

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780196

研究課題名（和文） 紅藻スサビノリ尿素トランスポーターの機能特性解析による窒素取込みの分子機構の解明

研究課題名（英文） Characterization and function of the urea transporter genes from *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) in molecular mechanisms underlying assimilation of nitrogen sources

研究代表者

柿沼 誠 (KAKINUMA MAKOTO)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：60303757

研究成果の概要（和文）：紅藻スサビノリには、一次構造の異なる2種類の尿素トランスポーター（PyUT1 および PyUT2）が存在する。スサビノリ葉状体は貧栄養環境下で、*PyUT1* および *PyUT2* 遺伝子を高発現することから、*PyUT* 遺伝子は葉状体の貧栄養環境に対する応答・適応反応に重要な役割を果たしていることが考えられた。*PyUT* 遺伝子は無機態窒素や尿素に対して顕著な発現応答性を示したが、酵母 *UT (DUR3)* 遺伝子欠損を機能的に相補しなかった。したがって、*PyUT* 遺伝子は無機態窒素や尿素取込みの輸送体として機能しているのではなく、尿素の細胞内輸送や尿素以外の物質の取込みに関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Two urea transporters (PyUT1 and PyUT2), which may be involved in nitrogen uptake and assimilation, have been identified in the rhodophyta seaweed *Porphyra yezoensis*. Expression of both *PyUT1* and *PyUT2* genes were rapidly induced under low nitrogen concentration, suggesting a possibility that the *PyUT* genes play an important role in adaptation to low nitrogen conditions. The expression levels of both *PyUT1* and *PyUT2* genes were affected by inorganic nitrogen sources and an organic nitrogen urea. When the yeast *UT (DUR3)* gene-mutant strain was transformed with the plasmid vector expressing PyUT1 or PyUT2 proteins, the growth complementation of these transformants was not observed. These results suggest that the *PyUT* genes play important roles in uptake of other nitrogen sources and/or in intracellular urea transport system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：海洋生物化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：紅藻，スサビノリ，トランスポーター，窒素同化，色落ち，栄養塩，環境応答，尿素

1. 研究開始当初の背景

食用海藻の中で産業上、最も重要な藻種である紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*)

の養殖は、日本の海面養殖業の中で重要な位置を占めている。養殖スサビノリの生産量は、近年の養殖技術の発達・改良，多収穫性品種

の選抜育種，加工工程の全自動化などにより飛躍的に増大した．しかしながら，スサビノリ養殖は気象や海況などに大きく左右されるため，依然としてスサビノリ養殖には多くの病障害が伴い，スサビノリの生産量や品質（商品価値）は不安定である．

特に近年，日本各地のスサビノリ養殖場において，スサビノリの生産量や品質を著しく低下させる色落ち現象が毎年のように発生し，スサビノリ養殖業に甚大な被害をもたらしている．色落ちとは，海水中の栄養塩類（特に無機態窒素）の減少によりスサビノリ葉状体が退色・黄褐色化する現象である．これまでに，養殖場の水質（栄養塩類濃度，植物プランクトン量など）と色落ち発症との関連性や，色落ちによるスサビノリ葉状体の生理状態変化が調べられているが，スサビノリ葉状体の栄養塩類の代謝特性や色落ち発症の分子機構は未だ明らかにされておらず，色落ち発症の予測・抑制を困難なものとしている．したがって，スサビノリ養殖場における色落ち発症予測，抜本的な色落ち対策，低栄養塩耐性品種の効率的な選抜育種を進めるためには，スサビノリ葉状体の栄養塩類の代謝特性を分子レベルで解明することが必要不可欠である．

一般に藻類や陸上植物が主に利用する無機窒素源は，硝酸イオンとアンモニウムイオンであり，それぞれ硝酸イオントランスポーター（NRT）とアンモニウムイオントランスポーター（AMT）によって取込まれる．我々はこれまでに，スサビノリ葉状体を対象として海水中の無機窒素量の変化に反応して発現変動する遺伝子を調べ，スサビノリの尿素トランスポーター（*PyUT*）遺伝子，*PyNRT* 遺伝子，*PyAMT* 遺伝子が海水中の無機窒素量の低下により発現誘導されること，特に *PyUT* 遺伝子発現が短時間で急激に増加することを明らかにしている．このような発現特性を示す *PyUT* 遺伝子は，硝酸イオンやアンモニウムイオンの取込みに関与する *PyNRT* や *PyAMT* 遺伝子と同様に，スサビノリ葉状体が利用可能な海水中の栄養塩類の取込み重要な役割を果たしていると考えられる．したがって，スサビノリ葉状体の栄養塩類の代謝特性や色落ち発症の分子機構を明らかにするためには，*PyUT* 遺伝子の機能特性の解明が必要不可欠である．

