

## 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 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82708

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880034

研究課題名（和文） 赤潮鞭毛藻類における日周鉛直移動の光制御

研究課題名（英文） Photoregulation of diurnal vertical migration in red-tide algae

## 研究代表者

紫加田 知幸 (SHIKATA TOMOYUKI)

独立行政法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・研究員

研究者番号：40603048

研究成果の概要（和文）：有害赤潮鞭毛藻類シャットネラ・アンティカの日周鉛直移動リズムに及ぼす光環境の影響を調べた。その結果、暗期における微弱な UV-A～青色光 ( $>0.01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 360～480 nm) の照射により、その後の日周鉛直移動リズムが変化することが判明した。さらに、暗期に回収したシャットネラ細胞について、全 mRNA シーケンスを実施したところ、クリプトクロームやオーレオクロームといった青色光受容体の類似配列が検出された。今後、これらの光受容体と日周鉛直移動リズムの光位相変化の関係を解析していく予定である。

研究成果の概要（英文）：We examined effects of light environment on the rhythm of diurnal vertical migration in a harmful red-tide flagellate *Chattonella antiqua*. As a result, it was found that irradiation of weak UV-A/blue light ( $\geq 0.03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 360–480 nm) during the dark period changes the rhythm of diurnal vertical migration. Furthermore, by total mRNA-seq of *C. antiqua* cells collected in the dark period, homologous sequences of blue light receptors such as cryptochrome and aureochrome were found. In the near future, we will analyze contributions of these blue light receptors to the light-induced phase shift of diurnal vertical migration.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：海洋生理生態学

科研費の分科・細目：農学・水産学一般

キーワード：海洋生態, 生理学, 赤潮, 鞭毛藻類, 体内時計

## 1. 研究開始当初の背景

近年九州の内海では赤潮による数十億円規模の大被害が頻発しており、赤潮被害防止技術の開発が水産学分野にとって喫緊の研究課題となっている。有害赤潮原因鞭毛藻類は、日の出前から上昇して表層に、日の入前に沈降して底層に集積するという日周鉛直移動

を行う。日周鉛直移動は有害赤潮発生過程における最も重要な生物現象の一つであると考えられているが、観測の難しさ等により、鉛直移動に与える環境条件の影響や移動リズムを引き起こす細胞内のしくみについての知見は極めて限られている。

## 2. 研究の目的

有害赤潮鞭毛藻類の発生機構には不明な点が多く、そのせいもあって有効な赤潮防除策の開発も遅れているのが現状である。一方で、鞭毛藻類の赤潮形成には、彼ら特有の日周鉛直移動能の発揮が必要だと考えられている。申請者は最近、日周鉛直移動の自動観察システムを開発し、鉛直移動のリズムのタイミング（位相）が夜間の光照射によって変化する（ずれる）ことを見出した。この性質をよく理解し、うまく利用すれば、以下のような赤潮被害防除技術を構築できないかと着想した。夜間に光を赤潮に照射して、

- 1) リズムを昼夜逆転（昼間底層、夜間表層）させれば、光合成ができず、増殖不能となる。
- 2) リズムを消失（一日中表層）させれば、生簀を下層に沈めて養殖魚を避難させることができる。

場所を少しずつずらしながら光を照射し、

- 3) リズムをバラバラにすれば、細胞は集積せず赤潮にならない。

本研究では日周鉛直移動の光位相制御機構の概要を把握し、確たる生物学的根拠に基づき、日周鉛直移動を人為的に制御する技術を用いた赤潮防除策構築へと展開するための研究基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

本研究では有害赤潮鞭毛藻シャットネラをモデル生物として、日周鉛直移動の光位相制御機構の概要を把握し、確たる生物学的根拠に基づき、日周鉛直移動を人為的に制御する技術開発へと展開するための研究基盤を確立しようとした。そのために、(1) 独自に開発した日周鉛直移動自動観察システム（図1）を用いて、日周鉛直移動の位相変化を引き起こす詳細な光条件を調べ、(2) 次世代シーケンサーを用いて、全 mRNA-シーケンスを行い、鉛直移動の光位相制御に関与し得る光受容系の相同配列を検索した。

