

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660160

研究課題名(和文) 浸透圧調節の特殊性から探る紅藻ウシケノリの低塩類濃度耐性機構の研究

研究課題名(英文) Study on regulatory mechanisms of hypotonic stress-tolerance in the red seaweed *Bangia fuscopurpurea*

研究代表者

三上 浩司 (Mikami, Koji)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40222319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海産紅藻ウシケノリは、淡水中で生存可能であり、そのとき細胞生理学上の常識に反して細胞収縮を引き起こす。そのような特殊な淡水適応の制御について研究を行った。その結果、淡水中では遊離アミノ酸含有量が減少していたが、細胞形態の変化から予測された膜脂質脂肪酸の組成変化は観察されなかった。また、トランスクリプトーム解析により、淡水中ではF-アクチン再構成に関わる遺伝子の発現が低下し、ミトコンドリアにおいてATP生産に関わる遺伝子の発現が上昇していた。以上のことから、ウシケノリは細胞内浸透圧を低下させることで細胞の膨張を抑え、生存を可能にするため増殖を停止してエネルギーを蓄えていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The marine red seaweed *Bangia fuscopurpurea* can adapt and live in fresh water, for which cell shrinkage occurs against physiological consensus of hypotonic stress-dependent cell swelling. The study was performed to elucidate the mechanism of such a special regulation in fresh water tolerance in *B. fuscopurpurea*. As results, intracellular contents of free amino acids was reduced by fresh water treatment, whereas fatty acid composition of membrane lipids, whose changes were expected by the morphological alternation of cells, was not different under normal and hypotonic conditions. In addition, transcriptome analysis revealed the expression was reduced for genes related to actin cytoskeleton and increased for genes involved in ATP synthesis in mitochondria. Therefore, to adapt to the hypotonic stress, *B. fuscopurpurea* reduces the concentration of cellular substances to prevent cell swelling and accumulates energy by stopping cell division to survive in fresh water.

研究分野：海洋植物学

キーワード：環境ストレス耐性 低塩類濃度ストレス 細胞収縮 葉緑体 遺伝子発現 トランスクリプトーム解析
ウシケノリ

1. 研究開始当初の背景

海産原始紅藻類は、環境変動の激しい潮間帯に生息していることから、強い環境耐性能を保持していると考えられている。しかし、陸圏以上の環境変動を伴う潮間帯での生息を可能にしている生理制御機構に関する知見は極めて少ない。また、その理解には環境応答遺伝子の発現制御機構の解明が必須であるが、解析技術の整備が不十分なためその解析も滞っているのが現状である。

そのため、申請者は原始紅藻類の環境ストレスに対する耐性能獲得の仕組みや環境応答遺伝子の発現制御機構について研究を進めている。その過程で海藻における一過的遺伝子発現系を世界で初めて開発することができ (Mikami et al., In, *Genetic Transformation*, pp241-258, 2011) これにより遺伝子の発現制御機構の解析を進めることが可能となった。しかし、原始紅藻類の環境応答については、遺伝子レベルでの解析が現象面と結びついていないのが世界的な現状となっている。

2. 研究の目的

潮間帯では潮の満引や降雨などが原因となる海水の塩類濃度の変化が大きいことから、ウシケノリの低塩類濃度あるいは低浸透圧ストレスへの耐性能やその獲得に関する研究を進める。

これまでの予備実験において次のような未発表ではあるが興味深い知見を得ている。

- ・潮間帯由来のウシケノリは淡水中でも生育可能である
- ・淡水中で細胞が潰れたように扁平になり葉緑体の形状がはっきりしなくなる

特に、低塩類濃度下、すなわち低張溶液中で見られる細胞の収縮については一般常識では理解できない予想外の現象である。

以上を踏まえ、本研究では強い低塩類濃度耐性能の生理学的基盤や低浸透圧条件下での細胞収縮を可能にしている生理現象の解明に重点を置き、遊離アミノ酸や膜脂質脂肪酸不飽和度の量的変化、および低塩類濃度耐性に関わる遺伝子の解析を行なうことにより、潮間帯に生息する原始紅藻類の環境耐性能の強さを新規の生物学的知見により説明することを試みる。