2. 研究の目的

我々は既に，スサビノリ葉状体の PyUT に一次構造の異なる 2 つのアイソフォーム（740 アミノ酸残基からなる PyUT1 と 680 アミノ酸残基からなる PyUT2）が存在すること，PyUT1 および PyUT2 はそれぞれ 15 回および 16 回の膜貫通ドメインをもつ膜タンパク質であること，室内培養下で色落ちを誘導した

スサビノリ葉状体において *PyUT1* および *PyUT2* 遺伝子が高発現すること，などを明らかにしている．このことから，PyUT1 および PyUT2 はスサビノリ葉状体の貧栄養条件に対する応答・適応反応に関係していると考えられるが，両分子の機能特性は未だ不明である．

そこで本研究では，*PyUT1* および *PyUT2* 遺伝子の発現特性を明らかにするために，各 *PyUT* 遺伝子発現を特異的に検出・定量可能なリアルタイム PCR プローブ・プライマーセットを作製し，スサビノリ葉状体の色落ち過程，種々の窒素源添加による色落ち回復過程における各 *PyUT* 遺伝子の発現変化を調べ，窒素源取込みにおける各 *PyUT* 遺伝子の役割を明らかにする．さらに，各 PyUT 分子を緑色蛍光タンパク質（GFP）との融合タンパク質として野生型酵母内で発現させ，GFP を指標として各 PyUT 分子の細胞内局在を明らかにすると共に，酵母内で発現させた場合の各 PyUT 分子の機能保持性を確認する．次いで，*UT (DUR3)* 遺伝子欠損型酵母内で *PyUT1* および *PyUT2* 遺伝子を発現させ，種々の窒素源添加培地上での生育を調べ，各 PyUT 分子の基質特性ならびに機能特性を明らかにする．また，PyUT1 および PyUT2 を特異的に認識する抗体を作製し，これらを用いた免疫染色により，スサビノリ葉状体細胞内での各 PyUT 分子の機能特性を明らかにする．

3. 研究の方法

(1) スサビノリ葉状体の色落ちおよび色落ち回復の室内培養試験

栄養補強海水（PES）培地を用いて，低水温（10°C），短日（明期 10 h，暗期 14 h）条件で室内培養したスサビノリ葉状体を天然海水培地に移し，培地交換をせずに培養を継続して葉状体の色落ちを誘導した．24 h 毎に葉状体色を色彩色差計で測定し，色落ちが始まるまでの培養時間と，完全な色落ち状態になるまでの培養時間を調べた．また，完全に色落ちした葉状体を種々の無機態窒素（硝酸態窒素，亜硝酸態窒素，アンモニア態窒素）あるいは有機態窒素（尿素，遊離アミノ酸など）で栄養補強した海水培地に移して培養し，色落ち回復を行った．24 h 毎に葉状体色を測定し，色落ち回復が始まるまでの培養時間と，完全な色落ち回復状態になるまでの培養時間を調べた．

(2) スサビノリ葉状体の色落ち過程における *PyUT* 遺伝子の発現解析

PyUT1 および PyUT2 cDNA の塩基配列情報を基に，各遺伝子発現を特異的に検出・定量可能なリアルタイム PCR 用プライマー・プローブセットを作製した．室内培養により葉状体の色落ちを誘導し，完全な色落ち状態になるまでの間，24 h 毎に葉状体を回収した．各葉状体から全 RNA を抽出し，ランダムプライム

法によりリアルタイム PCR 用 cDNA を調製した。リアルタイム PCR 用 cDNA を鋳型とし、*PyUT1* あるいは *PyUT2* 遺伝子の発現検出に特異的なプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム PCR 解析を行い、葉状体の色落ち過程における各 *PyUT* 遺伝子の発現特性を調べた。

(3) スサビノリ葉状体の色落ち回復過程における *PyUT* 遺伝子の発現解析

室内培養により完全に色落ちした葉状体を調製した。色落ち回復に効果が認められた窒素源で栄養補強した海水培地に色落ち葉状体を移して色落ちを回復させ、完全な色落ち回復状態になるまでの間、24 h 毎に葉状体を回収した。各葉状体から全 RNA を抽出してリアルタイム PCR 用 cDNA を調製し、これを鋳型としたリアルタイム PCR 解析により、葉状体の色落ち回復過程における *PyUT1* および *PyUT2* 遺伝子の発現特性を調べた。

