

博士論文

紅藻スサビノリ (*Pyropia yezoensis*) の
栄養欠乏応答に関する研究

吉村 航

目次

第1章 序論.....	1
1-1 序.....	2
1-2 本研究の目的.....	8
1-3 スサビノリの培養.....	9
第2章 タンパク質成分の分析.....	15
2-1 序.....	16
2-2 実験材料と方法.....	20
2-3 結果.....	32
2-4 考察.....	57
第3章 遺伝子発現解析.....	61
3-1 序.....	62
3-2 実験材料と方法.....	65
3-3 結果.....	75
3-4 考察.....	87
第4章 代謝産物の解析.....	93
4-1 序.....	94
4-2 実験材料と方法.....	95
4-3 結果.....	98
4-4 考察.....	107
第5章 養殖ノリの分析.....	110
5-1 序.....	111
5-2 実験材料と方法.....	112
5-3 結果.....	115

5-4 考察	128
第 6 章 総括	132
参考文献一覧.....	136
謝辞.....	150

第 1 章

序論

第1章 序論

1-1 序

1-1-1 スサビノリについて

スサビノリ *Pyropia yezoensis*^{*1}は紅色植物門紅藻綱ウシケノリ目ウシケノリ科アマノリ属に属する大型の海藻である（^{*1}スサビノリは以前、*Porphyra* 属に分類されていたが、2011年に *Pyropia* 属に移された(Sutherland *et al.*, 2011)）。そのため、それ以前の文献・資料では *Porphyra yezoensis* の学名で記載されており、インターネット上のデータベースにおいても古い学名が使われている場合がある。）。野生種は日本から朝鮮半島にかけての東アジアに自生する。生息域は沿岸の潮間帯や潮下帯で、汽水域にも生息する。中国、韓国、日本では養殖が行われており、日本での主な生産地は九州北部、瀬戸内海沿岸、東京湾沿岸などである。日本では養殖されたノリのほとんどは乾海苔（ノリを薄いシート状に成型し乾燥させたもの：板海苔）に加工されて食用に供される。日本全国での生産量は生換算重量で年間およそ 30 万トンにのぼり、日本における海面養殖のなかでも大きな比重を占めている。重量あたりの単価も高く、経済的にも重要な水産物である。

スサビノリは自然環境下では一年で完結する生活環をもち、その詳細はすでに解明されている（図 1-1）（能登谷、2000）。生活環は大まかに、有性世代と無性世代に分けられる。食用に加工されるノリは葉状体と呼ばれる有性世代で、秋季から冬季にかけて生育する。葉状体は冬から春にかけて海水温の高まりとともに成熟し、生殖細胞を形成する。受精とその後の細胞分裂によりつくられた果胞子は海中に放出され、放出された果胞子は牡蠣殻などに穿孔して糸状体に成長し、越冬する。秋になると糸状体は殻胞子嚢を形成し、内部に殻胞子をつくる。殻胞子は海中に放出されると、岩などの基部に付着して発芽し、葉状体へと成長する。また、葉状体は無性的に単胞子をつくり、海中に放出しており、単胞子は葉状体に成長する。実験室における人工的な培養によって、全ての世代にあるノリを培養することができ、生活環を完結させることが可能である。また、単胞子による無性生殖を利用することで、他の世代を経ずに葉状体の継代培養を行う

ことが可能である。

スサビノリの葉状体は単層の細胞からなるシート状をしており、全長は数 cm から大きいもので数十 cm になる。その外形は生育した環境により、細長い帯状から円形に近いものまで、大きく異なる。スサビノリは、高等植物のように分化した器官をもたず、生殖細胞以外に分化した細胞をもたない。通常、スサビノリの葉状体は赤紫色や赤褐色を呈する。この色は紅藻類に特徴的であり、葉状体が含有する光合成色素に起因する。紅藻類とシアノバクテリアは一部の例外を除いて、クロロフィル・カロテノイド類に加えて、フィコビリタンパク質と呼ばれる光合成色素タンパク質をもつ。スサビノリは数種類のフィコビリタンパク質を含み、そのうち最も量が多いフィコエリスリンは、ピンク色を呈する。そのため、この色がクロロフィルの緑色と合わさり、スサビノリは一般に赤紫色から赤褐色を呈する。スサビノリを加工した乾海苔では、複数枚のノリ葉状体が重なり合い、色が濃く見えるため、黒色に近い色に見える。また、フィコビリンの色は加熱によって失われるため、乾海苔を焼いた焼海苔は緑色を呈する。

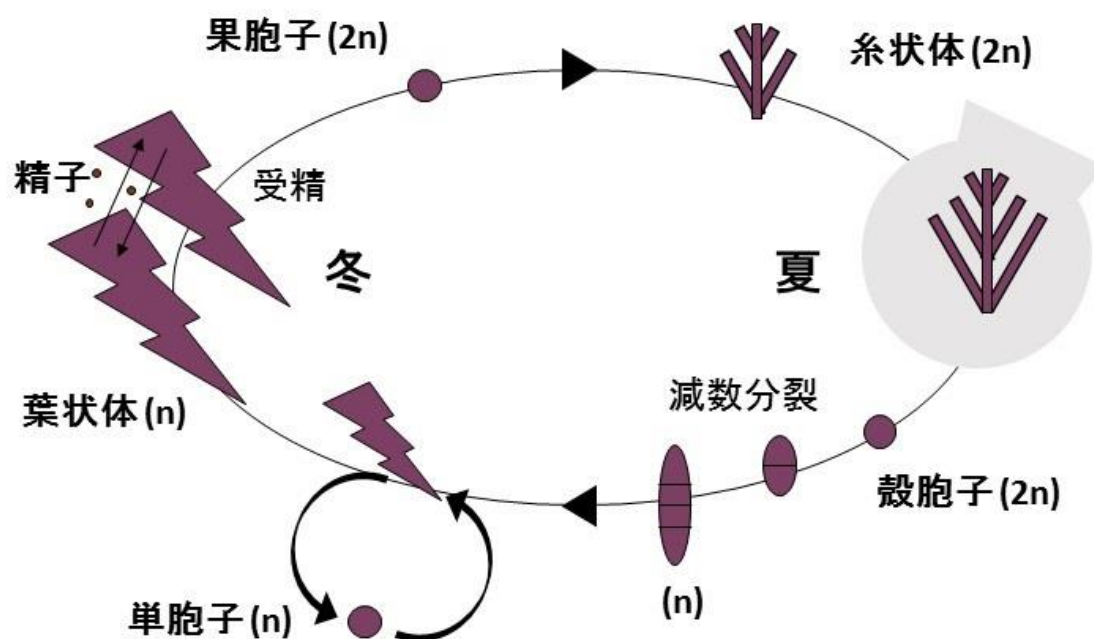


図 1-1 スサビノリの生活環

図中の n および $2n$ は s 染色体のセット数を表している。

1-1-2 ノリの色落ちについて

近年、ノリ養殖においては「色落ち」という現象が大きな問題となっている。

「色落ち」は養殖中のノリの色が極端に薄くなる現象を指す言葉で、漁業関係者の間で一般的に用いられている。前述のように、状態の良いノリの葉状体は赤紫色や赤褐色を呈するが、養殖の途中でこの色が薄い黄緑色から白っぽい色合いに変化することがある。「色落ち」は、通常よりも著しく色が薄くなる現象を指して養殖現場で経験的に用いられている言葉であり、どの程度色が薄くなれば色落ちに該当するかなどに数値上の統一的な基準はない。色落ちは必ずしも不可逆的な現象ではなく、時間の経過によって色調の回復することもあることが知られている。色落ちの大きな問題は、海苔の品質の低下につながる点にある。ノリ葉状体を加工してできる乾海苔の品質および市場価値は、色、味、香り、舌触りなどにより決定される。色落ちしたノリを原料とした乾海苔は色が薄いため見た目が悪く、また一般的に味や香りも良くないため、品質が悪く市場価値が

低い。このため、色落ちの発生は海苔の市場価値の低下につながり、大きな経済的損失をもたらす。このことから、色落ちの原因の特定と対策が強く求められてきた。色落ちとその原因について平成 25 年度の水産白書では

「近年では、養殖ノリの色が濃くならない「色落ち」と呼ばれる症状が発生しています。色落ちしたノリは単価が下がったり商品価値がなくなったりすることから、ノリ養殖で大きな問題となっています。この原因については、下水処理施設の発達等により海への栄養塩が補給されにくくなったほか、珪藻（けいそう）プランクトンが増殖して栄養塩を消費することが指摘されています。」

と述べられている。このように、色落ちは海中の必須栄養素の濃度低下に主に起因すると考えられてきた。これは、色落ちが以前からいくつかの条件下で発生しやすいことが経験的に知られているためである。色落ちは漁期の後半にあたる春先に起こりやすく、水温の上昇と共に発生件数の増える赤潮と同期して起こることが指摘されている（平成 23 年度 水産白書 水産の動向）。また、雨が少ない年には色落ちが起こりやすいとされている。赤潮が発生すると海水中の栄養塩は珪藻によって消費され、濃度が低下すると考えられる。また、海水中の窒素・リンなどの栄養塩は、その大部分が河川を通じて陸上から供給されたものであるが、降雨の減少はこれらの栄養塩の供給を低下させることで海水中の濃度の低下につながる。これらのことから、色落ちの原因として栄養塩の欠乏がもっとも有力視されてきた。しかし、環境中の諸条件（栄養塩濃度・水温など）を測定したデータからは、色落ちの発生との相関関係を議論することしかできない。そのため、栄養塩欠乏と色落ちの明確な因果関係を特定することは難しい。色落ちが栄養塩の欠乏によって引き起こされることは、色落ちの原因に関する一般的な説明として定着しているが、両者の関係にはいまだ解明すべき点が存在する。

一方で、実験室で培養したスサビノリを対象とした実験では、栄養塩の欠乏、特に窒素欠乏がスサビノリに「色落ち」に似た褪色および光合成色素含量の低下を引き起こすことがこれまでに報告されている（植木ら、2010）。このことから、養殖ノリにおける色落ちが栄養塩の欠乏によって引き起こされるという説

は補強されている。しかしながら、この実験室での栄養欠乏による褪色が、実際に養殖現場で生じている「色落ち」と生物学的に同様の現象であるかということに関しては疑問がある。というのも、「色落ち」という用語はあくまで、観察により類似性のある現象（著しい褪色）に対して、経験に基づいて付けられた言葉であり、目視による色調の変化のみによって特徴付けられているからである。ノリの色落ちを特徴づける共通の科学的な指標は確立されておらず、色調の変化の直接的原因である光合成色素含量の低下の度合いにも数値的な基準はない。また、現場での養殖ノリの色落ちと、栄養欠乏による褪色についてはともに、生物学的にどのような機構によって生じるかという、その詳細について、現在までのところほとんど知見が得られていない。

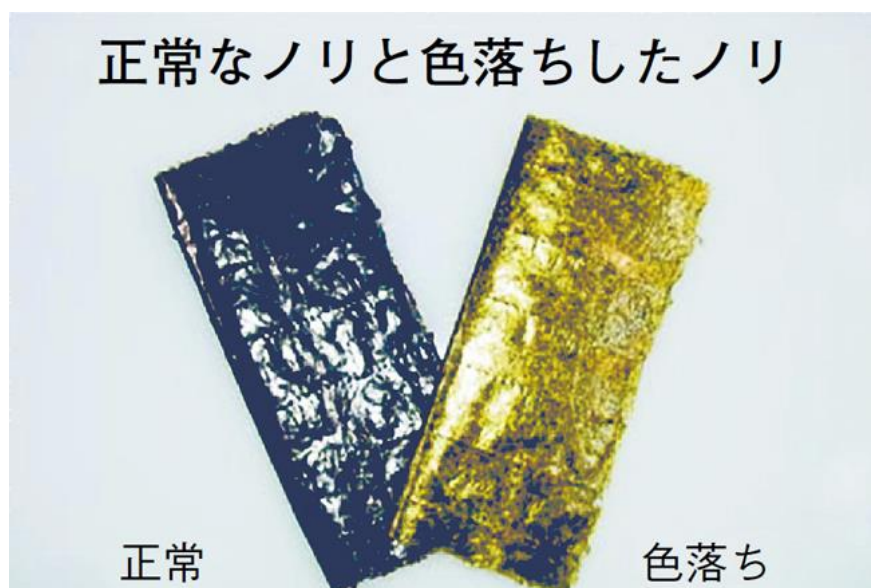


図 1-2 正常なノリと色落ちしたノリからつくられた乾海苔

出典 農林水産庁 web site 平成 20 年度 水産白書 水産の動向

(http://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/h20_h/trend/1/zoom_p020.html)

2016 年利用

1-1-3 植物における必須栄養素

紅藻類に分類されるスサビノリは高等植物には含まれないが、高等植物と同様に酸素発生型光合成を行う独立栄養生物である。高等植物における必須元素は 17 種類 (C、O、H、N、P、K、S、Ca、Mg、Cl、B、Zn、Fe、Cu、Mn、Ni、Mo) が知られており、また必須ではないが存在が生育を助ける元素としてナトリウム(Na)、ケイ素(Si)が知られている(Mengel *et al.*, 2001)。スサビノリの必須元素について網羅的に解析した研究報告はないが、一般に必須元素は高等植物と共通していると考えるのが妥当である。必須元素のうち、陸上植物にとって要求量が多く、特に不足しやすい元素として、窒素・リン・カリウムが挙げられ、これらは三要素とよばれる。このうち窒素・リンに関しては、海水中に溶存態として存在している量は少なく、季節変化などにより存在量が大きく変動することから、海水中でも不足しやすい元素であることが知られている(Turekian, 1968)。一方で、カリウムについては海水中に安定的かつ多量に存在するため、海洋植物にとってカリウムが量的に不足することは通常考えられない。三要素の次に、陸上植物に多量に必要な元素は多量栄養素とよばれ、酸素・水素・炭素・カルシウム・マグネシウム・硫黄の 6 種類である。これらの元素は海水中には安定的に一定量存在するため、海洋藻類がこれらの栄養素を欠乏する可能性は低い。次に、必須栄養素のうち微量栄養素として、鉄・マンガン・亜鉛・銅・モリブデン・ホウ素・塩素が挙げられる。一般的に海水は弱アルカリ性（表面海水で pH 7.9~8.2）であることから、多くの遷移金属は水酸化物の形で沈殿しやすく、溶存量は一般に低い。そのため、これらの元素は海水中では制限要因となりうる。このうち鉄は光合成に必須な元素であり、植物体の要求量は他の遷移金属と比較して多いが、海水中の溶存量は極めて少ない。そのため海洋中で不足しやすい元素であると考えられる。また、スサビノリの色落ちの原因について、鉄欠乏の可能性を指摘する報告も存在する(Zhang *et al.*, 2009)。

以上の知見をもとに、本研究では海洋で特に不足しやすい必須栄養素として窒素、リン、鉄を選び、これらの栄養素の欠乏について研究を行った。

1-2 本研究の目的

ノリの色落ちはノリ養殖において大きな問題であるが、その詳細は十分に解明されているとは言えない。そこで本研究では、ノリの色落ちについて新たな知見を得るために、ノリの色落ちが必須栄養素の欠乏により引き起こされるとの仮定を基にして以下の目的に対して実験を行った。

一つめの目的は、スサビノリの栄養状態を評価する方法を確立し、それを応用して養殖ノリの栄養状態を分析することである。まず実験室において、スサビノリ葉状体の窒素、リン、鉄欠乏に対する応答を分析し、栄養欠乏の指標となる因子を特定する。次に、それらの知見をもとにして、実際に現場で養殖されたノリの栄養状態を評価し、栄養欠乏と色落ちの関係性を明らかにしたいと考えた。

もう一つの目的は、栄養欠乏がスサビノリ葉状体に引き起こす褪色について、その仕組みについて新しい知見を得ることである。栄養欠乏、特に窒素欠乏において色落ち様の褪色が生じることはすでに述べたが、この現象の仕組みや関わる因子は特定されていない。一つめの目的と重複する部分があるが、栄養欠乏の指標となる因子を探す過程で、この現象に関わる因子の特定も目指した。

第 2 章では、主に、栄養欠乏時のタンパク質及びペプチドについて実験を行った。二次元電気泳動、逆相系高速液体クロマトグラフィーなどの手法を用いて、栄養欠乏時のタンパク質・ペプチドの組成の変化について調べた。第 3 章では、栄養欠乏の指標となる遺伝子の探索、および栄養欠乏条件での発現を調べた。第 4 章では、主に低分子の成分に着目し、栄養欠乏時の低分子成分の変動及び、栄養欠乏を特徴付ける成分の特定を試みた。第 5 章ではそれまでの結果を踏まえて、実際に東京湾で養殖されたノリを試料として用い、実験室で培養したスサビノリの研究で得られた知見を応用することで、栄養欠乏と色落ちの関係について明らかにすることを試みた。

なお、本論文に掲載している内容は博士課程において行った研究の成果である。

1-3 スサビノリの培養

1-3-1 スサビノリの培養株

スサビノリの培養株は *P. yezoensis* TU-1 strain (北海道大学より供与) を用いた。なおゲノム解読に用いられた株は *P. yezoensis* U-51 strain である。TU-1 strain は U-51strain をもとに北海道大学において作出された純系株である。

1-3-2 培養条件

全ての培養は人工気象器 LH220-S(NKsystem, Osaka, Japan)で行った。照明は一系統に設定し、人工気象器の内壁に白色のコピー用紙を貼って減光し、培養器周辺の照度が 1500 lx 程度になるよう調整した。葉状体が性成熟することを防ぐために、明暗周期は 10 時間／14 時間の短日条件に設定し、温度は終日 15°C に設定した。培養容器には加工した平底フラスコ(1 L, 2 L)およびアルガバック藻々(Hokkaido Wako, Sapporo, Japan)を用いた。平底フラスコは下部に枝管を取り付け、首の長さを 10 cm 程の長さにする加工を行った。培養容器の枝管にはシリコンチューブ(内径 4mm、外径 6 mm)を取り付け、そこにエアポンプ CAS-1(Asone, Osaka, Japan)を接続して 24 時間通気を行った。エアポンプの吸気口及びエアポンプと培養容器の間には孔径 0.45 μm のエアフィルター LABODISC-50CP(Advantech, Tokyo, Japan)を取り付けた。培養容器にシリコ栓をはめ、エアフィルターを接続した状態で 121°C、20 分間のオートクレーブ処理を行い、培養容器の滅菌を行った。

1-3-3 培地の調製

培地は人工海水に強化成分を加えて作製した。人工海水は蒸留水 10 L あたりに 350 g の SEALIFE(Marinetech, Tokyo, Japan)を溶解して調製した(Kitade *et al.*, 2002)。人工海水 1 L あたりに 10 ml の ESS₂ stock solution (Kitade *et al.*, 1996)を添加し、通常培地として用いた。窒素、リン、鉄を含む試薬をそれぞれ添加しない ESS₂ stock solution を作製し、それらを用いて調製した培地をそれぞれ窒素欠乏培地、リン欠乏培地、鉄欠乏培地とした。また、窒素およびリ

ンを含む試薬を添加しない ESS₂ stock solution を作製し、それを用いて調製した培地を窒素・リン欠乏培地とした。また硝酸ナトリウムを同等の物質量の塩化アンモニウムで置換した ESS₂ stock solution を作製し、それを用いて調製した培地をアンモニア培地とした。すべての ESS₂ stock solution は 121°C、20 分間のオートクレーブ処理を行った。前培養に用いる人工海水は 121°C、20 分間のオートクレーブ処理を行った。

1-3-4 培養の手順

培養には葉状体を用い、単胞子による単為生殖で継代培養を行った。単胞子を付着させる基材としてクレモナ糸を用いた。これは、クレモナ糸上で複数の葉状体を生育させることにより、試料の取り回しを簡便にするためである。葉状体は基材に付着していない状態でも生育が可能である。しかし遊離の状態での培養には、一枚の葉状体が多くの実験で 1 サンプルとして用いるには重量が小さすぎる、大量の葉状体をいくつかの群に分けるときの量をだまかに揃えることが困難であることなどの問題がある。また、養殖は網を機材として行われるため、基材を用いる培養のほうが養殖に近い状態であるといえる。クレモナ糸を 4 本束ねて、両端に結び目をつくり、5 cm ほどの長さに切断したものを多数作製し、70% エタノール中に保存した。数個のクレモナ糸の束を、すでに生育した葉状体とともに培養し、葉状体から放出された単胞子をクレモナ糸に付着させた。数週間、葉状体とともにクレモナ糸を培養し、単胞子から生育した新しい葉状体を 0.5 mm ほどの長さに生育させた。葉状体が生育したクレモナ糸の束は 5 mm ほどの長さに切断し、さらに培養を行った。本研究では 5 mm 長に切断したクレモナ糸上に生育した葉状体の一まとまりを一個体として扱った。培地は 3 日おきに全量を交換した。前培養時には、培地の交換時に培養容器も滅菌済みのものに交換し、植え継ぎはクリーンベンチで無菌的に行った。本培養時には、培地の交換のみを行い、植え継ぎは通常的环境下で行った。

表 1-1 培養液の組成

人工海水	
蒸留水	10 L
SEALIFE (マリンテック)	350 g
ESS ₂ stock solution	
HEPES ^{*1}	10 g
硝酸ナトリウム ^{*2}	6 g
β-グリセロリン酸ナトリウム ^{*3}	800 mg
Fe-EDTA・3 水和物 ^{*4}	300 mg
ヨウ化カリウム	2 mg
PII metals	400 ml
Vitamin mix ESS	10 ml
pH	8.0
蒸留水で 1 L に調製.	
PII metals	
Na ₂ -EDTA	1 g
塩化鉄(III)・6 水和物 ^{*5}	48.4 mg
ホウ酸	1140 mg
塩化マンガン・4 水和物	144 mg
塩化亜鉛	10.4 mg
塩化コバルト・6 水和物	4.04 mg
蒸留水で 1 L に調製	

Vitamin mix ESS	
ビタミン B ₁₂	1 mg
ビオチン	1 mg
チアミン塩酸塩	100 mg
ニコチン酸	100 mg
パントテン酸カルシウム	100 mg
<i>p</i> -アミノ安息香酸	10 mg
イノシトール	1 g
チミン	100 mg
蒸留水で 100 ml に調製.	

