

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780141

研究課題名 (和文) 海苔の成熟過程におけるアクチンの役割と分子マーカーとしての応用

研究課題名 (英文) A role of actin in maturation process of a marine alga *Porphyra* and its application to a molecular marker

研究代表者

北出 幸広 (KITADE YUKIHIRO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・特任准教授

研究者番号：90399999

研究成果の概要：海面養殖において成熟の進んだ海苔の収穫は製品の質を低下させることが知られている。しかし、海苔の成熟は比較的広い環境条件下で起こるため成熟時期の予測は難しい。そこで、海苔の成熟をモニターし得る何らかの客観的な指標があれば、適正な漁期を判断する基準の一つとして役立つと考えられる。本研究では海苔の持つ4種類のアクチン遺伝子の発現様式の違いに注目し、そのうちの1種類が成熟の指標として適していることを分子生物学的手法により明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,400,000 | 0 | 1,400,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 390,000 | 3,090,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：海苔、スサビノリ、成熟、アクチン、分子マーカー、紅藻、遺伝子ファミリー、有性生殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 原始紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は、日本の海苔養殖において最も栽培されている種である。本種は雌雄同株で有性生殖を行い、食用となる葉状体と種苗の維持に用いられる糸状体とが交代する典型的な異型世代交代タイプのライフサイクルを持つ。また、葉状体は二次芽と呼ばれる単胞子を介した無性生殖も行う。葉状体は、天

然では秋から冬の間には栄養成長を行い繁茂することから養殖でもこの時期のものが収穫される。通常、春になると栄養成長を続けることができなくなり有性生殖を行い夏の間は糸状体という形態で子孫を残す。しかしながら、葉状体の成熟(雌雄の生殖細胞形成をさす)は、比較的広い環境条件下で起こり得るのでいつ成熟が始まるのかを予測することは難しい。成熟を促進する主な環境要因

としては、経験的事実から水温・光周期・栄養塩濃度があげられるが、成熟に関する科学的データの蓄積は現在でも十分とは言えない。一方で、成熟の進んだ葉状体（一部糸状体も混入）の収穫は、海苔製品の質を低下させることから成熟の早い段階での見極めは重要である。

(2) 紅藻類で知られている分子マーカーについては、*SSUrRNA* や *rbcL* のような種判別等に用いられる遺伝子がほとんどで、藻体の成熟期特異的あるいは優先的に発現するような遺伝子の報告例はほとんどないと言ってよいのが現状である。一方、本種では、研究代表者らによってアクチン遺伝子 1 種 (*PyACT*) の cDNA クローニングと発現解析およびゲノミックサザン解析が行われ、その分子種が構成的発現パターンを示すことが明らかになった他、遺伝子ファミリーの存在が示唆された。さらに、後の EST (Expressed Sequence Tag) 解析によりそれらの部分的な実体が確認された。現在までに、研究代表者らによって 4 種類のアクチン遺伝子 (*PyACT1-4*) の存在が明らかになっており、少なくとも 1 種類のアクチン遺伝子 (*PyACT3*) は葉状体で優先的に発現することが予備実験により確認されている。この結果は、*PyACT3* が海苔の成熟状態をモニターする分子マーカーとして使える可能性を示唆する。

2. 研究の目的

(1) 紅藻のアクチンについては、細胞学的知見が真正紅藻類で蓄積されており、F-アクチンの Phalloidin による染色や各種阻害剤を用いた実験により、その受精過程・核分裂過程・ピットコネクションの形成への関与が示唆されている。しかしながら、本種葉状体の成熟過程においてアクチンがどのように関与しているのかについては、細胞骨格の形成や細胞分裂との関わりが推測されるが今のところ何もわかっていない。また、原始紅藻類では本種の近縁種 (*Porphyra leucosticta*) でアクチンに関する報告があるものの、特に糸状体でクリアな染色結果が得られなかったことから、まずアクチン染色において藻体の前処理を工夫することにより技術的な改善を図る必要がある。つぎに、本種ライフサイクルの各発生段階において染色されたアクチンの光学顕微鏡による観察と種々のアクチン阻害剤を用いた実験をすることによって、本種アクチンの役割に関する細胞レベルの基礎的知見を得ようと考えている。

(2) 上述のように本種のアクチン遺伝子は複数存在することから、予備実験により見つかっている成熟した葉状体で優先的に発現する遺伝子とその翻訳産物であるタンパク質に焦点を絞って研究を進める必要がある。具体的には、特異的プローブや特異抗体を作製

