

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07473

研究課題名(和文) 褐藻切断組織の組織癒合過程におけるオーキシン調節作用の解明

研究課題名(英文) Influence of auxin on the wound-healing process of brown algal tissue

研究代表者

田中 厚子 (Tanaka, Atsuko)

琉球大学・理学部・助教

研究者番号：40509999

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)：本研究は海洋沿岸域の一次生産者である褐藻アミジグサの傷害応答機構の解明を目的として行った。アミジグサに傷害を与えると傷口の癒合が見られることがあるが、植物ホルモンであるオーキシンを添加すると癒合する割合が高くなることから、癒合の過程にオーキシンが関与する可能性が示唆された。そこで傷害直後でオーキシン合成経路遺伝子を含めた遺伝子発現量の変化を解析した。一方でアミジグサとその近縁種には複数のストレス応答性ホルモンが含まれることを発見し、陸上植物とは起源の異なる褐藻類でも植物ホルモンが多様なストレス応答機構に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワカメや昆布に代表される褐藻類を含む大型藻類は日本の食文化に必須であり、食糧の供給、沿岸海洋環境の維持、さらには海洋の炭素固定に寄与する重要な生物群である。我々は大型藻類の特徴である高い再生能力と傷害抵抗性に注目し、そのメカニズムの解明を目的として研究を行った。その結果、褐藻組織の傷害治癒には陸上植物と同様にオーキシンが関与していることが判明し、さらには陸上植物で知られる傷害応答ホルモンの検出にも初めて成功した。これらの結果は多様な生物群に保存される統一的なメカニズムの理解に役立つだけでなく、実際の褐藻養殖現場では技術開発の可能性を広げる有意義な知見であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Present study has attempted to uncover the mechanism of wound reactions in brown alga *Dictyota dichotoma*, which is general component of coastal algal bed. Healing of wounded tissue is often observed after the mechanical wound and the addition of exogenous auxin accelerate the frequency of healing, suggesting that auxin may be involved in the healing process. Therefore, changes in gene expression levels including auxin synthesis pathway genes were analyzed before and after wounding. In addition, we found *D. dichotoma* and related species contained multiple stress-responsive hormones in the natural thalli. Our results may indicate that similar mechanisms with land plants involving plant hormones have been developed also in brown algae, which possess distinct evolutionary history from green lineage.

研究分野：藻類学

キーワード：褐藻 傷害応答 オーキシン 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物にとって組織損傷への対応は個体の生存に関わる重要な機構である。例えばヒトの組織では傷害が認識されると増殖因子やサイトカインによる伝達を経て、線維芽細胞等が損傷部位に集合し、組織を修復する。陸上植物では植物ホルモンが傷害の周辺で細胞分裂や細胞分化を誘導し、組織の修復・再生を行う。動物や陸上植物を中心に、これらの現象が着々と解明されている一方で、同じように多細胞体制を持つ他の分類群(菌類・紅藻・褐藻)での知見は極めて限定的である。しかし実際は、紅藻や褐藻も海洋環境の主要な一次生産者として絶えず摂食や物理的損傷の危機に晒されている。

そこで申請者らは、日本の沿岸に広く分布し、陸上植物とは系統的に全く異なる褐藻アミジグサ(図1 a)を用いた形態的な傷害応答の研究を行ってきた。その過程で、アミジグサも頂芽優勢を示すことや頂端組織が傷害誘導性の分枝形成位置を制御している可能性を既に報告している。さらに傷害組織が癒合(治癒)する現象を海藻類で初めて発見した(未発表)。アミジグサの癒合は、活発な細胞分裂で創傷部を埋めていく陸上植物とは異なり、破壊された細胞直下の無傷の細胞が球形または細長く膨張することで間隙を埋め、欠損部分両端の細胞壁が出会うと細胞壁成分が集積して圧着し、傷害部位を縫い合わせるように癒合することが分かっている(図1 b, c)。さらに通常の培地では癒合する個体の割合が3割程度であるのに対し、オーキシン添加培地では8割以上の個体が癒合することが判明した(図1 d)。

