

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20570059

研究課題名（和文） ハプト藻の円石形成機構の解明 ～cDNA マクロアレイを用いて～

研究課題名（英文） Analysis of calcification mechanism in Haptophyta, using cDNA macroarray

研究代表者

藤原 祥子 (FUJIWARA SHOKO)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30266895

研究成果の概要（和文）：研究室で作製した円石藻 *Pleurochrysis haptanemofera* の cDNA マクロアレイを用いて、核相の異なる円石形成細胞と非形成細胞、石灰化促進条件下の細胞と抑制条件下の細胞、及び近縁種 *P. carterae* の野生株と円石欠損変異株（PS2、PS3）で発現している遺伝子の比較を行った。その結果、カーボニックアンヒドラーゼやケラチン結合タンパク質等の遺伝子ホモログを含む遺伝子が、円石形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：cDNA macroarray analyses were performed in a pair of coccolith-bearing and naked strains of *Pleurochrysis haptanemofera*, cultures grown under various conditions to alter calcification rate, and wild type and coccolith-deficient mutants, PS2 and PS3, of *P. carterae*. The results suggested that genes including those for carbonic anhydrase and keratin-associated protein are involved in coccolith formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：形態・構造・微生物形態

キーワード：石灰化、cDNA アレイ、ハプト藻、円石藻、バイオミネラリゼーション

1. 研究開始当初の背景

円石藻は海洋に広く分布し、中生代白亜紀の石灰岩の形成に寄与したことで知られているが、現在においても海洋全体で年間約1億トン以上の CO₂ を炭酸カルシウムとして沈着していると見積もられている。このように円石藻は生態学的にも地球科学的にも重要な意味をもつ藻類である。

円石形成機構については、主に *Emiliania* と *Pleurochrysis* を材料として電子顕微鏡観察に基づく細胞学的研究が行われてきた。円

石に含まれる酸性多糖類については、オランダ・ライデン大 Westbroek、U.S.A.・テキサス大 Marsh、東京学芸大 尾崎氏（現東京大）、岡崎氏らにより構造と性質・局在性に関する研究が行われてきた。申請者らも *Pleurochrysis* の酸性多糖に着目し、蛍光標識レクチンとセルソーターを用いて細胞表面上の酸性多糖を検出する系を作り、種々の株で分析を行ってきた。また円石形成機構解明へのアプローチは微化石学者のグループ（U.K.・国立歴史博物館 Young ら）においても

なされているが、遺伝子レベルでの解析はこれまでほとんど行われていなかった。

申請者らは、石灰化関連遺伝子を同定することを目的として、*Pleurochrysis* から円石形成細胞と非形成細胞（生活環の中の異なる stage の細胞）を単離し、これらの細胞の poly(A)⁺ RNA mixture を用いて均一化 cDNA ライブラリーを作製し、9,550 個のランダム・クローンからなるマクロアレイを作製した。そしてまず、円石形成細胞と非形成細胞のマクロアレイ解析により、円石形成細胞特異的発現遺伝子の探索から着手したところであった。

2. 研究の目的

本研究では、海産性微細藻類による石灰化機構の解明とその利用を目指し、円石藻の円石形成機構に関与する遺伝子の単離・同定を行なう。具体的には、さらに種々の円石欠損変異株や生理条件（石灰化促進条件や抑制条件）でのマクロアレイ解析を行い、円石形成関連遺伝子を絞り込んで行くとともに、それらの遺伝子産物の機能や局在性について同定を進める。

3. 研究の方法

(1) 種々の細胞を用いたマクロアレイ解析：これまで用いてきた円石形成細胞と非形成細胞は、円石藻の生活環の中の stage の異なる細胞 (①) であるので、円石形成以外の stage 特異的遺伝子発現も含めて検出している可能性がある。そこでこれら以外の種々の細胞 (②、③) もあわせて用いることにより、石灰化関連遺伝子の絞り込みを行った。

② 石灰化促進条件もしくは抑制条件においた細胞：NaHCO₃ を添加した場合やリンなどの栄養塩を欠乏させた場合の石灰化速度に対する影響を調べ、影響を受ける生理条件下においた細胞を用いて解析を行った。

③ 円石欠損変異株：3 タイプの酸性多糖 (PS-1, -2, -3) のうち、2 タイプについては欠損株が報告され円石の形態異常も報告されている (Marsh and Dickinson, 1997; Marsh et al. 2002)。Marsh から入手したこれらの株について解析を行った。