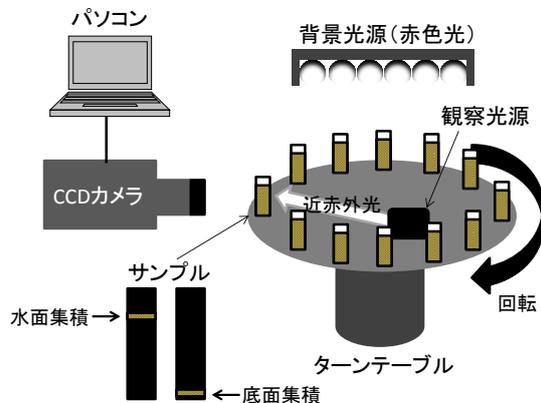


図1. 日周鉛直移動自動観察システム

## 4. 研究成果

(1) 日周鉛直移動リズムの位相変化を引き起こす光条件の特定

まず、小型角槽に細胞を接種し、白色蛍光灯を光源として異なる明暗周期（前培養と同じ6:00~20:00または16:00~6:00を明期とする14hL:10hD）下で培養し、日周鉛直移動リズムを2日間観測した。その結果、いずれの明暗周期においても明期および暗期へ移行する1~3時間前にそれぞれ表層および底層へ移動し、前培養から明暗周期を変化させた場合、細胞は観測開始2日目から新たな明暗周期に再同調した（図2）。次に、白色光に替えて波長の異なる単色光で再同調試験を行ったところ、UV-Aおよび青色光下では白色光と同様に新たな明暗周期への再同調が認められたが、赤色光下では新たな明暗周期への再同調は起こらず、前培養で覚えたリズムを保持した。以上の結果は、シャットネラの日周鉛直移動リズムは特定の波長光の明暗周期に同調して変化し、且つ自律性を有することを示す。故に、本生理現象は光受容体と体内時計によって制御されていると考えられた。

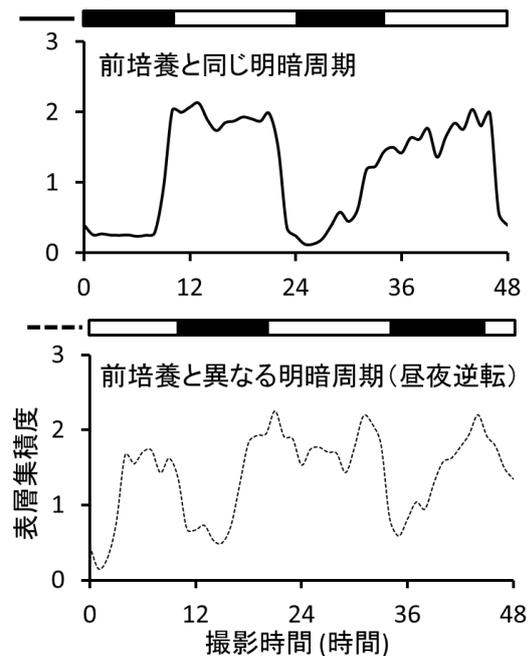


図2. 明暗周期と日周鉛直移動リズムとの関係

一般に体内時計によって制御される現象は夜間の光パルス照射によってリズムが変化する（光位相変化）ことが知られている。日周鉛直移動でも同様のことが起こるかどうかを検証するために、暗期の異なる時間帯に青色光を2時間照射して位相変化時間を観測した。その結果、暗期の前半および後半に照射した場合、鉛直移動の位相はそれぞれ後退および前進したが、中盤に照射した場合は

リズムが消滅した。

次に、位相変化が起こる光条件を特定した。まず、暗期の前半に異なる強度で青色光 (480 nm) を照射し、位相変化時間を観測した。その結果、光強度  $0.03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  以上の照射で位相変化時間が飽和し、それ以下の強度下では強度依存的に位相変化時間が大きくなった (図 3)。また、基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用いて、反応スペクトル (光強度  $0.03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 310~560 nm) を計測したところ、360~480 nm の UV-A~青色領域に位相変化時間の極大が認められ、スペクトルの形状からフラビンタイプの青色光受容体が関与する可能性が示唆された (図 4)。本研究により、日周鉛直移動には青色光受容体と体内時計が関与していることが判明し、それらの性状について基礎情報が得られた。