^{*1}IUPAC 名は 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid。^{*2}窒素欠乏培地、窒素・リン欠乏培地では添加しなかった。アンモニア培地では等物質量の塩化アンモニウムで代替した。^{*3}リン欠乏培地、窒素・リン欠乏培地では添加しなかった、^{*4,*5}鉄欠乏培地では添加しなかった。ESS₂ stock solution は調製後オートクレーブ滅菌、Vitamin mix ESS は調製後 0.45 μm のフィルターで濾過滅菌をし、4°C で保存した。



図 1-3 スサビノリの培養の実際

人工気象器内の培養の様子

1: エアポンプ 2: 吸気側エアフィルター 3: 三方コック 4: シリコ栓 5: 排気側エアフィルター 6: 1 L 培養フラスコ 7: シリコンチューブ

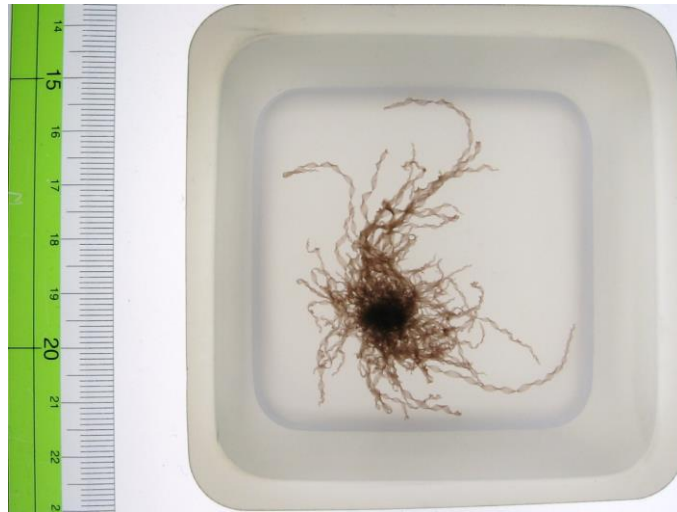


図 1-4 前培養したスサビノリ葉状体

通常培地で前培養し葉長が 3 cm 程度に生育したスサビノリの葉状体。密集した葉状体の中心にクレモナ糸の断片があり、そこに葉状体が着生している。本研究ではこのひとまとまりを一個体として扱った。

第 2 章

タンパク質成分の分析

第2章 タンパク質成分の分析

2-1 序

2-1-1 スサビノリの光合成色素について

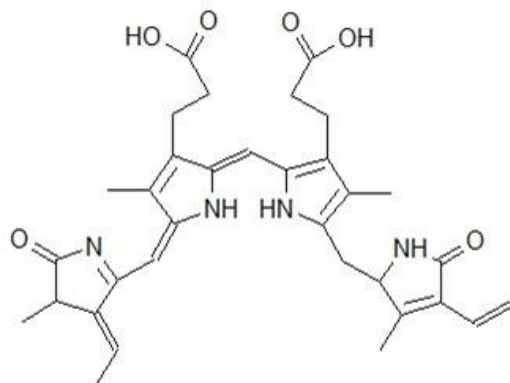
スサビノリは光合成色素としてクロロフィル、カロテノイドに加えて、フィコビルリンを含有する。フィコビルリンは可視領域に吸収波長をもつ開環テトラピロールで（図 2-1）、アポタンパク質と共有結合しフィコビリタンパク質を形成する。スサビノリには極大吸光波長の異なる 3 種類のフィコビリタンパク質、フィコエリスリン(Phycoerythrin)、フィコシアニン(Phycocyanin)、アロフィコシアニン(Allophycocyanin)が含まれる。各種のフィコビリタンパク質にはアポタンパク質の違いにより複数種のタンパク質が存在する。同種のフィコビリタンパク質は複合体を形成する。また、それら複合体は色素をもたない別のサブユニットを介して、さらに大きな複合体であるフィコビリソームを形成する。フィコビリソームは合計の分子質量が数 MDa にもなる巨大な複合体である(Adir, 2005)(Watanabe and Ikeuchi, 2013)。フィコビリソームは光化学系にチラコイド膜の外側から接続し、集光アンテナとして働く（図 2-2）。フィコビリソームはクロロフィルが利用できない波長帯の可視光線を吸収して、そのエネルギーを光化学系に伝達する。それにより太陽光の利用効率を上げることで、光合成の生産性を向上することに寄与している。紅藻類の他に、シアノバクテリアもフィコビリソームをもつ。シアノバクテリアのフィコビリソームは光や栄養などの環境条件に応答してその構成が大きく変化する(Grossman, 1993)。フィコビリソームについては主にシアノバクテリアにおいて研究が進められている。

2-1-2 シアノバクテリアにおけるフィコビリソームの分解

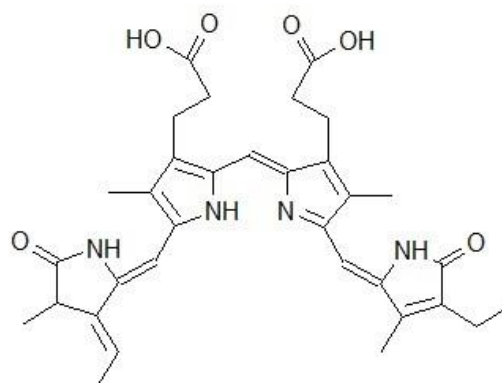
多くのシアノバクテリアにおいて、栄養欠乏によってフィコビリソームの分解が生じることが確認されている。*Synechococcus* sp.において遺伝子破壊株の表現型のスクリーニングにより、欠損すると窒素欠乏下でもフィコビリソームの分解が生じなくなる遺伝子として *NbLA* が特定された。*Synechococcus* sp.において *NbLA* は 59 アミノ酸で構成される短いポリペプチドをコードしており、

その発現は窒素欠乏によって劇的に誘導される (Collier and Grossman, 1994)。 *NbLA* の相同遺伝子は他のシアノバクテリアにも存在しており、 *Synechocystis* sp. (Richaud *et al.*, 2001)や *Anabaena* sp. (Bier *et al.*, 2004)でも同様の応答が確認されている。このことから、フィコビリソームの分解にはシアノバクテリアに共通する特異的な機構が存在することが強く示唆された。 *Synechococcus* sp. では硫黄やリンの欠乏でも *NbLA* の発現が誘導される、一方で *Synechocystis* sp. では硫黄の欠乏では誘導されない(Richaud *et al.*, 2001)など、その発現応答はシアノバクテリアにより異なる。 *NbLA* の機能については多くの議論があるが、まだ決着をみておらず、フィコビリソームおよびフィコビリタンパク質の分解の詳細なメカニズムについては明らかになっていない。

Phycoerythrobilin(PEB)



Phycocyanobilin(PCB)



Phycourobilin(PUB)

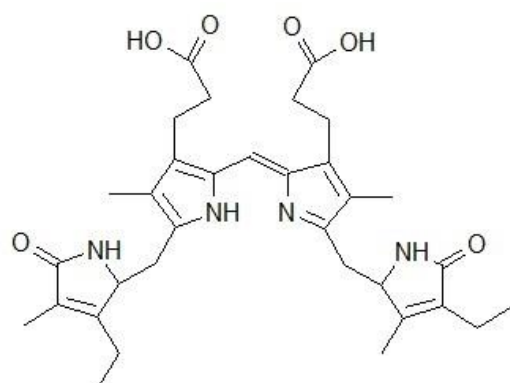


図 2-2 フィコビリンの化学構造

スサビノリに含まれる三種類のフィコビリンの化学構造。PEB と PUB はフィコエリスリンに、PCB はフィコシアニンとアロフィコシアニンに含まれる。フィコビリンはチオエーテル結合を介して、アポタンパク質のシステイン残基と結合する。(Cole *et al.*, 1967)(Chapman *et al.*, 1967)(Nagy *et al.*, 1985)

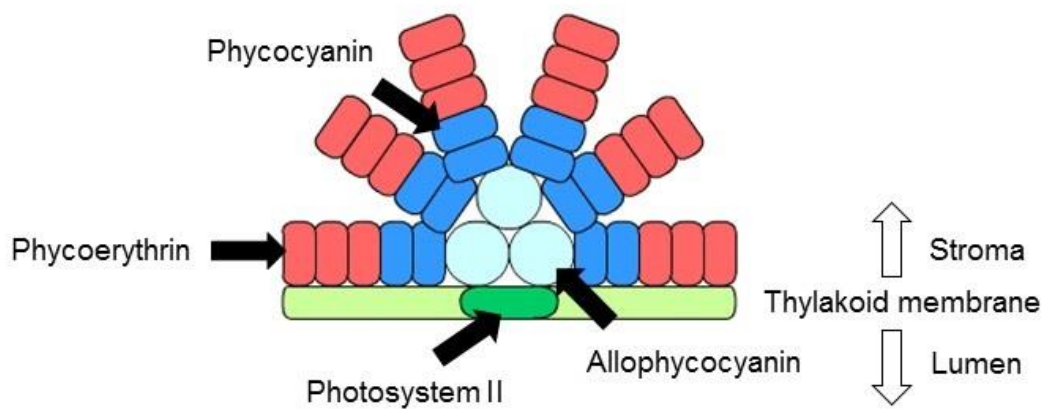


図 2-1 フィコビリソームの模式図

フィコビリソームの構造を横からみたところ。放射状に伸びるロッドは数枚のディスクが重なり合っている。一枚のディスクはそれぞれが、同種のフィコビリンの複合体である。中心のコアは画面手前から奥にのびるロッド状のアロフィコシアニン複合体を先端からみている。ロッドに吸収された光のエネルギーは中心に移動し、光化学系 II に移り光合成に使われる。チラコイド膜状には数多くのフィコビリソームが整列している。(Adir, 2005)

2-1-3 本章の目的

本章では、栄養欠乏時のスサビノリの応答を、主にタンパク質成分から調べることを目的として実験を行った。シアノバクテリアにおいては、栄養欠乏、特に窒素欠乏時に生じるフィコビリן含量の著しい低下が生じることが知られている(Schwarz and Forchhammer, 2005)。この現象はフィコビリンの積極的な分解によって生じると考えられており、変異体の解析からフィコビリソームの分解に関わる遺伝子(*NbLA*)が特定されている。一方でこの遺伝子の役割は依然として不明であり、またフィコビリタンパク質やフィコビリンの分解において直接的な役割を担っている遺伝子やタンパク質はいまだ同定されていない。シアノバクテリアにおけるフィコビリタンパク質の分解が、スサビノリにおける色落ちと生理学的に共通した現象であるかは議論の残るところである。しかし、スサビノリにおいても窒素欠乏によりフィコビリソームおよびフィコビリタンパク質の積極的な分解が起きている可能性が高い。本章では、それらの現象に関わる因子を特定したいと考えた。筆者は修士課程在籍時の研究において、cDNA サブトラクション法を用いて、スサビノリ葉状体で窒素欠乏時に発現が変動する遺伝子の網羅的解析を試みた。しかし、フィコビリソームおよびフィコビリタンパク質の分解に関わる因子の特定には至らなかった。そこで本章では二次元電気泳動法を用いて、窒素欠乏で量的変動がみられるタンパク質の探索を行った。また、栄養欠乏時にフィコビリタンパク質やその他のタンパク質の積極的な分解が生じているのであれば、生体内には一時的に分解産物であるペプチド断片や低分子の化合物が蓄積するのではないかと考えた。そこで、通常の電気泳動では良い分離が得られない低中分子量(10 kDa 以下)の成分にも着目し、栄養欠乏下で蓄積する因子の探索を行った。

2-2 実験材料と方法

2-2-1 栄養欠乏培地での培養

通常培地で培養し、葉長約 3 cm まで生育したスサビノリ葉状体の一部個体を採取した。残りを 4 つの群に分け、それぞれ、通常培地・窒素欠乏培地・リン欠乏培地・鉄欠乏培地に移して、9 日間培養を行った。培地は 3 日毎に全量を交換し、培地交換の際に一部個体を採取した。採取したノリは人工海水で洗い、キムタオルの間に 2 回挟んで水気を切った。その後、重さを量り、チャックつきのビニール袋に入れた。速やかに液体窒素で急速冷凍を行い、 -80°C で保存した。

2-2-2 窒素の化学形態の異なる培地での培養

通常培地で培養し、葉長約 3 cm まで生育したスサビノリ葉状体の一部個体を採取した。残りを無作為に 2 つの群に分け、それぞれ、通常培地およびアンモニア培地に移して、培養を行った。培養 3 日目に、通常培地で培養した個体を二つの群に分け、それぞれ新しい通常培地、窒素欠乏培地に移して 3 日間培養を行った。また、アンモニア培地で培養した個体は二つの群に分け、それぞれ新しいアンモニア培地、窒素欠乏培地に移して 3 日間培養を行った。サンプルの処理は 2-2-1 に従った。

2-2-3 窒素とリン同時欠乏培地での培養

通常培地で培養し、葉長約 3 cm まで生育したスサビノリ葉状体の一部個体を採取した。残りを無作為に 4 つの群に分け、それぞれ、通常培地、窒素欠乏培地、リン欠乏培地、窒素・リン欠乏培地に移して培養を行った。通常培地、リン欠乏培地に移した個体は 12 日間培養を行った。窒素欠乏培地、窒素・リン欠乏培地に移した個体は、培養 6 日目にそれぞれ、通常培地、リン欠乏培地に移してさらに 6 日間培養を行った。培地は 3 日毎に全量を交換し、培地交換の際に一部個体を採取した。サンプルの処理は 2-2-1 に従った。

2-2-4 実体顕微鏡による観察

窒素・リン欠乏培地で培養したスサビノリ葉状体の細胞を実体顕微鏡により観察した。スサビノリ葉状体をスライドガラス上に載せ、少量の海水で覆い、実体顕微鏡 VHX-5000(Keyence, Osaka, Japan)を用いて観察を行った。

2-2-5 光合成色素含量の測定

凍結したスサビノリ葉状体サンプルを乳鉢と乳棒を用い、液体窒素中で細かな粉末状になるまで破砕した。その際、少量の海砂（~50 mg）を加えて破砕を促進した。乳鉢内から液体窒素が完全に蒸発したところで、乳鉢に 5 ml の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)を加えた。乳鉢内の破砕されたノリをピペティングで緩衝液に完全に懸濁し、1 ml の懸濁液を 1.5 ml 遠心チューブに分取した。氷上で 2 時間静置した後、20,000 *g* で 15 分間遠心を行った。上清を回収しこれをフィコビルリン抽出液とした。沈殿に 1 ml の 90%アセトンを加え、タッピング、ボルテックスを用いて完全に懸濁した。これを 50°C の湯浴で 5 分間処理した後、4°C、20,000 *g* で 15 分間遠心を行った。上清を回収し、これをクロロフィル抽出液とした。

フィコビルリン抽出液・クロロフィル抽出液それぞれについて、分光光度計 V-550(Jasco, Tokyo, Japan)を用いて波長 450 nm から 700 nm の吸光スペクトルを測定した。吸光値が 1.5 を上回るサンプルについては、リン酸緩衝液または 90% アセトンで適宜希釈して測定を行った。測定されたスペクトルから以下の関係式を用いて、フィコビルリン含量、クロロフィル含量を算出した（西澤一俊と千原光男、1979）（土屋ら、1961）（平田ら、1978）。式中の A_x は波長 x nm における吸光度を示す。

$$\text{Phycoerythrin } (\mu\text{g/ml}) = 119.4A_{565} - 53.6A_{615}$$

$$\text{Phycocyanin } (\mu\text{g/ml}) = 164.5A_{615} - 0.14A_{565}$$

$$\text{Chlorophyll } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) = 11.6A_{665} - 1.31A_{645} - 0.14A_{630}$$

2-2-6 全タンパク質の抽出と定量

凍結保存したスサビノリ葉状体サンプルを乳鉢と乳棒を用い、液体窒素中で細かな粉状になるまで試料を破砕した。試料粉末を液体窒素中で冷却した 15 ml 容遠沈管に移し、試料重量の 10 倍量の全タンパク質抽出バッファー (50 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸(Tris-HCl) (pH 8.8)、150 mM 塩化ナトリウム、1%ドデシル硫酸ナトリウム、10%グリセロール) を加え、ボルテックスを用いて攪拌した。ソニケーターU200S(IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Germany)で 1 分間、氷上で処理した後 (Cycle 0.5, Amplitude 5.0)、ボルテックスで 1 分間激しく攪拌した。65°C で 15 分間熱処理を行った後、25°C、20,000 *g* で 10 分間遠心し上清を分取し、全タンパク質溶液とした。

タンパク質濃度の測定には、BCA protein assay kit(Wako, Osaka, Japan)を用いた。牛血清アルブミンを全タンパク質抽出バッファーに溶解し、2.0 mg/ml の溶液を作製した。これを全タンパク質抽出バッファーで希釈し、2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、0.2 mg/ml の溶液を調製した。65°C で 15 分間熱処理を行い、これらを検量線作製用の溶液とした。全タンパク質溶液は全タンパク質抽出バッファーで 10 倍に希釈して測定に供した。測定の手順は付属のマニュアルに従った。発色は 37°C で 30 分間行った。測定には分光光度計 V-550(Jasco)を用い、562 nm の吸光度を測定した。

2-2-7 フィコビリソーム粗抽出液の調製

凍結したノリサンプルを融解しないように注意して破砕した。破砕は 2-2-1 と同様に行った。サンプルの凍結した粉末をあらかじめ液体窒素中で冷却した 5 ml 遠心チューブに回収した。蓋を開けた状態で液体窒素中に静置し、チューブ内の液体窒素を完全に蒸発させた。チューブに 0.8 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)をサンプルの湿重量の 5 倍量加え、速やかに攪拌した。そこに 20%Triton-X 100 水溶液を終濃度 2%となるよう加え、速やかに混合した。チューブを氷上に置き、振盪器で 15 分間振盪を行った。懸濁液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、25°C、20,000 *g* で 15 分間遠心を行った。上清を回収してフィコビリソーム

ム粗抽出液とし、4°C で一時保存した。

2-2-8 フィコビリソームの単離

15 ml PET 超遠心チューブの底に 50%ショ糖、0.8 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を 5 ml 入れ、その上に 10%ショ糖、0.8 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) をチューブの上端から 1 cm のところまでパスツールピペットで静かに重層した。チューブを、パラフィルムを被せたシリコ栓で蓋をした。チューブを静かに真横に倒し、室温で 2 時間半静置することで密度勾配を作製した。チューブを静かに垂直に戻し、チューブ内液上部にフィコビリソーム粗抽出液を重層した。4°C、100,000 *g* で 15 時間遠心を行った。チューブの底から約 3 cm のところに形成される無傷フィコビリソームのバンドを吸い上げ針で回収した。回収した無傷フィコビリソーム画分を 3 kDa M.W. cut off の透析チューブに入れ超純水 1 L に対して一晩透析を行った。チューブの内液を回収し、トリクロロ酢酸の終濃度が 20% になるよう 80%トリクロロ酢酸と超純水を加えて調製した。5 ml の超遠心チューブに移し、氷上で 30 min 静置後、4°C、100,000 *g* で 30 分間遠心を行った。上清を破除去し、チューブに氷水で冷却したアセトンを加えて軽く攪拌して沈殿を洗い、その後アセトンを除去する操作を 10 回ほど繰り返した。上清の pH が酸性から中性になったことをリトマス試験紙で確認し、沈殿を 1.5 ml 遠心チューブに移し、アセトンを除去し風乾した。

2-2-9 全タンパク質の抽出

凍結したノリサンプルを乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で、細かな粉末状になるまで破碎した。その際、少量の海砂 (~50 mg) を加えて破碎を促進した。粉末をあらかじめ液体窒素中で冷却した 5 ml 遠心チューブに移し、サンプル湿重量の 5 倍量の抽出バッファー (7 M 尿素、2 M チオ尿素、4% CHAPS、10 mM ジチオスレイトール (DTT)) を加えて、ボルテックスを用いて激しく攪拌した。懸濁液を 5 ml PET 超遠心チューブに移し、超純水を重層してチューブを満たした。4°C、100,000 *g* で 30 分間遠心を行い、上清を回収した。4 ml の上清に 1

ml の 80% w/v トリクロロ酢酸溶液を加えて混合し、新しい超遠心チューブに移した。氷上で 30 min 静置後、4°C、100,000 *g* で 30 分間遠心を行い、上清を除去した。チューブに氷水で冷却したアセトンを加えて軽く攪拌して沈殿を洗い、その後アセトンを除去する操作を 10 回ほど繰り返した。上清の pH が酸性から中性になったのをリトマス試験紙で確認し、沈殿を 1.5 ml マイクロチューブに移し、アセトンを除去し風乾した。

2-2-10 二次元電気泳動サンプルの調製

タンパク質をトリクロロ酢酸で沈殿させたペレットに 300 μ l の膨潤液（7 M 尿素、2 M チオ尿素、4% CHAPS）を加えた。ボルテックス・ソニケーターを用いて入念に沈殿を溶解した。4°C、20,000 *g* で 15 分間遠心を行い、不溶性成分を沈殿させ、上清のタンパク質溶液を回収した。タンパク質溶液の濃度測定には Bradford 法の原理を用いた Protein assay kit (Bio-rad Laboratories, Hercules, California)を使用した。検量線作成のための標準液には、牛血清アルブミン(Wako)を膨潤液に溶解したものをを用いた。牛血清アルブミンを膨潤液に溶解し 1 mg/ml の溶液を調製した。これを膨潤液で希釈し、1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.0 m/ml の検量線用標準液調製した。検量線の濃度範囲を外れたサンプルについては膨潤液で適宜希釈を行い、測定した。

2-2-11 二次元電気泳動

一次元目の分離システムには Ettan IPGphor (GE Healthcare, Chicago, IL) を使用した。IPG ストリップホルダーと immobiline DryStrip (GE Healthcare) は 11 cm のものをを用いた。pH レンジは pH 4-7 のものと pH 3-11 のもの 2 種類を使用した。タンパク質溶液、1 M DTT（終濃度 20 mM）、IPG buffer(終濃度 0.5%) を混合し、膨潤液で 200 μ l に調製した。添加したタンパク質の濃度は実験により異なるため、結果の図中に記載した。一次元目の電気泳動は以下の条件で行った。ストリップ 1 本当たりの電流上限値は 25 mA に設定した。

pH 4-7 strip 使用時

Rehydration : 14 時間

Step and Hold : 500 V : 2 時間

Gradient : 1000 V、1 時間

Gradient : 6000 V、2 時間 30 分

Step and Hold : 40 分

pH 3-11 strip 使用時

Rehydration : 14 時間

Step and Hold : 500 V : 1 時間

Gradient : 1000 V、1 時間

Gradient : 6000 V、2 時間

Step and Hold : 40 分

一次元目の電気泳動が終了後、ゲルストリップをホルダーから取出し、プラスチックシャーレにフィルム側を壁面に沿わせるようにして入れ、平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.8)、6 M 尿素、30% (v/v) グリセロール、1% SDS、10 mM ジチオスレイトール) を 30 ml 加えて 15 分間穏やかに振盪した。平衡化バッファーを交換しさらに 15 分間振盪を行った。平衡化したストリップは泳動バッファーで軽くゆすぎ、二次元目のゲルの上部に置き、アガロース溶液 (0.5%アガロース、0.375 M Tris-HCl pH 8.8) で封入した。タンパク質分子量マーカーには LMW Protein Marker for SDS (GE Lifescience)を用い、5 mm 角に切り出した濾紙に 0.5 ml を染み込ませて、ゲル上部の左端に載せ、アガロースで封入した。二次元目の泳動にはアクリルアミド濃度が 12.5%の 13 cm × 13 cm のゲルを用いた。ゲル及び泳動バッファーの組成は以下の通りである。泳動はゲル 1 枚当たり 30 mA の定電流で行った。泳動端のブロモフェノールブルーがゲルの下端から約 1 cm のところまで到達したら泳動を停止した。

濃縮ゲル

1.5 M トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸(pH 8.8) : 5.00 ml

30%アクリルアミド/ビス : 8.34 ml

10%ドデシル硫酸ナトリウム: 0.20 ml

超純水 : 6.26 ml

10%過硫酸アンモニウム : 0.20 ml

N,N,N,N-テトラメチルエタン-1,2-ジアミン : 8.0 μ l

分離ゲル

0.5 M トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸(pH 6.8) : 0.75 ml

30%アクリルアミド/ビス : 0.50 ml

10%ドデシル硫酸ナトリウム : 0.03 ml

超純水 : 1.69 ml

10%過硫酸アンモニウム : 0.03 ml

N,N,N,N-テトラメチルエタン-1,2-ジアミン : 3 μ l

泳動バッファー

トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸: 3.0 g

グリシン : 14.4 g

ドデシル硫酸ナトリウム : 1 g

超純水で 1 L に fill up

2-2-12 ゲルの染色

ゲルの染色には 2D 銀染色キット(Cosmobio, Tokyo, Japan)を用いた。染色操作は製品付属のマニュアルに従って行った。製品中の前処理剤についてはこれを使わず、グルタルアルデヒド処理を行わなかった。

2-2-13 低中分子画分の分析

電気泳動では精度良く分離することが出来ない約 10 kDa 以下のペプチド及び中低分子の有機化合物域に着目して 1 M 酢酸で抽出を行った(Minamino *et al.*, 2003)。

凍結したノリサンプルに少量の海砂を加え、液体窒素冷却下で乳鉢と乳棒を

用いて粉末状になるまで破碎を行った。試料粉末を、あらかじめ液体窒素中で冷却した 1.5 ml マイクロチューブに移し、サンプル湿重量の 5 倍量の 1 M 酢酸を加えて速やかに攪拌した。ソニケーターを用いて氷上で 1 分間超音波処理を行った後、4°C、20,000 g で 15 分間遠心を行った。回収した上清を、Mono Spin C18(GL Science, Tokyo, Japan)にロードし、10,000 g で 1 分間遠心を行った。濾液を回収して同様に再度通液を行った。500 µl の 0.1% トリフルオロ酢酸でカラムを洗浄し、100 µl の 0.1%トリフルオロ酢酸／80%アセトニトリルで溶出を行った。これをペプチド粗抽出液とした。

2-2-14 低中分子画分の大量抽出

大量の低中分子画分を得るため、2-2-13 の低中分子画分の調製法を一部改変して実験を行った。スサビノリを通常培地で培養し葉長 10 cm 程度まで生育させた。その後、窒素欠乏培地に移して 6 日間培養を行った。サンプル湿重量の 5 倍量の 1 M 酢酸と攪拌子をビーカーに入れ、マグネチックスターラーを用いて攪拌した。液体窒素冷却下で乳鉢と乳棒を用いて破碎を行い、生じた粉末を攪拌しているビーカーに投入した。懸濁液を 50 ml 遠心チューブに約 35 ml ずつ分注した。チューブを氷上に置き、冷却を行いつつソニケーター Sonifier 250D (Branson Ultrasonics, Danbury, CT)で 5 分間の超音波処理 (Cycle: 1 s, Duty: 20%, Amplitude: 0.5)を行った。ボルテックスで 1 分間攪拌した後、4°C、16,000 g で 30 分間遠心を行った。上清を回収し、2 本の sep-pak C-18 100 mg (Waters, Milford, MA)に通し、濾液を回収した。それぞれ 1.6 ml の 0.1%トリフルオロ酢酸 / 80%アセトニトリルで溶出を行った。回収した濾液は 2 本の sep-pak C-18 50 mg(Waters)に通した。それぞれ 800 µl の 0.1%トリフルオロ酢酸／80%アセトニトリルで溶出を行った。溶出液を合わせて、1.5 ml マイクロチューブに分注し、液体窒素で凍結後、-80°C で一時保存した。遠心濃縮器で 10 分の 1 程度の体積まで濃縮を行った。4°C、20,000 g で 5 分間遠心を行い、上清を回収した。沈殿には少量の 0.1%トリフルオロ酢酸を加え、ボルテックスで 5 分間攪拌した。4°C、20,000 g で 5 分間遠心を行い、上清を回収、前述の上清と合わせて

ペプチド粗抽出とした。

2-2-15 低中分子画分の高速液体クロマトグラフィー分離

2-2-14 で調製したペプチド粗抽出液を高速液体クロマトグラフィーで分離した。分析条件は以下の通りである。

カラム：TSKgel ODS-80_{TM} (4.6 mm × 150 mm) (Tosoh, Tokyo, Japan)