(4) *PyUT*-GFP 融合タンパク質の酵母用発現ベクターの構築

酵母用 GFP 発現ベクター pSNM4 の MET25 プロモーターと GFP cDNA の間に、*PyUT1* および *PyUT2* cDNA を挿入し、各 *PyUT* 分子の C 末端に GFP が付加された GFP 融合タンパク質、すなわち GFP 融合 *PyUT1* および GFP 融合 *PyUT2* の酵母用発現ベクター（各 pSNM4-*PyUT1* および pSNM4-*PyUT2*）を構築した。

(5) 酵母発現系を利用した *PyUT* の細胞内局在と発現 *PyUT* の機能性確認

酵母用 GFP 発現ベクター pSNM4、酵母用 GFP 融合 *PyUT* 発現ベクター pSNM4-*PyUT1* および pSNM4-*PyUT2* を用いて、野生型酵母 (BY4742 株) を形質転換した。各発現ベクターにより形質転換させた酵母をメチオニン (-) 培地にて培養し、GFP 融合 *PyUT1* および GFP 融合 *PyUT2* の発現を誘導した。次いで、共焦点レーザー顕微鏡観察を行い、GFP 蛍光を指標として *PyUT1* および *PyUT2* の酵母生細胞内における局在性を調べた。なお、*PyUT1* および *PyUT2* は膜タンパク質であるため、発現 *PyUT* の膜局在性を指標として、酵母内で発現させた *PyUT* の機能性の有無を判断した。

(6) 酵母発現系を利用した *PyUT* 遺伝子の機能特性解析

pSNM4、pSNM4-*PyUT1*、pSNM4-*PyUT2* を用いて、*UT (DUR3)* 遺伝子欠損型酵母 (YHL016c 株) を形質転換した。各発現ベクターにより形質転換した酵母をメチオニン (-) 培地に移して各 GFP 融合 *PyUT* の発現を誘導後、無機態窒素源または有機態窒素源を添加した培地上に塗布した。各培地上での形質転換酵母の生育状況を比較し、酵母内で発現させた *PyUT1* および *PyUT2* の基質特性ならびに機能特性を調べた。

(7) *PyUT* 特異的なポリクローナル抗体の作製

PyUT1 および *PyUT2* cDNA の塩基配列から演

繹されたアミノ酸配列を基に、膜貫通ドメイン以外の領域において、各 *PyUT* 分子に特異的なアミノ酸配列を見出し、これらを利用して各 *PyUT* 分子を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製した。すなわち、*PyUT1* については N 末端側から 1~17 および 724~740 残基目、*PyUT2* については 558~574 および 664~680 残基目のアミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、*PyUT1* および *PyUT2* についてカクテルペプチド抗原を調製した。各カクテルペプチド抗原を用いてウサギを免疫後、全採血して各 *PyUT* のウサギ抗血清を得た。

(8) スサビノリ葉状体細胞内における *PyUT* の機能特性解析

PES 培地を用いて培養した葉状体、色落ち誘導した葉状体、完全に色落ちした葉状体、色落ち回復に効果的であった窒素源添加により色落ち回復させた葉状体を調製し、4% パラフォルムアルデヒドに浸漬して固定した。固定した葉状体をエタノール浸漬して脱色後、ティッシュュー・テック OCT コンパウンドに包埋し、クライオスタットを用いて凍結切片を作製した。また、固定・脱色後の葉状体を水系アクリル樹脂 (LR-white resin) に包埋し、ミクロトームを用いてアクリル樹脂切片を作製した。各切片に対して一次抗体

(*PyUT* 抗血清)、二次抗体 (アルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗ウサギ IgG 抗体) を反応後、NBT/BCIP 発色法を利用した免疫染色を行い、葉状体細胞内における各 *PyUT* 分子の局在性を調べた。

4. 研究成果

(1) スサビノリ葉状体の色落ち過程における *PyUT* 遺伝子の発現解析

天然海水 (溶存無機態窒素 : DIN=140 μ L) を用いて培地交換をせずに葉状体を培養して色落ち誘導したところ、24 h 後に海水 DIN は最小値 (10 μ L) となり、その後は大きく変化しなかった。葉状体色の退色は 48 h 後に始まり、その後は培養時間の経過に伴い退色が進み、96 h 後に葉状体がほぼ完全な色落ち状態になることが明らかとなった。