3. 研究の方法

(1) 細胞および葉緑体の形状変化を促す塩類濃度の同定とそれらの変化の可逆性の検討

海水培地を段階的に希釈して塩類濃度が海水の 75%, 50%, 25%, 15%, 0% となる培地を用

意し、それらの中でウシケノリを 1 週間あるいは 2 週間培養することで細胞収縮と葉緑体形状変化を促す塩類濃度を同定する。また、その影響の可逆性を検証するため、影響の回復に必要な通常海水中での培養期間の同定を行う。以上により、ウシケノリが強い低塩類濃度耐性を持つことを示す。

(2) 細胞内成分の解析

まず、細胞質溶解物としての遊離アミノ酸の量的変動をアミノ酸分析装置により解析する。サンプルは、100%, 75%, 50%, 25%, 15%, 0% 塩類濃度培地で 1 週間あるいは 2 週間培養したウシケノリである。この解析により、ウシケノリの低塩類濃度耐性に遊離アミノ酸の減少に伴う細胞内浸透圧強度の低下が必要かどうかを検証する。

塩ストレスによる脂肪酸組成の変動は単細胞性藻類では観察されている (Shalaby et al., *J. Med. Plant Res.* 4, 2622-2632, 2010; Kirrolia et al., *J. Algal Biomass Util.* 2, 28-34, 2011) が、大型紅藻では解析例がない。ここでは、100%, 75%, 50%, 25%, 15%, 0% 塩類濃度培地で 1 週間あるいは 2 週間培養したウシケノリにおける脂肪酸組成を解析し、塩類濃度依存的な変動の有無を明らかにする。

以上で明らかとなるアミノ酸や脂肪酸の組成変化に基づき、ウシケノリの低塩類濃度耐性の強度に関わる代謝関連遺伝子を予測し、他生物と異なる点を明らかにする。

(3) シロイヌナズナを用いたナトリウム・ポンプの機能解析

細胞収縮を可能にする細胞内のイオン放出に関わる因子の 1 つとして、陸上維管束植物では見られないが海藻が保持しているナトリウム・ポンプが注目される。本研究では、遺伝子資源の確保が容易なスサビノリ由来のナトリウム・ポンプ (PyKPA1) 遺伝子を用い、海藻では形質転換ができないためシロイヌナズナでの過剰発現を通してその機能解析を行う。

初めに、クローン化してある PyKPA1 遺伝子 (Uji et al., *Mol Biol Rep.* 39, 7973-7980, 2012) をシロイヌナズナ形質転換用ベクターに組込む作業を完了させる。その後ナトリウム・ポンプ遺伝子の機能解析を目的に、その遺伝子を過剰発現しているシロイヌナズナ形質転換株を作成する。次いで、得られた複数の形質転換ラインが低塩濃度ストレスに対してどの様に応答するかを野生株と比較して検討する。この場合、シロイヌナズナ生育培地を段階的に希釈し (窒素源とショ糖は一定濃度に揃える) 野生株と形質転換ラインの生育

速度やバイオマスの比較を行う。

以上の解析によりスサビノリ由来の PyKPA1 がシロイヌナズナの低塩類濃度耐性に関わるかどうかを明らかにする。

(4) トランスクリプトーム解析による低塩類濃度耐性遺伝子の同定

海水および淡水で培養したウシケノリよりそれぞれ RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行うことで淡水培養時に発現が顕著な遺伝子を低塩類濃度耐性遺伝子として同定する。加えて、生合成系や代謝系の遺伝子の変動も網羅的に比較することで、低塩類濃度応答機構あるいは低塩類濃度耐性機構の全体像を把握する。実際の解析は、BGI JAPAN 社に委託して行った。得られた結果を踏まえて、上記で見出された遺伝子やナトリウム・ポンプ遺伝子の発現パターンを検証する。このような解析により、低塩類濃度耐性遺伝子の同定とその低張下での細胞収縮における機能を予測する。