溶離液：A 液：0.1% トリフルオロ酢酸／1%アセトニトリル

B 液：0.1% トリフルオロ酢酸／80%アセトニトリル

流速：1 ml

検出波長：280 nm

カラム温度：40°C

グラジエント

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	95	5
10	95	5
50	47	53
65	0	100

2-2-16 分取したピークの再分離

2-2-15 で分離したピーク (Peak1、Peak2) を 1.5 ml 遠心チューブに分取した。液体窒素中で凍結後、凍結乾燥を行った。チューブに 100 µl の超純水を加えてボルテックで乾燥粉末を溶解した。これに 100 mM ギ酸アンモニウム水溶液および 1 M ジチオスレイトールを終濃度がそれぞれ 10 mM になるよう添加した。65°C で 15 分間加熱した後、トリフルオロ酢酸を終濃度が 1% となるよう添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸で 5 倍に希釈して、高速液体クロマトグラフィーのサンプルとした。分析条件は以下の通りである。

カラム：TSKgel ODS-80_{TM} (4.6 mm × 150 mm) (Tosoh)

溶離液：A 液：10 mM ヘプタフルオロ酪酸／1%アセトニトリル

B 液：10 mM ヘプタフルオロ酪酸／80%アセトニトリル

流速：1 ml

検出波長：280 nm

カラム温度：40°C

グラジエント

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	95	5
10	95	5
75	50	50
85	0	100

2-2-17 ピークの分取と吸光スペクトル測定

2-2-16 で分離したピーク (Peak1、Peak2) を 1.5 ml 遠心チューブに分取した。液体窒素中で凍結後、凍結乾燥を行った。チューブに 100 μ l の超純水を加えてボルテックで乾燥粉末を溶解した。吸光光度計 V-550(JASCO)を用いて 200 nm から 700 nm の吸光スペクトルを測定した。測定には一滴測定ユニットを使用し、光路長が 0.2 mm のセルを使用した。

2-2-18 Peak2 のペプチド濃度測定

2-2-17 でスペクトル測定に用いたのと同様のサンプルを用いて Peak2 のペプチド濃度を測定した。測定には、BCA protein assay kit (Wako)を用いた。牛血清アルブミンを 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に溶解し、2.0 mg/ml の溶液を作製した。これを 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で希釈し、2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、0.2 mg/ml の溶液を調製した。65°C で 15 分間熱処理を行い、これらを検量線作製の溶液とした。測定の手順は付属のマニュアルに従った。発色は 37°C で 30 分間行った。測定には分光光度計 V-550(Jasco)を用い 562 nm の吸光度を測定した。

2-2-19 Peak2 のゲル濾過クロマトグラフィー

2-2-17 でスペクトル測定に用いたのと同様のサンプルを用い、ゲル濾過カラムを用いて高速液体クロマトグラフィーで分離した。

カラム : Superdex Peptide 10/300GL (4.6 mm × 150 mm) (GE Healthcare)

溶離液 : 0.1%トリフルオロ酢酸／30%アセトニトリル

流速 : 0.5 ml

検出波長 : 280 nm

カラム温度 : 室温

2-2-20 Peak2 の ^1H NMR 測定

2-2-16 で分離した Peak2 を 1.5 ml チューブに分取した。凍結乾燥後、超純水に溶解した。重水およびリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)をそれぞれ、終濃度 10%、10 μM となるよう添加し、約 80 μl に調製した。3 mm 径の対称形ミクロサンプルチューブ BMS-003(Shigemi, Tokyo, Japan)に入れ、NMR 測定を行った。軽水のシグナルを除去するために、WATERGATE のパルス系列を使用した。NMR の測定条件は以下の通りである。

核種 : ^1H

Solvent : D_2O

Field Strength : 600 MHz

Pulse Sequence : wgh

X_offset : 4.67 ppm

X_points : 16384

X_Sweep : 11.26126126 kHz

Relaxation Delay : 3 s

Water Suppression : Watergate W3

Scans : 1520 times

Receiver_Gain : 62

2-2-21 Peak2 の TOCSY NMR 測定

2-2-20 で測定したのと同様のサンプルについて TOCSY NMR を測定した。
軽水のシグナルを除去するために、WATERGATE のパルス系列と
Presaturation を併用した。測定条件は以下の通りである。

核種 : ^1H

Solvent : D_2O

Field_Strength : 600 MHz

Pulse_Sequence : Tocsy_dipsi2_wgh_phase

X_offset : 4.67 ppm

X_points : 2048

X_Sweep : 11.26126126 kHz

Y_points : 256

Y_Sweep : 9.00900901 kHz

Relaxation Delay : 1.2 s

Watergate_Selection: W3

Dante Attenuator : 40 dB

Scans : 160 times

Receiver_Gain : 63

2-3 結果

2-3-1 窒素、リン、鉄欠乏による色調の変化

窒素、リン、鉄の欠乏により、実際に葉状体に褪色が生じるかを確認するため、各栄養欠乏培地で培養したスサビノリ葉状体の色調の変化を観察した（図 2-3）。通常培地で培養したサンプルは培養 9 日目でも目視で判別できる色調の変化は見られなかった。窒素欠乏培地で培養したサンプルは培養 3 日目で、目視で褪色が確認された。さらに 6 日目、9 日目と日数が経過するにつれ、褪色が進行し、色調は褐色から薄緑色に変化した。リン欠乏培地で培養したサンプルは 6 日目でやや薄い色調に変化し、9 日目では通常培地で培養したノリと比較してやや薄い、茶色い色調に変化した。鉄欠乏培地で培養したサンプルでは培養 6 日目ではほとんど色調に変化が見られなかったが、9 日目では通常培地で培養したノリと比較してやや明るい、赤い色調に変化した。

2-3-2 窒素、リン、鉄欠乏サンプルにおける光合成色素含量の測定

栄養欠乏による褪色が、光合成色素含量の低下に由来するのかを確認するため、窒素、リン、鉄欠乏培地でそれぞれ培養したスサビノリ葉状体の光合成色素含量を測定した（図 2-4）。通常培地で培養したサンプルのフィコエリスリン含量は、3 日目、6 日目と 0 日目と比べて徐々に低下する傾向がみられた。一方、クロロフィル *a* 含量には 3 日目でやや減少したが、6 日目では 0 日目とほぼ同じ値を示した。窒素欠乏培地で培養したサンプルでは、培養日数が経つとフィコエリスリン、クロロフィル *a* 含量とも低下した。クロロフィル *a* に比べてフィコエリスリン含量の低下が大きく、3 日でほぼ半減した。リン欠乏培地、鉄欠乏培地で培養したサンプルでは通常培地で培養したサンプルと比較して、3 日目では有意な差はみられなかったが、6 日目ではフィコエリスリン、クロロフィル *a* 含量ともに有意な減少がみられた。

2-3-3 実体顕微鏡による観察

栄養欠乏がスサビノリに与える影響を詳しく観察するため、通常培地、窒素、

リン欠乏培地でそれぞれ 3 日間培養したスサビノリ葉状体の細胞の様子を実体顕微鏡で観察した（図 2-5）。窒素欠乏培地で培養したサンプルでは、通常培地で培養したサンプルと比較して細胞内で光合成色素が分布している範囲が狭く、色も薄くなっていることが観察された。リン欠乏培地で培養したサンプルでは、通常培地、窒素欠乏培地で培養したサンプルと比較して細胞が小さく、細胞全体に光合成色素が分布していることが観察された。また、多くの細胞に対して大きさが近く向きが揃っている細胞が隣に存在しており、細胞分裂直後の細胞の配列が維持されていることが観察された。

2-3-4 窒素栄養の化学形態の違いによる色調の変化

培地中の窒素の化学形態の違いが、スサビノリ葉状体の色調に及ぼす影響を調べるため、通常培地（硝酸態窒素を含む）、アンモニア培地でそれぞれ培養した後、通常培地、窒素欠乏培地に移して培養したスサビノリ葉状体の色調の変化を観察した（図 2-6）。アンモニア培地で培養したサンプルは、通常培地で培養したサンプルに比べてやや色が濃くなる傾向が見られた。両条件の間で生育にはほとんど差は認められなかった。どちらの培地で培養したサンプルも、その後の窒素欠乏培地での培養によって、同様に褪色した。

2-3-5 窒素・リンの同時欠乏と窒素の再添加による色調の変化

窒素・リンの同時欠乏が褪色に与える影響及び、褪色が可逆的な現象であるかを確認するため、窒素、リン、窒素・リン欠乏培地でそれぞれ培養した後、窒素を添加して培養したスサビノリ葉状体の色調の変化を観察した（図 2-7）。窒素欠乏と窒素・リン欠乏の褪色の度合いは、目視で確認できるほどの違いはなかった。窒素欠乏による褪色は、通常培地への植え継ぎにより回復が見られた。6 日間の回復培養により、通常培地で培養したサンプルとほぼ同じ色調まで回復した。また、窒素・リン欠乏培地で培養したサンプルをリン欠乏培地に植え継ぎ、リン欠乏を継続しながら窒素に関して回復培養を行った。この条件でも、若干の褪色の回復が観察された。

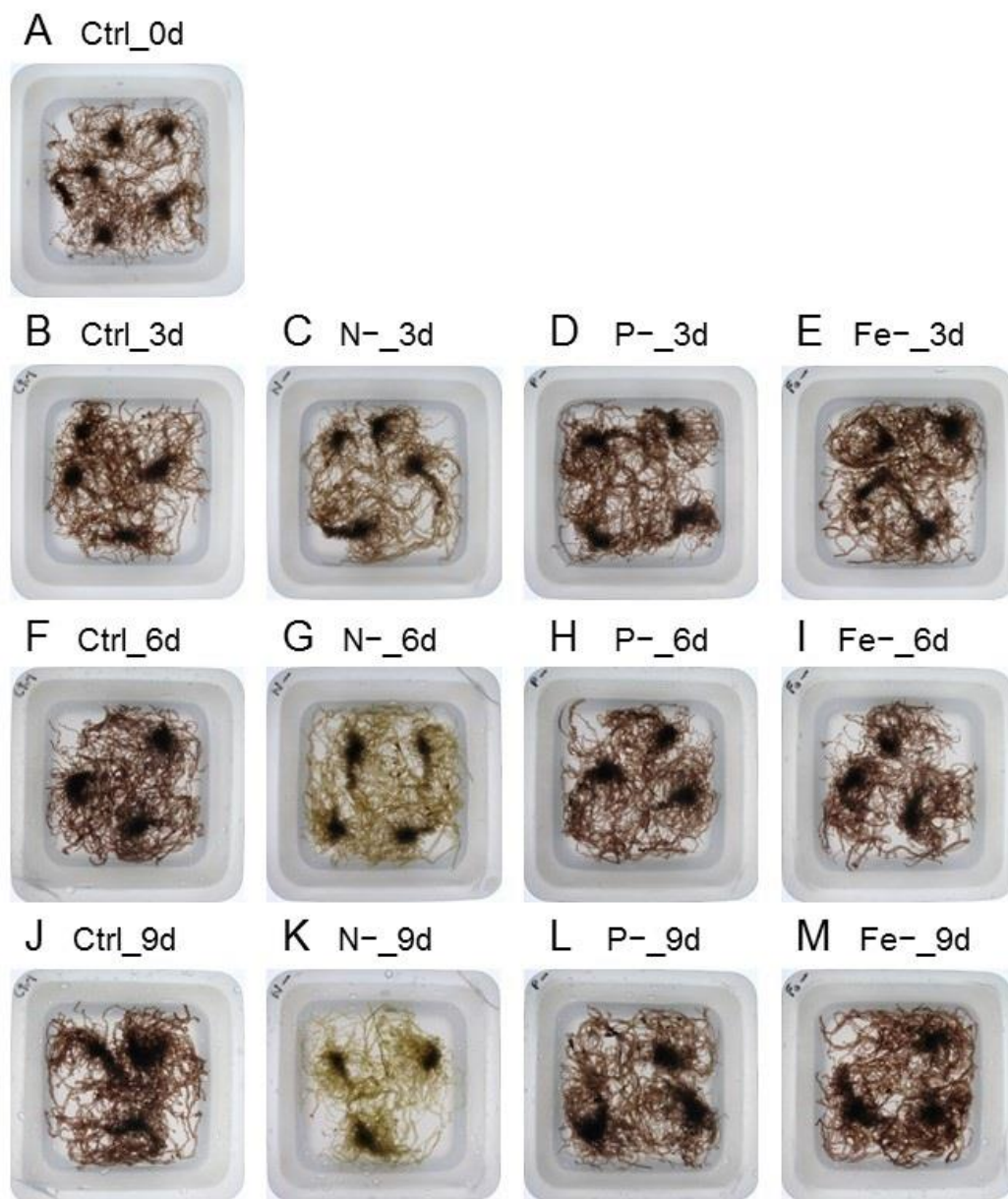


図 2-3 栄養欠乏による葉状体の色調の変化

A：通常培地で前培養したサンプル、B：通常培地で3日間培養したサンプル、C：窒素欠乏培地で3日間培養したサンプル、D：リン欠乏培地で3日間培養したサンプル、E：鉄欠乏培地で3日間培養したサンプル、F：通常培地で6日間培養したサンプル、G：窒素欠乏培地で6日間培養したサンプル、H：リン欠乏培地で6日間培養したもの、I：鉄欠乏培地で6日間培養したサンプル、J：通常培地で9日間培養したサンプル、K：窒素欠乏培地で9日間培養したサンプル、L：リン欠乏培地で9日間培養したサンプル、M：鉄欠乏培地で9日間培養したサンプル

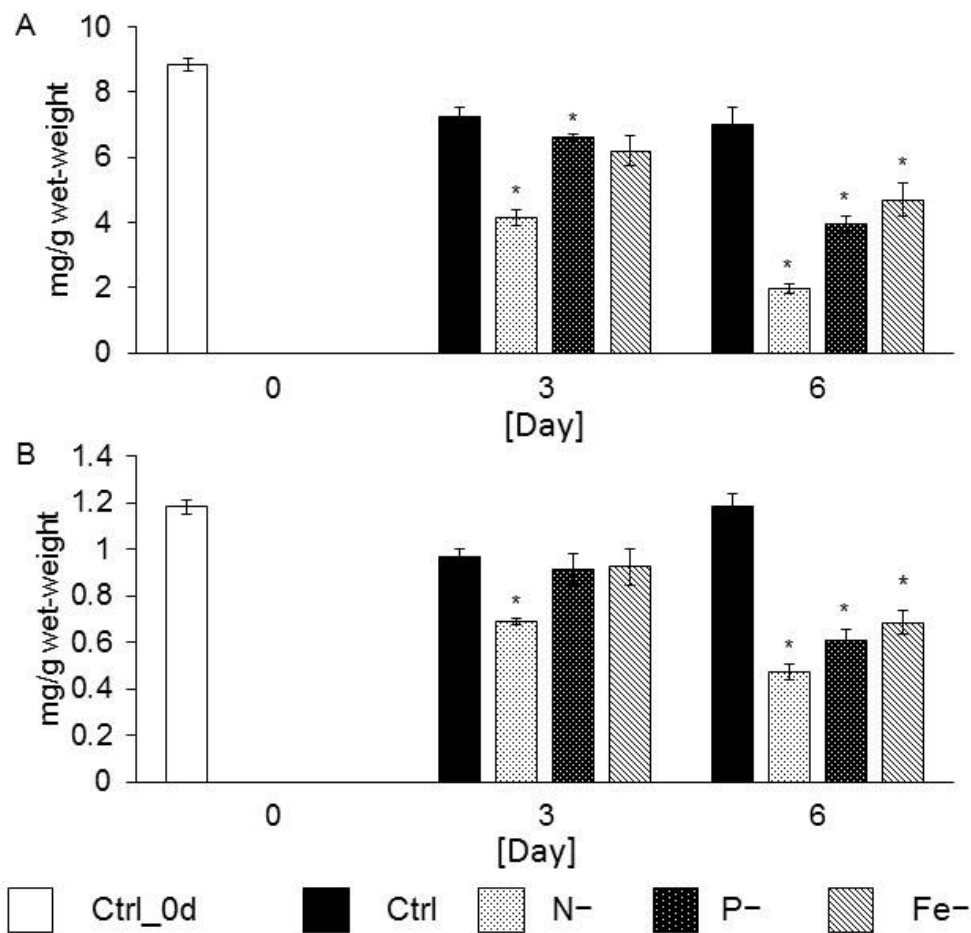


図 2-4 栄養欠乏時の光合成色素含量

A: 湿重量当たりのフィコエリスリン含量、B: 湿重量当たりのクロロフィル *a* 含量
 横軸: 培養経過日数(day)、Ctrl_0d: 通常培地で前培養したサンプル、Ctrl: 通常培地で培養したサンプル、N-: 窒素欠乏培地で生育したサンプル、P-: リン欠乏培地で生育したサンプル、Fe-: 鉄欠乏培地で生育したサンプル

n = 3, * p < 0.05 Ctrl との比較

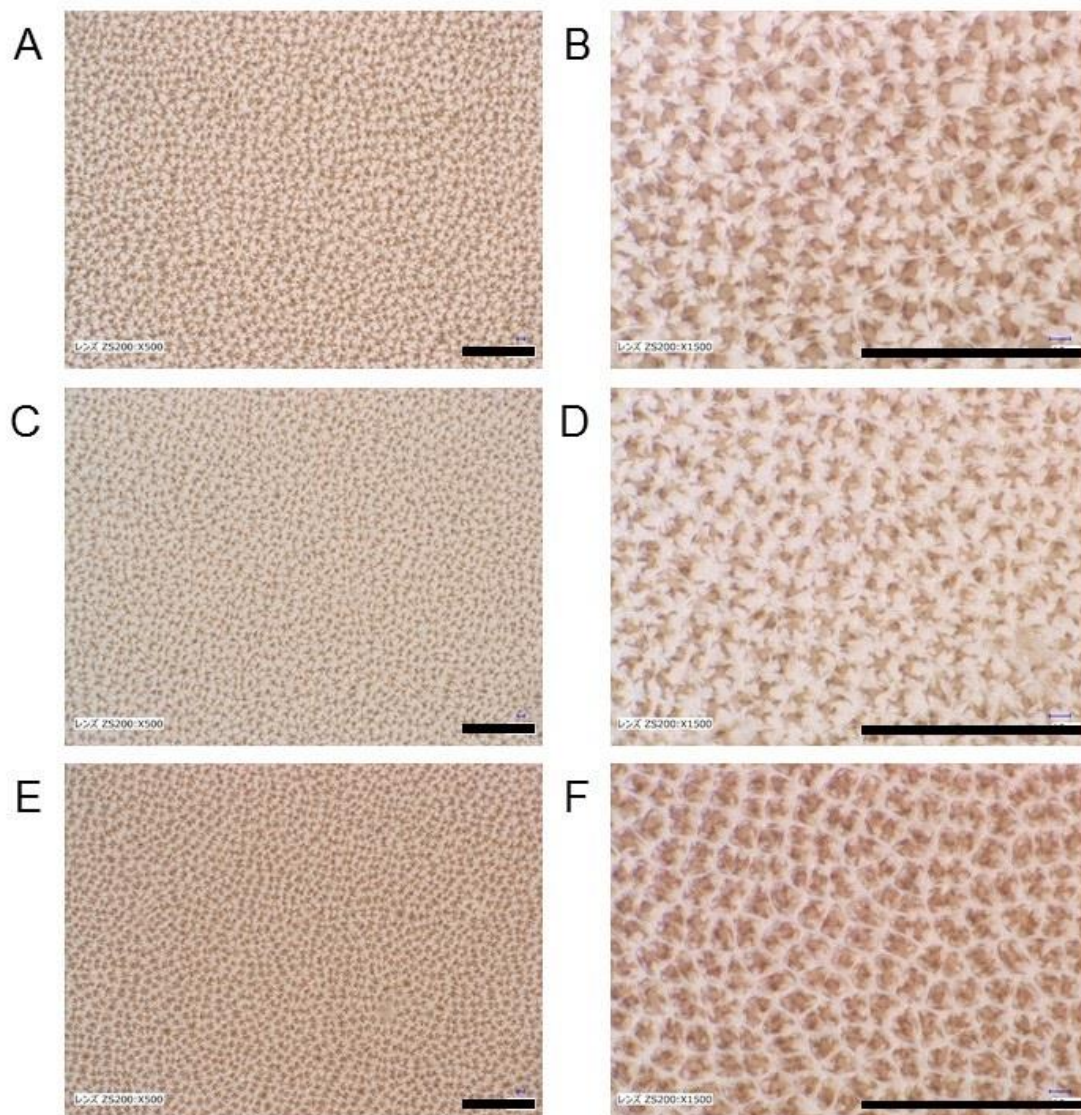


図 2-5 実体顕微鏡による窒素欠乏,リン欠乏時の葉状体の観察

A : 通常培地で 3 日間培養したサンプル、。B : A の拡大図。C : 窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。D : C の拡大図。E : リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。F : E の拡大図。

図中のスケールバーは 100 μm

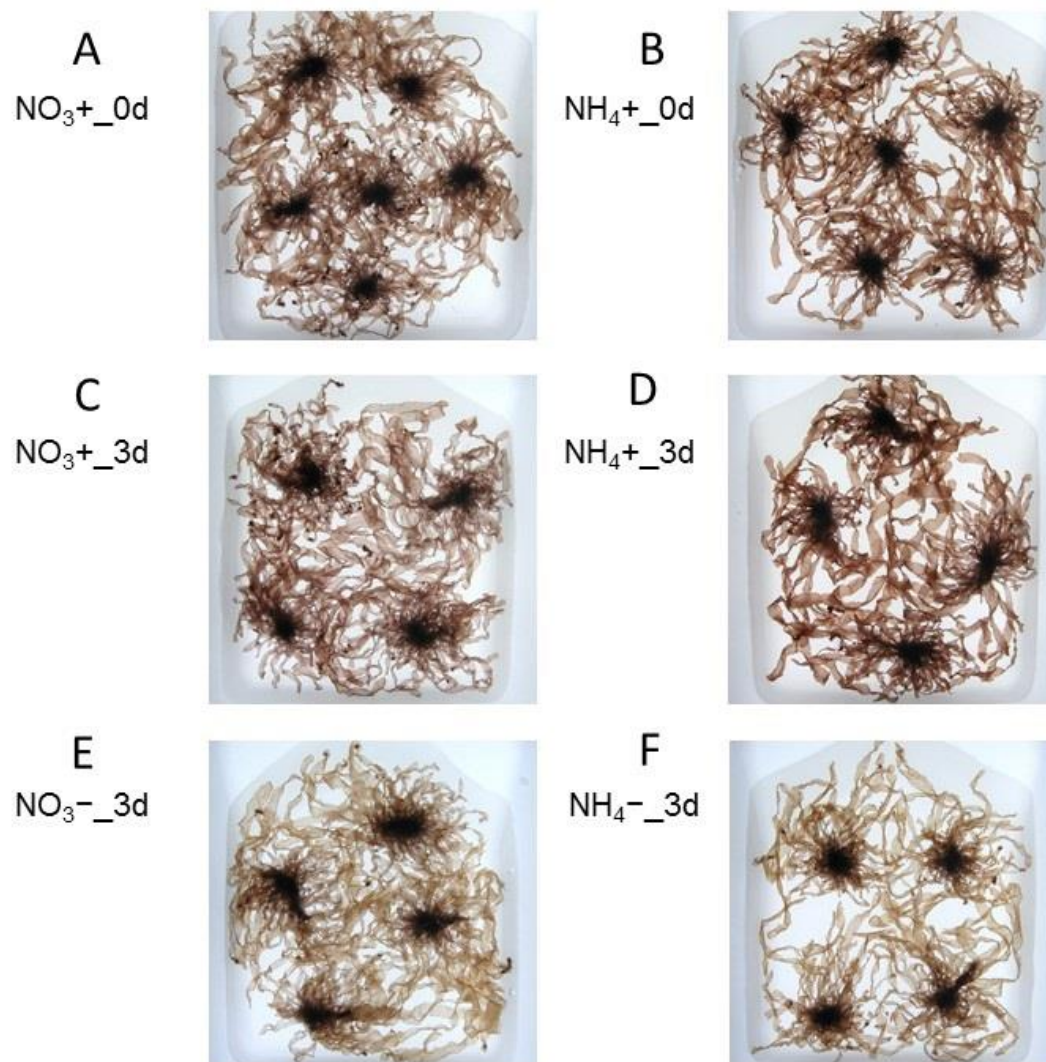


図 2-6 培地中の窒素の化学形態の違いによる葉状体の色調の変化

A : 通常培地で 3 日間培養したサンプル、B : アンモニア培地で 3 日間培養したサンプル、C : A を通常培地でさらに 3 日間培養したサンプル、D : B をアンモニア培地でさらに 3 日間培養したサンプル、E : A を窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル、F : B を窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル

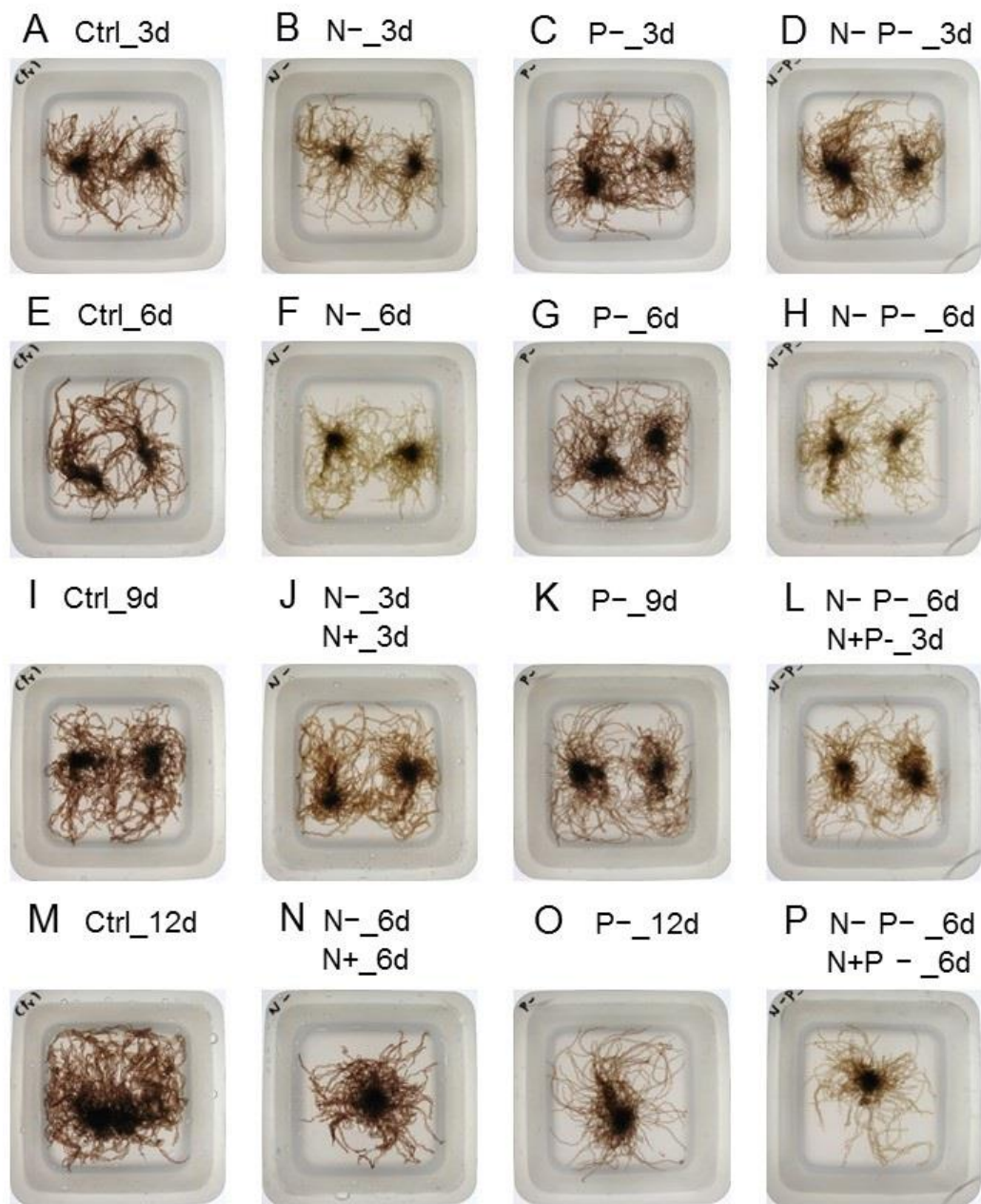


図 2-7 窒素とリンの同時欠乏と窒素の再添加による葉状体の色調の変化

A : 通常培地で 3 日間培養したサンプル、B : 窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル、C : リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル、D : 窒素・リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル、E : 通常培地で 6 日間培養したサンプル、F : 窒素欠乏培地で 6 日間培養したサンプル、G : リン欠乏培地で 6 日間培養したサンプル、H : 窒素・リン欠乏培地で 6 日間培養したサンプル、I : 通常培地で 9 日間培養したサンプル、J : F を通常培地で 3 日間培養したサンプル、K : リン欠乏培地で 9 日間培養したサンプル、L : H をリン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル、M : 通常培地で 12 日間培養したサンプル、N : F を通常培地で 6 日間培養したサンプル、O : リン欠乏培地で 12 日間培養したサンプル、P : H をリン欠乏培地で 6 日間培養したサンプル

2-3-6 窒素欠乏および窒素再添加による全タンパク質量の変化

窒素欠乏時、また窒素再添加時の光合成色素以外のタンパク質量の挙動を調べるため、窒素欠乏培地で6日間培養し、その後通常培地に移して6日間培養したスサビノリ葉状体の全タンパク質量の経時的変化を測定した（図2-8）。窒素欠乏培地で6日間培養したサンプルでは全タンパク質量は、欠乏処理前の半分以上に低下した。その後の6日間の回復培養によって、全タンパク質量は欠乏処理と同程度に回復した。

2-3-7 窒素欠乏による光合成色素含量と全タンパク質量比

窒素欠乏時、また窒素再添加時の光合成色素とそれ以外のタンパク質量の相関を調べるため、欠乏処理前と窒素欠乏培地で6日間培養した後の、光合成色素含量と全タンパク質量との比率を算出した（図2-9）。全タンパク質量に対するフィコエリスリンの量比は、窒素欠乏処理によって有意に低下した。一方、全タンパク質量に対するクロロフィル *a* の量比は窒素欠乏処理によって有意に上昇した。

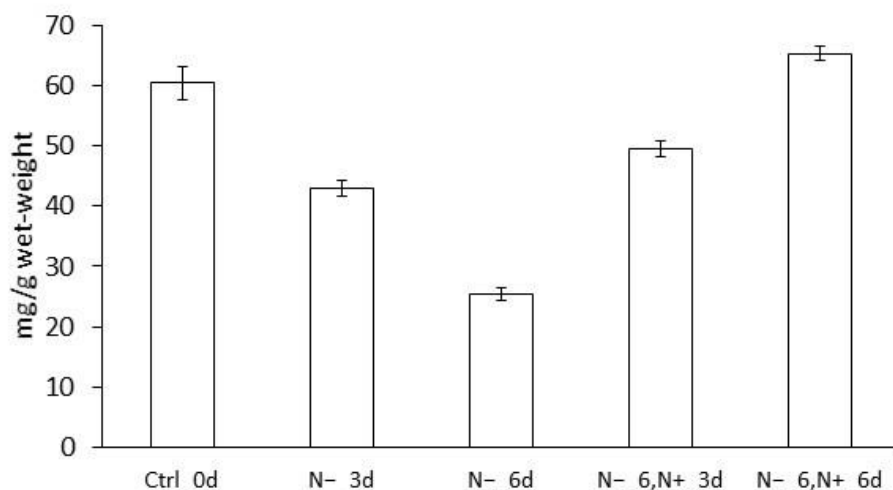


図2-8 窒素欠乏と窒素再添加による全タンパク質含量の経時変化

Ctrl_0d：通常培地で前培養したサンプル。N_3d：窒素欠乏培地で3日間培養したサンプル。N_6d：窒素欠乏で6日間培養したサンプル。N_6,N+_3d：窒素欠乏で6日間培養後、通常培地で3日間培養したサンプル。N_6,N+_6d：通常培地で6日間培養後、通常培地で6日間培養したサンプル。

n = 3

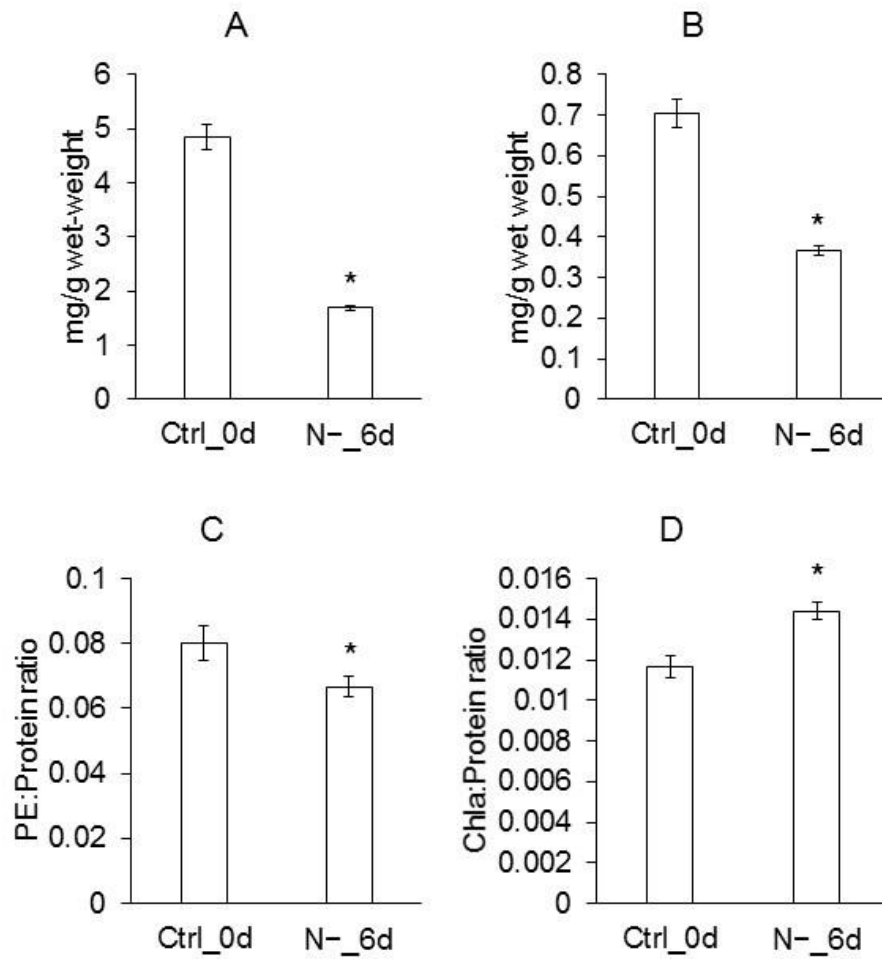


図 2-9 窒素欠乏時の光合成色素含量とタンパク質含量の比率

A : フィコエリスリン含量。B : クロロフィル *a* 含量。C : フィコエリスリン含量とタンパク質含量の比率。D : クロロフィル含量とタンパク質含量の比率。

Ctrl_0d : 通常培地で前培養したサンプル。N_6d : 窒素欠乏で 6 日間培養したサンプル。
n = 3 *p < 0.05

2-3-8 フィコビリソームの単離と分析

栄養欠乏によりフィコビリソームの構造的な変化（主にサイズの変化）が生じるかを調べるため、窒素、リン、鉄欠乏培地で培養したスサビノリ葉状体から抽出し、超遠心によって分離した無傷フィコビリソームのバンドを比較した（図 2-10 A）。分離された無傷フィコビリソームのバンドの中心（一番濃い部分）の位置は、窒素欠乏培地で培養したサンプルでは他のサンプルと比較して僅かに上方に位置した。また、単離した無傷フィコビリソームを SDS-PAGE で分離した（図 2-10 B）。バンドパターンにサンプル間で明確な差はみられなかった。

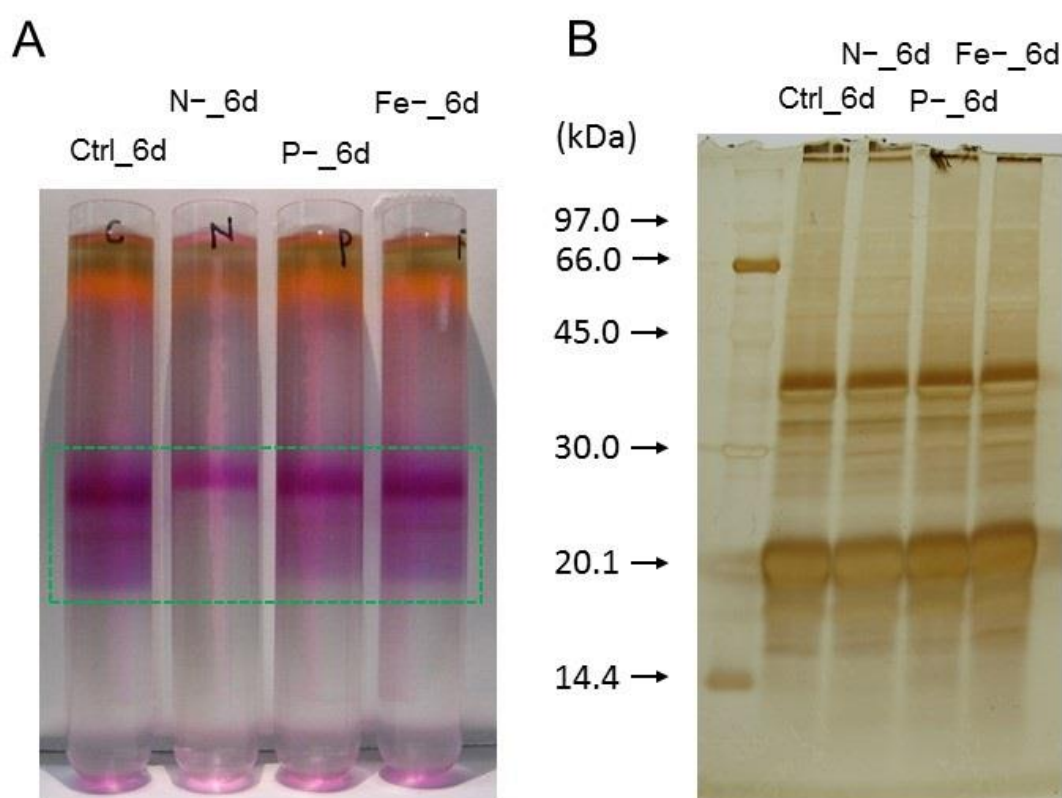


図 2-10 単離フィコビリソームとその電気泳動

A：超遠心分離を行い、緑色の枠で囲った無傷フィコビリソーム画分を分取した。B：分取した無傷フィコビリソーム画分を電気泳動し銀染色した。Ctrl_6d：通常培地で6日間培養したサンプル。N-_6d：窒素欠乏培地で6日間培養したサンプル。P-_6d：リン欠乏培地で6日間培養したサンプル。Fe-_6d：鉄欠乏培地で6日間培養したサンプル。

2-3-9 全タンパク質の二次元電気泳動

窒素欠乏により蓄積または減少する（光合成色素タンパク質以外の）タンパク質を同定するため、通常培地および窒素欠乏培地で2日間培養したサンプルから全タンパク質を抽出し二次元電気泳動を行った。窒素欠乏培地では3日間の培養でノリ葉状体の色が目視でもはっきりと分かる程度に薄くなり、光合成色素含量も半分近くに減少していた。このことから、3日間よりも短い時間で、生体内でこれらの応答に関わるタンパク質、例えばフィコビリンの分解に関わるタンパク質に量的な変化が見られるのではないかと考えられた。そこで、通常培地と窒素欠乏培地で2日間、培養したスサビノリ葉状体から全タンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行った。1次元のゲルにはpI 4-7のものとpI 3-11のものの2種類を用いた。pI 5.0を中心にして20 kDa付近にフィコビリンの広範囲のスポットが確認できた。これらがフィコビリタンパク質のスポットであると、染色前のスポットの色から判断された。このスポットの上方の領域では、スポットが横方向にストリーキングを起こしており分離が低下していた。このスポットに含まれるタンパク質の量が非常に多いため、分離低下の原因になっていると考えられた。また、pI 4.5よりも酸性側の領域でもスポットが横ストリーキングを起こしており、スポットの判別は困難であった。それ以外の範囲では、多くのかかなり明瞭なスポットが得られた。サンプル間で差のあるスポット、特に窒素欠乏サンプルでのみみられるスポットは観察されなかった。サンプル間で濃淡に差のあるスポットはいくつかみられたが、同じ条件で電気泳動の追試を行った結果、再現性は見られなかった（データは示していない）。

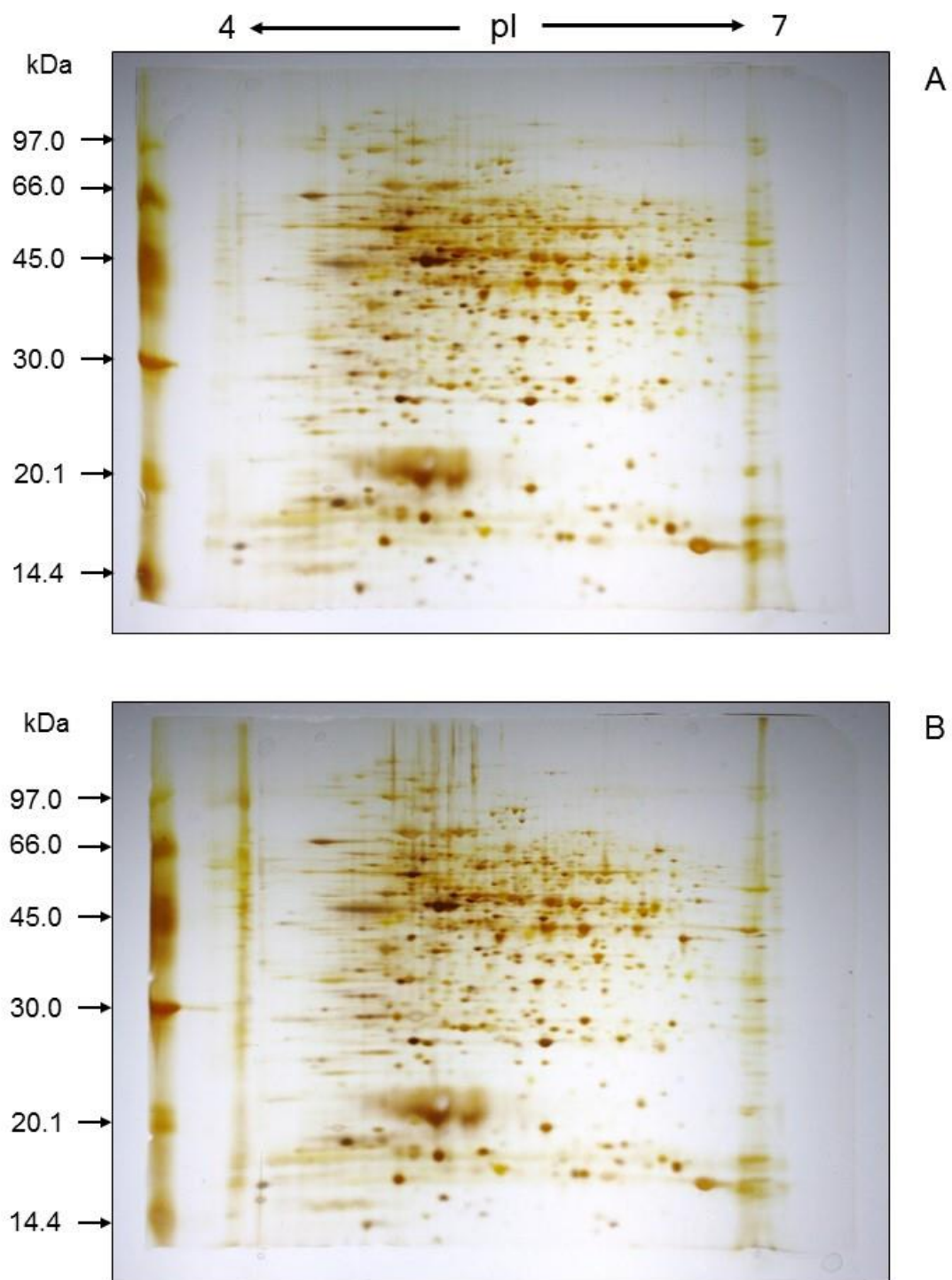


図 2-11 窒素欠乏サンプルの二次元電気泳動 pI 4 - 7

A: 通常培地で 2 日間培養したスサビノリ葉状体サンプルから抽出した全タンパク質。
 B: 窒素欠乏培地で 2 日間培養したスサビノリ葉状体サンプルから抽出した全タンパク質。ロードしたタンパク質量それぞれ 100 μ g。

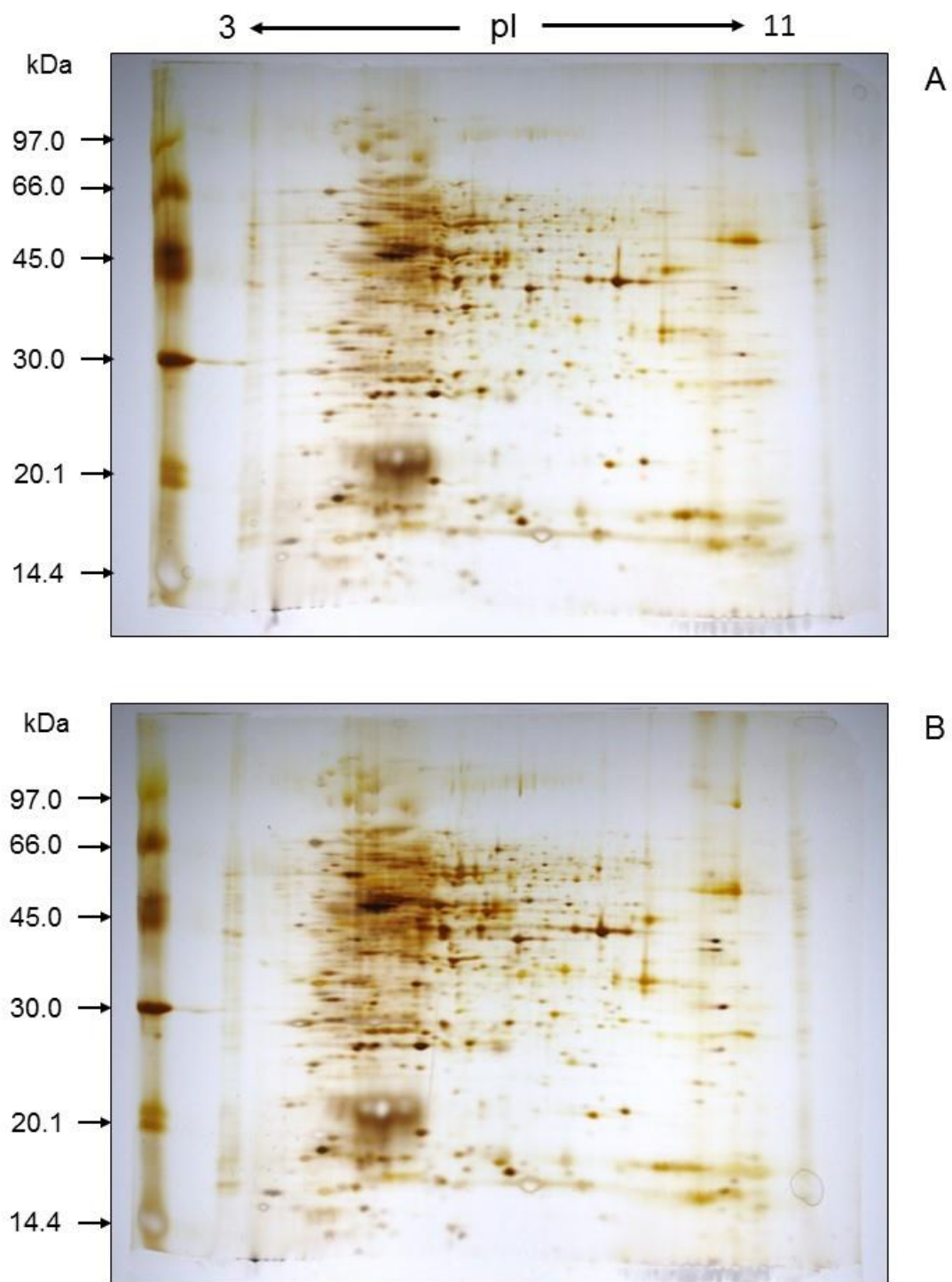


図 2-12 窒素欠乏サンプルの二次元電気泳動 pI 3 - 11

A: 通常培地で 2 日間培養したスサビノリ葉状体サンプルから抽出した全タンパク質。
 B: 窒素欠乏培地で 2 日間培養したスサビノリ葉状体サンプルから抽出した全タンパク質。ロードしたタンパク質量それぞれ 60 μ g。

2-3-8 HPLC による低中分子画分の分離

スサビノリ葉状体に栄養欠乏において特異的に蓄積する低中分子の化合物を探索するため、通常培地および栄養欠乏培地で培養したサンプルから抽出した低中分子画分を高速液体クロマトグラフィーで分離した（図 2-13）。窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプルでは検出波長 280 nm で Retention time(Rt) 32.5 min と Rt 35.0 min に強度の高いピークが見られた。これらのピークは通常培地、リン欠乏培地、鉄欠乏培地で 3 日間培養したサンプルでは検出されなかった。培養の期間を 6 日間、9 日間と延長すると、窒素欠乏培地で培養したサンプルではこれらのピークの強度の上昇が認められた。リン欠乏、鉄欠乏サンプルでは、これらのピークは 6 日間、9 日間の培養によっても観察されなかった。これらの窒素欠乏サンプルに特異的なピークをそれぞれ Peak1(Rt 32.5 min)、Peak2(Rt 35.0 min)とした。リン欠乏、鉄欠乏ではそれぞれのサンプルに特異的なピークは観察されなかった。

