

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 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580195

研究課題名（和文） コンブ類の繁殖における静的抵抗性解明に関する研究

研究課題名（英文） A Study on constitutive resistance in the reproduction of kelp

研究代表者

水田 浩之（MIZUTA HIROYUKI）

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：00250499

研究成果の概要（和文）：

コンブ類の繁殖における静的防御機構（健全な藻体に存在する本来備えている抵抗機構）に関与する新たな化学成分の検索し、防御メカニズムの解明を目指した。その結果、マコンブ胞子体の生殖成長期（子嚢斑と呼ばれる生殖器官形成期）には、ROS 生成と制御、ROS とヨウ素の放出に特徴付けられる動的抵抗力と共に、フェノール化合物およびケイ素の蓄積による静的抵抗力を強化し、繁殖を成功に導く機構が働いていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We focused on the role of constitutive resistance in the reproduction of kelp, particularly *Saccharina japonica*. It has been suggested that sori (reproductive organ in the sporophyte) have a high phenolic compound content and that they are protected by the release of iodine and radical oxygen species to combat biotic stresses. Silicon deposition is also considered to provide constitutive resistance in kelp sori. These phenomena suggest that wound-healing and kelp reproduction are supported by both constitutive and induced resistance mechanisms, and that silicon and phenolics deposition might contribute as protectants to the success of kelp reproduction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：海藻、静的抵抗性、ストレス、コンブ、繁殖、生殖

1. 研究開始当初の背景

近年、海中林の消失原因の一つに環境の変化が指摘されている。また海藻養殖現場において、付着生物の寄生や病原菌の進入により著しい品質の低下を招いている現状もある。このように様々な環境ストレスは、コンブ自

身の生理状態の低下を招き、病的症状の発現・拡大に大きく寄与していると考えられる。しかしながら、海藻類の傷害や生物的ストレス等に対する応答については、病原菌の植物体への進入後に生じる過敏反応などの事後的な応答に関する報告はあるものの、海藻

が本来備えている抵抗性（静的抵抗性）に関する適応戦略あるいは抵抗戦略に関する報告はほとんど無い。そのため海藻の環境ストレスに対する抵抗力の評価手法も確立おらず、解決すべき問題も数多く残されている。加えて、抵抗力を強化した品種改良や選抜育種を達成するための基盤整備という点からも、コンブ類胞子体の成熟過程における静的抵抗性のメカニズム解明は必須である。

2. 研究の目的

申請者はコンブ類を対象として、その生育環境との相互関係、有用海藻の生活環の制御メカニズムの解明やそれに伴う栄養要求特性の解明に関する研究を行ってきた。その過程で、環境ストレスがコンブの成長や成熟などを左右していることを明らかにしてきた。中でも種苗生産や天然資源の更新に重要な意味を持つ胞子体から配偶体への世代交代の成功はその後の生産量に大きく影響を及ぼす。そこで、コンブ類の胞子体から配偶体への世代交代時において、静的抵抗性に関与すると考えられる構造的性質（構造的障壁）やフェノール類などの化学的性質（化学的障壁）を調べ、その特徴を明らかにすることを目的とした。また、胞子体の成熟過程において、静的抵抗性と動的抵抗性（過敏反応能力など）がどのように繁殖に関与しているかを明らかにし、コンブ類の栽培管理上有用な知見の獲得を目指した。

3. 研究の方法

(1) 子嚢斑形成に伴う活性酸素(ROS)生成量と放出量測定：マコンブ胞子体の葉状部から栄養組織(未成熟組織)から採集した直径約2cmのディスクを培養した。ディスク表面が隆起する過程(子嚢斑形成)を、4段階に分けた：第1段階(栄養成長期)、第2段階(側糸伸長初期)、第3段階(側糸伸長及び遊走子嚢形成期)および第4段階(遊走子放出期)。異なる成熟段階にある子嚢斑形成ディスクを、2', 7'-ジクロロフルオレセインジアセテート(DCFH-DA, 50 μ M)を含む海水中で培養後、ディスク中に生じたジクロロフルオレセイン(DCF)を抽出し、抽出液の蛍光強度からROS生成速度を算出した。また、培養開始時と終了時の培地中のROS量の変化量からROS放出量を算出した。さらに、各ステージにあるディスクを50 μ M DCFH-DAを含む海水中で培養し、洗浄後ハンドセクションによる切片作成を行い、蛍光顕微鏡観察に供した。

(2) 子嚢斑と未成熟部位におけるROS消去系酵素活性と各種化学物質含量等の比較：子嚢斑が形成されたディスクの子嚢斑部位とそれに隣接する未成熟部位に分け、それぞれのROS消去系酵素活性[アスコルビン酸ペルオ