4. 研究成果

(1) 細胞および葉緑体の形状変化を促す塩類濃度の同定とそれらの変化の可逆性の検討

ウシケノリを淡水で培養したときに見られる細胞の形態変化は、15%希釈海水である程度観察されたが、やはり淡水での変化が最も顕著であった。25%以上の希釈海水では細胞の形態に変化は観察されなかった。葉緑体の形態変化も同様で、淡水で顕著であり、15%希釈海水である程度観察された。

このような形態変化が可逆的かどうかを確かめるために、淡水中で変化を示した藻体を100%海水培地に戻して培養したところ、1週間以内に細胞および葉緑体の形態が回復した。このことから、ウシケノリの低塩類濃度応答は形態的な可塑性を持つ柔軟なものであることが明らかとなった。

(2) 細胞内成分の解析

低張溶液中で細胞が収縮するためには、細胞内への水の流入を阻止するために細胞内も低張状態にする必要があると考えられた。その傍証を得るため、細胞内の遊離アミノ酸含有量の変化をモニターした。その結果、淡水適応において全てのアミノ酸についてその含有量が減少していることが判明し、細胞内の低張化が起きていることが示唆された。

細胞内の低張化には各種電解質の細胞外への輸送も重要であるが、それを可能にするトランスポーターやチャンネルの活性は細胞膜

の物理状態に依存している。そのため、膜脂質脂肪酸の組成の変化を分析した。しかし、通常および淡水培養時でその組成に変化はなく、淡水適応における細胞内低張化は、脂肪酸の飽和度に原因する物理状態の変化とは関係がないと考えられた。今後は、実際にトランスポーターやチャンネルの活性を測定することで細胞内低張化を説明する必要がある。

(3) シロイヌナズナを用いたナトリウム・ポンプの機能解析

上記の研究に関連して、低塩類濃度ストレスに依存した膜輸送活性の変化が実際に検証できれば、低張下での細胞収縮の仕組みが解明できると考え、スサビノリの PyKPA1 遺伝子を、モデル植物であるシロイヌナズナで発現させ、そのときの塩ストレス耐性の評価を行う試みを行った。この場合、維管束植物はナトリウムチャンネルを持たないので、PyKPA1 の活性は容易に観察できると考えた。

アグロバクテリア法により PyKPA1 の発現カセットをシロイヌナズナのゲノムに安定的に挿入できた。得られた複数ラインの形質転換株を用いて塩耐性能を検証したところ、予想に反して塩ストレス感受的となった。これは、シロイヌナズナで発現した PyKPA1 が、塩ストレス条件下で根においてナトリウムイオンを細胞内に取り込み隔離することで地上部の生育を可能にしているトランスポーター HKT1 と拮抗的に働いてしまい、細胞内に取り込まれたナトリウムイオンを道管に放出することで個体が強い塩ストレスを受けようになってしまうと考えられた。このことは、PyKPA1 がシロイヌナズナで機能的に発現していることを示しているが、維管束植物の性質上、その機能を十分に解析することができないことが明らかとなり、今後は他の方法を試みる必要がある。

なお、上記の結果は本来の目的達成には貢献していないが、維管束植物における塩ストレス耐性で主要な役割を果たしている HKT1 活性の重要性を明確に示すもので、予期せぬ結果ではあったが意義深いと考えている。

(4) トランスクリプトーム解析による低塩類濃度耐性遺伝子の同定

通常培養および淡水培養したウシケノリから total RNA を調整し、それらを用いてトランスクリプトーム解析を行った。得られた結果から、両条件で遺伝子発現のパターンが違っており、特に通常培養や淡水培養でのみ発現する遺伝子が数多く見られたことに興味を持たれた。その内訳を見てみると、淡水培養では F-アクチンの形成に関わる遺伝子の中