そして、円石形成株もしくは円石形成条件で特異的に発現している遺伝子の塩基配列を決定し、相同性検索から機能の推定、発現パターンの解析を行なった。

(2) 酸性多糖の円石内における局在性、結合の強さに関する解析：円石形成に重要な働きをしていると考えられる酸性多糖の円石内における局在性についても、検討を行った。様々な pH で CaCO₃ の結晶を溶解させた後ウレア等の変性剤で処理を行い、抽出される酸性多糖の定量、電気泳動、抗体 (Ph-PS-2 抗体)

による検出、及び円石の形態の観察（走査型電子顕微鏡観察、ナノサーチ顕微鏡観察）を行った。

4. 研究成果

(1) 種々の細胞を用いたマクロアレイ解析：研究室で作製した円石藻 *Pleurochrysis haptonemofera* の cDNA マクロアレイを用いて、①核相の異なる円石形成細胞と非形成細胞、②石灰化促進条件下の細胞と抑制条件下の細胞、及び③近縁種 *P. carterae* の野生株と円石欠損変異株 (PS2、PS3) で発現している遺伝子の比較を行った。

①③ ①で得られた円石形成細胞で発現比が高い (3倍以上) 遺伝子 54 個のうち、PS3 株で発現比が低い遺伝子として、カーボニックアンヒドラーゼやケラチン結合タンパク質の遺伝子ホモログを含む 18 個が見出された。このうち 12 個は PS2 株でも発現比が低く、これらの遺伝子が円石形成に関与している可能性が示唆された。

②石灰化に対する Ca²⁺、Mg²⁺ などの濃度の影響を検討し、石灰化促進・抑制条件を設定した。石灰化抑制条件で発現比が低い遺伝子のうち、低 Ca 条件で発現比が低いものは光合成関連遺伝子などであったのに対し、円石の形態及び酸性多糖 (Ph-PS-1, 2, 3) の量比に異常がみられる低 Ca 高 Mg 条件では、GFP-mannose 3, 5-epimerase 遺伝子などの発現比が低くなっていた。

(2) 酸性多糖の円石内における局在性、結合の強さに関する解析：様々な pH で CaCO₃ の結晶を溶解させた後ウレア処理を行うことにより、Ph-PS-1 は円石の表面に、Ph-PS-3 はそのやや内側に、Ph-PS-2 は結晶内部にも存在していることが明らかとなった。また、Ph-PS-2 抗体を用いた検出により、Ph-PS-2 は結晶内部にも円石表面にも存在し円石に強く結合していることが示された。これらの結果により、Ph-PS-2 は結晶核の形成に、Ph-PS-3 は結晶の成長に関与しているという変異株の観察に基づく仮説 (Marsh 2003) が強く支持された。

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 10 件)

- ① Izumo, A., S. Fujiwara, T. Sakurai, S. G. Ball, Y. Ishii, H. Ono, M. Yoshida, N. Fujita, Y. Nakamura, A. Buléon and M. Tsuzuki: Effects of granule-bound starch synthase I-defective mutation on the morphology and structure of pyrenoidal starch in *Chlamydomonas*. *Plant Sci.* 180: 238-45. (2011), PMID: 21421366

- ② Miyashita, S., S. Fujiwara, M. Tsuzuki and T. Kaise: Rapid biotransformation of arsenate into oxo-arsenosugars by a freshwater unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 522-30. (2011), PMID: 21389618
- ③ Hirabaru, C., A. Izumo, S. Fujiwara, Y. Tadokoro, T. Shimonaga, M. Konishi, M. Yoshida, N. Fujita, Y. Nakamura, M. Yoshida, T. Kuroiwa and M. Tsuzuki: The primitive rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* contains a semiamylopectin-type, but not an amylose-type α -glucan. *Plant Cell Physiol.* 51: 682-93. (2010), PMID: 20385610
- ④ Suzuki, E., H. Ohkawa, K. Moriya, T. Matsubara, Y. Nagaike, I. Iwasaki, S. Fujiwara, M. Tsuzuki and Y. Nakamura: Carbohydrate metabolism in the mutants of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 defective in glycogen synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3153-9. (2010), PMID: 20363800
- ⑤ Katagiri, F., Y. Takatsuka, S. Fujiwara and M. Tsuzuki: Effects of Ca and Mg on growth and calcification of the coccolithophorid *Pleurochrysis haptoneofera*: Ca-requirement for cell division in coccolith-bearing cells and for normal coccolith-formation with acidic polysaccharides. *Mar. Biotechnol.* 12: 42-51. (2010), PMID: 19444518
- ⑥ Hirokawa, Y., S. Fujiwara, M. Suzuki, T. Akiyama, M. Sakamoto, S. Kobayashi and M. Tsuzuki: Structural and physiological studies on the storage β -polyglucan of haptophyte *Pleurochrysis haptoneofera*. *Planta* 227: 589-599. (2008), PMID: 17940796
- ⑦ Shimonaga, T., M. Konishi, Y. Oyama, S. Fujiwara, A. Satoh, N. Fujita, C. Colleoni, A. Buléon, J.-L. Putaux, S. G. Ball, A. Yokoyama, Y. Hara, Y. Nakamura and M. Tsuzuki: Variation in storage α -glucans of the Porphyridiales (Rhodophyta). *Plant Cell Physiol.* 49: 103-116. (2008), PMID: 18079144