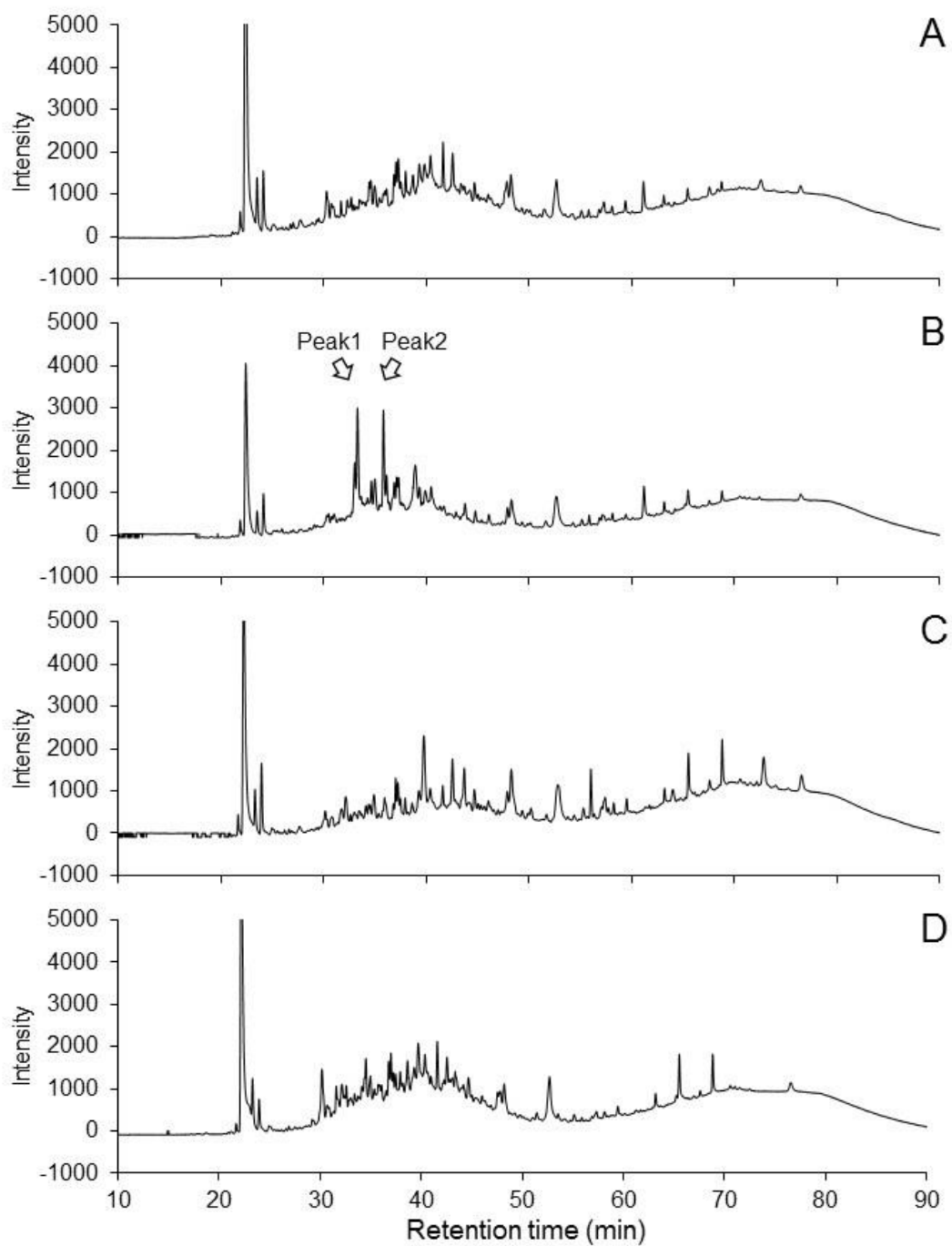


図 2-13-1 低中分子抽出画分の逆相高速液体クロマトグラフィー

葉状体の 1 M 酢酸抽出画分を逆相高速液体クロマトグラフィーで分離し、波長 280nm で検出した。A：通常培地で 3 日間培養したサンプル。B：窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。C：リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。D：鉄欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。

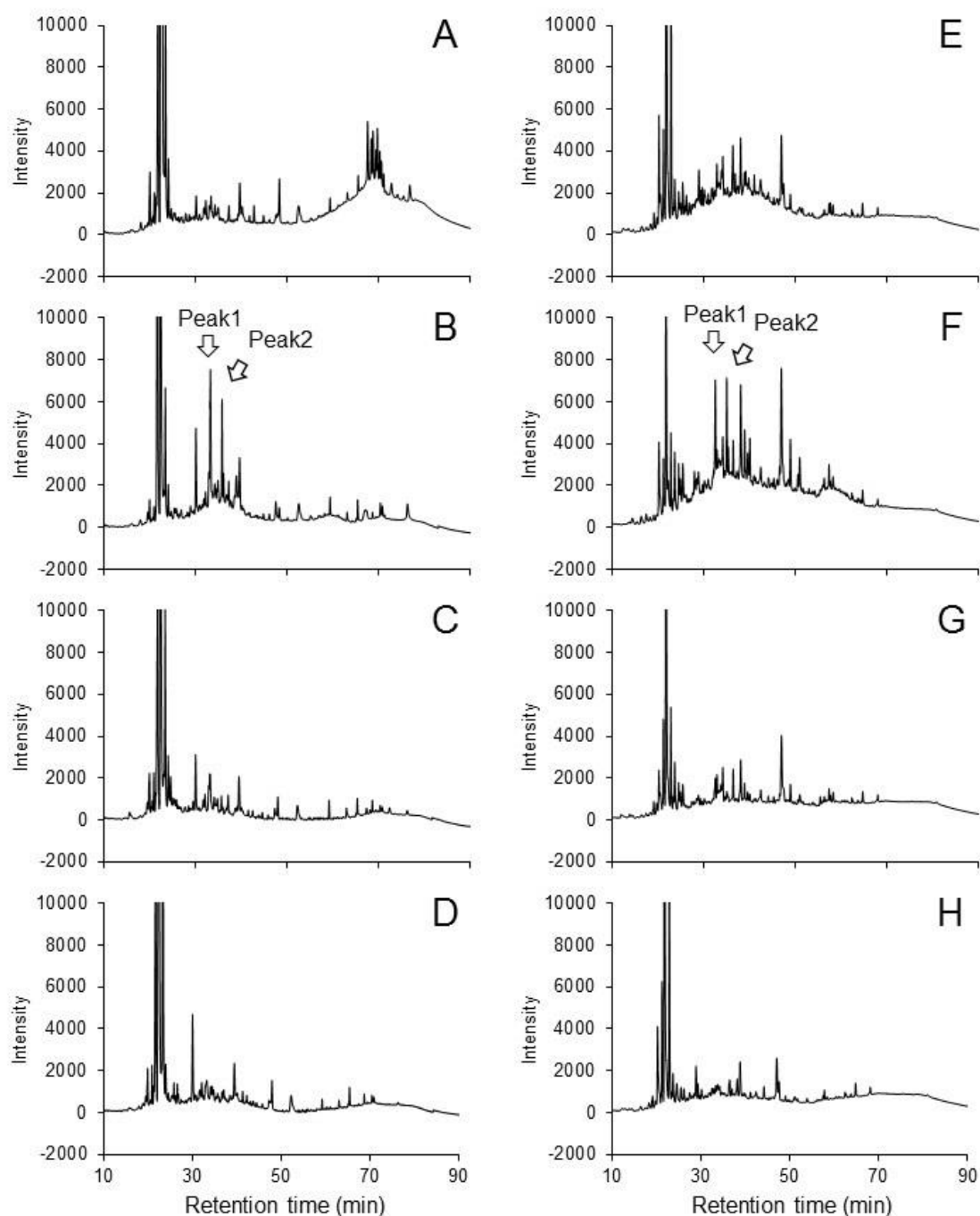


図 2-13-2 低中分子抽出画分の逆相高速液体クロマトグラフィー

葉状体の 1 M 酢酸抽出画分を逆相高速液体クロマトグラフィーで分離し、UV 280nm で検出した。A：通常培地で 6 日間培養したサンプル。B：窒素欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。C：リン欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。D：鉄欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。E：通常培地で 9 日間培養したサンプル。F：窒素欠乏培地で 9 日間培養したサンプル。G：リン欠乏培地で 9 日間培養したサンプル。H：鉄欠乏培地で 9 日間培養したサンプル。

2-3-9 大量抽出および Peak1・Peak2 の精製

2-3-8 で窒素欠乏サンプルに特異的に蓄積するピークを分離、精製するため、窒素欠乏培地で 6 日間培養したスサビノリ葉状体(~70 g)から低中分子画分を抽出し逆相高速液体クロマトグラフィーで分離を行った (図 2-14 A)。2-3-8 で、窒素欠乏サンプルで特異的に観察されたピークである Peak1 と Peak2 がこのサンプルでも確認された。これらのピークを分取し、溶媒系の異なる逆相高速液体クロマトグラフィーで再度分離を行った (図 2-14 B,C)。Peak1 は Rt 50.8 min に、Peak2 は Rt 45.3 min に強いピークが観察された。いくつかの小さなサブピークが検出されたが、ピーク強度の違いから、これらのピークが目的物由来のピークであると考えられた。それぞれピークを分取して、以降の実験に供した。

2-3-10 再分離した Peak1・Peak2 の吸光度測定

2-3-9 で再分離した Peak1、Peak2 を凍結乾燥後、超純水に溶解して吸光スペクトルを測定した (図 2-14 D,E)。Peak1、Peak2 とともに波長 265 nm を吸収極大波長とする吸光スペクトルが得られた。その他の波長には吸収極大がみられず、300 nm よりも長波長側にはほとんど吸収は存在しなかった。

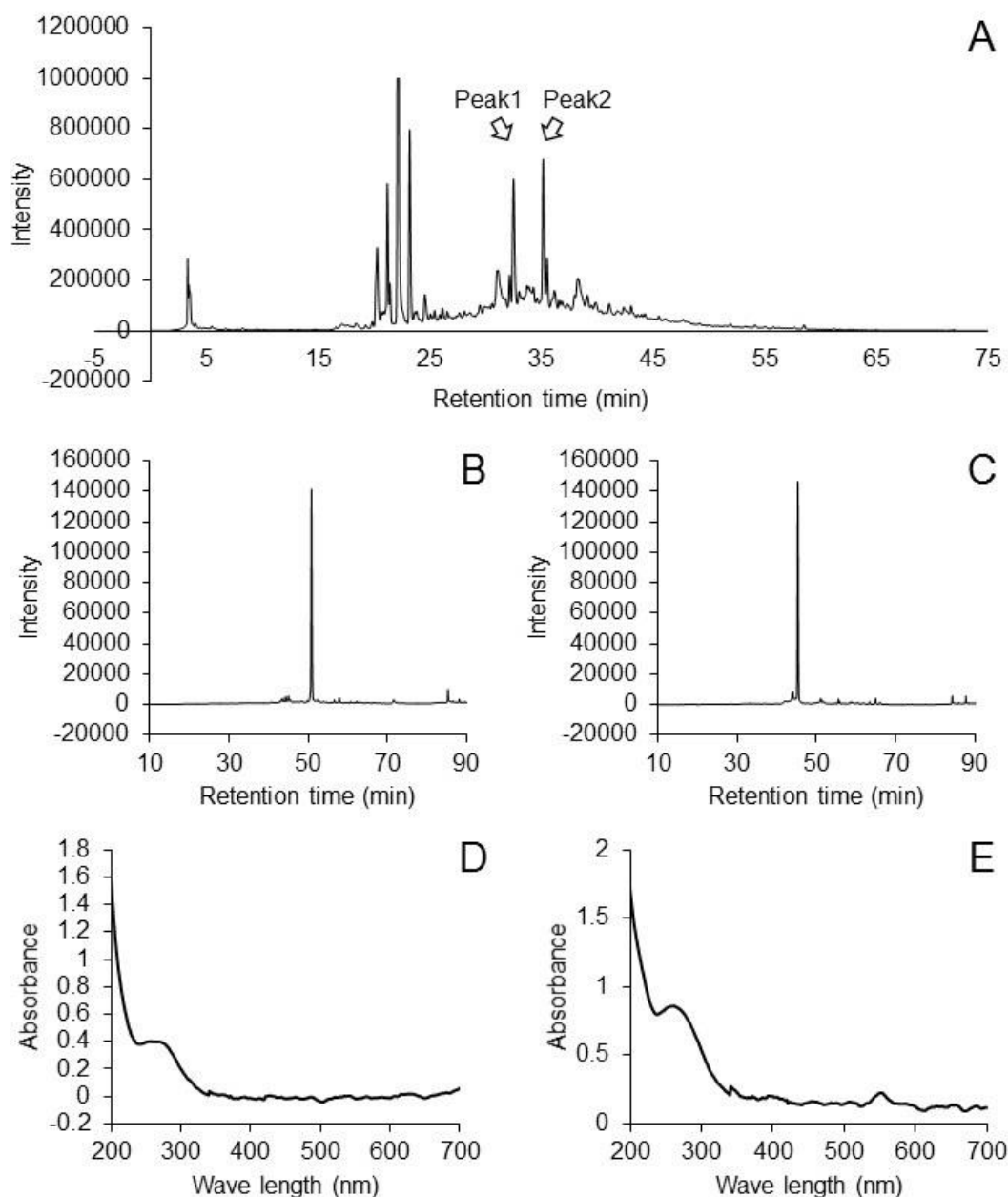


図 2-14 Peak1、Peak2 の分離・分取と吸光スペクトル

A : 窒素欠乏で 6 日間処理したサンプルの 1 M 酢酸抽出画分を逆相高速液体クロマトグラフィーで分離し、波長 280nm で検出した。Peak1、Peak2 を分取した。B : 分取した Peak1 を、ヘプタフルオロ酪酸を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで再分離し、ピークを分取した。C : 分取した Peak2 を、HFBA を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで再分離し、ピークを分取した。D : B で分取した Peak1 を超純水に溶解し波長 200 nm から 700 nm の吸光スペクトルを測定した。E : C で分取した Peak2 を超純水に溶解し波長 200 nm から 700 nm の吸光スペクトルを測定した。

2-3-11 Peak2 のペプチド濃度測定

Peak2 に含まれる物質がペプチドであるのかを判断するため、逆相高速液体クロマトグラフィーにより 2 回精製した Peak2 のペプチド濃度を BCA 法により測定し、波長 280 nm における吸光度との関係を求めた。波長 280 nm における吸光度が 1.0 のサンプルに対して、BCA 法で求めたペプチド濃度は 0.063 mg/ml であった。

2-3-12 Peak2 のゲルろ過クロマトグラフィー

2 回分離した Peak2 の精製度、および Peak2 の分子量を推定するため逆相高速液体クロマトグラフィーにより 2 回精製した Peak2 をゲルろ過クロマトグラフィーにより分離した（図 2-15）。標準物質を分離して作成した検量線から、もっとも強度の高いピーク (Rt 28.8 min) の分子量は 1,800 と推定された。

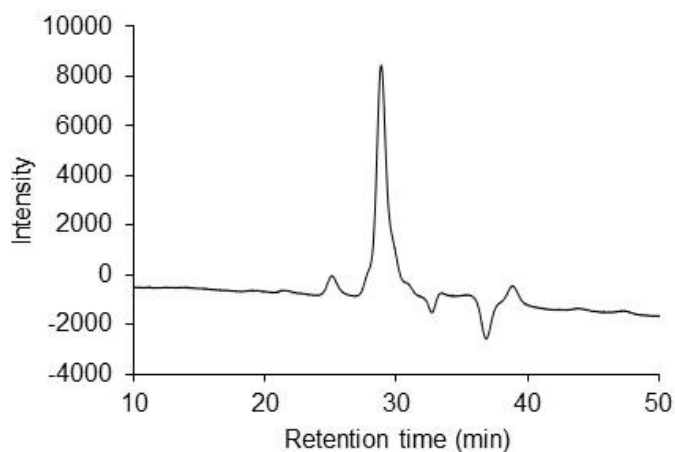


図 2-15 Peak2 のゲルろ過クロマトグラフィー

逆相高速液体クロマトグラフィーで 2 回精製した Peak2 を、ゲルろ過カラムを用いて高速液体クロマトグラフィーで分離した。波長 225 nm で検出した。

2-3-11 Peak2 の ^1H NMR

Peak2 の化学構造について知見を得るため、逆相高速クロマトグラフィーで 2 回分離した Peak2 の ^1H NMR を軽水中で測定した (図 2-16)。化学シフト 4.7 ppm 付近のピークは軽水のシグナルを消す WATERGATE の効果によって消えている。1-3 ppm 付近にはメチル基やメチレン基に由来すると考えられる多くのピークが観察されたが、ピークが重なり合っており、これらのピークが由来する構造について議論することは困難であった。また 5.31 ppm、5.75 ppm、6.29 ppm には炭素炭素二重結合に由来すると考えられるピークが観察された。7.0 ppm 以上の低磁場領域にも、7.79 ppm、7.85 ppm、8.49 ppm、8.82 ppm に主にアミド結合もしくは芳香環のプロトンに由来すると考えられるピークが、10.28 ppm にアルデヒドに由来すると考えられるピークが観察された。3.21 ppm のピークは逆相クロマトグラフィーの溶媒に用いたアセトニトリルに由来すると考えられた。

2-3-12 Peak2 の TOCSY NMR

Peak2 の化学構造について知見を得るため、Peak2 の TOCSY NMR を軽水中で測定した (図 2-17)。まず、 ^1H NMR の結果から二重結合由来と考えられた 5.31 ppm、5.75 ppm、6.29 ppm のピーク間でクロスピークがみられた。結合定数と相関から、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ の構造が推定された。また、相関が他のプロトンにつながっていないことから、この構造が付加している炭素にはプロトンが付いていないと判断した。

また、7.79 ppm と 7.85 ppm の 2 つのピークからは、低磁場側の複数のピークとの間にクロスピークがみられた。7.79 ppm のピークは 4.23 ppm、3.00 ppm、2.82 ppm のピークと相関しており、7.85 ppm のピークは 4.28 ppm、3.05 ppm、2.82 ppm のピークと相関していた。これらのピークのうち 7.79 ppm、7.85 ppm のピークがアミド($-\text{CONH}$)由来、4.23 ppm、4.28 ppm のピークが α 炭素についたプロトン由来であると考え、これら二つの相関ピークの系列はポリペプチド中のアミノ酸残基由来であると説明できる。残りの

ピークは側鎖中のプロトン由来であると考えられる。二つの系列に属するピークの化学シフトがわずかに異なることから、構造が同じだがポリペプチド中の位置が異なるなど、状態の異なる二種類のアミノ酸残基が分子中に存在すると考えられた。ポリペプチド中の一般的なアミノ酸の化学シフト調べた報告によると(Bundi A. and Wuthrich K., 1979)、これらの系列にはアスパラギン酸(8.41, 4.76, 2.84, 2.75 ppm)が良く該当した。ただし、高磁場側の拡大図をみると 3.0 ppm(3.05 ppm)、2.82 ppm のピークはさらに 2.48 ppm、1.19 ppm のピークとの間にクロスピークが存在するようにみえ、相関がさらにつながっている可能性がある。これらのピークを考慮にいと、該当するアミノ酸はタンパク質を構成するアミノ酸のなかには存在しない。このことから、これらのピークがアミノ酸残基に由来するものではない可能性も考えられた。

高磁場領域(1~3 ppm)のピークは相関によっていくつかのグループに分かれていた。1.7 ppm を中心に互いに強い相関を示しているピーク群は主に、メチル、メチレンなどに由来すると考えられる。また 2.0 から 3.0 ppm の間にも複数のピークが存在し、水酸基やカルボン酸、ケトンなど、酸素原子を含む官能基の存在が示唆された。

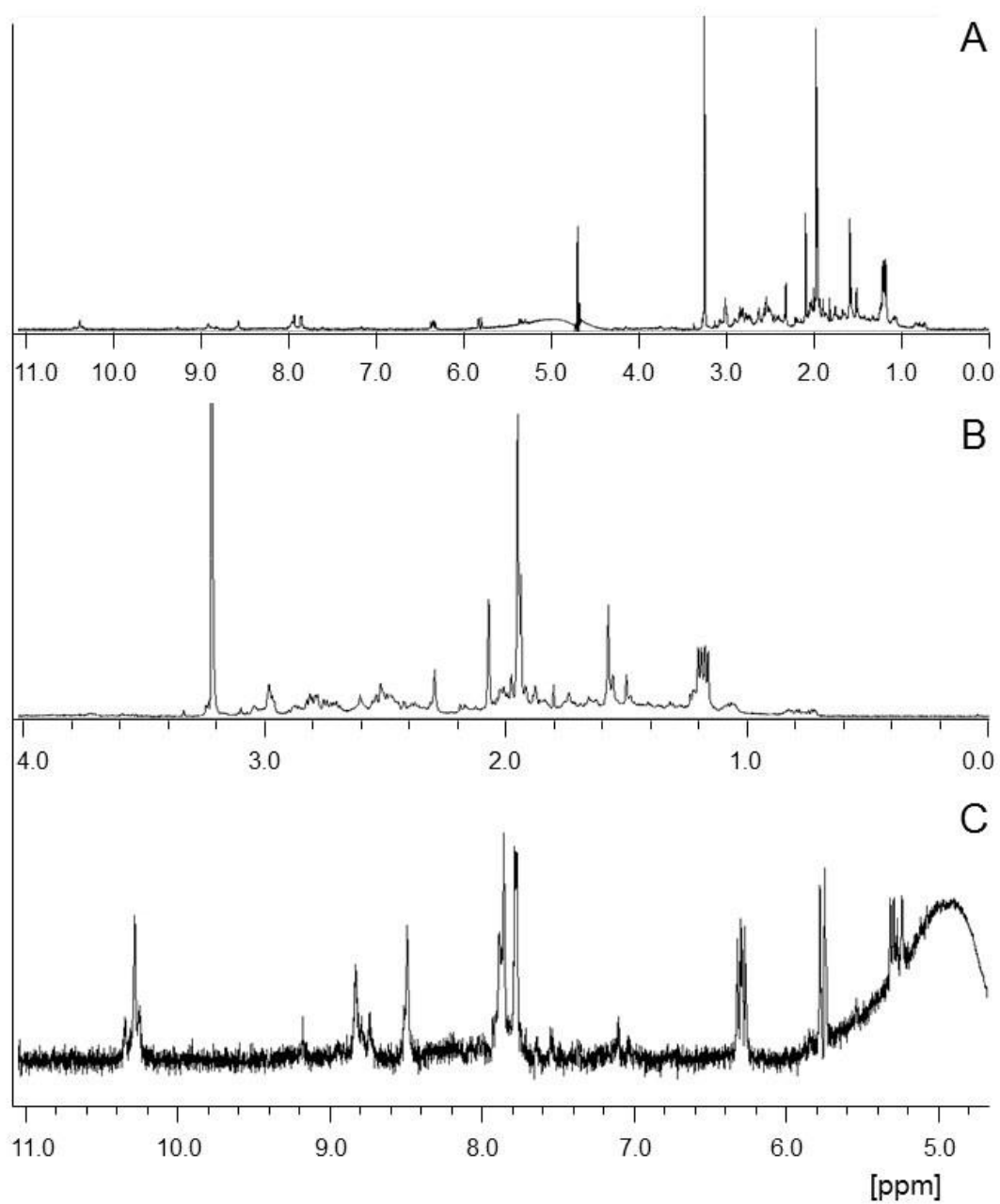


図 2-16 Peak2 の ^1H NMR

逆相高速液体クロマトグラフィーで分離した Peak2 の ^1H NMR を測定した。10%の重水を含む軽水中で測定した。緩衝液には 10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0 を用いた。A：全領域。B：高磁場領域の拡大図。C：低磁場領域の拡大図。

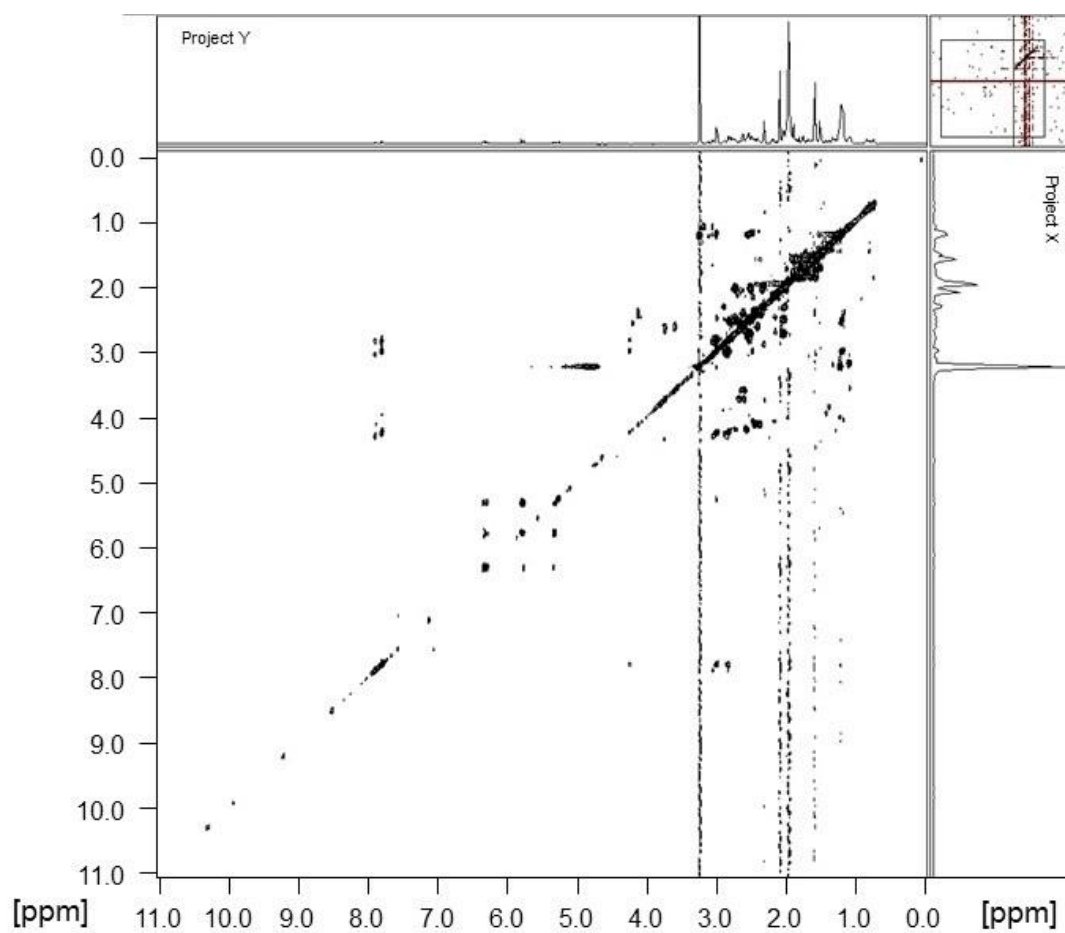


図 2-17-1 Peak2 の TOCSY NMR

逆相高速液体クロマトグラフィーで分離した Peak2 の TOCSY NMR を測定した。10%の重水を含む軽水中で測定した。緩衝液には 10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)を用いた。

