

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770276

研究課題名(和文) 蛍光標識法を用いた光合成ウミウシ体内における植物由来オルガネラの動態解析

研究課題名(英文) Dynamics analysis of the fluorescently labeled algal organelle incorporated in photosynthetic sea slug cell

研究代表者

松尾 充啓 (Matsuo, Mitsuhiro)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：70415298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：貝殻を持たない貝の仲間であるウミウシにおいては、餌である藻類から葉緑体を盗みとり、自身の細胞に埋め込んで光合成を行う変わりものがある。本研究では、この光合成ウミウシの盗葉緑体现象を詳細に解析するため、ウミウシの餌である多核緑藻類ハネモのオルガネラ(核、葉緑体、ミトコンドリア)を蛍光標識して、それらが光合成ウミウシに摂取された後、ウミウシ体内でどのような挙動を示すのかをライブイメージングにより観察・解析できる実験系を、世界に先駆け開発・構築した。

研究成果の概要(英文)：Sacoglossan sea slugs suck cytosol from macroalga and capture the chloroplast to perform photosynthesis in the slug's cell. Although the mysterious phenomenon, termed as kleptoplasty, has been reported by a lot of sea slug researchers, the mechanism has remained largely unknown. In this study, to analyze the detail process of kleptoplasty, a live-imaging procedure monitoring the algal organelle incorporated in the slug cell was developed. At first, a macro alga, *Bryopsis plumosa*, was transformed with chimeric genes encoding GFP-fused proteins targeting chloroplast, nucleus and mitochondrion. And then, by feeding the transformed alga to a photosynthetic sea slug, *Elysia ornata*, fluorescent-labelled algal organelle in the slug body were successfully detected. The novel system will give new insights for the mechanism of the Kleptoplasty, and the technique transforming *B. plumosa* should be applicable to other seaweed research.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・進化生物学

キーワード：盗葉緑体 光合成ウミウシ ハネモ コノハミドリガイ 多核緑藻類 形質転換

### 1. 研究開始当初の背景

浅海に棲むウミウシは貝殻のない巻き貝の仲間である。体長数センチメートルの小さな動物であるが、その外見・食性は多様性に富む。面白いことに、草食性ウミウシの仲間には海藻の細胞内小器官である葉緑体を自らの細胞に取り込んで、光合成を行う変わりものが存在する。これらの光合成ウミウシの多くは囊舌目のグループに属しており、鋭い歯舌を用いて餌である海藻に穴を空けて、葉緑体を吸い取る。動物が微細藻類を細胞内に共生させてその光合成機能を利用する例は、ゾウリムシ、ホヤ、クラゲ、サンゴ虫など、様々な水生生物で知られているが、光合成ウミウシの場合は、「微生物」ではなく「葉緑体」を共生させており、極めてユニークなケースだと言える。葉緑体を取り込んで光合成を行うこれらの現象は chloroplast symbiosis (葉緑体共生) や kleptoplasty (盗葉緑体現象) と呼ばれており、光合成ウミウシ体内において、数ヶ月にわたって維持される例も報告されている。

葉緑体は微量の遺伝情報=DNA を持った単なる細胞小器官にすぎない。そのため一般に、長期にわたって葉緑体単独で機能を維持することは不可能で、その機能維持には、植物の核にコードされている遺伝情報の発現が必要である。この意味で、囊舌目ウミウシの盗葉緑体は非常に不思議な現象と言える。「葉緑体の共生」を行うウミウシは、摂食した藻類の細胞質の中から葉緑体だけを選び出し、それらを中腸腺を通して体表近くに運搬し、中腸腺上皮細胞に食作用によって取り込むとされている。しかし、これはごく限られた電子顕微鏡観察からの推測であり、その普遍性や分子機構については疑問があった。実際、捕獲したウミウシを超薄切片にして電子顕微鏡で解析すると、しばしば、多数の無傷葉緑体とともに、起源のわからない複数の核が観察される。ウミウシは、藻類の細胞質から、本当に葉緑体だけを選別して細胞に取り込むのだろうか？ だとしたら、その選別や輸送のメカニズムはどうなっているのだろうか？ それとも、葉緑体と同時に、藻類の核やミトコンドリアを取り込んでいる可能性はないのだろうか？ もしそうなら、ウミウシの核は、藻類の核を利用して、葉緑体を間接支配している可能性が考えられる。電子顕微鏡写真を見ているとこのような疑問が自然とわいてくる。この疑問は、ウミウシ内での藻類オルガネラの挙動をライブイメージング技術により、直接的に観察できれば解消されるが、研究開始当初、そのような実験系を保持している研究室は世界中のどこにもなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、光合成ウミウシの餌となる海藻のオルガネラ(葉緑体、ミトコンドリア、核)を蛍光標識し、それらがウミウシの体内でど