実はオーキシンの傷害組織の癒合に対する関与が、近年シロイヌナズナでも報告されている(Asahina et al. 2011)。陸上植物でも細かい作用機序は未解明だが、アミジグサの場合は細胞の膨張が顕著であることから、オーキシンによる細胞壁の酸性化(酸成長)が関与している可能性もある。褐藻類のオーキシン合成能は *in silico* 解析で支持されているものの(Bail et al. 2010)、機能としては受精卵の発生過程(極形成や分枝形成)に影響することが示唆されるに留まっており(Basu et al. 2002)、アルギン酸が細胞壁の主要成分である褐藻類でも酸成長が起こるのか、についても全く知見がない状態である。

2. 研究の目的

これまでに藻類でオーキシン合成の空間的位置決定に成功した例はなく、さらに生理活性物質が極性を持って移動するという報告はない。アミジグサは解剖学的には均一な細胞層を持つため形態学的に頂端組織を定義することは難しいが、分子生物学的アプローチを併用することで合成部位の同定は可能だと考えている。形態形成の中心的な役割を担うオーキシンの合成部位が解明されれば、癒合現象だけでなく、頂芽優勢の仕組み、傷害誘導性の分枝形成機構、二分枝の維持機構など、その後の形態学的研究は飛躍的に広がる。さらに傷害応答性因子を網羅的に把握することにより、オーキシン以外の傷害応答ホルモンの関与が明らかとなる可能性もある。このような生物学的意義に基づき、本研究は褐藻アミジグサの癒合現象におけるオーキシンの合成、輸送、機能発現までを包括的に理解することを目的として、以下の3つの項目を具体的に掲げた。

- オーキシン合成部位と輸送経路の推定
- 傷害応答因子の抽出と傷害応答性オーキシン合成関連因子の探索
- 傷害応答や傷害組織の癒合におけるオーキシンの役割の推定

3. 研究の方法

(1) サンプルと培養

本研究で褐藻アミジグサ *Dictyota dichotoma* を研究材料とする利点は、アミジグサが培養下でも天然と同じ規則的な二分枝を維持し(図1 a)、横断面は単純な3層構造で二次元的な頂端成長を行うため成長量の測定や形態観察が容易である事である。さらに母藻表面に形成される四分胞子から大量のクローン幼葉を同調的に得られる点や、間接蛍光抗体法や急速凍結置換法など細胞学的な手法が確立されている点も挙げられる。申請者らは、このアミジグサにおける傷害組織の癒合能発見も含め、これまで傷害応答機構についての研究を精力的に行っており[1]、本種は本研究に最適な材料であると考えている。また褐藻類ではシオミドロ *Ectocarpus siliculosus*、マコンブ *Saccharina japonica*、オキナワモズク *Cladosiphon okamuranus* のゲノム情報が公開されており[5,7,8]、本研究ではこれらの情報も活用して研究を進める。本研究で使用する幼葉は高さ 5-8mm、幅 1-2mm で、滅菌カミソリを用いて実体顕微鏡下で藻

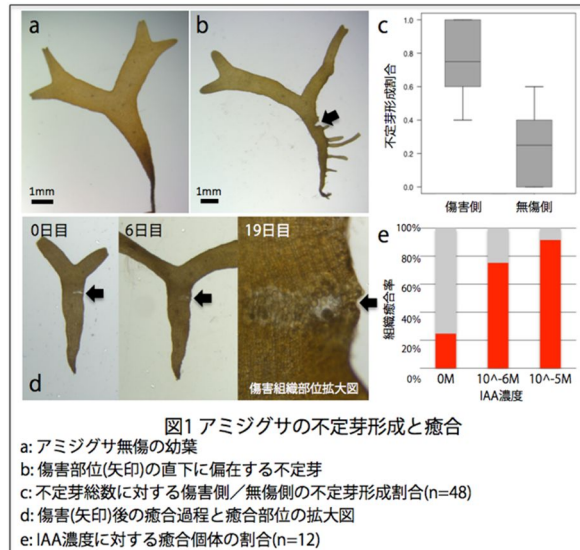


図1 アミジグサの不定芽形成と癒合

- a: アミジグサ無傷の幼葉
- b: 傷害部位(矢印)の直下に偏在する不定芽
- c: 不定芽総数に対する傷害側/無傷側の不定芽形成割合(n=48)
- d: 傷害(矢印)後の癒合過程と癒合部位の拡大図
- e: IAA濃度に対する癒合個体の割合(n=12)

