じた制御を受けている可能性が考えられた。

##### (2) 遺伝子導入・発現系を利用した *PyDUR3* アイソフォームの細胞内動態解析

*PyDUR3* 遺伝子 cDNA および *GFP* 遺伝子 cDNA を利用して、酵母用 *GFP* 融合 *PyDUR3* 発現ベクター (pAUR-*PyDUR3/GFP*)、植物用 *GFP* 融合 *PyDUR3* 発現ベクター (p35S-*PyDUR3/GFP*)、スサビノリ用 *GFP* 融合 *PyDUR3* 発現ベクター (pAct-*PyDUR3/GFP*) を構築した。

各発現ベクターをそれぞれ、酵母、タマネギ表皮細胞、スサビノリ葉状体に導入後、GFP 蛍光を指標として各 *PyDUR3* の細胞内動態を観察したところ、いずれの発現系においても *PyDUR3* の細胞膜への局在が認められた。したがって、*PyDUR3* アイソフォームは細胞膜局在型輸送体であり、尿素の取込みに重要な役割を果たしている可能性が考えられた。また、酵母を利用した異種発現系により、*PyDUR3* の細胞内機能解析が可能であることが示唆された。

#### (3) 酵母発現系を利用した *PyDUR3* アイソフォームの細胞内機能解析

まず、酵母用 GFP 融合 *PyDUR3* 発現ベクター (pAUR-*PyDUR3*/GFP) を用いて、野生型酵母 (BY4742) および *DUR3* 遺伝子欠損型酵母 (YHL016c) を形質転換し、各形質転換体を硫酸アンモニウムまたは尿素を唯一の窒素源とする培地に塗布して生育させ、遺伝子相補性を調べた。硫酸アンモニウムを窒素源とした培地では、野生型および *DUR3* 遺伝子欠損型酵母の形質転換体の生育に差は認められなかったが、尿素を窒素源とした培地では両形質転換体の生育に大きな差が認められ、酵母 *DUR3* 遺伝子欠損に対して *PyDUR3* 遺伝子は相補機能を発揮しなかった。

形質転換に用いたのは GFP 融合 *PyDUR3* 発現ベクターであったため、GFP が発現 *PyDUR3* の機能阻害を起こしている可能性が考えられた。そこで、GFP 融合 *PyDUR3* 発現ベクターから GFP 遺伝子 cDNA を除去し、新たに *PyDUR3* 発現ベクター (pAUR-*PyDUR3*) を構築した。pAUR-*PyDUR3* を用いて野生型酵母 (BY4742) および *DUR3* 遺伝子欠損型酵母 (YHL016c) を形質転換し、遺伝子相補の再試験を行ったが、明確な遺伝子相補結果は得られなかった。

陸上植物 *DUR3* の細胞内機能解析には、本研究で用いた酵母とは遺伝型が異なる野生型酵母 (23346c) および *DUR3* 遺伝子欠損型酵母 (YNVW1) が利用されている。現在、*PyDUR3* アイソフォームの細胞内機能を明らかにするために、酵母用発現ベクター pAUR-*PyDUR3* と酵母株 (23346c および YNVW1) を用いた遺伝子相補試験に取り組んでいる。

#### (4) *PyDUR3* 遺伝子上流領域の塩基配列解析

構築した GWL を鋳型とし、各 *PyDUR3* 遺伝子特異的な PCR プライマーを用いて PCR を行ったところ、*PyDUR3.1* 遺伝子については約 3.6 kbp、*PyDUR3.3* 遺伝子については約 2.8 kbp の gDNA 断片の増幅が確認されたが、*PyDUR3.2* 遺伝子については gDNA 断片の増幅はみられなかった。

*PyDUR3.1/3.3* 遺伝子の増幅 gDNA 断片を pT7Blue-T ベクターにクローン化して、p*PyDUR3.1*-GE および p*PyDUR3.3*-GE を得た。各 gDNA クローンの塩基配列を決定し、既知 *PyDUR3.1/3.3* 遺伝子の部分塩基配列情報と比較した。その結果、*PyDUR3.1* 遺伝子の転写開始点は開始コドンから 356 bp 上流と推測

され、約 3.0 kbp の 5' 上流領域の塩基配列を明らかにすることができた。一方、*PyDUR3.3* 遺伝子の転写開始点は開始コドンから 185 bp 上流と推測され、約 2.5 kbp の 5' 上流領域の塩基配列を明らかにすることができた。