のように挙動するのかをリアルタイムで観察できる世界初の実験系を開発することを目的にしている。

### 3. 研究の方法

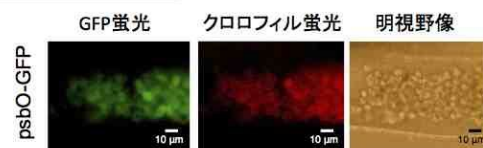
本研究開発を行うにあたり、培養系が確立されている多核緑藻類ハネモ (*Bryopsis plumosa*) とそれを餌にして安定して飼育できる囊舌目ウミウシ、コノハミドリガイ (*Elysia ornata*) の実験系を用いた。まずハネモの蛍光標識系統の作製を行った。具体的には GFP 遺伝子を用いてハネモ葉緑体蛍光標識用キメラ遺伝子、核蛍光標識用キメラ遺伝子、ミトコンドリア蛍光標識用キメラ遺伝子を作製して、それらのキメラ遺伝子をパーティクルガン法を用いてハネモ核ゲノムに導入した。次いで、それらのハネモを餌にして光合成ウミウシを飼育して、光合成ウミウシの体内で、蛍光標識された藻類オルガネラがどのような挙動を示すのかを、蛍光顕微鏡下で観察・解析を行った。また核の取り込みについては、分子生物学的手法を用いた検証も行った。

### 4. 研究成果

(1) 多核緑藻ハネモ (*Bryopsis plumosa*) のオルガネラ蛍光標識系の作成

葉緑体、ミトコンドリア、核を標識するため高等植物でそれぞれのオルガネラに局在することがわかっているタンパク質遺伝子 (*psb0*, *rbcS*, histone H2A.Z, H2B, *atpA*) のクローニングを行い、それらの GFP 融合遺伝子を、ハネモ *psb0* プロモーターに連結させたキメラコンストラクトを作成した。そしてこれらのコンストラクトをパーティクルガン法によりハネモへの形質導入を行い、ハネモの細胞内において、蛍光標識された葉緑体、核、ミトコンドリア様の顆粒状構造物を検出することに成功した(図1)。

#### 葉緑体蛍光標識ハネモ



#### 核蛍光標識ハネモ



図1 オルガネラ蛍光標識ハネモ *psb0*-GFP と Histone H2A-GFP コンストラクトを用いた形質転換により葉緑体と核を GFP 蛍光標識した例を示す。

(2) ハネモ形質転換系の改良

上記の形質転換実験でハネモオルガネラを

蛍光標識できるようになったものの、それらの形質転換ハネモは不安定で、経代培養を続けていくと GFP 蛍光シグナルを検出できなくなることが判明した。そこで安定に GFP を発現するハネモの形質転換体を作成するため、形質転換系の改良を行った。まず実験を行う上で律速になっていた形質転換効率を改善するため、ハネモ *psb0* プロモーターにホタルルシフェラーゼ遺伝子をつないで作成した定量解析用コンストラクトを用いて、パーティクルガンによる形質転換実験のパラメータの詳細な検討を行った。その結果、IDERA GIE- (TANAKA co., LTD)を用いて、金粒子の径: 1.5-3.0 $\mu\text{m}$ , プラスミド量: 500ng, He ガス圧力 7.2kgf/cm<sup>2</sup>, ターゲットまでの距離: 9.5cm, 噴出時間: 0.025sec, 減圧度 700~720mmHg に設定することで、一回のシューティング実験あたり、4-5 割の高効率で藻体の一部が形質転換されたハネモを得ることが可能になった。次いで、形質転換部位選抜のための、抗生物質耐性マーカー遺伝子の検討を行った。ハネモの抗生物質に対する感受性実験により、選抜マーカーには、ハイグロマイシン耐性遺伝子である *hph* 遺伝子が適していることが判明した。また、GFP の発現強度をさらに上げるため、プロモーターを高等植物において強発現プロモーターで知られる *rbcS* 遺伝子のもに替えた。これらの改良により、形質転換ハネモにおいて、一年以上 GFP の発現を安定に維持させることが可能となった。ただ一年間、選抜を続けても藻体の全オルガネラが強く蛍光標識されるレベルまでは、標識効率を上げることは出来なかった。さらなるオルガネラ蛍光標識効率の改善については今後の研究課題として残された。