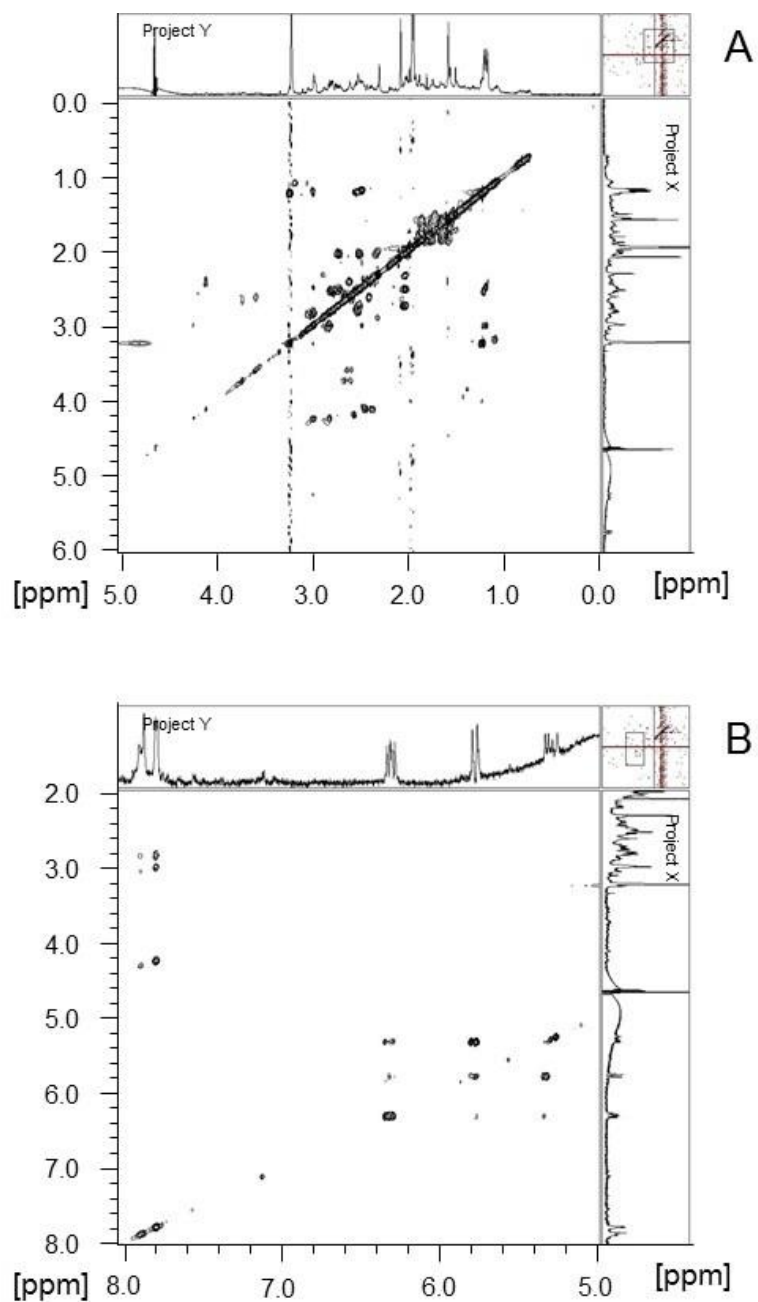


図 2-17-2 Peak2 の TOCSY NMR

逆相高速液体クロマトグラフィーで分離した Peak2 の TOCSY NMR を測定した。10% の重水を含む軽水中で測定した。緩衝液には 10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) を用いた。A：高磁場領域の拡大図。B 低磁場領域の拡大図。

2-4 考察

窒素、リン、鉄のいずれの欠乏においてもスサビノリ葉状体で光合成色素含量の減少が生じることが確かめられた。減少の度合いは窒素欠乏で最も速やかであった。窒素欠乏時には、光合成色素含量だけではなく、タンパク質含量も減少した。タンパク質量に対するクロロフィル量が上昇した一方で、タンパク質量に対するフィコエリスリン量は低下が見られた。このことは、窒素欠乏時にクロロフィルや他のタンパク質と比較してフィコビリタンパク質が優先的に分解されている、もしくは強く合成が抑制されていることを示している。

窒素とリンを同時に欠乏させた場合、窒素のみを欠乏させた場合と比較して、より褪色が早まるのではないかと考え、両者を同時に欠乏させる実験を行った。しかし、窒素とリンの同時欠乏では、窒素欠乏と比較して、目視で確認できるほどの差は見られなかった。さらに、窒素欠乏による褪色が回復可能なものであるかを検証するため、回復培養を行った。窒素欠乏により褪色したスサビノリは、欠乏と同程度の期間の回復培養（通常培地での培養）により、欠乏前の水準の色調に回復した。このことから、窒素欠乏による褪色は可逆的な現象であることが確認された。一方で、窒素とリンの同時欠乏によって褪色させたスサビノリを、リン欠乏培地（窒素源を含む）で培養すると、緩やかではあるが色調の回復が見られた。窒素の再添加によって、リン欠乏下でも色素の蓄積が生じるということは、リン欠乏下でも光合成色素の新規合成が行われていることが分かる。このことから、リン欠乏では光合成色素の積極的な分解が生じていないことが示唆された。リン欠乏では色素の生合成が抑制され、成長に伴う湿重量の増加によって光合成色素含量の低下が引き起こされているのだと考えられる。シアノバクテリア *Synechococcus* sp.においても同様のことが指摘されており (Collier and Grossman, 1994)、スサビノリにおいても窒素欠乏によるフィコビリソームの分解はリン欠乏や鉄欠乏とは異なり、積極的な分解の仕組みによって生じると考えられる。

窒素欠乏時のフィコビリソームの分解は窒素の転流を目的とした積極的な生理的応答であると考えられる。クロロフィルは光合成に必須であるが、フィコビ

リソームは光合成において補助的な集光アンテナの役割を果たしていることから、フィコビリタンパク質が一種の窒素貯蔵物質であり、窒素欠乏時に窒素供給源として機能しているのではないかということが主にシアノバクテリアにおいて議論されてきた(Yamanaka and Glazer, 1980)。一方で、一部のシアノバクテリアではリン欠乏でもフィコビリソームの分解が生じることが報告されている。リンはタンパク質の基本的な構成成分ではなく、リン欠乏時にフィコビリンを分解することでリンを転流することはできない。すると、シアノバクテリアにおけるフィコビリンの分解には元素の転流以外の目的が存在することが考えられる。一方、スサビノリにおいてはリン欠乏ではフィコビリンの分解が生じていないと考えられることから、スサビノリとシアノバクテリアのフィコビリンの分解は異なる生理的応答であることが示唆された。

鉄欠乏は光合成色素含量に与える変化が窒素欠乏に比べて緩やかであったが、これは鉄が光合成色素の主要な構成成分ではないということに加えて、スサビノリが生体内に鉄を貯蔵しているためと考えられる。多くの動植物と同様、スサビノリも鉄の貯蔵タンパク質であるフェリチンを持つことが、ゲノム情報から推測される。初期の鉄欠乏では貯蔵された鉄を放出して利用することができ、すぐに鉄が不足することはない。光合成色素含量の低下は、リンと同様に、生合成の抑制によって生じていると考えられる。

超遠心による無傷フィコビリソームの分離において、窒素欠乏サンプルでは他のサンプルと比較してフィコビリソームのバンドが僅かに上方に位置する傾向がみられたが、明確な差はみられなかった。シアノバクテリアでは窒素欠乏時に分解によってフィコビリソームのサイズが小さくなり、フィコビリソームのバンドが上方に移動することが知られている(近藤ら、2009)。一方、スサビノリにおいて電子顕微鏡によって窒素欠乏時のフィコビリソームのサイズ変化を観察した報告では、フィコビリソームの明確なサイズ変化は確認できていない(植木ら、2010)。このことからスサビノリでは窒素欠乏でフィコビリソームのサイズはほとんど変化しないと考えられた。また電気泳動の結果から、フィコビリソームに含まれるタンパク質の構成も栄養欠乏によってほとんど変化してい

ないことが明らかになった。

二次元電気泳動では、窒素欠乏によってスサビノリのタンパク質の分布が、ほとんど変化していないことが明らかになった。窒素欠乏ではタンパク質の分解が生じるため、タンパク質の構成にも大きな変化があるのではないかと考えた。しかし、予測とは異なり窒素欠乏がタンパク質の構成に大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。スサビノリ葉状体は多くの細胞外多糖を含むため、一般的な方法で調製した試料では分離の良い電気泳動が困難であったが、今回示したプロトコルによって調製した試料では電気泳動の分離は良く、再現性は高かった。この試料調製法は今後のスサビノリにおけるプロテオーム解析に役立つのではないかと考えられた。

低中分子画分の逆相高速液体クロマトグラフィーによる分析から、波長 280 nm に吸収をもつ二つのピークが窒素欠乏サンプルで特異的に観察された。これらのピークはリン、鉄欠乏サンプルではみられなかったことから、窒素欠乏特異的な生理的応答に関与している可能性が考えられた。特に、窒素欠乏時にはフィコビリンの分解が生じることから、分解に関わる化合物や、フィコビリンの分解産物の可能性が期待された。このうち Peak2 を分取して分析したところ、ゲル濾過カラムによる分離から、分子量は約 1,800 であると推定された。この推定は誤差が大きい、分子量は 1,000 から 10,000 の間にある可能性が高いと考えられる。また、質量分析により、分子量の特定を試みたが、MALDI TOF-MS では再現性のある結果は得られず、分子量の特定は困難であった。スペクトル測定では Peak1、Peak2 とともに波長 265 nm に極大吸収が存在した。このことから、Peak1、Peak2 は互いに類似した構造をもつ化合物ではないかと推察した。そのため、主にピーク強度が強い Peak2 の構造決定を試みた。Peak2 の構造について知見を得るため、 ^1H NMR と TOCSY NMR の測定を行った。265 nm 付近に極大吸収をもつ生体分子の代表的なものに DNA や RNA などの核酸が挙げられる。しかし、 ^1H NMR の結果から核酸である可能性は排除された。TOCSY NMR は相関のあるスピン系列全てにクロスピークが出ることから、分子内部分構造の推定に適している。TOCSY NMR の結果から、アミノ酸様の部分構造をもつ

こと、炭素炭素二重結合(-CH=CH_2)をもつことが推定された。分子サイズおよび BCA アッセイの結果からペプチドの可能性を考慮に入れていたが、純粋なペプチドと考えるとアミノ酸系列の種類が少ないことから、純粋なペプチドではなく一部にペプチドもしくは類似の構造をもつ化合物であると考えられた。また、炭素炭素二重結合(-CH=CH_2)の存在が特徴的であるが、この構造をもつ化合物としてクロロフィルやフィコエリスロビリן (図 2-2) が挙げられる。このことから、この物質がフィコエリスリンの分解産物である可能性が考えられた。

第 3 章

遺伝子発現解析

第3章 遺伝子発現解析

3-1 序

3-1-1 スサビノリのゲノムについて

単細胞性の紅藻である *Cyanidiochyzon merolae* で真核藻類として初めてゲノムの解読がなされて以来(Matsuzaki *et al.*, 2004)、多くの単細胞性の藻類でゲノム配列が決定されてきた。一方で、多細胞性の藻類でゲノム配列が明らかになっているものは少ない。前述したとおり、海洋性の大型の藻類であるスサビノリは、その生活環の詳細がすでに解明されており、実験室での培養が比較的容易であるなど実験材料として多くの利点がある。これらのことから海のモデル植物としての利用が提唱されており、ゲノムプロジェクトが進められてきた(嵯峨、2008)。現在、プラスチドゲノムの配列が解読・公開され(Wang *et al.*, 2013)、核ゲノムのドラフト配列が公開されている(Nakamura *et al.*, 2013)。スサビノリのゲノムサイズは約 43 Mbp であり、従来考えられていたよりも、ゲノムサイズが小さいことが明らかになった。ゲノム上には 10,327 個の遺伝子が存在し、そのうちの約 60%がイントロンを含まないと予測されること、配列の相同性から機能が予測できない遺伝子が全体の約 35%存在することなど、いくつかのゲノム構造上の特徴が示された。

これまでスサビノリ以外に、紅藻類に属するいくつかの生物種についてゲノム解読が完了している。それらを以下に示した。

- ・ *C. merolae* (Matsuzaki *et al.*, 2004) 単細胞 プラスチド・核ゲノム
- ・ *Galdieria sulphuraria* (Barbier *et al.*, 2005) 単細胞 プラスチド・核ゲノム
- ・ *Porphyridium purpureum* (Bhattacharya *et al.*, 2012) 単細胞 プラスチドゲノム
- ・ *Gracilaria chilensis* 多細胞 トランスクリプトーム解析
- ・ *Chondrus crispus* (Collen *et al.*, 2013) 多細胞 プラスチド・核ゲノム

このうちで、*C. merolae* と *G. sulphuraria* は高温酸性の環境に生育する温泉藻である。特に *C. merolae* は細胞壁を持たない、主要な細胞小器官を一つずつしかもたないなど、単純な構成の細胞に特徴があり、ゲノムサイズも真核生物と

して最小クラスである(Matsuzaki *et al.*, 2004)。これらのことから、モデル生物として研究に用いられているが、紅藻類の大きな特徴であるフィコビリソームを欠損していることから、フィコビリソームに関する研究に用いることができない。*C. crispus* は、多細胞性の紅藻である点でスサビノリと共通点がある。両者の遺伝情報には多くの相同性が確認されたが、ゲノムの構造に関しては多くの相違があることが報告されている(Collen *et al.*, 2013)。ゲノム配列情報が使用できるようになったことで、これらの生物種と遺伝情報を比較する研究も可能になり、スサビノリの分子生物学的な手法を用いた実験は以前よりも格段に容易になった。

3-1-2 本章の目的

ゲノム情報が明らかになったことで、遺伝子発現からスサビノリの栄養状態を調べることが可能になった。遺伝子発現を指標として栄養状態を調べる手法は現在幅広く用いられているが、この手法の利点はその生物が感じている栄養状態を直接知ることができる点にある。これまで養殖ノリにおける色落ちの原因を探る研究は主に、環境中の栄養塩濃度と色落ちの相関を調べる手法によって行われてきた。しかし、海洋には流れがあり、海水中の栄養塩濃度は長時間一定に保たれているわけではない。また、実際の分析においては膨大な量の海水のうち、ごく一部を分析せざるを得ないことなどから、実際に生物が利用可能な海水中の栄養塩量を正確に推定することは難しい。さらに、その測定により得られた濃度が、スサビノリにとって栄養要求性を満たすものであるかを判断することが難しいという欠点があった。そこで、養殖ノリの遺伝子発現を調べることで、実際に養殖ノリが感じている栄養状態を直接的に分析することで、栄養欠乏と色落ちの関係について新たな知見を得ることができるのではないかと考えた。しかし、スサビノリのゲノム配列決定が終了したのは2013年のことであり、スサビノリの遺伝子発現に関する研究は少ない。そのため、栄養状態の指標となる遺伝子の知見に乏しい。そこで、本章ではスサビノリの栄養欠乏の指標となる遺伝子を特定するべく実験を行った。他の生物種での先行研究から、スサビノリに

においても窒素、リン、鉄の取り込みや同化に関わっていると予測された遺伝子をスサビノリのゲノムデータベース上から検索した。それらの候補遺伝子について、栄養欠乏時の発現量を定量PCRの手法を用いて調べた。候補遺伝子のうち、栄養欠乏時に特異的に発現が変動する遺伝子を、スサビノリにおける栄養欠乏の指標遺伝子として特定することを目指した。これらの実験により得られた知見は養殖ノリにおける応用のためだけではなく、スサビノリ对环境に対する生理的応答についての基礎的なデータとしても有用なものであると考えられる。

3-2 実験材料と方法

3-2-1 栄養欠乏培地での培養

通常培地で培養し、葉長約 3 cm まで生育したスサビノリ葉状体の一部個体を採取した。残りを 4 つの群に分け、それぞれ、通常培地・窒素欠乏培地・リン欠乏培地・鉄欠乏培地に移して、培養を行った。3 日間培養した後、全個体を採取した。採取したノリは人工海水で洗い、キムタオルの間に 2 回挟んで水気を切った。その後、重さを量り、チャックつきのビニール袋に入れた。速やかに液体窒素で急速冷凍を行い、 -80°C で保存した。

3-2-2 異なる窒素態の培地での培養

通常培地で培養し、葉長約 3 cm まで生育したスサビノリ葉状体の一部個体を採取した。残りを 2 つの群に分け、それぞれ、通常培地およびアンモニア培地に移して 3 日間培養を行った。3-2-1 と同様にサンプリングを行った。

3-2-3 窒素・リン同時欠乏培地での培養

通常培地で培養し、葉長約 3 cm まで生育したノリ葉状体の一部個体を採取した。残りを 2 つの群に分け、それぞれ、窒素欠乏培地および窒素・リン欠乏培地に移して 3 日間培養を行った。3-2-1 と同様にサンプリングを行った。

3-2-4 候補遺伝子の選定

スサビノリのゲノムデータベース上から、スサビノリの栄養状態に応じて発現が変動する遺伝子の候補遺伝子を探索した。スサビノリのゲノムデータベースは中央水産研究所の web ページ (<http://nrifs.fra.affrc.go.jp>) からダウンロードした。他の生物種で窒素欠乏、リン欠乏または鉄欠乏で、発現が変動することが知られている遺伝子の翻訳後のアミノ酸配列を National Center for Biotechnology Information の web ページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得した。それらの配列をクエリとして、スサビノリの予測タンパク質データベース (Pyezoensis_Augustus_proteins_v1) に対してアミノ酸配列の相同性検

索 Protein BLAST (balstp)を行った。

3-2-5 窒素関連遺伝子の発現解析

相同性検索により選定した窒素の栄養状態に応じて発現が変動することが知られている遺伝子のオーソログについて、3-2-1 で培養したサンプルに対して、発現解析を行った（表 3-1）。*PyNRT* (Kaminuma *et al.*, 2008)、*PyNAR* (Nakamura and Ikawa, 1993)、*PyNIR* (*Chlamydomonas reinhardtii* の亜硝酸還元酵素のオーソログ) (Fernandez and Galvan, 2007)、*PyAMT1-4* (*Arabidopsis thaliana* AtAMT1 のオーソログ) (Yuan *et al.*, 2007)、*PyGS* (*Cyanidioschyzon merolae* のグルタミン合成酵素のオーソログ) (Imamura *et al.*, 2009)の 8 遺伝子について発現を調べた。このうち *PyNRT*、*PyNAR* に関してはすでにスサビノリの硝酸トランスポーターおよび硝酸還元酵素として報告されている。

表 3-1 発現を解析した窒素関連遺伝子

Name	ID ^{*1}	Predicted Function
18S rRNA ^{*2}	gi:557883180	18S ribosomal RNA
<i>PyNRT</i>	g3774	Nitrate transporter
<i>PyNAR</i>	g3705	Nitrate reductase
<i>PyNIR</i>	g159	Nitrite reductase
<i>PyAMT1</i>	g3953	Ammonia transporter
<i>PyAMT2</i>	g3631	Ammonia transporter
<i>PyAMT3</i>	g8709	Ammonia transporter
<i>PyAMT4</i>	g3790	Ammonia transporter
<i>PyGS</i>	g1222	Glutamine synthetase

^{*1}18S rRNA は NCBI の Gene ID に、それ以外はゲノムデータベース中の遺伝子番号に相当する。^{*2} 定量 PCR の内標準として用いた。

3-2-6 窒素の化学形態の異なる培地での窒素関連遺伝子の発現解析

3-2-2 で培養したサンプルにおいて、3-2-5 で発現を解析した窒素関連遺伝子（表 3-1）の発現を解析した。

3-2-7 リン関連遺伝子の発現解析

相同性検索により選定したリンの栄養状態に応じて発現が変動することが知られている遺伝子のオーソログについて、3-2-1 で培養したサンプルに対して、発現解析を行った（表 3-2）。*PyPIT1-3* (*Tetraselmis chuii* の無機リン酸トランスポーター遺伝子のオーソログ) (Chung *et al.*, 2003)、*PyAPH* (*Neurospora crassa* のアルカリフォスファターゼ遺伝子のオーソログ) (Han *et al.*, 1987) の 4 遺伝子について発現を調べた。

表 3-2 発現を解析したリン関連遺伝子

Name	ID ^{*1}	Predicted Function
18S rRNA ^{*2}	gi:557883180	18S ribosomal RNA
<i>PyPIT1</i>	g7306	Inorganic phosphate transporter
<i>PyPIT2</i>	g7285	Inorganic phosphate transporter
<i>PyPIT3</i>	g5500	Inorganic phosphate transporter
<i>PyAPH</i>	g5529	Alkaline phosphatase

^{*1}18S rRNA は NCBI の Gene ID に、それ以外はゲノムデータベース中の遺伝子番号に相当する。^{*2} 定量 PCR の内標準として用いた。

3-2-8 鉄関連遺伝子の発現解析

相同性検索により選定した鉄の栄養状態に応じて発現が変動することが知られている遺伝子のオーソログについて、3-2-1 で培養したサンプルに対して、発現解析を行った（表 3-3）。*PyIRT* (*Chlamydomonas reinhardtii IRT* (Allen *et al.*, 2007) のオーソログ)、*PyFTR1,2* (*C. reinhardtii FTR* (Allen *et al.*, 2007) のオーソログ)、*PyFEA* (*C. reinhardtii FEA* (Allen *et al.*, 2007) のオーソログ)、

PyFOX1,2 (*C. reinhardtii FOX* (Allen *et al.*, 2007)のオーソログ)、*PyFRE1,2* (*C. reinhardtii FRE* (Allen *et al.*, 2007)のオーソログ) の 8 遺伝子について発現を調べた。

表 3-3 発現を解析した鉄関連遺伝子

Name	ID ^{*1}	Predicted Function
18S rRNA ^{*2}	gi:557883180	18S ribosomal RNA
<i>PyIRT</i>	g8450	Ferrous iron transporter
<i>PyFTR1</i>	g3322	High affinity ferric iron transporter
<i>PyFTR2</i>	g3321	High affinity ferric iron transporter
<i>PyFEA</i>	g7341	Iron assimilating protein
<i>PyFOX1</i>	g1116	Multi copper ferroxidase
<i>PyFOX2</i>	g7089	Multi copper ferroxidase
<i>PyFRE1</i>	g4565	Ferric reductase
<i>PyFRE2</i>	g3561	Ferric reductase

^{*1}18S rRNA は NCBI の Gene ID に、それ以外はゲノムデータベース中の遺伝子番号に相当する。^{*2} 定量 PCR の内標準として用いた。

3-2-9 窒素とリン同時欠乏時の窒素およびリン関連遺伝子の発現解析

3-2-3 で培養したサンプルについて、3-2-5、3-2-7 で発現を解析した窒素およびリン関連遺伝子のうち、以下の遺伝子の発現を解析した。*PyNRT*、*PyNAR*、*PyAMT1*、*PyPIT3*、*PyAPH* の 5 遺伝子について発現を調べた。定量 PCR の内標準として 18S ribosomal RNA(gi:557883180)を用いた。

3-2-10 光合成色素タンパク質の遺伝子発現解析

クロロフィル結合タンパク質、フィコビリタンパク質の遺伝子について、3-2-1 で培養したサンプルに対して、発現解析を行った (表 3-5)。*PyCpeA* (フィコエリスリン α サブユニット)、*PyCpcB* (フィコシアニン β サブユニット)、*PyApcA*

(アロフィコシアニン α サブユニット)、*PyPsaA* (光化学系 I 中心タンパク質 A1)、*PyPsbA* (光化学系 II 中心タンパク質 D1) (Wang *et al.*, 2013)の 5 遺伝子について発現を調べた。