*PyDUR3.1/3.3* 遺伝子上流領域のシスエレメント解析の結果、約 -280 ~ -2220 bp の領域に複数のシスエレメント (BES1, bHLH, bZIP, C2H2, CAMTA, ERF, FAR1, LBD, MYB, TCP) が見出された。両遺伝子に共通の ERF および LBD は、*PyDUR3.1* 遺伝子では約 -580 ~ -980 bp、*PyDUR3.3* 遺伝子では約 -280 ~ -1040 bp に集中していた。一方、*PyDUR3.1* 遺伝子特異的なシスエレメント (C2H2, CAMTA, FAR1, MYB, TCP) は約 -390 ~ -630 bp と約 -1040 ~ -1360 bp に、*PyDUR3.3* 遺伝子特異的なシスエレメント (BES1, bHLH) は約 -2200 ~ -2220 bp にみられた。*PyDUR3.1* 遺伝子は葉状体と糸状体の両世代で発現しているが、葉状体よりも糸状体で発現レベルが高く、いずれの世代でも貧栄養環境で発現誘導される。一方、*PyDUR3.3* 遺伝子は糸状体特異的な発現性を示す。両遺伝子の発現特性の差異には、各遺伝子特異的に存在するシスエレメントが関与していると考えられた。

#### (5) メタボローム解析によるスサビノリ尿素代謝機構の解明

通常、色落ち、尿素施肥による色落ち回復葉状体のメタボローム解析により、計 181 物質 (カチオン 93, アニオン 88) が検出・同定された。主成分分析および階層的クラスタリング解析の結果から、スサビノリ葉状体の代謝特性は栄養環境によって著しく変化することが明らかとなった。

通常、色落ち、色落ち回復葉状体で同定された代謝物質の検出ピークについて相対面積比較を行ったところ、色落ちにより尿素回路 (オルニチン、シトルリンの減少)、アミノ酸代謝 (アスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、グリシン、グルタミン、グルタミン酸、セリンの減少、分岐鎖アミノ酸と芳香族アミノ酸の増加)、核酸代謝 (イノシン、ヒポキサンチン、グアノシン、ウリジンの増加) が大きく変化するが、尿素の施肥により各代謝物質は基底状態に戻ることが分かった。スサビノリ葉状体は、通常環境下で特定のアミノ酸 (アスパラギン酸、アラニン、グルタミン酸、タウリン) を蓄積する。色落ちにより蓄積アミノ酸の減少や、ヌクレオチド関連化合物の増加 (ヌクレオチドの分解) が認められたことから、これら含窒素化合物が貧栄養環境下での生存・生長に利用されていることが明らかとなった。また、通常、色落ち、色落ち回復葉状体の間で大きな変動が認められた代謝物質は、葉状体の生理状態評価、色落ち発症や色落ち回復の評価に有効と考えられた。なお、通常および色落ち葉状体で尿素は検出限界以下であったが、尿素施肥後の色落ち回復葉状体では尿素の蓄積が認め

られた。したがって、貧栄養環境下のスサビノリ葉状体は、尿素を能動的に取込み窒素代謝に利用していることが考えられ、細胞外尿素の取込みや細胞内尿素の輸送に *PyDUR3* アイソフォームが深く関わっている可能性が示唆された。

#### 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1件)

Kakinuma M, Suzuki K, Iwata S, Coury DA, Iwade S, Mikami K. Isolation and characterization of a new *DUR3*-like gene, *PyDUR3.3*, from the marine macroalga *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). *Fish. Sci.* 82 (1), 171-184 (2016), 査読有.  
DOI: 10.1007/s12562-015-0947-7

[学会発表](計4件)

柿沼 誠, 鈴木康平, 岩田晋太郎, 岩出将英, 三上浩司. アマノリ類の栄養環境応答・適応に関わる遺伝子の解析(シンポジウム, アマノリ研究における基礎生物学的視点の涵養). 第18回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2016年5月29日, 北海道大学函館キャンパス(北海道函館市).

岩田晋太郎, 鈴木康平, 三上浩司, 柿沼 誠. 紅藻スサビノリ尿素輸送体の細胞内局在解析. 平成27年度日本水産学会春季大会, 2015年3月28日, 東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区).

Kakinuma M, Iwade S, Suzuki K, Iwata S. Disorders induced by environmental stress in *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). Sixth Bilateral Seminar Italy and Japan, Physiological and Chemical Impacts on Marine Organisms: Supporting Blue Growth in Meaningful Mutual Symbiosis with the Marine Environment, 2014年11月20日, Are della Ricerca del CNR(Palermo, Italy).

鈴木康平, 岩田晋太郎, 三上浩司, 柿沼 誠. 紅藻スサビノリ尿素輸送体遺伝子(*PyDUR3* 遺伝子)の発現・構造解析. 平成26年度日本水産学会秋季大会, 2014年9月20日, 九州大学箱崎キャンパス(福岡県福岡市).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

スサビノリ尿素輸送体遺伝子(*PyDUR3*) cDNA および gDNA の DDBJ/EMBL/GenBank アクセス番号

*PyDUR3.3* cDNA : AB931115

*PyDUR3.1* gDNA : AB933542

*PyDUR3.2* gDNA : AB933541

*PyDUR3.3* gDNA : AB933540

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

柿沼 誠 (KAKINUMA, Makoto)

三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授

研究者番号: 60303757

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者