

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 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 - 2011

課題番号：21658075

研究課題名（和文） 渦鞭毛藻の無毒変異メカニズム解明のための一細胞ライブラリーの構築

研究課題名（英文） Construction of cDNA library for the elucidation of mechanism occurred in non-toxic mutant of dinoflagellate

研究代表者

長 由扶子 (Yuko Cho)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：60323086

研究成果の概要（和文）：麻痺性貝毒生産渦鞭毛藻 *A. tamarense* のクローン株内の細胞について HPLC-FL による一細胞内毒量分析により調べ、毒生産能多様性を確認した。単離後の培養早期から同一ウェル内の細胞でも分裂が同調的ではなく毒量も不均一化することを実験的に明らかにした。均一系一細胞ライブラリー構築のための基礎的データを収集した。

研究成果の概要（英文）：Single-cell analysis of paralytic shellfish toxins by HPLC with post column fluorescent derivatization revealed the large variety of toxin productivity among cells from the clonal strain of *A. tamarense*, a PST-producing dinoflagellate. The different growth rate and toxin contents were observed among the cells in the identical culture well at the early stage of incubation after re-isolation. The fundamental data for the construction of the single-cell library was obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	0	1,600,000
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	210,000	3,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：水産学、プランクトン、麻痺性貝毒、無毒変異、cDNA ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻はクローン株内でも不均一化していることが知られている。本研究以前に研究代表者はすでに代表的な麻痺性貝毒生産渦鞭毛藻 *A. tamarense* の培養中の変異により生じた一対の有毒、無毒の株の比較研究を開始していた。有毒、無毒株の間で配列及び発現量の異なる遺伝子断片を見出し、さらに他の姉妹株の遺伝子解析でも多型の存在を明らかにした。また、再単離有毒株の一細胞分析で株内に大きな毒量差のある細胞が混

在していることも示唆されていた。培養中に生じた変異が蓄積された株に従来の分子生物学的手法をそのまま適用すると、毒性と関わりのない変異遺伝子が数多くヒットしてしまう。世界中で探索研究がなされているにもかかわらず、藍藻では明らかになりつつある生合成系 (Kelleman 2007) が渦鞭毛藻では依然として不明のままであるのもこのことが一因であるものと考えられた。

不均一化の問題のひとつには株内の非同調増殖もあげられる。研究代表者はすでに

3種の代謝阻害剤（マイトマイシン C (MC)、5-フロロ-2'-デオキシウリジン (FUdR)、コルヒチン) で増殖抑制濃度を決定していた。さらに MC と FUdR はともに S 期で周期を停止させるが、MC では毒生産が継続するのに対し、FUdR では毒生産が停止することも明らかにしていた。コルヒチンは通常の動植物細胞では M 期に停止させる薬剤として知られているが、*A. tamarense* では G₁ 期で停止させ、毒生産を抑制することも報告した。これらの阻害剤を用いて細胞周期制御すれば非同調的増殖による不均一性は回避できるものと考えられた。

その他の不均一性はミトコンドリア遺伝子 (Cytb5 近傍及び Cox3) に多型が生じて株内に遺伝子型の異なる細胞が存在することに由来することが示唆された。さらにその変異部分の塩基配列が短い断片の種類と数の組み合わせの異なるものであったことから外来遺伝子の水平伝搬が示唆され、細胞内にもヘテロのミトコンドリアが存在する可能性も示唆されていた。そこでクローン株内の細胞の変異を調べ、多様性の少ない細胞を得て、不均一性の問題を克服すれば渦鞭毛藻の麻痺性貝毒遺伝子や無毒化のメカニズムについて解明できるのではないかとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では麻痺性貝毒生産渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の培養株から得られた世界的にも貴重な無毒変異株における無毒化メカニズムを解明するために、渦鞭毛藻の特殊性に由来する困難を克服する実験系として毒量及び遺伝子プロファイルの均一なサブクローン系を作出し、最も小さな単位すなわち一細胞毎に解析することを目的とした。

同一細胞に由来する一対の有毒、無毒サブクローン株を用い、サブクローン内の不均一性に注目して一細胞分析した研究は国内外に例がなく学問的にもチャレンジングな試みであった。