キシダーゼ(APX)、カタラーゼ(CAT)、グルタチオンレダクターゼ(GR)およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)]を測定した。また、抗酸化活性、フェノール化合物含有量、ヨウ素、ケイ素および多糖類(アルギン酸、ラミナラン、フコイダン)含有量を測定した。

(3) 傷害組織とそれらの隣接部位におけるケイ素含有量の蓄積量の比較：1ヶ月培養したディスクの中央部と縁辺1mmの部位から藻体片を切り出し、ケイ素含有量の測定に供した。子嚢斑を形成した場合には、その部位と隣接する未形成部位からも試料を採取し、ケイ素含有量の測定に供した。また、藻体内のケイ素の分布を観察するため、珪藻、海綿およびバクテリアにおいてケイ素の沈着を可視化するのに用いられてきたローダミン123(R123)による染色を行い、切片等を蛍光顕微鏡で観察した。

(4) チガイソ科褐藻胞子体の葉状部と胞子葉間における抗酸化活性、フェノール化合物含有量およびケイ素含有量の比較：チガイソあるいはワカメの胞子葉と葉状部様の胞子葉からディスクを切り抜き、抗酸化活性、フェノール含有量およびケイ素含有量を測定し、比較した。

4. 研究成果

子嚢斑未形成ディスク(第1段階)は、 0.13 ± 0.06 (mean \pm s.d.) μ g cm^{-2} h^{-1} のROS生成速度を示し、側糸が伸長し始める第2段階にはROS生成速度は増加するものの、第1段階と有意な差は認められなかった。その後、遊走子嚢が形成される第3段階になると、最も高いROS生成速度(0.45 ± 0.23 μ g cm^{-2} h^{-1})が観察され、その値は第1段階の約5倍にも達した。遊走子が放出され、子嚢斑が剥離すると(第4段階)、ROS生産速度は第1段階と同レベルまで低下した。

ROSの放出は第1段階に比べ第2段階で有意増加し、第3段階に最も高い放出(0.28 ± 0.4 μ g cm^{-2} h^{-1})が認められ、その値は第1段階の2.6倍に達した。第4段階では、ROS放出は第1段階と同レベルまで減少した。

ROSの生産を組織化学的に観察すると、子嚢斑部位で強いDCFの緑色蛍光が認められた(図1A, B)。子嚢斑から遠ざかるに従い、クロロフィルの赤い自家蛍光のみが観察されるようになり、その移行部では、弱い緑色蛍光を示した。強いDCFの緑色蛍光は、側糸の伸長期に観察され(図1C)、その蛍光は側糸の細胞壁付近の細胞質周囲に位置していた。DCFの緑色蛍光は、遊走子嚢にも観察された(図1D 矢印)。しかし、側糸(図1E 矢印:p)の先端に位置する粘液帽には、蛍光は見られなかった(図1E and E' 矢尻:mc)。このROS

の発生は、 $10\ \mu\text{M}$ のジフェニルヨードニウム (DPI) の前処理により抑制されたことから、細胞膜にある NADPH オキシダーゼが側糸や遊走子囊の伸長・形成に深く関与していると考えられた。また、子囊斑の形成に伴い ROS の体外への放出も認められ、通常生物ストレスを受けて誘導されることが知られる過敏反応が、コンブ孢子体の成熟過程においては、コンブが自ら誘導することにより、繁殖時の抵抗性を向上させていることが示唆された。

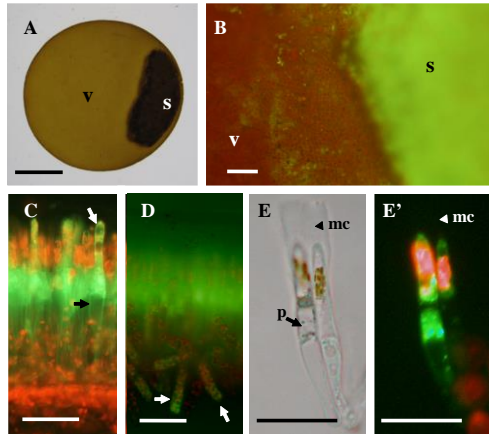


図1 マコンブ孢子体ディスクに形成された子囊斑(s)と子囊斑未形成部位(v)におけるROS生産

子囊斑と隣接する子囊斑未形成部位で、抗酸化活性と活性酸素消去系酵素4種の活性を比較したところ(図2)、子囊斑部位の抗酸化活性は未形成部位に比べ1.5倍高かった(図2)。ROS消去系酵素活性(APX, GR, CATとSOD)もまた、子囊斑部位で高く、その値は未形成部位2.1~2.5倍高かった(図2)。これらのことは、子囊斑を構成する側糸や遊走子囊の伸長に活性酸素を必要とすることや体内での活性酸素の濃度を制御するために抗酸化物質あるいは活性酸素消去系酵素活性の上昇が起きていることを示すものである。