次に、リアルタイム PCR により、葉状体の色落ち過程における *PyUT1* および *PyUT2* 遺伝子の発現変化を調べた。18S rRNA を内部標準とし、色落ち誘導前の葉状体内での発現量に対する各 *PyUT* 遺伝子の相対発現量を調べたところ、いずれの *PyUT* 遺伝子についても 24~48 h で著しく発現誘導されることが明らかとなった。なお、*PyUT1* 遺伝子発現は 48 h 後に 12.7 倍となり、168 h まで発現レベルは 30.5 倍まで増加し続ける傾向が認められた。一方、*PyUT2* 遺伝子発現は 24 h 後に 46.8 倍、48 h 以降では 64.9~68.9 倍となった。したがって、葉状体は *PyUT* 遺伝子を高発現して

貧栄養環境に対応していること、*PyUT2* 遺伝子が貧栄養環境に対する応答・適応反応に特に重要な役割を果たしていること、*PyUT2* 遺伝子がノリ養殖場の環境悪化や色落ち発症の早期予測の指標として最も有効であることが考えられた。

(2) スサビノリ葉状体の色落ち回復過程における *PyUT* 遺伝子の発現解析

色落ち誘導培養により色落ち状態とした葉状体に対して、無機態窒素（硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム）または有機態窒素（尿素、ヒドロキシ尿素、アルギニン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、プロリン、アラニン、タウリン）を最終濃度 1.5 mM-at N で添加し、48, 96, 144 h 後の葉状体色を測定した。その結果、無機態窒素ではいずれにおいても十分な色落ち回復効果が認められ、硫酸アンモニウムによる回復効果が特に優れていた。一方、尿素を除く有機態窒素の色落ち回復効果は無機態窒素のそれよりも弱い傾向がみられたが、尿素の色落ち回復効果は硫酸アンモニウムと同等以上であることが明らかとなった。

次に、色落ち葉状体に対して、十分な色落ち回復効果の認められた窒素源（硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素）と弱い色落ち回復効果の認められた窒素源（アルギニン、グルタミン酸、グリシン）を添加し、24 h 後の葉状体における *PyUT* 遺伝子発現をリアルタイム PCR により調べた。その結果、色落ち状態により高レベルとなった *PyUT1* および *PyUT2* 遺伝子発現は、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、グリシンを添加した場合に大きく抑制される傾向が認められた。なお、これら窒素源の色落ち葉状体色に対する回復効果は[硫酸アンモニウム=尿素>硝酸ナトリウム=亜硝酸ナトリウム=塩化アンモニウム>グリシン]の順であったが、色落ちにより高レベルとなった *PyUT* 遺伝子発現に対する抑制効果は[塩化アンモニウム≧硝酸ナトリウム=亜硝酸ナトリウム=硫酸アンモニウム>尿素=グリシン]の順であった。したがって、貧栄養状態の葉状体は硝酸イオン、亜硝酸イオン、アンモニウムイオンを優先的に取込むこと、*PyUT* 遺伝子は無機態窒素、尿素やグリシンといった低分子の有機態窒素に対して顕著な発現応答性を示すことが明らかとなった。

(3) 酵母発現系を利用した *PyUT* 遺伝子の機能特性解析

まず、GFP 融合 *PyUT* を野生型酵母内で発現させ、GFP 蛍光を指標として *PyUT* 分子の細胞内局在を調べた。酵母用 GFP 発現ベクター pSNM4、酵母用 GFP 融合 *PyUT* 発現ベクター

pSNM4-*PyUT1* および pSNM4-*PyUT2* を用いて野生型酵母を形質転換させ、対数増殖期まで液体培地で培養後、共焦点レーザー顕微鏡にて酵母細胞を観察した。pSNM4 で形質転換した酵母では、GFP 蛍光が細胞質のみで認められた。一方、酵母内で発現させた GFP 融合 *PyUT* 由来の蛍光は、酵母細胞膜と核周辺の小胞体膜で確認された。なお、GFP 融合 *PyUT1* と比較して、GFP 融合 *PyUT2* の方がより選択的に細胞膜に局在化していた。酵母細胞での異種発現解析の結果、*PyUT1* および *PyUT2* はいずれも、酵母細胞内で膜局在能を有する膜タンパク質として発現すること、細胞膜や細胞内オルガネラ膜に選択的に配位することが明らかとなった。