3. 研究の方法

(1)一細胞での in situ hybridization 法の確立

固定、ハイブリ、洗浄、検出の操作を 50 穴のカルチャーwell を有するスライドグラス上で行い、ハイスループット化を検討した。

固定後の操作で細胞が剥離してしまうという問題に対処するため、有効な固定剤を検索した。酢酸-メタノールによるクロロフィル除去、含水エタノールによる脱水、パラホルムアルデヒドによる固定で前処理した有毒株細胞とチトクロム B5' 隣接領域で見いだされた有毒、無毒共通部分から設計した蛍光

色素標識オリゴ DNA または無毒株にのみ見られた部分から設計した標識オリゴ DNA をハイブリさせた。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡観察に供した。コントロールとして標識オリゴ DNA 以外すべて同様に操作した細胞を用いた。

(2)サブクローン系培養株の不均一化時期の確認

96 穴プレートに分注した T₁ 改変培地に渦鞭毛藻 *A. tamarense* 有毒、無毒株から細胞を単離し、10 日間培養した。経目的に細胞数を測定し、分裂の同調性を調べた。10 日後に一細胞毒量分析に供し毒量を確認した。

(3)高感度蛍光化 HPLC 分析法による一細胞 C-toxin 毒量分析法の定量性評価

以前確立した蛍光化 HPLC 分析法による C-toxin (C1 及び C2) の一細胞毒量多検体分析法の定量性について、繰り返し測定時の変動係数、溶出時間の安定性、直線性の範囲、回収率で評価した。

(4)高感度蛍光化 HPLC 分析法による有毒株内毒量の多様性の検証

有毒株細胞 47 個についての一細胞毒量を測定し、有毒株内の毒生産多様性を調べた。同時に通常の方法で収穫して、毒量分析に供し、コントロールとした。

(5)高感度蛍光化 HPLC 分析法による 3 群一斉一細胞毒量分析法の開発

2 種類の原理の異なるカラムを連結してグラジエント分析する麻痺性貝毒 3 群 (C-toxin 群、GTX 群及び STX 群) 一斉分析を試み、標品混合液を用いて分離条件を検討した。最適化した条件で有毒株の細胞抽出液を希釈した溶液 (10 細胞相当) を分析し、実試料への応用の可能性を調べた。

(6)阻害剤での毒生産制御

本研究当初にはまず均一サブクローン系の培養法確立と細胞周期制御して得られた細胞での cDNA ライブラリー構築を企図したが、研究の遂行にあたり新たにデータベース検索したところ、代謝阻害剤 5-フロロ-2'-デオキシウリジン (FUdR) にチミジレートシンターゼ以外の酵素阻害活性があることがわかり、本阻害剤での毒生産停止、均一化の可能性について追求することにした。FUdR は S 期に周期を停止させることがわかっていたが、毒生産阻害機構については不明である。最近らん藻のサキシトキシン生合成遺伝子クラスターに含まれる sxt 遺伝子群のひとつが FUdR の阻害する酵素の遺伝子と同一性を示すという報告がされた。そこで FUdR が直接麻痺性貝毒生合成を阻害している可能性

が示唆された。FUdRと同時にFUdRで枯渇すると言われている既知成分を添加した渦鞭毛藻で細胞増殖や毒生産に変化があるかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) 一細胞での in situ hybridization

酢酸-メタノールによりクロロフィル除去、含水エタノールによる脱水、パラホルムアルデヒドによる固定で前処理した有毒株細胞で残留クロロフィルの影響による自家蛍光のレベルを決定し、共焦点レーザー顕微鏡のパラメーターを定めた。本条件ではコントロールの細胞からはほとんどシグナルが検出されなかったがチトクロムBの5'隣接領域で見いだされた有毒、無毒共通部分から設計した蛍光色素標識オリゴDNAをハイブリさせた細胞では明らかに強度の高い蛍光を検出した。無毒株にのみ見られた配列で設計した蛍光標識オリゴDNAでのin situ hybridizationでは期待されたような無毒株細胞のみのシグナルは得られず、有毒株細胞でも強いシグナルが観察され、特異性は見られなかった。

本手法の適用にあたり、課題であった細胞の剥離については特殊コーティングのスライドグラスを用いることで対処できることがわかった。今後特異性の高い遺伝子配列を取得した場合、今回確立した条件で一細胞分析できるものと考えている。