子囊斑形成部位のフェノール化合物含量は、未形成部位に比べ3.7倍高かった(図2F)。フェノール化合物は動物の被食等に対する化学的隔壁として作用することから、成熟に伴い被食動物等に対する抵抗性を向上させていると考えられた。一方、子囊斑形成部位のヨウ素含有量は、未形成部位の63%に満たなかった(図2G)。このことから、子囊斑形成に伴い起こるヨウ素の放出が、酸化防御メカニズムとそれ自身の抗菌作用により抵抗力強化に貢献していることが示唆され、ヨウ素もまた化学的障壁の一つとなっていると考えられた。さらに、子囊斑形成部位では、高いラミナランおよびフコイダン含有量が観察された。ラミナランは貯蔵物質として、またフコイダンは保護物質と予想されてい

る物質であり、フコイダンの蓄積もまた静的抵抗性の付与に大きく寄与していることが分かった。

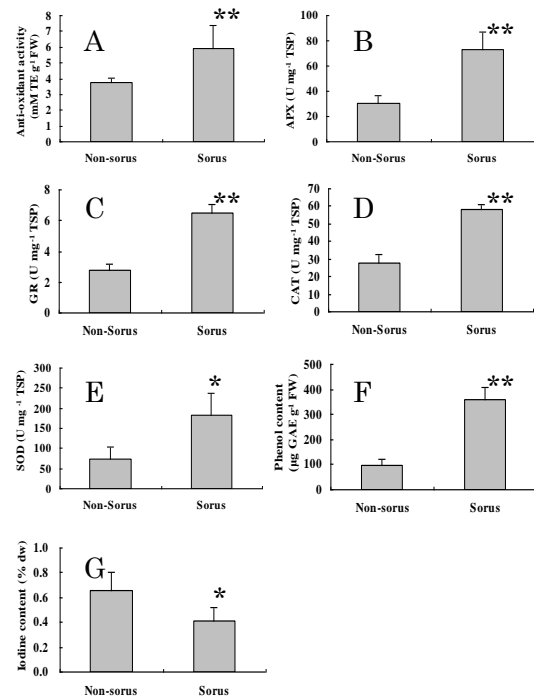


図2 マコンブ子囊斑とその隣接部位における抗酸化活性、4種ROS消去系酵素活性、フェノール化合物およびヨウ素含有量の比較 (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$)

ケイ素は、マコンブ孢子体全体にわたり分布していた。茎状部-葉状部移行部から300cm部位の中帯部のケイ素含有量 ($9.6 \pm 4.7\ \mu\text{g gFW}^{-1}$) は、基部中帯部のそれ ($2.6 \pm 0.6\ \mu\text{g gFW}^{-1}$) より有意に高い値を示した(図3)。同様の傾向が縁辺部にも当てはまり、基部から先端部にかけて増加傾向を示した。一方、中帯部から縁辺部に向けても増加する傾向があり、移行部から200cmの縁辺部の縁のケイ素含有量 ($26.0 \pm 14.0\ \mu\text{g gFW}^{-1}$) は、中帯部 ($3.65 \pm 1.40\ \mu\text{g gFW}^{-1}$) に比べ7倍高かった。

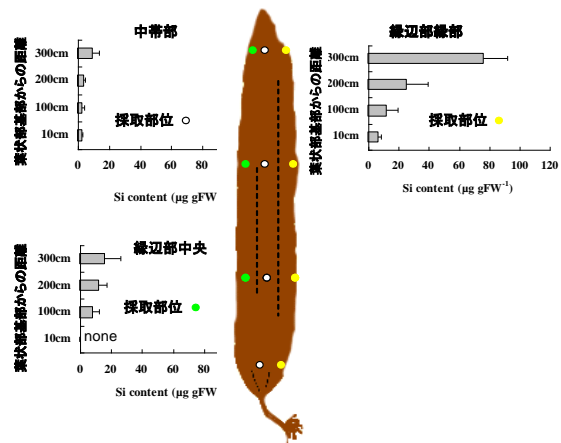


図3 マコンブ胞子体におけるケイ素の分布

茎状部のケイ素含有量は、 $7.25 \pm 2.45 \mu\text{g gFW}^{-1}$ であった。R123を用いてケイ素の分布を蛍光顕微鏡で観察すると、傷害の無い部分では、表皮細胞と皮層細胞間のアポプラストおよびクチクラ層にR123の蛍光が観察された。