に発現が完全に抑制されているものが見られ、その一方で、通常培養では発現していなかったミトコンドリアでの ATP 生成に関わる複数の遺伝子の発現が上昇していた。F - アクチンは細胞分裂に必須な細胞骨格成分であるが、その発現が抑えられているということは、淡水中で形態変化を起こした細胞が分裂することなく生存していることを示している。また、ATP 生成関連遺伝子の発現上昇は、生存のために必要なエネルギーを生成していることを示している。これらのことは、ミトコンドリアによる ATP 生成関連遺伝子が低塩類濃度耐性付与遺伝子の候補であることを示している。なお、上記のように淡水応答には可逆性があるため、このような応答は、生育環境が正常に近い状況に戻るとなくなると考えられる。

以上の結果より、ウシケノリが淡水中で生存できる理由として、細胞分裂などでエネルギーを消費することを避け、同時に可能な限りエネルギーを蓄える応答が可能となっていることがあげられる。しかし、そのエネルギーがどのような生理制御に利用されているのかについては現時点では不明である。

上記の結果だけでは細胞や葉緑体の形態変化について説明することはできない。従って、上記の遺伝子について、それらの発現制御や機能に関する研究を行い、遺伝子レベルの研究と生理応答を結びつけることで、ウシケノリの淡水適応機構の解明を進めて行くことが必要となる。また、トランスクリプトーム解析では、他にも生育環境の違いにより発現の様子が異なる多くの遺伝子が見出されている。従ってこれらの遺伝子の機能解析や発現解析は、ウシケノリの低塩類濃度ストレス応答で見られる特殊な形態変化の制御機構を明らかにするうえで重要であり、今後の課題となる。

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 9 件)

Mikami, K., Mori, I.C., Matsuura, T., Ikeda, Y., Kojima, M., Sakakibara, H. and Hirayama, T.: Comprehensive quantification and genome survey reveal the presence of novel phytohormone action modes in red seaweeds. *J. Appl. Phycol.* in press (2016). doi:10.1007/s10811-015-0759-2 査読有

Kakinuma, M., Suzuki, K., Iwata, S., Coury, D.A., Iwade, S. and Mikami, K.: Isolation and characterization of a new DUR3-like gene, PyDUR3.3, from the marine macroalga *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). *Fisheries Sci.*, 82: 171-184 (2016) 査読有

Inoue, A., Mashino, C., Uji, T., Saga, N., Mikami, K. and Ojima, T.: Characterization of an eukaryotic PL-7 alginate lyase in the marine red alga *Pyropia yezoensis*. *Curr. Biotechnol.* 4, 240-248 (2015). doi:10.2174/2211550104666150915210434 査読有

Choi, Y.H., Kim, E.-Y., Mikami, K. and Nam, T.J.: Chemoprotective effects of a recombinant protein from *Pyropia yezoensis* and synthetic peptide against acetaminophen-induced Chang liver cell death. *Int. J. Mol. Med.* 36, 369-376 (2015). 査読有

Mikami, K.: A technical breakthrough close at hand: Feasible approaches toward establishing a gene-targeting genetic transformation system in seaweeds. *Front. Plant Sci.* 5:498 (2014). doi:10.3389/fpls.2014.00498 査読有

Mikami K.: Structural divergence and loss of phosphoinositide-specific phospholipase C signaling components during the evolution of the green plant lineage: Implications from structural characteristics of algal components. *Front. Plant Sci.* 5:380 (2014). doi:10.3389/fpls.2014.00380 査読有

Mikami K.: Comparative genomic view of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor in plants. *J. Plant Biochem. Physiol.* 2: 132 (2014). doi:10.4172/2329-9029.1000132 査読有

Kishimoto, M., Shimajiri, Y., Ohshima, A., Hase, A., Mikami, K. and Akama, K.: Functional expression of an animal type- Na^+ -ATPase gene from a marine red seaweed *Porphyra yezoensis* increases salinity tolerance in rice plants. *Plant Biotechnol.* 30, 417-422 (2013). 査読有

Mikami, K. and Hosokawa, M.: Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 13763-13781 (2013). 査読有

[学会発表] (計 10 件)