### (3)ウミウシ体内における蛍光標識ハネモオルガネラの検出

次に作成した蛍光標識ハネモをコノハミドリガイに摂食させて、蛍光標識ハネモオルガネラがウミウシ体内で検出できるかどうかを調べた。まず、この解析に先立ち、ウミウシの摂食行動の観察を行った。蛍光励起光下でのウミウシの摂食行動を動画にて撮影したところ、ウミウシが藻類の細胞質を吸引している様子を撮影することができた。興味深いことに、コノハミドリガイは摂食時に藻類の細胞質を吸い込むだけでなく、吐き出すような動作をしており、少なくとも量の細胞質が海水中に放出されていることが明らかになった。ハネモのオルガネラ蛍光標識効率だけでなくこれら摂食時のロスを考えて、ウミウシ体内にて蛍光標識オルガネラを検出するには、大量の形質転換ハネモをコノハミドリガイに長時間摂食させる必要があると考えられた。そこで3日間絶食させたコノハミドリガイに、形質転換ハネモを数日にわたり食餌させ続ける実験を行った。その結果、2日間形質転換ハネモを摂食させたコノハミ

ドリガイ側足部位より GFP 由来の蛍光シグナルを検出することに成功した(図2)。興味深いことに GFP シグナルは葉緑体を蛍光標識した形質転換ハネモを食餌させたウミウシからは検出されたが、核を蛍光標識したハネモを餌として与えたウミウシからは検出されなかった。この結果は、コノハミドリガイが葉緑体を細胞内に選択的に取り込んでいること、そして核については取り込まないか、もしくは取り込んでも速やかに分解していることを示唆している。

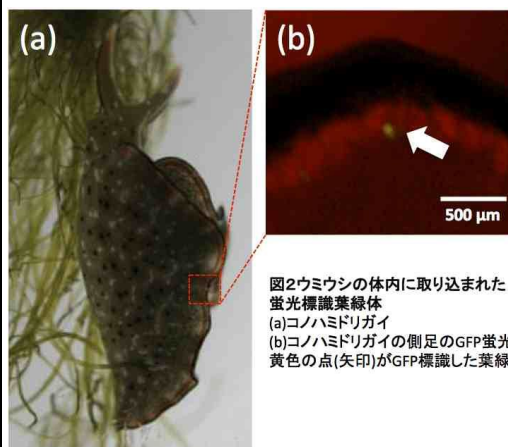


図2ウミウシの体内に取り込まれた  
蛍光標識葉緑体  
(a)コノハミドリガイ  
(b)コノハミドリガイの側足のGFP蛍光像  
黄色の点(矢印)がGFP標識した葉緑体

### (4)コノハミドリガイからは藻類(ハネモ)ゲノムは検出されない。

上記の観察実験より、藻類核の遺伝情報は、コノハミドリガイに取り込まれないか、取り込まれてもすぐに分解されていることが示唆された。そこでこの観察が本当に正しいかどうかを PCR 法により検証した。ハネモを餌にして飼育したコノハミドリガイの成体からゲノムを抽出して、それをテンプレートにハネモ光合成核遺伝子配列のプライマーを用いて PCR を行ったところ、ハネモゲノムに対応する配列は全く増幅されなかった。興味深いことに、PCR 実験においては、何故かイントロンをもたない cDNA 型の光合成遺伝子配列がウミウシゲノムサンプルから検出された。この cDNA 型の遺伝子配列はハネモのゲノムサンプルからは検出されず、驚いたことに、ウミウシゲノムサンプルにおいても、1 万分の 1 遺伝子コピー程度のわずかな量しか存在していないことが、リアルタイム PCR 法による定量実験により明らかになった。これら PCR 実験の結果は、蛍光標識オルガネラシステムを用いた観察結果を支持しており、本研究開始時に疑問であった「光合成ウミウシが、藻類核をとりこんで利用している可能性」を否定した。また、コノハミドリガイゲノムから検出された cDNA 型の藻類遺伝子様産物の存在は、餌である藻類からウミウシへの mRNA・逆転写反応を介した遺伝情報の伝播がごく稀に生じていることを示唆しており、非常に興味深い。詳細について、今後の解析を待たれる。