し、成熟した葉状体におけるより正確な発現部位を調べる。一方で、他にも分子マーカーの候補となるようなアクチンの分子種がないかどうかについても調べることも重要と考えている。なぜなら、例えば、もし糸状体で特異的あるいは優先的に発現する新規アクチン遺伝子が分子マーカーとして使えれば、成熟の進んだ葉状体（一部糸状体も混入）の検出が可能になるからである。

(3) 本研究では、本種葉状体の効率的な成熟条件の決定とアクチンに関する細胞レベルの基礎的知見を得ること、各種アクチン遺伝子の構造・発現解析による特徴づけ、成熟した葉状体で優先的に発現するアクチン (*PyACT3*) の細胞内での局在性を免疫組織化学的手法により明らかにすることを目的とする。また、葉状体成熟における分子マーカーとしてのアクチン遺伝子の有効性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 藻の培養：スサビノリ葉状体と糸状体は enriched sealife (ESL) 培地中でそれぞれ単藻培養した。葉状体の成熟は 15°C 短日条件から 15°C 長日条件へ移すことにより誘導した。糸状体の成熟は 25°C 全日条件から 15°C 長日条件へ移すことにより誘導した。

(2) 遺伝子クローニング：先行のスサビノリ EST 解析で見つかった 4 種類のアクチン遺伝子 (*PyACT1-4*) のうち、全長 cDNA 配列が含まれなかった 2 種類について、5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により未知領域のクローニングを行った。また、上記 4 種類の cDNA に対応するゲノム塩基配列は PCR 法とダイレクトシーケンシング法を用いて決定した。

(3) 遺伝子の発現解析：*PyACT2-4* について、半定量的 RT-PCR 法により 4 種類の発生段階（栄養成長した葉状体:G、成熟した葉状体:Gsrc、栄養成長した糸状体:S、成熟した糸状体:Sc）の発現レベルを比較した。また、発現値はエロンゲーションファクター 1 α 遺伝子の値で均一化を行った。*PyACT3* については、ノーザン法により藻体の部位別（葉状体の先端部と基部）の発現量の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 構造解析の成果：①本研究により既報の 1 種類 (*PyACT1*) 以外の新規 3 種類 (*PyACT2-4*) のアクチン遺伝子の読み取り枠の全長構造を明らかにできた。それらアイソフォーム間のアミノ酸配列の同一性は 83% 以上であり、最も高かったのは *PyACT3* と *PyACT4* 間で 95% だった。また、4 種類とも推定の核搬出シグナル (NES) がアミノ酸配列中に見つかった。アクチンタンパク質中の架橋形成に関与することが報告されている 6 カ所のアミ

ノ酸対について、スサビノリ配列では保存性が低かった。配列解析の結果より、PyACT2はモノマーあるいは通常のF-アクチンという形をとらずに核内で機能することが示唆された。②イントロンの分布と位置については、真正紅藻類のアクチン遺伝子のもものと異なっていることが明らかになった。

(2)発現解析の成果：PyACT3 遺伝子の発現レベルは、栄養成長した葉状体(G)よりも成熟した葉状体(Gsrc)で有意に高かった(図1)。しかし、mRNAは成熟した葉状体の先端部と基部におけるPyACT3 遺伝子の発現レベルの差は見られなかった(図2)。一方、PyACT2とPyACT4 遺伝子の発現レベルは、栄養成長した葉状体(G)と成熟した葉状体(Gsrc)間で有意に変動しなかった。