[学会発表] (計 17 件)

- ① 遠藤博寿、笠島大貴、藤原祥子、都筑幹夫、猿渡和子、小暮敏博、長澤寛道: 円石藻 *Pleurochrysis carterae* におけるココリス形成の分子生物学的解析. 第 6 回バイオミネラルゼーションワークショップ (東京) 2011/12.
- ② 笠島大貴、遠藤博寿、長坂征治、藤原祥子、都筑幹夫、長澤寛道: 円石藻のコクリスの有機基板に含まれるタンパク質の同定と発現解析. 第 5 回バイオミネラルゼーションワークショップ (東京) 2010/11.
- ③ 藤原祥子: 海産性植物プランクトン、円石

藻の石灰化 (ココリス形成). 第 4 回バイオミネラルゼーションワークショップ (東京) 2009/12 (特別講演).

- ④ 高塚由紀子、藤原祥子、須田邦裕、中島大輔、岡崎孝映、柴田大輔、田畑哲之、都筑幹夫: 円石藻 *Pleurochrysis haptoneofera* の円石形成関連遺伝子の網羅的解析と環境因子の影響. 第 12 回マリンバイオテクノロジー学会 (東京) 2009/5.
- ⑤ 高塚由紀子、藤原祥子、片桐史朗、柴田大輔、田畑哲之、都筑幹夫: 円石藻 *Pleurochrysis haptoneofera* の石灰化に及ぼす環境因子の影響. 日本藻類学会第 33 回大会 (那覇) 2009/3.
- ⑥ 高塚由紀子、藤原祥子、片桐史朗、須田邦裕、柴田大輔、田畑哲之、都筑幹夫: 円石藻 *Pleurochrysis* の石灰化における 2 価金属イオンと重炭酸イオンの影響. 第 3 回バイオミネラルゼーションワークショップ (東京) 2009/12.
- ⑦ 藤原祥子、広川安孝、高塚由紀子、須田邦裕、浅水恵理香、高柳賢利、柴田大輔、田畑哲之、都筑幹夫: マクロアレイを用いた円石藻の円石形成細胞特異的発現遺伝子の網羅的解析. 第 11 回マリンバイオテクノロジー学会大会 (京都) 2008/5 (論文賞授賞講演).

[図書] (計 3 件)

- ① Miyashita S., K. Kondo, M. Tsuzuki and S. Fujiwara: Arsenic metabolism in cyanobacteria. In *Cyanobacteria: Toxicity, Ecology and Management* (Eds.: &, ISBN:), Nova Science Publishers, Inc., in press.
- ② 藤原祥子、都筑幹夫: 藻類ハンドブック (渡邊信監修)、第 2 章 代謝と物質、第 1 節 代謝と物質、5 糖類—デンプン他、株式会社エヌ・ディー・エス、in press.
- ③ Fujiwara, S. and M. Tsuzuki: Coccolith formation in the Haptophyta. In *Marine Phytoplankton* (Eds.: Kersey, W. T. & S. P. Munger, ISBN: 978-1-60741-087-4), Nova Science Publishers, Inc., (2009).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 祥子 (FUJIWARA SHOKO)
東京薬科大学・生命科学部・准教授
研究者番号: 30266895

(2) 研究分担者

都筑 幹夫 (TSUZUKI MIKIO)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号: 70155430

(3) 連携研究者
なし