(5) 国内外での成果の位置づけと今後の展望

本研究は、世界で初めて多核緑藻類ハネモの形質転換系の開発を行い、蛍光標識オルガネラを保持する形質転換体ハネモの作成に成功した。これまでハネモのような海藻の安定形質転換体についての報告は少なく、本研究で得られたハネモ形質転換系の知見は、国内外問わず海藻の研究分野において貴重な知見だといえる。また作成された形質転換ハネモを用いれば、多核藻類細胞内でのオルガネラ間相互作用等、これまで形質転換が困難で解析が遅れていた現象について細胞学的解析が可能になる。本研究の成果は、これらの研究分野におけるブレークスルーに繋がると予想される。

また光合成ウミウシの盗葉緑体現象については、日本、アメリカ、ドイツにおいて、ゲノム解読・トランスクリプトーム解析、生理学的解析が進められているが、本研究のように形質転換海藻をウミウシに摂取させ、ウミウシ体内における蛍光標識海藻オルガネラをライブイメージング観察により解析を行った例は見当たらない。光合成ウミウシの盗葉緑体現象について新しい解析手法を開発した本研究は極めてオリジナリティが高く、当該分野におけるマイルストーン的な研究になるとと思われる。

本研究は数日をかけてウミウシに蛍光標識オルガネラを取り込ませることで、ライブイメージング観察による盗葉緑体現象の解析が可能であることを示した。しかしウミウシ体内における藻類由来オルガネラの動態を詳しく知るには、より短時間での動態解析が必要である。そのためには今後、ウミウシに取り込ませるハネモのオルガネラ蛍光標識効率をさらに上げて、実験系を改良していくことが必要で、現在その検討を進めている。

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)

[学会発表](計 7件)

石井寿季、安井孝彰、中塚直樹、佐藤壮一郎、松尾充啓、平野弥生、本村泰三、小保方潤一  
緑藻ハネモのオルガネラの蛍光標識と盗葉緑体研究への応用  
第53回日本植物生理学会年会 2012年3月 京都  
石井寿季、安井孝彰、中塚直樹、佐藤壮一郎、松尾充啓、平野弥生、本村泰三、小保方潤一  
緑藻ハネモ (*Bryopsis plumosa*) のオルガネラの蛍光標識と盗葉緑体研究への応用

日本藻類学会第36回大会 2012年7月 札幌

松尾充啓、片山裕樹、安井孝彰、中塚直樹、佐藤壮一郎、石井寿季、多和田佳織、平野弥生、本村泰三、小保方潤一  
光合成ウミウシ卵における緑藻由来

DNA配列の存在様式について  
第35回日本分子生物学会年会 2012年12月 福岡

石井寿季、安井孝彰、佐藤壮一郎、松尾充啓、平野弥生、本村泰三、小保方潤一  
緑藻ハネモ(*Bryopsis plumosa*)のオルガネラの蛍光標識と盗葉緑体研究への応用  
第35回日本分子生物学会年会 2012年12月 福岡

石井寿季、安井孝彰、佐藤壮一郎、松尾充啓、平野弥生、本村泰三、小保方潤一  
緑藻ハネモ(*Bryopsis plumosa*)の形質転換系の確立と光合成ウミウシの盗葉緑体研究への応用  
第54回日本植物生理学会年会 2013年3月 岡山

松尾充啓、片山裕樹、安井孝彰、中塚直樹、多和田香織、佐藤壮一郎、石井寿季、平野弥生、本村泰三、小保方潤一  
海藻から光合成ウミウシへの遺伝情報の転移について  
第2回マトリョーシカ型生物学研究会  
2013年7月 京都

石井寿季、安井孝彰、佐藤壮一郎、松尾充啓、平野弥生、本村泰三、小保方潤一  
海藻オルガネラの蛍光標識系の開発と光合成ウミウシの盗葉緑体研究への応用  
第2回マトリョーシカ型生物学研究会  
2013年7月 京都

[その他]

ホームページ等

[http://www2.kpu.ac.jp/life\\_envirom/planet\\_genome\\_bio/Site/yan\\_jiuno\\_shao\\_jie.html](http://www2.kpu.ac.jp/life_envirom/planet_genome_bio/Site/yan_jiuno_shao_jie.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾 充啓 (Matsuo Mitsuhiro)

京都府立大学・生命環境科学研究(科)・助教

研究者番号：70415298