傷害部位や子嚢斑形成部位のケイ素含有量は、前述した鉛直かつ水平分布と深く関連していると思われた。しかし、傷とその周辺無傷部位や子嚢斑とその隣接部位の間には明確な違いが認められ、傷害部位や子嚢斑のケイ素含有量は、隣接する部位に比べ高い値を示した。傷害部位や子嚢斑部位の高いケイ素含有量は培養胞子体ディスクで顕著であり(図4)、ディスク縁辺部の傷害部位におけるケイ素含有量は $16.1 \mu\text{g gFW}^{-1}$ であり、ディスク中央($10.0 \mu\text{g gFW}^{-1}$)に比べ約1.6倍高い値を示した(図4a)。培養ディスク上に形成された子嚢斑部位のケイ素含有量($6.13 \mu\text{g gFW}^{-1}$)も、隣接する未成熟部位の1.8倍高い値を示した(図4b)。さらに蛍光顕微鏡観察において、強いR123蛍光が、胞子体ディスクの傷害部位で認められた(図5a)。このことは、傷害を受けたのち治癒した部分においてケイ素が傷害を覆うように沈着していることを示している。

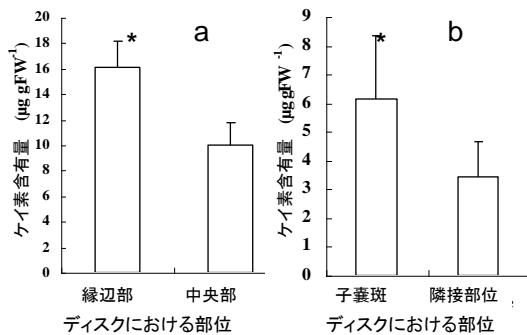


図4 培養マコンブ胞子体ディスクの周辺切断面(a左)と子嚢斑部位(b左)におけるケイ素含有量

さらに強いR123蛍光は、子嚢斑でも認められた(図5b,c)。R123の蛍光は、子嚢斑を形成する側糸と呼ばれる遊走子(無性生殖細胞)嚢を保護する役割を担うと言われている部分(図5c中のp)とそれを保護するため側糸先端部に形成される粘液帽(図5c中のm)に分布していた。これに対し、無傷の部位あるいは子嚢斑未形成部位ではクロロフィルの赤い自家蛍光のみが観察された。これらのことから、ケイ素が胞子体が成長していく過程のみならず、コンブ類の胞子体の生殖

器官の形成及びその保護に大きく関わり、繁殖の成功に大きく寄与していることが明らかになった。

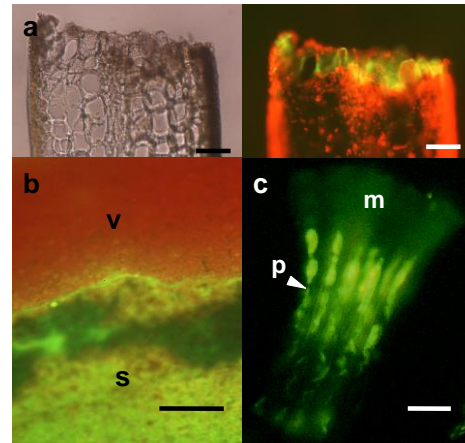


図5 マコンブ胞子体ディスク切断面(a)および子嚢斑(b,c)におけるR123の分布。

加えて、チガイソ科褐藻の胞子葉(めかぶと呼ばれる生殖器官)でも高いフェノール化合物やケイ素含有量を示す傾向が認められたことから、生殖器官の保護に寄与するこれらの物質は、コンブ科褐藻だけでなくチガイソ科褐藻を含めたコンブ類に広く共通する特徴であると考察された。さらに、ケイ素の機能や必須性は大型海藻類において全く不明であった元素であり、本成果は海藻類の栄養要求における学術的にも貴重な基礎的知見となる。

以上の通り、本研究は、種苗生産現場での生理障害に対する栽培管理上の貴重な情報となるだけでなく、品種改良や選抜育種に向けた抵抗性強化技術の開発や品質保証に不可欠な知見となるであろう。

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2件)

1. Mizuta, H. and Yasui H. Protective function of silicon deposition in *Saccharina japonica* sporophytes (Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology* (2012) 24:1177-1182. (査読有) DOI 10.1007/s10811-011-9750-8
2. Mizuta, H. and Yasui H. Significance of radical oxygen production in sorus development and zoospore germination in *Saccharina japonica* (Phaeophyceae). *Botanica Marina* (2010) 53: 409-416. (査読有) DOI 10.1515/BOT.2010.047

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水田 浩之 (Mizuta Hiroyuki)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号 : 00250499