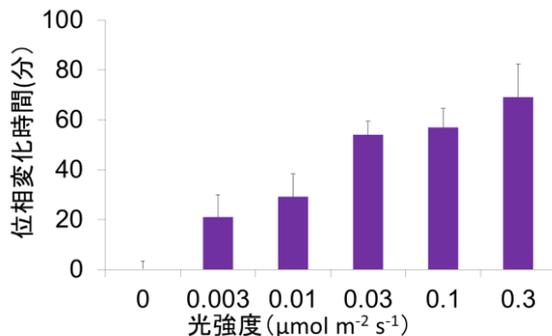


図 3. 異なる光強度の青色光を照射した時の日周鉛直移動リズムの位相変化

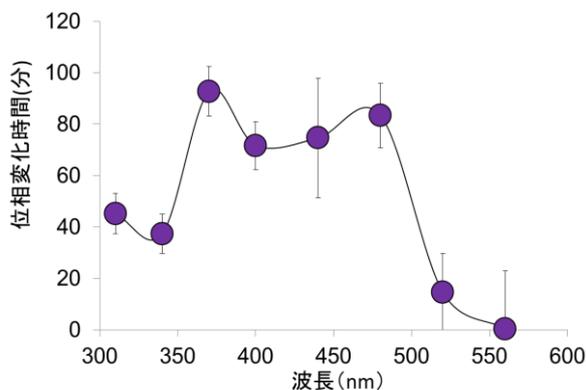


図 4. 異なる波長の単色光を照射した時の日周鉛直移動リズムの位相変化

#### (2) 全 mRNA-シーケンス

まず、シャットネラの RNA は非常に分解しやすいため、次世代シーケンサーによるシーケンシングに耐えうる高品質の total RNA を得るための方法論を詳細に検討する必要があった。細胞の回収法、前処理 (RNase 除去) 溶液の組成、RNA の抽出精製試薬等を変えて RNA を調製し、電気泳動によるクオリティチェックを行うことを繰り返した。その結果得られたプロトコールに従って作製した total

RNA 試料について、Illumina のキットを用いて cDNA ライブラリーを構築し、基礎生物学研究所、生物機能解析室の次世代シーケンサー-Illumina HiSeq2000 (1 lane, Pair-end 法: 100 bp+86 bp) によって合計で 114M reads シーケンシングした。リード配列に対して Trinity による de novo アセンブリを行った結果、201~47706 b の配列長を持つ 6 万弱のコンティグを得ることができた。RSEM プログラムを用いて、各 transcript について、発現量を示す tau 値を算出するとともに、BLAST 検索を行った。その結果、4 万強の transcript がヒットし、発現量が多かった transcript は機能不明のものを除けば、主に光合成関連 (fucoxanthin chlorophylla /c binding protein など) やリボソームタンパク質にヒットした。また、 $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -actin や GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) といったハウスキーピング遺伝子の相同配列も得られた。さらに、他生物において体内時計および青色光受容の関連タンパク質として報告されているクリプトクロームや青色光受容体として知られているオーレオクロームの類似配列も検出された。今後、これらの光受容体の日周鉛直移動リズムの光位相制御への寄与について解析していく予定である。

#### 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 3 件)

① Shikata T et al., Blue light regulates the rhythm of diurnal vertical migration in the raphidophyte red-tide alga *Chattonella antiqua*, Journal of Plankton Research, 査読有, 35, 2013, p. 542-552.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 紫加田知幸, 赤潮鞭毛藻の日周鉛直移動, 平成 24 年 9 月, 埼玉大学分子生物学科/環境科学研究センター共催セミナー, 埼玉大学
- ② 紫加田知幸, 赤潮鞭毛藻の日周鉛直移動, 光合成学会若手の会, 平成 24 年 6 月, 東京工業大学
- ③ 紫加田知幸, ラフィド藻 *Chattonella antiqua* における日周鉛直移動の光位相制御, 平成 23 年 9 月, 日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 高知大学

[図書] (計 1 件)

① 楠田哲也ほか, 恒星社厚生閣, 蘇る有明海——再生への道程, 2011, 361

[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)  
独立行政法人水産総合研究センター・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

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：