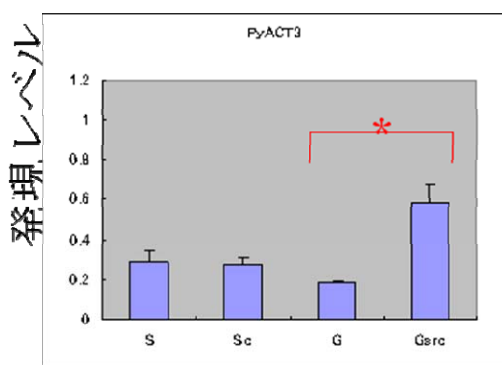


図1 4種類の発生段階におけるPyACT3 遺伝子の発現レベルの比較

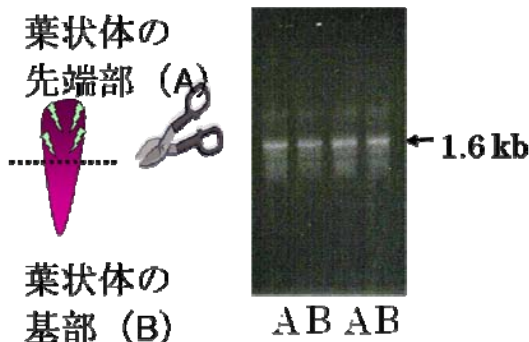


図2 成熟した葉状体の部位ごとのPyACT3 遺伝子の発現レベルの比較

(3)位置づけとインパクト、今後の展望：

①本研究で得られた主な成果は、海苔の4つのアクチン遺伝子のうちPyACT3 遺伝子が成熟をモニターする分子マーカーとして適していることを明らかにしたことである。このような分子マーカーの開発は、収穫した海苔の品質管理や海苔養殖学の発展に寄与するものと考えられる。

②相同遺伝子のイントロンの位置は、近縁生物間(例えば、緑藻クラミドモナスとボルボックス)でよく保存されていることが知られ

ている。紅藻類では、真正紅藻類間のアクチン遺伝子で同様の例が示された報告があるが、本研究によりスサビノリの場合はその位置が保存されていないことが明らかになった。近年、スサビノリは海洋におけるモデル生物の一つとして注目されているが、イントロンの位置の保存性に関する知見はモデルの適用範囲を予測するうえで役立つかもしれない。

③アクチン遺伝子の数は、形態の複雑な生物ほど増加する傾向が知られている。例えば緑色植物の系統において、多くの緑藻ではゲノム中に1個、蘚苔類では2-3個、シダや被子植物ではより複雑な遺伝子ファミリーを持っている。しかしながら、紅藻類では進化的位置とアクチン遺伝子の数の関係は明確ではない。なぜなら、本研究で明らかになったようにスサビノリは少なくとも4種類のアクチン遺伝子を持つが、より複雑な形態的特徴(例えば、スサビノリにはない果胞子体世代)をもつ真正紅藻ツノマタではアクチン遺伝子をゲノム中に1個しか持たないことが報告されているからである。一方、他の真正紅藻でアクチン遺伝子を複数持つものも報告されており、これらの藻類は上記ツノマタが同型世代交代タイプであるのに対しスサビノリと同様に異型世代交代タイプのライフサイクルを持っている。また、ライフサイクルの進化に関連して、紅藻類は7つの主たる系統を含んでいるが、そのうち2つの系統(BangiophyceaeとFlorideophyceae)だけが有性生殖とピットプラグを伴う多細胞体制を維持している。アクチンはピットプラグと関連するという報告もある。また、スサビノリはライフサイクルにおいて糸状体でのみピットプラグを持つことが知られている。本研究で明らかにしたスサビノリにおけるアクチン遺伝子の多様化の知見は、比較ゲノム解析や遺伝子の機能解析と組み合わせることにより紅藻類の生活環の進化を研究するうえで近い将来に役立つかもしれない。

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 Kitade Y., Nakamura M., Uji T., Fukuda S., Endo H., Saga N. Structural features and gene-expression profiles of actin homologs in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Gene*, 423, 79-84, 2008, 査読有
- ② Park E.-J., Endo H., Kitade Y., Saga N. Simple differentiation of two closely related species *Porphyra tenera* and *Porphyra yezoensis* (Bangiophyceae,

Rhodophyta) based on length polymorphism of actin-related protein 4 gene (*ARPA*). Fisheries Science, 74, 613-620, 2008, 査読有

- ③ Kitade Y., Asamizu E., Fukuda S., Nakajima M., Ootsuka S., Endo H., Tabata S., Saga N. Identification of genes preferentially expressed during asexual sporulation in *Porphyra yezoensis* gametophytes (Bangiales, Rhodophyta). Journal of Phycology, 44, 113-123, 2008, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 北出幸広、中村理湖、宇治利樹、福田覚、遠藤博寿、嵯峨直恆、紅藻スサビノリ配偶体の成熟をモニターする分子マーカーの探索、日本分子生物学会、2007 年 12 月 14 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北出 幸広 (KITADE YUKIHIRO)
北海道大学・大学院水産科学研究院・
特任准教授
研究者番号：90399999

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし