

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23580272

研究課題名(和文) 有害渦鞭毛藻シストの休眠および発芽の誘導・制御機構の解明

研究課題名(英文) Induction and control mechanism on the dormancy and germination of cysts of harmful dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*

研究代表者

坂本 節子 (Sakamoto, Setsuko)

国立研究開発法人水産総合研究センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：40265723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：渦鞭毛藻には赤潮や貝毒の原因となる種が多く含まれる。その数種は生活史の中でシストを形成する。シストの存在は分布拡大や新たな海域への定着に影響を与える。しかしながら、分子生物学的なシスト発芽の誘導や制御の機構は不明である。本研究では有毒渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* シストの休眠や発芽誘導の制御機構を分子生物学的に明らかにすることを目的として、シストに特異的に発現している遺伝子配列を解析した。その結果、休眠シストから光捕集タンパク質や膜輸送体などの複数の発現遺伝子が得られ、シストの発芽準備が休眠期間中から進行していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The dinoflagellates include many harmful species causing red tide and shellfish poisoning. Some species in the dinoflagellate produce cysts in the life cycle. The existence of the cyst affects to the distribution expansion and colonization in new waters. However, the molecular biological induction and control mechanism of the cyst germination is still unknown. In this study, to clarify the control mechanism of induction of dormancy and germination in molecular biology, the expression gene from the cysts of harmful dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* was analyzed. As the result, several expression gene sequences of functional proteins such as light-harvesting proteins, chlorophyll a-b binding protein, and ABC transporter ATP-binding subunit were obtained from the dormant cyst. This result suggests that preparation of the cyst germination advanced always from the dormant period.

研究分野：水産海洋学

キーワード：有害有毒プランクトン シスト 発現遺伝子 休眠 発芽 生活史

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻の生活史は、至適な温度と栄養環境下では無性的に増殖する栄養細胞の時期と、有性生殖を経て形成される不動で環境の変化に強い耐性を持つシストの時期に大別される。このような渦鞭毛藻の生活史における細胞ステージの変化は、環境の変化に対する一つの生存戦略であり、興味深い現象としてこれまで数々の観察がなされてきた。特に、海産渦鞭毛藻類には赤潮や貝毒の原因となる有害有毒種が多く存在する。その出現動態は環境の変化に伴って現れる生活史の過程によって大きく変化する。また、有害有毒渦鞭毛藻においてはシストの存在が分布拡大や定着化に大きな影響を与え、赤潮や貝毒の発生海域の拡大などの水産業上の問題にも関与している。したがって、有害有毒渦鞭毛藻の生活史を明らかにすることは、赤潮や貝毒原因種の発生機構の解明や新たな予察技術の開発につながることを期待される。

しかしながら、渦鞭毛藻の生活史を巡る細胞形態の変化やそれに伴う環境耐性の獲得は、これまで現象の観察のみにとどまっており、細胞内で起きている様々な変化を制御しているメカニズムは全くわかっていない。

渦鞭毛藻類の生活史の誘導・制御機構に関する先行研究としては、有害渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の有性生殖過程についての研究があるものの (Hosoi-Tanabe et al. 2005, Kobiyama et al. 2007)、有性生殖の誘導や制御の機構はまだ解明には至っていない。また、本種の栄養細胞の高温耐性に関与するタンパク質 (Kobiyama et al. 2009) や毒生産に関与する遺伝子の探索 (Cho et al. 2008) も試みられているが、いずれの研究も端緒にすぎたばかりである。シストの休眠や発芽の誘導・制御機構に関する研究に至っては、国内外を見渡しても未着手の状態にある。

筆者は有害渦鞭毛藻の生活史や生理生態学的研究を進めてきた。その過程で、シスト形成や発芽の過程においてクロロフィル蛍光の消失や出現、発芽誘導にともなうシスト細胞内での細胞器官の形成等、様々な細胞の変化が経時的および環境依存的に観察されることがわかってきた。また、有害渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* や *Pyrodinium bahamense* のシストが同調的に発芽する条件を明らかにし (Sakamoto et al. 2003, Sakamoto et al. 2009)、ほぼ同じ発芽反応過程にある細胞を得ることができる技術を確立した。これにより、シスト形成直後から発芽誘導における異なる細胞ステージの試料を経時的に入手することができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、現象としてとらえられている渦鞭毛藻の生活史の過程を分子生物学的、生化学的に解明することを目的とする。本研究では、特にシストの休眠や発芽の誘

導・制御機構を分子生物学的、生化学的に明らかにして有害有毒渦鞭毛藻の出現や消滅を生物の代謝機構から説明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) シスト形成と回収

実験材料として有害渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* を用いた。2 または 3 株の本種クローン培養株を改変 f/2 培地中、18、12hL:12hD の明暗周期で混合培養し、シストを形成させた。ここで用いた改変 f/2 培地は通常の f/2 培地の窒素およびリン濃度を 1/5 に、微量金属類濃度を 1/3 に添加したものである。シストは形成後 2 日以内に顕微鏡下でキャピラリーを用いてマイクロチューブに分離し、液体窒素で急速凍結後 -80 に保存した。栄養細胞については細胞数を計数後、遠心分離で細胞を集藻し、液体窒素で急速凍結後 -80 で保存し、対照区の試料とした。

(2) 微量シスト試料からの cDNA ライブラリーの構築

トータル RNA の抽出には RNeasy plant mini kit (キアゲン) を用いた。まず、凍結した細胞に抽出キット付属の抽出液を添加した後、ペレットペッスルで細胞をすりつぶした。次に、キットのプロトコールに従いトータル RNA を抽出した。得られた RNA の一部から Oligotex-dT30<Super> (タカラバイオ) を用いて mRNA を分離精製した。得られた mRNA を元に cDNA Synthesis Kit (M-MLV version) (タカラバイオ) を用いて 1 本鎖および 2 本鎖 cDNA を合成した。RNA および cDNA 濃度は各抽出精製後に NanoDrop (ライフテクノロジーズ) を用いて測定した。

(3) シスト期の各生活史段階の細胞に特異的、差次的に発現している遺伝子の配列解析

ディファレンシャル・ディスプレイ法 (Liang and Pardee 1992) を用いて、シストの各生活史段階で特異的に発現している遺伝子を抽出した。DNA フラグメントの増幅 PCR プライマーとして和光 DNA オリゴマー (12) セット A-2 (和光純薬)、PCR 酵素に ExTaq (タカラバイオ) を用いて DNA 断片を増幅した。得られた産物を 1% アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色 (0.5 μg/ml) して得られた DNA 断片のバンドの分子量を比較した。シスト試料から特異的に得られた PCR 産物のバンドを切り出し、精製、クローニングした後、3130xl ジェネティックアナライザー (アプライド・バイオサイエンス) を用いて塩基配列を解析した。得られた塩基配列について遺伝子データベースを用いた相同性検索を行い、遺伝子の機能推定を行った。

(4) 次世代シーケンサーを用いた mRNA 網羅的解析

シストに発現している遺伝子の全体像をつかむため、次世代シーケンサーを用いた mRNA の網羅的解析を実施した。500 ~ 1600 細胞の 5 試料のシスト(休眠期間が異なるシストが混在)からそれぞれトータル RNA を抽出した。抽出には RNeasy plank mini kit(キアゲン)を用いた。次に、トータル RNA 中の DNA を除去するため、DNase 処理を施した。バイオアナライザーを用いて得られたトータル RNA の品質を確認した後、RNA が分解されていない 3 試料を選抜した。3 試料のうち、同日にシストを分離した 2 試料については、混合して 1 試料とし、最終的に 2 試料のトータル RNA を得た。これを SMARTer Ultra Low RNA Kit for illumina Sequencing-HV (クローンテック)を用いて 1 本鎖 cDNA の合成、および完全長 2 本鎖 DNA の増幅を行った。得られた cDNA 試料の一部を用いて次世代シーケンサー Hi-Seq (illumina)での分析用ライブラリーを調製し、配列データをペアエンド法、100 塩基読み取りにより取得した。遺伝子配列解析プログラム cutadapt (version 1.1) および Trimmomatic (version 0.32)を用いて、得られた配列からアダプター配列および QV 値(クオリティー値)が低い領域のトリミングを施した後、プログラム Trinity (version 2.0.6)を用いてアセンブリを施し、コンティグ配列を得た。

4. 研究成果

(1) シスト形成と回収

シストに特異的に発現している遺伝子を解析するためには、栄養細胞が混在しないシストのみを回収する必要がある。しかしながら、*G. catenatum* のシスト形成は同調的には起こらず、増殖の対数期から定常期にかけての 10 日間前後の間に比較的まとめて形成された。シストが形成された培養液中には栄養細胞も混在することから、形成時期が明らかなシストだけの試料を得るには顕微鏡下でキャピラリーを使用して回収する方法が最も確実であった。

研究の過程で、それまでシストが形成されていた培養株で突然シストの形成率が低くなり研究材料の入手が困難になった。添加する栄養塩濃度の再検討や、新たな培養株を分離してシスト形成株の入手を試みたものの、シストの形成率は非常に低い状態が続いた。最終的に、培養に用いた培地のベースとなる海水を変更したことが原因であることがわかり、海水を変えることによりシストの形成が復活した。Sawayama et al (1993) は *Alexandrium catenella* のシスト形成が海洋細菌によって阻害されること、阻害物質が高分子タンパク質であることを報告している。*G. catenatum* のシスト形成においても海水中何らかの接合阻害物質によりシスト形成が阻害された可能性がある。本研究で観察された現象は、シスト形成条件についてもまだ十分に解明できていないことを示している。

(2) 微量シスト試料からの cDNA ライブラリーの構築

G. catenatum のシストはペッスルで物理的に破壊することにより RNA 抽出が可能であった。RNeasy Mini Kit には 2 種類の抽出バッファ-RLT と RLC (Guanidinium Isothiocyanate 入り)があるが、トータル RNA の抽出には抽出は RLT で可能であった。1.3 × 10³ 細胞のシストからは 0.3 μg のトータル RNA が分離でき、その全量を用いて 16 μg の 2 本鎖 cDNA が得られた。一方、栄養細胞 6.9 × 10⁴ 細胞からは 33 μg のトータル RNA が分離でき、その一部を用いて 12 μg の 2 本鎖 cDNA が得られた。

以上の検討から、市販の遺伝子工学キットを組み合わせて活用し、1300 細胞程度のシスト試料からトータル RNA を抽出し、mRNA 精製、2 本鎖 cDNA 合成して cDNA ライブラリーを構築する方法が確立できた。

(3) シスト期の各生活史段階の細胞に特異的、差次的に発現している遺伝子の配列解析 cDNA の希釈液とランダムプライマー 12 種類を用いて PCR 増幅した産物を電気泳動で比較した。ランダムプライマーのうちシストおよび栄養細胞の両方から PCR 産物が安定して得られた A22(GCCTGCCTCAGC) および A29(GGTTCCGGGAATG)の PCR 産物のうち、シスト試料から特異的に得られた産物の配列解析を実施し、遺伝子配列データベースで機能性タンパク質の配列の検索を実施したところ、真核生物被子植物である金属輸送タンパク質と比較的高い相同性を示す配列 (E-value 2e-08, 相同性 55%) やクラミドモナスのメチル基転移酵素 (E-value 0.011, 相同性 73%) が得られた。しかし、得られた配列のほとんどはデータベースの配列との相同性が認められないか、相同性が低く、相同配列長が短い (100 bp 以下) 機能不明な遺伝子であった。そこで、検索するデータベースを渦鞭毛藻類の配列に絞り込んで解析した結果、褐虫藻の光合成関連タンパク質である光捕集タンパク質 (E-value 4e-51, 相同性 78.9%)、渦鞭毛藻ヘテロカプサ トリケトラの光捕集タンパク質 (E-value 3e-6, 相同性 75.6%) など複数の光捕集タンパク質と相同な配列が発現していることがわかった。さらに、本研究の対象生物である *G. catenatum* の栄養細胞の mRNA-Seq 解析により得られた遺伝子配列 (コンティグ配列数 33593) が Hackett et al. (2013) により遺伝子データベースに公開されたことから、この配列とシストから得られた配列の比較を行った結果、リボソームタンパク質合成関連タンパク質、膜輸送体タンパク質、光合成に関わるクロロフィル a-b 結合タンパク質、ABC 輸送体などに関わるタンパク質など、保存性の高い複数のドメイン配列と相同性を示した。

G. catenatum のシストの発芽において、光は発芽の過程を促進させる役割を果たして

いと推測される。しかし、休眠中のシストでは、光合成色素の活性は消失してクロロフィル蛍光は確認されなくなる。発芽に向かう過程でその活性は復活することが観察されているが、本研究から光捕集タンパク質や光合成に関連する遺伝子、および膜輸送体・ABC輸送体といった物質輸送とエネルギー形成に関わる遺伝子が休眠期のシストにも発現していることが示唆され、発芽の準備が進行していることが推察される。このことは、逆にこれらの機能タンパク質合成の制限ではない方法で休眠・発芽が制御されていることを想像させる。

次に、得られた遺伝子の発現機序を明らかにすることを目的として、本研究では休眠から発芽の過程における休眠状態の異なるシスト（内的休眠中～発芽誘導中）から mRNA の抽出を試みた。しかしながら、研究の過程でシストの形成率が低下して RNA を抽出するのに十分なシスト材料が回収できないなどのトラブルがあり、シストの遺伝子発現機序の解明には至らなかった。

今回の発現遺伝子解析においてシスト期に発現していると推測される配列の一部が明らかになったことから、今後、これらの配列を基に定量 PCR による発現量解析を検討し、発現機序を明らかにしたいと考えている。

（４）次世代シーケンサーを用いた mRNA 網羅的解析

5 試料のシストから 137～982ng のトータル RNA を抽出した。この試料を DNase 処理後、RNA の品質が高かった 2 試料を選抜して 19.78ng（試料 1）および 24.08ng（試料 2）のトータル RNA を得た。これらの試料を基に mRNA-Seq 解析を実施した結果、約 4500 万リードの配列をそれぞれの試料から取得した。さらに配列のトリミングおよびアッセンブルを進めた結果、2 試料の合計で約 11.6 万のコンティグ配列（平均配列長 821b、最長配列 17,904b、N50 1246b。コンティグ配列長の頻度分布を図.1 に示す）が得られた。現在、このコンティグ配列のアノテーション解析を進めている。

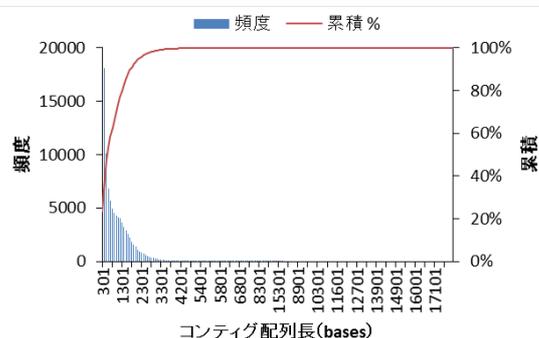


図 1. mRNA-Seq 解析で得られたコンティグの配列長の頻度分布

< 引用文献 >

Anderson D M, Fukuyo Y, Matsuoka K, Cyst methodologies, In: Hallegraef G M, et al. (Ed.) Manual on Harmful Marine Microalgae, 2003, pp.165-189.

Cho Y, Hiramatsu K, Ogawa M, Omura T, Ishimaru T, Oshima Y, Non-toxic and toxic subclones obtained from a toxic clonal culture of *Alexandrium tamarens* (Dinophyceae): Toxicity and molecular biological feature., Harmful Algae, 7, 2008, 740-751.

Hosoi-Tanabe S, Tomishima S, Nagai S, Sako Y, Identification of a gene induced in conjugation-promoted cells of toxic marine dinoflagellates *Alexandrium tamarens* and *Alexandrium catenella* using differential display analysis., Fems Microbiology Letters, 251, 2005, 161-168.

Kobiyama A, Ikeda Y, Koike K, Ogata T., Isolation of a differentially expressed gene in separate mating types of the dinoflagellate *Alexandrium tamarens*., Eur. J. Phycol., 42, 2007, 183-190.

Kobiyama A, Tanaka S, Kaneko Y, Lim P-T, Ogata T, Temperature tolerance and expression of heat shock protein 70 in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarens* (Dinophyceae)., Harmful Algae, 9, 2010, 180-185.

Liang P and Pardee AB, Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 14;257(5072), 1992, 967-71.

Sakamoto S, Kotani Y, Matsuyama Y, Yamaguchi M, Effect of temperature and light on cyst germination of *Gymnodinium catenatum* Graham., Seventh International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates, Abstract, 2003, 101.

Sakamoto S, Yamaguchi M, Gatdula N, Furio EF, Effect of environmental factors on the life cycle of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Dinophyceae). In: (Ishida K et al., eds.) 9th International Phycological Congress, Tokyo, August 2-8, 2009. Phycologia 48 (4 Suppl.): pp. 114.

Sawayama S, Sako Y, Ishida Y, New Inhibitor for mating reaction of *Alexandrium catenella* produced by marine *Alteromonas* sp., Nippon Suisan Gakkaishi,

59, 1993, 291-294.

Hackett JD, Wisecaver JH, Brosnahan ML, Kulis DM, Anderson DM, Bhattacharya D, Plumley F, Erdner DL, Evolution of Saxitoxin Synthesis in Cyanobacteria and Dinoflagellates., Mol Biol Evol. 30, 2013, 70-78.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

坂本 節子

渦鞭毛藻シストの休眠・発芽の誘導・制御機構に関する研究 - シストの光発芽環境、微細藻類研究会、2013年6月13日、自然科学機構基礎生物学研究所岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡崎市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 節子 (SAKAMOTO, Setsuko)

国立研究開発法人水産総合研究センター・その他部局・主任研究員

研究者番号：4 0 2 6 5 7 2 3