体幅の半分まで切れ込みを入れ、これを傷害とする(図 1d)。形態観察を行う場合はマルチウェルプレートを用いて個体ごとに経時観察を行う。アミジグサの傷害組織の癒合は、傷害を与えてから3日以降に実体顕微鏡で確認できる。

(2)各目標項目に対するアプローチ

目的に掲げた目標項目を達成するため、各項目に対しての手法を示す。

▶ オークシン合成部位と輸送経路の推定

オークシン合成酵素をコードする遺伝子の中でシオミドロとシロイヌナズナで高い相同性が示される遺伝子をクローニングし、その配列をターゲットにした DNA プローブを用いて in situ hybridization 法を行う。さらに培養で得られる複数のクローン個体を部位別に分けて液体窒素で固定した後、UPLC-MS/MS でオークシンの定量を試みる。

▶ 傷害応答因子の抽出と傷害応答性オークシン合成関連因子の探索

クローン個体の幼葉を用いて、無傷/傷害直後/傷害3日後(癒合完了時)の3条件でトランスクリプトーム解析を行う。藻体を液体窒素で凍結させた後、粉末状にし、抽出した RNA を DNases 処理すると共に、rRNA の除去キットを用いて精製する。精製した RNA を用いて、次世代シーケンズで1サンプル当たり4ギガのデータを取得する。アミジグサのゲノム情報がいないため、得られた3サンプル全てのリードを混合してアセンブリーを行い、共通のリファレンス・ライブラリーを作成する。検出されたリードをこのリファレンスにマッピングすると共に、マッピングされたリード数から発現量を推定し、サンプルごとに比較する。

▶ 傷害応答や傷害組織の癒合におけるオークシンの役割の推定

オークシン合成部位の切除による形態的な応答の変化、特に分枝形成と癒合における変化を確認する。具体的には傷害を与えた幼葉をオークシン合成阻害剤等に曝露した後に培養し、傷害組織癒合率からオークシンの傷害組織の癒合への関与の有無を検証する。

4. 研究成果

本研究は総じて計画通りにいかない部分が多く、想定した以上の時間を要した点は深く反省すべき点であった。予想した成果が現時点では得られていない反面、計画段階では想定していなかった天然海藻を用いた実験が順調に進み、ある一定の知見が得られた事は特記すべき点である。以下、計画段階で立てた目標に対する成果を記述すると共に、研究を進める過程で追加された実験結果についても示す。