三上浩司、池田陽子、松浦恭和、森泉、平山隆志 (2015) : 褐藻シオミドロの雄性配偶体に偏ったサイトカイニンの蓄積 . 平成 27 年度日本水産学会秋季大会 . 東北大学、2015.9.22-25 (宮城県、仙台市)

三上浩司、森泉、松浦恭和、池田陽子、平山隆志 (2015) : 海藻は未知の植物ホルモン情報伝達機構を持つ . 日本応用藻類学会第 14 回大会 . 東京海洋大学、2015.5.16 (東京都、品川区)

小林乗時、三上浩司、宮下和夫、細川雅史 (2015) : 紅藻スサビノリのカロテノイド生合成経路の解析 . 平成 27 年度日本水産学会春季大会 . 東京海洋大学、2015.3.27-31 (東京都、品川区)

岩田晋太郎、鈴木康平、三上浩司、柿沼誠 (2015) : 紅藻スサビノリ尿素輸送体の細胞内局在解析 . 平成 27 年度日本水産学会春季大会 . 東京海洋大学、2015.3.27-31 (東京都、品川区)

三上浩司、森泉、松浦恭和、平山隆志 (2014) : 原始紅藻類における植物ホルモン定量分析法の開発 . 平成 26 年度日本水産学会秋季大会 . 九州大学、2014.9.19-22 (福岡県、博多市)

鈴木康平、岩田晋太郎、三上浩司、柿沼誠 (2014) : 紅藻スサビノリ尿素輸送体遺伝子 (*PyDUR3* 遺伝子) の発現・構造解析 . 平成 26 年度日本水産学会秋季大会 . 九州大学、2014.9.19-22 (福岡県、博多市)

小林拓也、三上浩司、板橋豊 (2014) : 紅藻ウシケノリにおける低塩類ストレス応答に伴う脂肪酸組成の変動 . 日本油化学会第 53 回年会 . ロイトン札幌、2014.9.9-11 (北海道、札幌市)

三上浩司、七海大輔、横山雄彦、小林拓也、加藤敦之、板橋豊 (2013) : 海産紅藻ウシケノリに見られる高度な低塩類濃度ストレス耐性 . 平成 25 年度日本水産学会秋季大会 . 三重大学、2013.9.19-22 (三重県、津市)

鈴木康平、富永紘志、三上浩司、柿沼誠 (2013) : 紅藻スサビノリ新規 *DUR3*-like 遺伝子 (*PyDUR3.3* 遺伝子) の cDNA クローニングと発現解析 . 平成 25 年度日本水産学会秋季大会 . 三重大学、2013.9.19-22 (三重県、津市)

三上浩司、七海大輔、横山雄彦、小林拓也、加藤敦之、板橋豊 (2013) : 海産紅藻ウシケノリ *Bangia fuscopurpurea* に特徴的な低塩類濃度ストレス応答 . 日本植物学会第 77 回大会、北海道大学札幌キャンパス、2013.9.13-15 (北海道、札幌市)

[図書] (計 2 件)

Yokoyama, T. and Mikami, K.: D-amino acids and amino acid racemases in seaweeds. In, *Seaweed: Mineral Composition, Nutritional and Antioxidant Benefits and Agricultural Uses* (V.H. Pomin, ed.), Nova

Science Publishers, New York, pp135-155 (2014)

Mikami, K.: Current advances in seaweed transformation. In, *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications* (G.R. Baptista, ed.), InTech Open Access Publisher, Rijeka, 323-347 (2013)

[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]

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
三上 浩司 (MIKAMI, Koji)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号 : 4 0 2 2 2 3 1 9

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
板橋 豊 (ITABASHI, Yutaka)
北海道大学・大学院水産科学研究院・特任教授
研究者番号 : 6 0 1 4 2 7 0 9

加藤 敦之 (KATO, Atsusi)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号 : 9 0 1 7 7 4 2 8

横山 雄彦 (YOKOYAMA, Takehiko)
北里大学・水産学部・講師
研究者番号 : 6 0 2 9 6 4 3 1