

自己評価報告書

平成23年 4月 4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. 研究計画の概要

円石藻は、ハプト藻植物門に属す微細藻類で、細胞表面に精巧な形態の石灰化された鱗片(円石)をもつ。本研究では、その形成機構を解明することを目的としてマクロアレイ解析を行い、円石形成関連遺伝子の単離・同定を行う。具体的には、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)でのアレイ解析により候補遺伝子を絞り込み、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。

2. 研究の進捗状況

(1) 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、

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円石形成細胞で発現比が高く(3倍以上)、かつ 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 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 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) 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における局在性についても、検討を行った。様々なpHで CaCO_3 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。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

核相の異なる円石形成細胞と非形成細胞、及び、野生株と円石欠損変異株、石灰化促進条件と抑制条件においた細胞でのアレイ解析により、円石形成関連遺伝子の候補を絞り込むことができた。また、酸性多糖の円石内における局在性の検討もを行い、ESTデータベースの構築についてもほぼ完成させることができた。

4. 今後の研究の推進方策

これまでのマクロアレイ解析により得られた、円石形成株及び円石形成条件で特異的に発現している遺伝子の中からカーボニックアンヒドラーゼを含む数個の遺伝子を選び、その翻訳産物の機能と細胞内局在性の推定を行う。具体的には、EST配列を基にcDNAの全長を含むクローンを単離し、その翻訳産物のN末端とGFP融合タンパク質を発現させ局在性の推定を行う。その際先ず形質転換が可能な珪藻で検討を行うとともに、円石藻においても一過的な発現が可能かどうか検討する。また、大腸菌で発現させた遺伝

子産物の機能を *in vitro* で推定、抗体を作製し抗体を用いた局在性の検討も行う。

5. 代表的な研究成果

(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 8 件)

- ① 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).
- ② 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).
- ③ Katagiri, F., Y. Takatsuka, S. Fujiwara and M. Tsuzuki: Effects of Ca and Mg on growth and calcification of the coccolithophorid *Pleurochrysis haptanemofera*: Ca-requirement for cell division in coccolith-bearing cells and for normal coccolith-formation with acidic polysaccharides. *Mar. Biotechnol.* 12: 42-51. (2010).
- ④ 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 haptanemofera*. *Planta* 227: 589-599. (2008).
- ⑤ 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).

[学会発表] (計 9 件)

- ① 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 回バイオミネラルリゼーションワークショップ (東京) 2009/12 (特別講演)。
- ② 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 haptanemofera* 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 1 2 回マリンバイオテクノロジー学会
- ③ 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 haptanemofera* の石灰化に及ぼす環境因子の影響。日本藻類学会第 3 3 回大会 (那覇) 2009/3。

- ④ 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 回バイオミネラルリゼーションワークショップ (東京) 2009/12。
- ⑤ 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 1 1 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 1 件)

- ① 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).

[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]