表 3-4 発現を解析した葉緑体遺伝子

Name	ID ^{*1}	Predicted Function
18S rRNA ^{*2}	gi:557883180	18S ribosomal RNA
<i>PyCpeB</i>	gi 90994558	Phycoerythrin beta subunit
<i>PyCpcB</i>	gi 90994568	Phycocyanin beta subunit
<i>PyApcA</i>	gi 90994453	Allophycocyanin alpha subunit
<i>PyPsaA</i>	gi 90994474	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
<i>PyPsbA</i>	gi 90994403	Photosystem II protein D1

^{*1}18S rRNA は NCBI の Gene ID に、それ以外はゲノムデータベース中の遺伝子番号に相当する。^{*2} 定量 PCR の内標準として用いた。

3-2-11 RNA 抽出と逆転写

試料からの total RNA の抽出には RNeasy plant mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)を用いた。凍結したノリサンプルを乳鉢と乳棒を用い、液体窒素中で細かな粉末状になるまで破砕した。試料粉末約 50 mg をあらかじめ液体窒素中で冷却した 1.5 ml 遠心チューブに移した。これに付属の buffer RLC 450 μ l を加えて、速やかにボルテックスを行い、完全に懸濁した。懸濁液を製品付属のシュレッダーカラムに移し、20,000 *g* で 5 分間遠心し、上清を回収した。このあとの操作は、製品付属のマニュアルに従った。スピンカラムに RNase free water 30 μ l を加え RNA を溶出させた。得られた RNA 溶液を、超純水を用いて 30 倍に希釈し、マイクロセルを用いて分光光度計で 300 nm から 200 nm の吸光度を測定した。

得られた total RNA 溶液を鋳型として、cDNA 合成を行った。Prime Script

RT reagent kit (Perfect real time) (Takara, Kusatsu, Japan)を用い、操作は付属の製品マニュアルに従った。反応液は以下の通りに調製した。

RT enzyme mix : 0.5 μ l

RT buffer : 2 μ l

Random hexamer : 0.5 μ l

Poly-dT primer : 0.5 μ l

Total RNA : 500 ng

超純水で 10 μ l に調製

得られた cDNA 溶液は分注し、-30°C で保存した。

3-2-12 定量 PCR

Real time PCR の試薬は SYBR premix ExTaq II (Takara)を用いた。反応はそれぞれ 10 μ l の系で行った。上記の cDNA 溶液を超純水で 36 倍に希釈し、テンプレート溶液とした。反応液は以下の通りに調製した。

SYBR Premix ExTaq II : 5 μ l

Forward primer (100 μ M) : 0.5 μ l

Reverse primer (100 μ M) : 0.5 μ l

テンプレート : 1 μ l

超純水 : 3 μ l

合計 : 10 μ l

反応液を 20 μ l の LightCycler Capillary (Roche Diagnostics, Basel, Switherland)に入れ、LightCycler real time PCR detection system (Roche)を用いて反応を行った。発現量を標準化するための内標準には 18S rRNA を用いた。核ゲノム遺伝子の real-time PCR のサイクル設定は以下の通りである。

初期変性 : 90°C、30 秒

以下を 50 サイクル

変性 : 95°C、5 秒

アニーリング・伸長：64°C、30 秒

葉緑体遺伝子の real-time PCR のサイクル設定は以下の通りである。

初期変性：95°C、30 秒

以下を 50 サイクル

変性：95°C、5 秒

アニーリング：57°C、30 秒

伸長：57°C、30 秒

C_T 値は Fit point 法を用いて算出した。得られた C_T 値から $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法を用いて (Livak K. J. and Schmittgen T. D., 2001) (Bustin S. A. *et al.*, 2005)、相対的な発現量を算出した。

3-2-13 プライマーの設計

Real-time PCR に使用したプライマーの設計は web 上のソフトウェアである Primer3Plus を用いて行った(<http://primer3plus.com/>)。核ゲノム遺伝子のプライマー設計には以下の設定を用いた。

T_m 値：60-65°C、

長さ：18-22 塩基、

GC%：45-60%、

プロダクトサイズ：80-150 塩基

葉緑体遺伝子のプライマー設計には以下の設定を用いた。

T_m 値：55-65°C、

長さ：18-24 塩基、

GC%：45-60%、

プロダクトサイズ：80-150 塩基

その他のパラメーターについては、初期設定の値を使用した。実験に用いたプライマーの配列は以下の表 3-1 に示した。

表 3-5 real- time PCR 用プライマーの配列

Gene	Forward	Reverse
<i>PyNRT</i>	CCACCATCAAGGAAGAGAACA	AAGCGTCGTCTGCGTAATG
<i>PyNAR</i>	CCGCTATTACTGCTGGTGCT	GGTGTTGTTGCCCTCGTC
<i>PyNIR</i>	ATTGACCCGCACGAGATG	GAGAGCCAGACACGCAAATG
<i>PyAMT1</i>	CCTGGTTGGTGTCTCCGTA	GCTTCTCCTCCGTCGTGATA
<i>PyAMT2</i>	GGAGACCATTGACGCTGATG	AAGACCAGGATGCCACAGAG
<i>PyAMT3</i>	ATTCGTGCTATGGGCTGGT	CCAAGAGGGTGTTGATGAGG
<i>PyAMT4</i>	AGGAGATGGACGGGCTTGAC	TCGCTGAGGAGATTGCGTAG
<i>PyGS</i>	TCCTCACCAACCTCAAGACG	GCCCACGCCGCAATAGTA
<i>PyPIT1</i>	TTTGCTTCGTTTGTGCTGTC	GAGTGGATGGCTGTGGAGAG
<i>PyPIT2</i>	CGGGTGGAGAAGTTTGACC	AAATGGACCGATGCTGTTTG
<i>PyPIT3</i>	GTTGCCCTCATCTCTTGGTG	CGGGTTCTTCATCATCTCCA
<i>PyAPH</i>	ATTGCTCACCATCACACACG	CCATCGTCATCTCGTCCAG
<i>PyIRT</i>	GCTTGCCACATTGCTGCTG	CCCGTTGCGTAGTAGATAGGC
<i>PyFTR1</i>	TCCACCAGGAACAGCCACT	GCCCCTCATCCCCTAAAG
<i>PyFTR2</i>	ATTGTTGTGGGCGTGAGC	CGATGAGCAGGATTGAGGAG
<i>PyFEA</i>	CACGACGATTGCTGGCTAC	AGTTGGACTTGGCGTTCTCG
<i>PyFOX1</i>	GTTTGGGTTGCTTCTCATCG	CACGCTCTCGTTCTCATCCA
<i>PyFOX2</i>	ATGATGGCGGTTGTGAACG	CGGCAAGGTAGTGGGTGTAG
<i>PyFRE1</i>	AGTGGGCGGTTGATGATG	TACGAGACGGTGACGCTACG
<i>PyFRE2</i>	TGCTTGACTACGACGAGGTG	TCTTGGACATTGGGTGTGG
<i>PyCpeA</i>	ATTCATCGCAGGTGGTAAC	CAGAAACAGCATCAGAAACG
<i>PyCpcB</i>	CTCAAGCAGACGCAAGAGG	TAAGCAAGCAGCCATACG
<i>PyApcA</i>	TCGTGAGCGTATTGTAAAGCA	CATCGCCAGCAACTATTCC
<i>PyPsaA</i>	TTAGGCTGTTTAGGCTGGAC	ATTTCTTGCGGAGACACG
<i>PyPsbA</i>	TGTTGATAGCCAAGGTCGTG	GAGGGAAGTTGTGAGCGTTAC

配列は 5'→3'の向きで記載

3-2-14 増幅効率の確認

各プライマーの real-time PCR における増幅効率を検量線から算出した。上記の cDNA 溶液を超純水で 1 倍、6 倍、36 倍、216 倍、1296 倍に段階希釈した希釈系列を作製した。各プライマーセットに対して、cDNA 希釈系列 1 μ l をテンプレートとして含む PCR 反応液を 3-2-5 と同様に作製した。3-2-5 と同様の条件で PCR を行い、C_T 値を求めた。得られた C_T 値から検量線を作製し、DNA の量が 1 サイクルで 2 倍になるときを 100% とした増幅効率を算出した。

3-2-15 増幅配列の確認

表 3-1 に示したプライマーセットそれぞれについて、Real-time PCR と同様の反応液を Thermal cycler DICE (Takara) で増幅を行った。テンプレートには、増幅対象の遺伝子の発現量が最も高かったサンプルの cDNA 溶液を用いた。反応液の調製および PCR のサイクル設定は 3-2-5 と同様の条件を用いた。PCR 反応により得られた DNA 溶液を 100 倍に希釈したものをテンプレートとして用い、再度 PCR を行った。2% アガロースゲルで電気泳動を行い、PCR 産物の長さを確認した。サブバンドが見られた PCR 産物については目的の DNA 断片をゲルから回収した。それ以外の PCR 産物はエタノール沈殿を行い、精製した。得られた DNA 断片は TA cloning kit (Invitrogen, Waltham, MA) を用い、製品付属のマニュアルに従いサブクローニングを行った。大腸菌株 XL1-blue に形質転換を行った。形質転換した大腸菌からプラスミドを回収し、配列解析を外注した。

3-2-16 *NblA* と相同性のある遺伝子の発現解析

シアノバクテリアの *NblA* 遺伝子と高い相同性をもつ、スサビノリの葉緑体遺伝子 Ycf18(gi|90994557) とゲノム遺伝子 g3612 について窒素欠乏時の発現を調べた。Ycf18 に対しては以下のプライマーセットを用いた。定量 PCR の内標準として 18S ribosomal RNA (gi:557883180) を用いた。

Fwd: TCTTG AACAA GAGTT CGAAT TAGTC

Rev: GCATC GTTTT CAATG TTTCTG

g3612 に対しては以下のプライマーセットを用いた。

Fwd: CAGAC TATGT CCGAG CAGCA

Rev: CGTTAAGCAT CGACT TGAGGA

サンプルには 3-3-1 で培養したサンプルを用いた。

3-3 結果

3-3-1 定量 PCR プライマーの増幅効率の確認

実験に用いた各プライマーセットの増幅効率を表 3-6 に示した。増幅効率は、1 サイクルで DNA 量が 2 倍に増えるときの増幅効率を 100%と定義し、それに対する割合で示した。増幅効率は 92%から 107%の間の数値をとった。

表 3-6 プライマーの増幅効率

Name	% efficiency	Name	% efficiency
<i>PyNRT</i>	92	<i>PyFTR1</i>	107
<i>PyNAR</i>	95	<i>PyFTR2</i>	97
<i>PyNIR</i>	99	<i>PyFEA</i>	94
<i>PyAMT1</i>	96	<i>PyFOX1</i>	97
<i>PyAMT2</i>	100	<i>PyFOX2</i>	101
<i>PyAMT3</i>	102	<i>PyFRE1</i>	99
<i>PyAMT4</i>	106	<i>PyFRE2</i>	103
<i>PyGS</i>	99	<i>PyCpeA</i>	96
<i>PyPIT1</i>	106	<i>PyCpcB</i>	96
<i>PyPIT2</i>	98	<i>PyApcA</i>	94
<i>PyPIT3</i>	95	<i>PyPsaA</i>	94
<i>PyAPH</i>	97	<i>PyPsbA</i>	92
<i>PyIRT</i>	101		

3-3-2 定量 PCR の増幅配列の確認

表 3-1 のプライマーセットで増幅した DNA 断片について、*PyFTR1* を除いて、増幅された DNA 断片が標的遺伝子の配列であることを確認した。*PyFTR1* に関しては増幅した DNA 断片の配列が解析できず、*PyFTR1* の配列に由来するものであることが確認できなかった。

3-3-3 栄養欠乏条件での窒素関連遺伝子の発現解析

各栄養欠乏条件で培養したスサビノリ葉状体の窒素関連遺伝子の発現量を図 3-1 に示した。*PyNRT*、*PyNAR*、*PyAMT1* について、窒素欠乏培地で培養したサンプルでは他の条件で培養したサンプルに比べて有意に発現の増大が見られた。*PyNIR*、*PyAMT2* の発現はサンプル間でほとんど変化が見られなかった。*PyAMT3*、*PyAMT4*、*PyGS* の発現量は通常培地で 3 日培養したサンプルの発現量と有意な差は見られなかった。

3-3-4 窒素の化学形態の異なる培地における窒素関連遺伝子の発現解析

通常培地（硝酸態窒素を含む）及びアンモニア培地で培養したスサビノリ葉状体の窒素関連遺伝子の発現量を図 3-2 に示した。*PyNRT*、*PyAMT2*、*PyAMT3*、*PyAMT4* の各遺伝子の発現量は、二つのサンプル間で変化はなかった。*PyNAR*、*PyNIR*、*PyAMT1* の発現量は硝酸培地で生育したサンプルに比べ、アンモニア培地で培養したサンプルにおいて有意に発現の抑制が見られた。*PyGS* の発現量はアンモニア培地で培養したサンプルで高い傾向が見られた。

3-3-5 栄養欠乏条件でのリン関連遺伝子の発現解析

各栄養欠乏条件で培養したスサビノリ葉状体のリン関連遺伝子の発現量を図 3-3 に示した。リン欠乏培地で培養したサンプルにおける *PyPIT1*、*PyPIT2* の発現量は、他のサンプルに比べて低い傾向を示した。*PyPIT3* の発現量はリン欠乏培地で培養したサンプルで、他のサンプルと比較して有意に高かった。*PyAPH* の発現量はリン欠乏培地で培養したサンプルで高い傾向が見られ、危険率 5% で有意差は見られなかったが、7% では他のサンプルの発現量と有意差があるという結果になった。

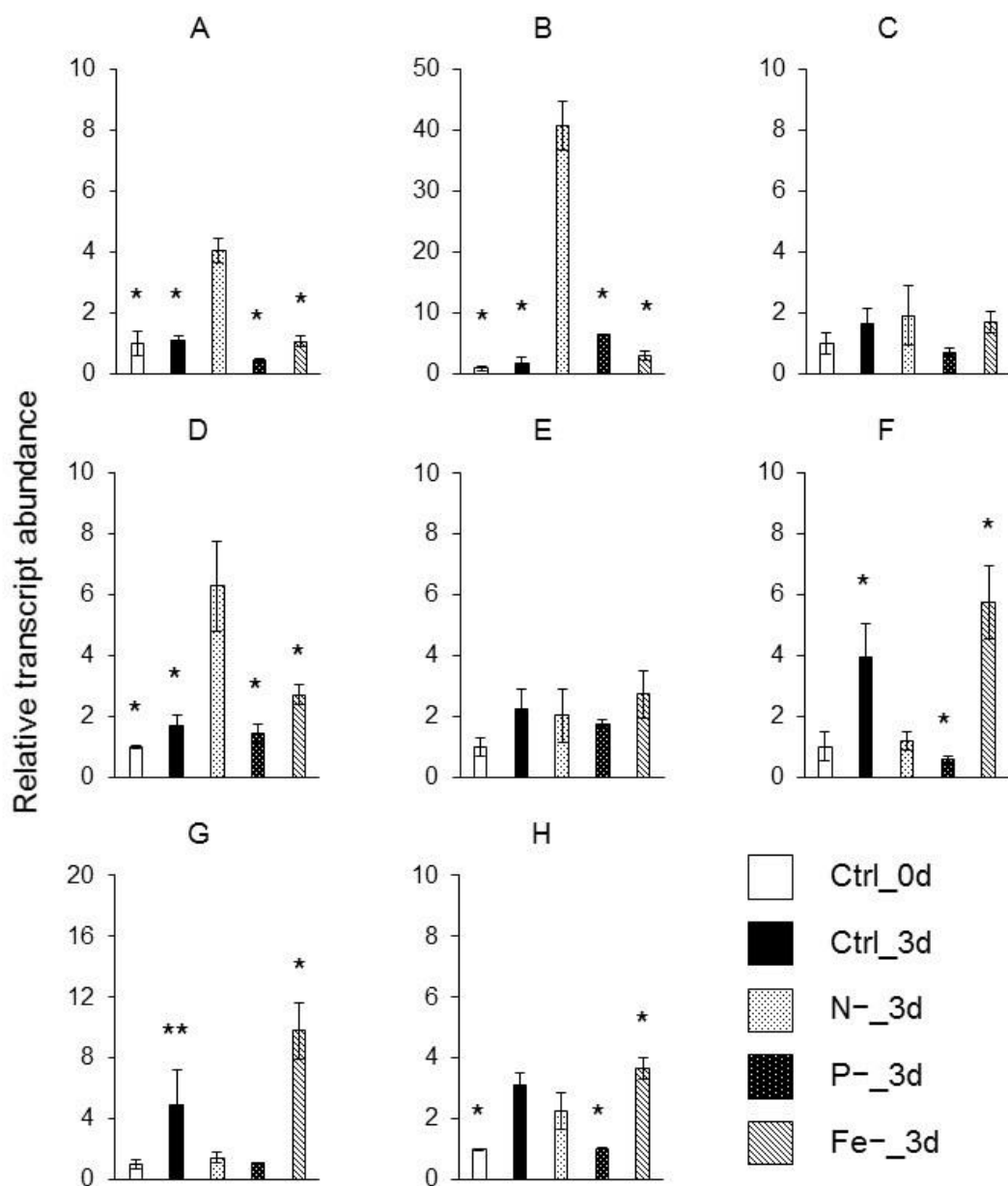


図 3-1 栄養欠乏条件での窒素関連遺伝子の発現量

Ctrl_0d : 通常培地で前培養後回収したサンプル。Ctrl_3d : 通常培地で 3 日間培養したサンプル。N_3d : 窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。P_3d : リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。Fe_3d : 鉄欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。

A : *PyNRT*, B : *PyNAR*, C : *PyNIR*, D : *PyAMT1*, E : *PyAMT2*, F : *PyAMT3*, G : *AMT4*, H : *PyGS*

n = 3, mean \pm S.D.

有意差は N_3d に対して *p < 0.05 **p < 0.07

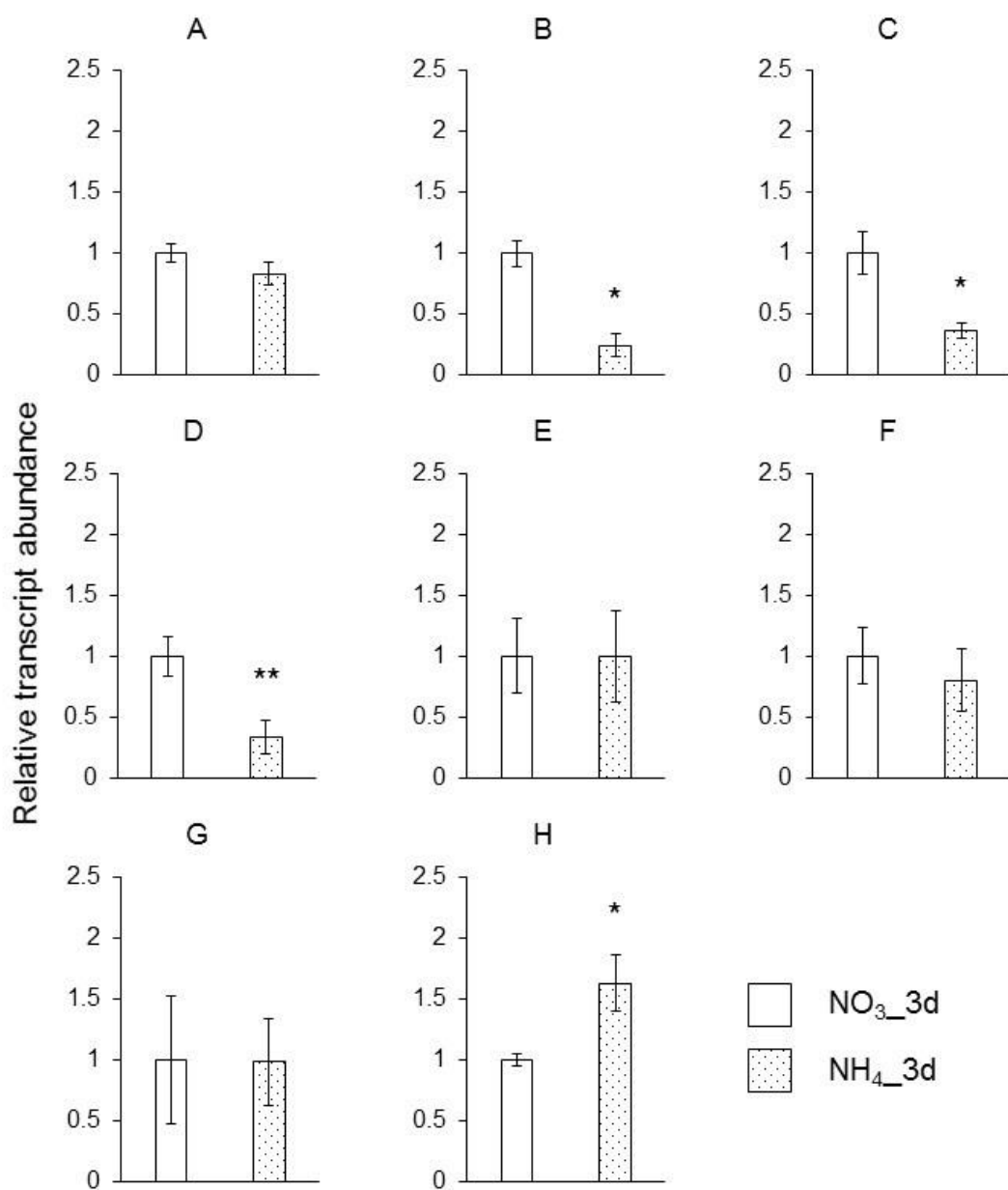


図 3-2 窒素の化学形態の異なる培地における窒素関連遺伝子の発現量

$\text{NO}_3\text{-3d}$: 通常培地で 3 日間培養したサンプル。 $\text{NH}_4\text{-3d}$: アンモニア培地で 3 日間培養したサンプル。

A: *PyNRT*, B: *PyNAR*, C: *PyNIR*, D: *PyAMT1*, E: *PyAMT2*, F: *PyAMT3*, G: *AMT4*, H: *PyGS*

n = 3, mean \pm S.D.

有意差は $\text{NO}_3\text{-3d}$ に対して * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

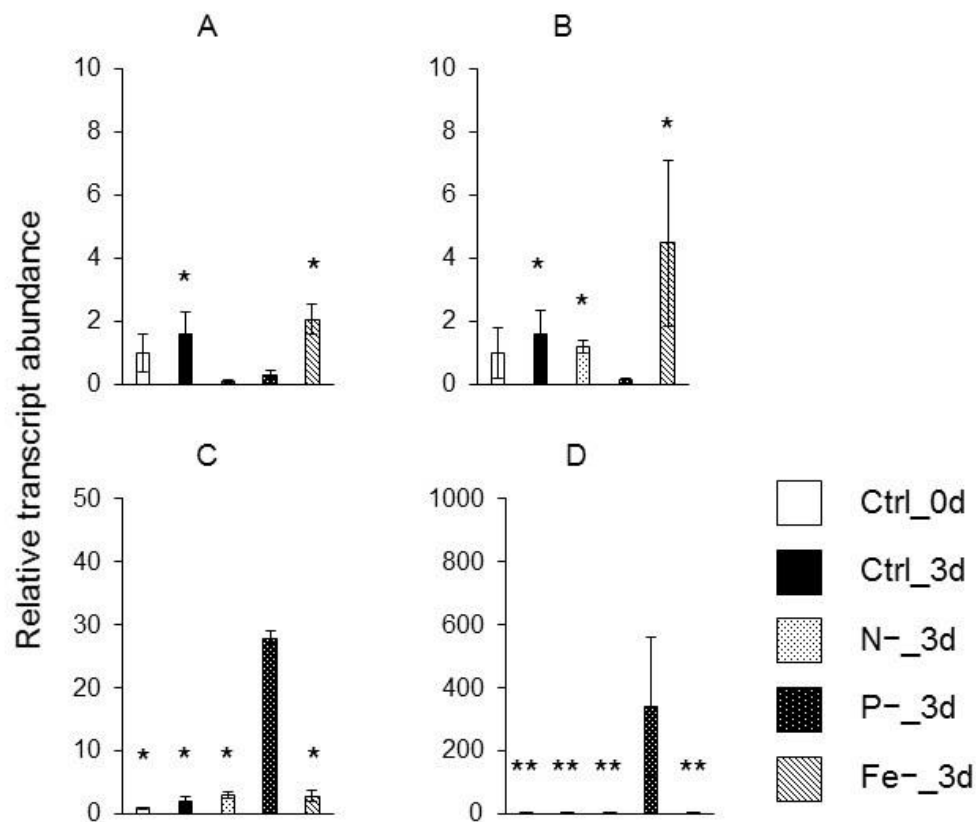


図 3-3 栄養欠乏条件でのリン関連遺伝子の発現量

Ctrl_0d : 通常培地で前培養後回収したサンプル。Ctrl_3d : 通常培地で 3 日間培養したサンプル。N_3d : 窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。P_3d : リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。Fe_3d : 鉄欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。

A : *PyPIT1*, B : *PyPIT2*, C : *PyPIT3*, D : *PyAPH*

n = 3, mean \pm S.D.