(2) サブクローン系培養株の不均一化時期の確認

単離後10日後には2から4細胞周期後に相当した(有毒株5個、無毒株10個)。細胞数の観察から有毒無毒株ともに2細胞周期目ですでに分裂が同調的ではなくなり、不均一化することが判明した。また細胞内毒量は有毒株由来細胞で56-173 fmol/cellであり、96穴プレートでは再単離後早期に毒量の多様性が生じることを世界で初めて実験的に証明した。均一系を得るには分裂の同調化が必要である。さらに決定した細胞の固定法を応用することにより、今後は同一の細胞からの毒量分析と遺伝子解析が可能になるものと期待される。

(3) 蛍光化 HPLC 分析法による一細胞 C-toxin 毒量分析法の定量性

蛍光化 HPLC 分析法による C-toxin (C1 及び C2) の一細胞毒量多検体分析法を確立し、C2 で 1.4 fmol (S/N = 2) までの検出が可能となった条件を用いたところ、溶出時間は 0.7 分未満の変動(変動係数 1%) と良好な安定性を示し、一回の注入あたり 2.5 - 1000 fmol の範囲で良好な精度 (2.5 fmol で CV =

0.6%, n = 3) と直線性 ($r^2 = 0.9998$)、良好な回収率(104 %, CV = 13 %, n = 5, 25 fmol の C2 を *A. insuetum* 抽出液に添加)を示した。

(4) 高感度蛍光化 HPLC 分析法による有毒株内毒量の多様性の検証

有毒株細胞 47 個についての一細胞毒量を測定し、有毒株内の毒生産能多様性を調べたところ、通常分析による毒量付近の細胞以外に検出限界未満や平均値の 3 倍高含量の細胞が検出された (< 1.8 to 136 fmol/cell)。本手法の開発途中にはさらに高毒量 (700 fmol/cell) の細胞も見出されており、有毒株内の毒生産能多様性が確認された。

(5) 高感度蛍光化 HPLC 分析法による 3 群一斉一細胞毒量分析法の開発

2種類の原理の異なるカラムを連結してグラジエント分析する麻痺性貝毒3群 (C-toxin 群、GTX群及びSTX群) 一斉分析を試み、良好な分離条件を確立した。本条件で有毒細胞抽出液を希釈後10細胞相当量を注入してC2, GTX4及びneoSTXと溶出時間の一致するピークを検出することに成功した。

(6) 阻害剤での毒生産制御

FudRと同時にFudRで枯渇することが知られている既知成分を添加した渦鞭毛藻 *A. tamarense* で細胞増殖と毒生産に変化があるかどうか調べたところ、FudR単独添加系よりも増殖はより抑制された上、毒生産もより抑制されることがわかった。すなわち毒生産抑制はFudRの主な阻害対象であるチミジンシンターゼ阻害で成分が枯渇したためではない可能性が示唆された。今回FudRと同時に添加した成分にもFudRと同じく藍藻のSTX生合成酵素と相同性のある酵素に対する阻害活性が知られており、相加的に作用したものと推定された。無毒化のメカニズム解明につながる重要な結果が得られた。

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 1 件)

1. Yuko Cho*, Motoo Ogawa, Mayumi Hirota, and Yasukatsu Oshima, Effects of mitomycin C and colchicine on toxin production and cell cycle regulation in the dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, Harmful Algae, 2011, 10, 235-244. 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1. 長 由扶子、尾関 諒子、大島 泰克、渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* 麻痺性貝毒量の一細胞分析、第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、2009年6月16日、仙台

2. Yuko Cho, Ryoko Ozeki and Yasukatsu Oshima, Single-cell analysis of paralytic shellfish toxins in *Alexandrium tamarense* by HPLC with post column fluorescent derivatization, ゴードン会議, 2009年6月21日-26日, ニューロンドン、アメリカ合衆国

3. Yuko Cho, Ryoko Ozeki and Yasukatsu Oshima, Variety of toxin contents in a clonal culture of *Alexandrium tamarense* determined by single-cell analysis using HPLC with post column fluorescent derivatization for paralytic shellfish toxins, 環太平洋国際化学会議, 2010年12月15日-19日, ホノルル、アメリカ合衆国

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長 由扶子 (Yuko Cho)

東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：60323086

(2) 研究分担者
なし

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし

研究者番号：