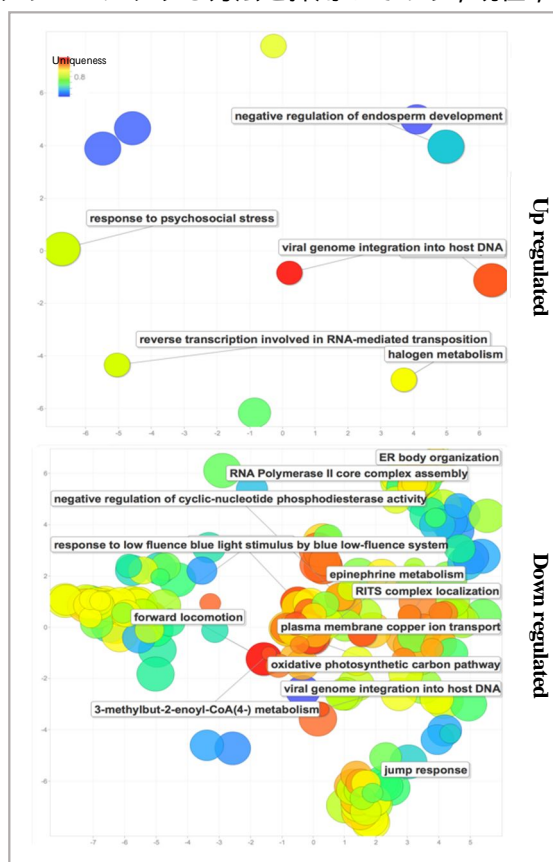
▶ オークシン合成部位と輸送経路の推定

度重なる試行を行ったにも関わらず、予定していたオークシン合成酵素遺伝子のクローニングが上手く進まなかった。現在も原因は不明ではあるが、代替措置として、トランスクリプトーム解析によって得られる膨大な mRNA 配列をスクリーニングする方法を採用しており、現在、より正確な配列決定を試みている最中である。

さらに部位別のオークシン検出を行うため、まずはクローン個体全体を使った UPLC-MS/MS によるオークシンの検出を試みた。検出する際は有傷/無傷の個体を用いたが、有意な値としてオークシンを検出することはできなかった。

▶ 傷害応答因子の抽出と傷害応答性オークシン合成関連因子の探索

クローン個体から同時に発生するクローン幼葉を用いて、有傷/無傷のグループを作り、トランスクリプトーム解析を行った。解析は同一条件・手法で個別に3回行い、それらを合わせて de novo assembly を行っている。ここでは標準的と思われる1回目の結果を示す。傷害によって変化する遺伝子数は8000を超えており、そのうち発現量が増加した遺伝子はたった700程度であった。それに対し、発現抑制されている遺伝子は7000以上であり、傷害によって遺伝子発現のパターンが大きく変化していることが分かった。遺伝子の機能別に分けた図が右図であるが、ストレス応答遺伝子以外にも多くの遺伝子群が変化していた。現在は3回分の試行を合わせた解析を行っており、より明確なパターン解析の結果が得られるはずである。さらに配列情報を用いてオークシンを始めとする植物ホルモン合成遺伝子群の探索も開始している。



➤ 傷害応答や傷害組織の癒合におけるオーキシンの役割の推定

傷害組織の癒合におけるオーキシンの役割については、外因性オーキシンの添加に加えて、オーキシン合成阻害剤の添加が与える影響についても精査した。さらに先行研究で頂芽優勢の保持に不可欠である頂端部分(先端から 0.3mm)を切除することによって、傷害組織の癒合に影響が出るのかについても検証した。その結果、陸上植物では有効とされているオーキシン阻害剤の影響は特に見られなかった。これは薬剤が藻体内へ導入されていないことが原因であるとも考えられるため、固形培地での検証や傷害から阻害剤曝露の時間を短縮するなどの方法を試みたが、現時点では阻害剤の影響は全く確認されていない。頂端組織の切除については、より多くの側芽の形成が見られたが、外因性オーキシンや阻害剤の影響が顕著に見られることはなかった。

➤ 天然藻体を用いた植物ホルモンの探索

前述のように非常に多くの時間を費やして様々なアプローチを試みたものの、傷害組織の癒合に対するオーキシンの作用を解明するための糸口はほとんど見当たらないままであった。そのため、まずは自然環境にいるアミジグサ類の海藻がどのような植物ホルモンを有しているかを知るため、アミジグサ類 8 種について UPLC-MS/MS での解析を行った。その結果、ジャスモン酸をはじめとする傷害応答ホルモンが検出され、海藻類で初出のホルモンまでもが確認できた。その一方で、オーキシンやサイトカイニンの検出はできず、内在性オーキシンの存在は確認できないままであった。

本研究課題の目標であった傷害組織の癒合とオーキシンの関係について得られた知見は現時点では非常に限定的ではあるが、現在も継続的にデータの解析や曝露実験を行っている。支援期間終了後も本研究課題は継続される予定であり、今後の発展を支える礎が得られたことは本研究最大の成果だと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前兼久 郁, 田中 厚子
2. 発表標題 アミジグサの傷害に対する反応と生長
3. 学会等名 日本藻類学会第42回大会
4. 発表年 2018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
研究分担者	松浦 英幸 (Matsuura Hideyuki) (20344492)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	