次に、*UT (DUR3)* 遺伝子欠損型酵母を用いた遺伝子相補試験を行い、*PyUT1* および *PyUT2* の細胞内機能を調べた。pSNM4-*PyUT1* および pSNM4-*PyUT2* を用いて遺伝子欠損型酵母を形質転換し、それぞれの形質転換体 ($\Delta DUR3$:pSNM4-*PyUT1* および $\Delta DUR3$:pSNM4-*PyUT2*) を得た。また、実験対照として、pSNM4 を用いて野生型酵母および遺伝子欠損型酵母を形質転換し、それぞれの形質転換体 (Wild type:pSNM4 および $\Delta DUR3$:pSNM4) を得た。各形質転換体を対数増殖期まで液体培地で培養後、硫酸アンモニウムまたは尿素を窒素源としたプレート培地に塗布し、各形質転換体の生育を調べた。硫酸アンモニウムを窒素源とした培地では、遺伝子欠損型酵母形質転換体 ($\Delta DUR3$:pSNM4, $\Delta DUR3$:pSNM4-*PyUT1*, $\Delta DUR3$:pSNM4-*PyUT2*) と野生型酵母形質転換体 (Wild type:pSNM4) の生育に差は認められなかった。一方、尿素を窒素源とした培地での遺伝子欠損型酵母形質転換体の生育は、同培地での野生型酵母形質転換体や硫酸アンモニウムを窒素源とした培地上での各形質転換体の生育よりも明らかに劣っていた。したがって、*PyUT1* および *PyUT2* 遺伝子は酵母 *UT (DUR3)* 遺伝子欠損を機能的に相補しないことが明らかとなり、両 *PyUT* 遺伝子はスサビノリ葉状体において、尿素取込みの輸送体として機能しているのではなく、尿素の細胞内輸送や尿素以外の物質の取込みに関与している可能性が示唆された。

(4) スサビノリ葉状体細胞内における *PyUT* の機能特性解析

PyUT1 および *PyUT2* のカクテルペプチド抗原を用いてウサギを免疫後、全採血して各 *PyUT* のウサギ抗血清を調製した。カクテルペプチドを固相化したマイクロプレートを用い、ELISA 法により各ウサギ抗血清の抗体価を調べたところ、免疫前血清の 12500 倍であった。

次に、PES 培地で培養した葉状体、色落ち葉状体、硫酸アンモニウムあるいは尿素の添加により色落ち回復させた葉状体を調製し、

各葉状体の凍結切片およびアクリル樹脂切片（いずれも 10 μ m）を作製した。各切片を MAS コートスライドガラスに接着後、ブロッキング、一次抗体（PyUT 抗血清）反応、二次抗体（AP 標識抗ウサギ IgG 抗体）反応を順に行い、NBT/BCIP 発色により抗体反応を検出した。凍結切片法では均一な葉状体切片が得られず、ほとんどの細胞で変形、破損、脱落がみられた。また、免疫染色の操作過程で大部分の切片がスライドガラスから剥離し、染色結果を得ることができなかった。一方、アクリル樹脂切片では細胞の形態が保持され、免疫染色の操作過程での切片の剥離・脱落もみられなかったため、葉状体の切片作製にはアクリル樹脂包埋が有効であることが分かった。しかしながら、いずれの葉状体のアクリル樹脂切片においても明瞭な抗体反応は認められず、PyUT1 および PyUT2 の葉状体細胞内における局在性を明らかにするには至らなかった。PyUT1 および PyUT2 はいずれも膜タンパク質であるため、PyUT 抗血清の認識部位が構造的障害を受けていたことが考えられる。葉状体の固定条件、抗原の賦活化条件など、免疫染色の諸条件をさらに検討する必要がある。

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Kakinuma M, Morita T, Tominaga H, Inoue M, Okumura E, Coury DA, Maegawa M, Amano H. Molecular analysis of physiological responses to environmental changes in marine macroalgae and angiosperms. Forth Bilateral Seminar Italy and Japan: Physiological and Chemical Impacts on Marine Organisms (for Conservation of Biodiversity and Sustainability). 2010 年 10 月 26 日, 愛知県愛知郡長久手町.

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

DDBJ/EMBL/GenBank アクセス番号
PyUT1 (PyDUR3.1) cDNA : AB359179
PyUT2 (PyDUR3.2) cDNA : AB359180

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿沼 誠 (KAKINUMA MAKOTO)
三重大学・大学院生物資源学研究科・
准教授
研究者番号 : 60303757