有意差は P_3d に対して *p < 0.05 **p < 0.07

3-3-6 鉄関連遺伝子の発現解析

各栄養欠乏条件で培養したスサビノリ葉状体の鉄関連遺伝子の発現量を図 3-4 に示した。*PyIRT* の発現量は通常培地、鉄欠乏培地で培養したサンプルの間で発現量に差がみられなかった。*PyFTR2*、*PyFEA* の発現量は鉄欠乏培地で培養したサンプルで特異的に高く、それぞれ通常培地で培養したサンプルの約 500 倍、約 220 倍の発現量を示した。鉄欠乏培地で培養したサンプルにおける *PyFTR1* の発現量は非常にばらつきが大きく、他のサンプルとの有意な差は得られなかった。増幅した配列が確認できなかったことを考え合わせると、定量 PCR における増幅の特異性に問題があると推察された。*PyFOX2* の発現量は、鉄欠乏培地で培養したサンプルにおいて他のサンプルと比較して有意に高い値を示した。*PyFRE1* の発現量はサンプル間でほとんど変化が見られなかった。*PyFRE2* の発現量は鉄欠乏培地で培養したサンプルにおいて高い傾向を示したが、値のばらつきが大きく有意な差はなかった。

3-3-7 窒素とリン同時欠乏条件における窒素、リン関連遺伝子の発現解析

窒素欠乏培地および窒素・リン欠乏培地で培養したスサビノリ葉状体の窒素、リン指標遺伝子の発現量を図 3-5 に示した。*PyNRT* の発現量は窒素・リン欠乏培地で培養したサンプルで有意に高かった。*PyNAR*、*PyAMT1* は二つのサンプル間で同程度の発現量を示し、有意な差はみられなかった。一方、*PyPIT3* の発現量は窒素・リン欠乏培地で培養したサンプルで有意に高く、*PyAPH* の発現量は窒素・リン欠乏培地で培養したサンプルで有意に低かったが、その発現量の差は PCR における 1 サイクル以内と小さかった。

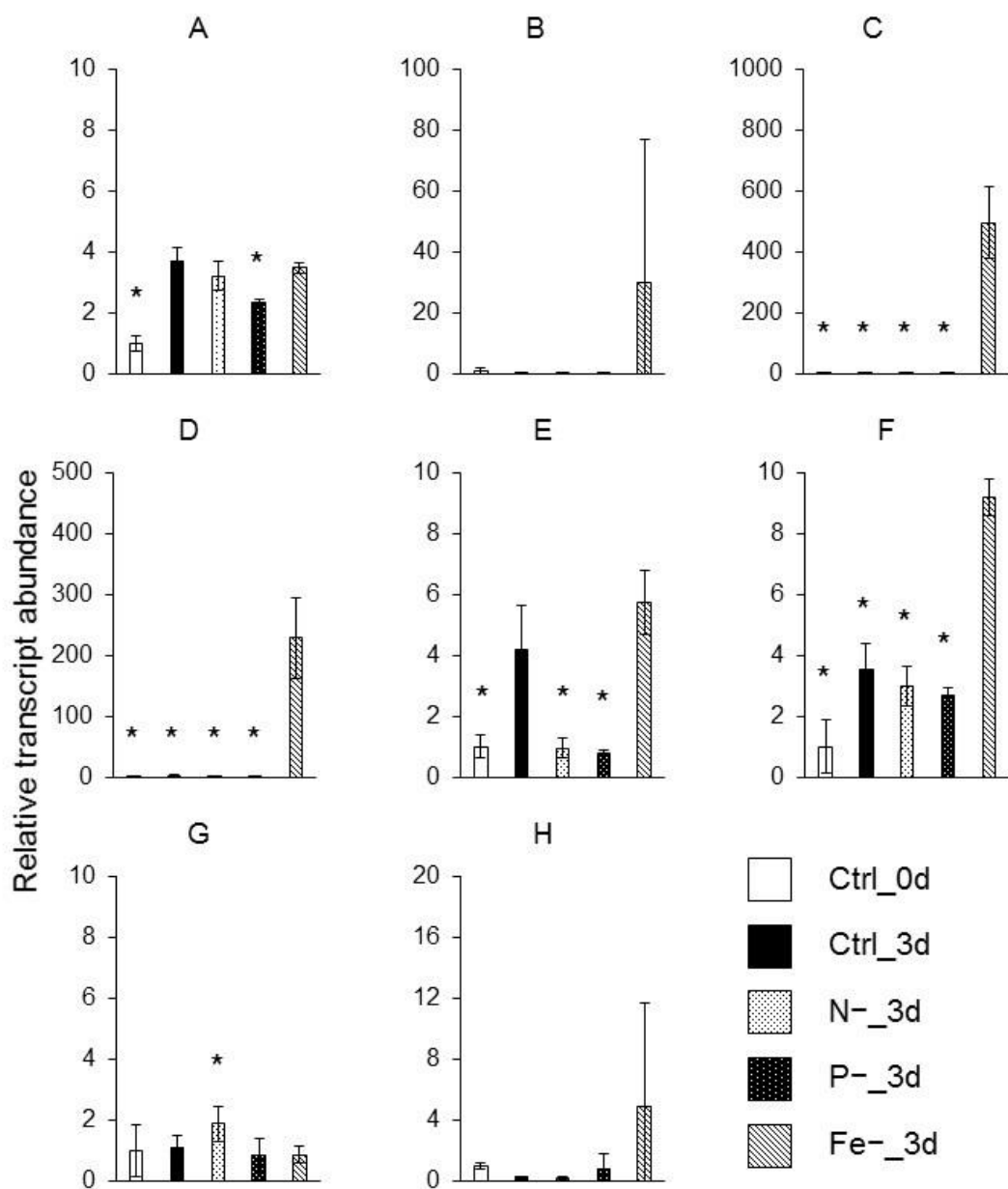


図 3-4 栄養欠乏条件での鉄関連遺伝子の発現量

Ctrl_0d : 通常培地で培養したサンプル。Ctrl_3d : 通常培地でさらに 3 日間培養したサンプル。N-_3d : 窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。P-_3d : リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。Fe-_3d : 鉄欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。

A : *PyIRT*, B : *PyFTR1*, C : *PyFTR2*, D : *PyFEA*, E : *PyFOX1*, F : *PyFOX2*, G : *PyFRE1*, H : *PyFRE2*

n = 3, mean \pm S.D.

有意差は Fe-_3d に対して *p < 0.05

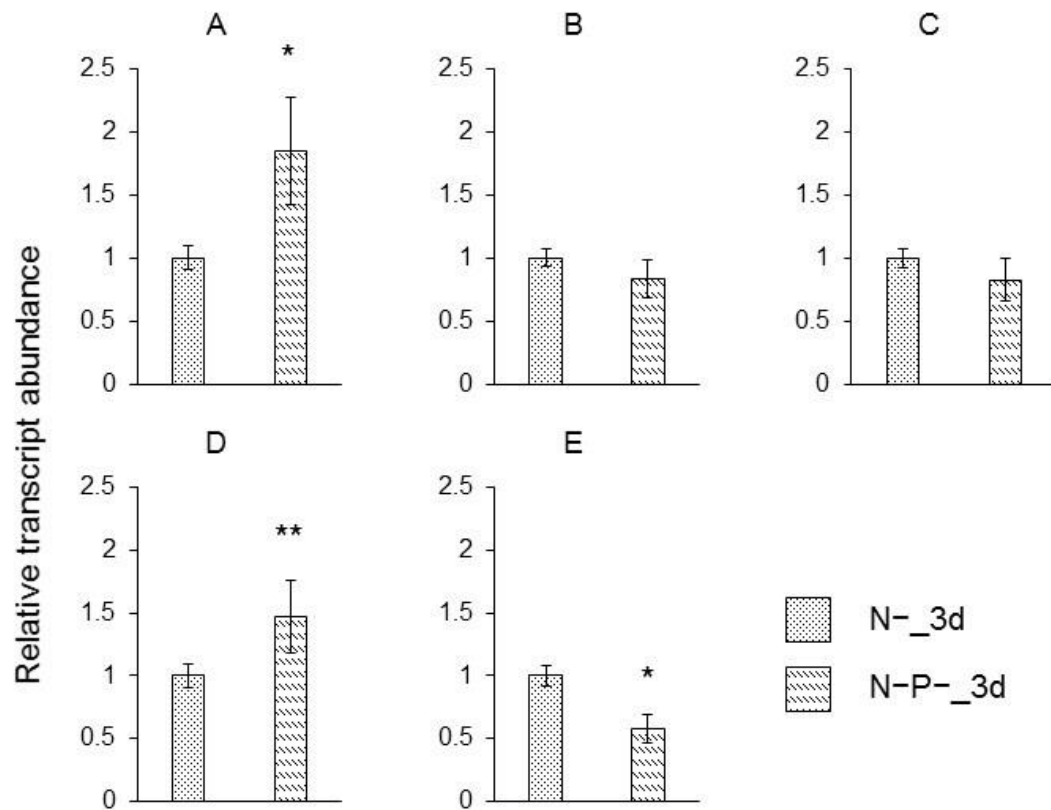


図 3-5 窒素とリン同時欠乏条件での窒素、リン関連遺伝子の発現量

N_3d : 窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。N-P-3d : 窒素・リンともに欠乏した培地で 3 日間培養したサンプル。

A : *PyNRT*, B : *PyNAR*, C : *PyAMT1*, D : *PyPIT3*, E : *PyAPH*

n = 3, mean \pm S.D.

有意差は*p < 0.05 **p < 0.07

3-3-8 光合成色素遺伝子の発現解析

各栄養欠乏条件で培養したスサビノリ葉状体の光合成色素遺伝子の発現量を図 3-6 に示した。窒素、リン欠乏培地培養したサンプルでは、*PyCpeB*、*PyCpcB* の発現量が、通常培地で培養したサンプルと比較して有意に低かった。この二つの遺伝子の発現量は、窒素欠乏サンプルにおいて、リン欠乏よりも低い傾向を示した。また *PyApcA*、*PyPsaA* の発現量も窒素、リン欠乏サンプルにおいて有意に低い値を示した。一方、*PyPsbA* の発現量には各サンプル間で有意な差はみられなかった。鉄欠乏培地で培養したサンプルでは、全ての光合成色素遺伝子について、通常培地で培養したサンプルにおける発現量と有意な差は見られなかった。

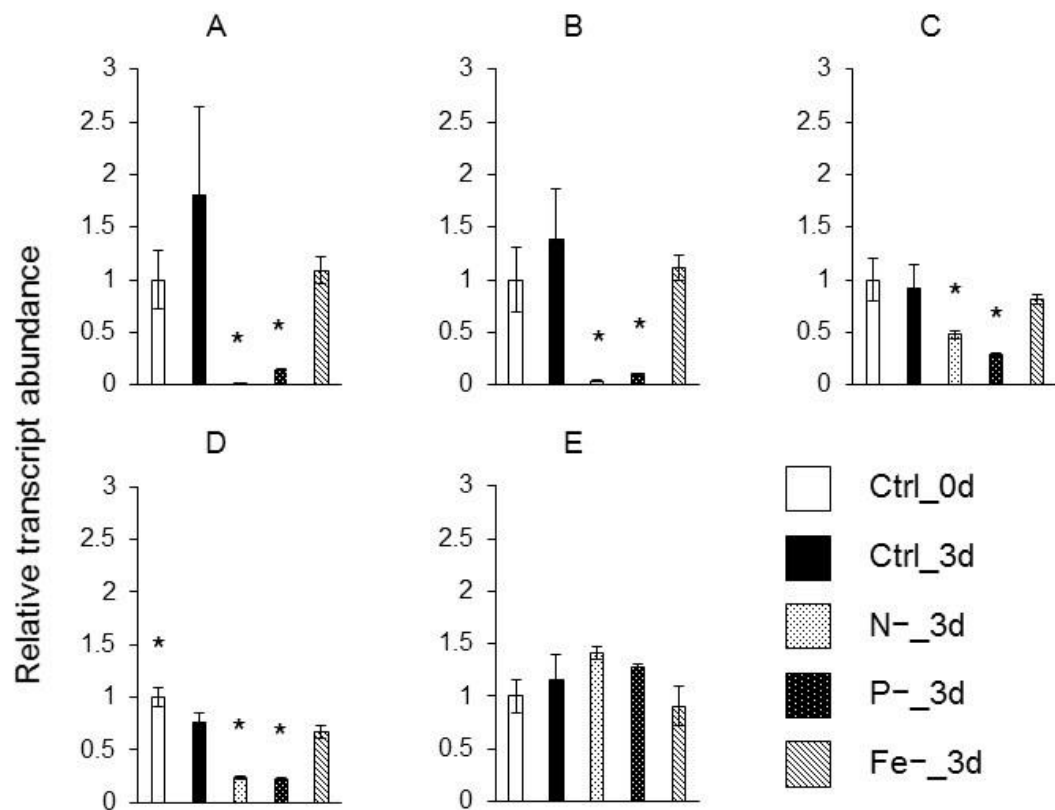


図 3-6 光合成色素遺伝子の発現量

Ctrl_0d: 通常培地で前培養後回収したサンプル。Ctrl_3d: 通常培地で 3 日間培養したサンプル。N_3d: 窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。P_3d: リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。Fe_3d: 鉄欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。

A: *PyCpeB*, B: *PyCpcB*, C: *PyApcA*, D: *PyPsaA*, E: *PyPsbA*

n = 3, mean \pm S.D.

有意差は Ctrl_3d に対して *p < 0.05 **p < 0.07

3-3-9 *NblA* と相同性のある遺伝子の発現解析

窒素欠乏条件で培養したスサビノリ葉状体における、*NblA* と相同性の高い遺伝子 *g3612* の発現量を図 3-7 に示した。*g3612* の発現量は通常培地で培養したサンプルと比較して窒素欠乏培地で培養したサンプルにおいて有意に低かった。*Ycf18* の発現量は定量 PCR において、35 サイクル以内に増幅が認められず、定量できなかった。

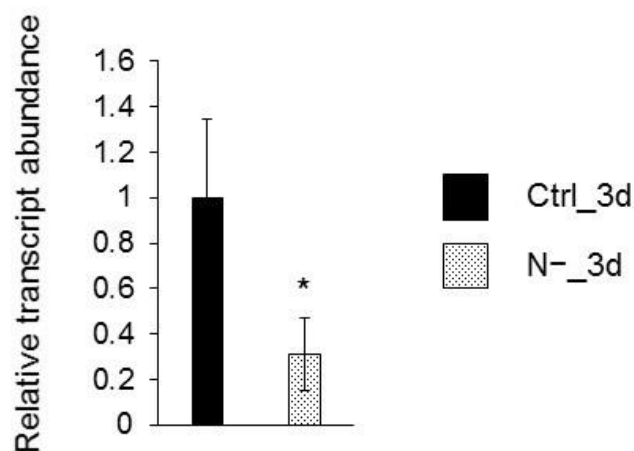


図 3-7 窒素欠乏条件での *g3612* の発現量

Ctrl_3d：通常培地で 3 日間培養したサンプル。N-_3d：窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。

n = 3, *p < 0.05

3-4 考察

高等植物において、窒素の取り込みと同化は以下のように進行すると考えられている(図 3-8)。硝酸トランスポーター(NRT)により細胞内に取り込まれた硝酸イオンは硝酸還元酵素(NAR)により亜硝酸イオンに還元され、その後、亜硝酸還元酵素(NIR)によってアンモニアに還元される。還元によって生成したアンモニウムイオンと、アンモニアトランスポーター(AMT)によって細胞に取り込まれたアンモニウムイオンは両方とも、グルタミン合成酵素(GS)によりグルタミン酸に付加され、グルタミンとして同化される(Crawford, 1995)。今回発現を解析した窒素関連遺伝子のうち *PyNRT*、*PyNAR*、*PyAMT1* の各遺伝子が窒素欠乏に対して誘導的な発現を示し、なおかつリン、鉄欠乏では誘導されなかった。これらの遺伝子は同じ紅藻に属する *C. merolae* でも同様に、窒素欠乏誘導性の発現応答を示すことが報告されている(Imamura *et al.*, 2009)。シロイヌナズナにおいて、硝酸トランスポーター遺伝子は *NRT1*、*NRT2* の二つのファミリーが知られている(Crawford and Glass, 1998)(Orthel, 2002)。*PyNRT* は、高親和性の硝酸トランスポーターだと考えられる *AtNRT2* と高い相同性をもつ遺伝子で、スサビノリのゲノムデータベース中には *NRT1* ファミリーに属すると考えられる遺伝子は確認できなかった。しかし、シロイヌナズナにおいては *AtNRT2.1* の発現は硝酸誘導性であり(Krouk *et al.*, 2006)、スサビノリの *PyNRT* とは応答性が異なる。これらのことから、スサビノリでは硝酸の取り込みについて、高等植物とは異なる、より単純な仕組みを保持していることが示唆された。

培地中の硝酸態窒素をアンモニア態窒素で代替した際の窒素関連遺伝子の発現解析の結果から以下のことが考えられた。*PyNAR*、*PyAMT1* の発現量は、アンモニア培地では硝酸培地と比較して、少し減少しており、*PyNRT* の発現量にはほとんど変化は見られなかった。この発現パターンは、スサビノリは培地中のアンモニアによって、生体の窒素要求量が満たされている時は、硝酸の取り込みを積極的に行わないことを示している。これらのことからスサビノリは硝酸・アンモニアどちらかだけを窒素源として生育することが可能であり、硝酸とアン

モニアの取り込み系は連動して制御されていると考えられた。高等植物では *NRT2*、*AMT1.1* の発現が生体内のグルタミンによって負の制御を受けるというモデルが提唱されており (Glass *et al*, 2002)、同様の制御系がスサビノリにも存在している可能性が高い。アンモニア培地中では *PyGS* の発現量の上昇がみられたが、これは、直接アンモニアを取り込むことによって、細胞内のアンモニア濃度が高まったためと考えられる。アンモニアは生体にとっては有害であり、高濃度では生育に悪影響を与えることが知られている。そのため、無害なグルタミンへの固定の速度を上げる防御機構が働いていると推察された。アンモニア培地中で *PyNRT*、*PyNAR*、*PyAMT1* 遺伝子の発現は誘導されなかった。そのため、窒素源の化学形態に関わらず、これらの遺伝子は窒素欠乏の指標遺伝子として機能しうると考えられた。

リン酸は細胞膜上の無機リン酸トランスポーター(PIT)を通じて細胞内に取り込まれる (Schachtman *et al*, 1998)。有機リン化合物については、そのままでは細胞内に取り込むことができないため、アルカリフォスファターゼ(APH)を細胞外に分泌し、それがアルカリ環境下でリン酸エステル結合を分解することで、無機リン酸を遊離させ、遊離したリン酸を取り込む仕組みが存在する (図 3-9)。リン欠乏においては *PyPIT3* と *PyAPH* の発現に特異的な上昇が見られた。*PyAPH* の発現量は、リン欠乏のサンプルにおいては大きなばらつきを示した。同様の値のばらつきは、新たに培養して調製したサンプルにおいてもみられたが (データは示していない)、実際に発現量に大きなばらつきが存在するのか、または実験条件による技術的なばらつきなのかは判断できなかった。ただし、リン欠乏による発現量の上昇幅は大きく、測定サンプル数を増やすことで有意な差がみられるのではないかと考えられた。*PyPIT3* の発現量はリン欠乏特異的に大幅な誘導を示した。*PyPIT1* と *PyPIT2* の発現はリン欠乏では誘導されないことから、*PyPIT3* が直接、リン酸の取り込みに関与している可能性が高く、おそらくは細胞膜状に存在する無機リン酸トランスポーターであると考えられた (Mucchal and Raghothama, 1999)。*PyPIT3* と *PyAPH* はリン欠乏の指標遺伝子としては十分機能すると考えられた。

藻類において、以下のような特異的な鉄の取り込み経路が存在すると考えられている(図 3-10) (Curie and Briat, 2003) (Hell and Stephan, 2003)。鉄には二価と三価イオンが存在するが、それぞれ異なるトランスポーターによって細胞内に取り込まれると考えられている。二価の鉄は二価鉄のトランスポーター(IRT)によって直接細胞内に取り込まれる。一方、三価の鉄は一度、鉄還元酵素(FRE)により二価に還元されたのち、鉄酸化酵素(FOX)の働きにより酸化され、三価に戻るエネルギーを利用して高親和性鉄(III)トランスポーター(FTR)によって細胞内に取り込まれる。一部の藻類では FEA というタンパク質が細胞外に分泌されており、これらの系の中で鉄の取り込みに何らかの関与をしていると考えられている。鉄イオンには他にも ABC トランスポーターなど他のトランスポーターを通じた取込み経路も存在する(Blaby-Haas and Merchant, 2012)。また、高等植物のうちイネ科植物は体外に分泌した鉄キレーターを介した鉄の取込み経路をもつ(Schmidt, 1998)。今回発現を調べた鉄関連遺伝子のうち、*PyFTR2*、*PyFEA*、*PyFOX2* で鉄欠乏特異的な発現誘導がみられた。このことからスサビノリにおいても鉄欠乏時に高発現する高親和性の鉄取込み系が存在することが示唆された。FEA はクラミドモナスにおいて鉄欠乏誘導性の因子として特定された、細胞外分泌タンパク質であり、詳しい機能は明らかになっていない。この遺伝子の相同遺伝子は主に緑藻においてのみ確認されており、高等植物にはみられない(Blaby-Haas and Merchant, 2012)。緑藻類とは進化的に大きく異なる紅藻類にこの遺伝子の相同遺伝子が存在していることは、藻類に共通した鉄の取り込み機構の存在を示唆している。また、クラミドモナス *C. reinhardtii* においては鉄欠乏により *CrFRE* の発現量が上昇することが報告されている(Allen *et al.*, 2007)。その他にも陸上植物において、*FRE* は鉄欠乏誘導性であることが報告されている(Jeong and Connolly, 2009)。一方、スサビノリでは *PyFRE1*、*PyFRE2* とともに鉄欠乏での誘導は見られなかった。これには培地の条件が影響している可能性も考えられる。培地中に添加している鉄は Fe(III)-EDTA と塩化鉄(III)でありどちらも三価の鉄イオンである。このことから、鉄欠乏培地に関わらず、通常培地においても鉄を還元するために *PyFRE* が高発現し

た状態にあり、それゆえ鉄欠乏時との発現量の差がみられなかった可能性が考えられる。事実、real-time PCR のサイクル数から推定された *PyFRE1*、*PyFRE2* の発現量は、誘導されていないときの *PyFTR2*、*PyFOX2* の発現量よりもかなり高かった。*PyFTR2*、*PyFEA*、*PyFOX2* は鉄欠乏の指標遺伝子として機能すると考えられた。

窒素、リン関連遺伝子の発現をさらに詳しく調べるため、窒素欠乏と窒素・リンがどちらも欠乏したときを比較した。窒素・リン同時欠乏では *PyNRT*、*PyNAR*、*PyAMT1* の発現量は窒素欠乏条件と同程度の発現量を示した。これは窒素欠乏と同様に、これらの遺伝子が誘導されたことを示している。一方で、窒素・リン同時欠乏では *PyPIT3*、*PyAPH* の発現量も窒素欠乏と大きな違いはみられなかった。これは窒素欠乏と同様に、これらの遺伝子は誘導されていないことを示している。つまり、窒素とリンがともに欠乏した条件では、窒素欠乏に対するのと同様の発現応答を示すが、リンの欠乏に対する応答は示さなかった。光合成色素の減少も窒素欠乏のほうがリン欠乏よりも速やかな変化を引き起こすことから、窒素に対する要求量のほうが大きく、リンに対する要求は窒素に対する要求が満たされている条件下で起こるのではないかと推察された。環境中で窒素とリンの枯渇が同時に起こっていた場合には、これらの遺伝子の発現からリン欠乏を確認することは難しいと考えられた。

光合成色素遺伝子の発現量をみると、窒素欠乏ではフィコビリタンパク質と光化学系 I のクロロフィル結合タンパク質の遺伝子の発現が顕著に抑制されていることが分かった。リン欠乏においても同様の傾向を示し、光合成色素含量の低下が窒素欠乏に比べて緩やかなリン欠乏でも、発現の抑制の度合いは窒素欠乏と大きく変わらなかった。このことは、窒素欠乏では発現の抑制だけではなく、積極的な光合成色素の分解が生じていることを示唆している。一方、鉄欠乏におけるこれら遺伝子の発現量は、栄養十分条件とほとんど差がなかった。それでも、鉄欠乏では光合成色素含量の低下がみられたことから、鉄欠乏における光合成色素含量の低下の原因は主に、生体の成長による色素密度の減少にあるのではないかと考えられた。光化学系 II の中心タンパク質である D1 タンパク質の遺

伝子発現量は全てのサンプルでほぼ一定であり、大きく変動しないことが明らかになった。リン欠乏においては、目視で明確な色の差が確認できるよりも早い3日目で、光合成色素遺伝子の発現量に大きな差がみられることから、潜在的な栄養欠乏を判断する指標として、これらの遺伝子の発現解析は有用であると考えられた。

シアノバクテリアにおいてフィコビリソームの分解に関与している *Nb1A* と相同性の高いスサビノリの遺伝子 *Ycf18* と *g3612* について、窒素欠乏条件での発現を調べた。しかし、*g3612* の発現量は窒素欠乏サンプルにおいてむしろ低く、誘導はみられなかった。また *Ycf18* については PCR で増幅が見られず、発現が確認できなかった。*Ycf18* に関しては窒素欠乏では誘導されず、アンモニア態窒素によって誘導されるという報告がある(Kawakami *et al.*, 2009)。このことから、どちらの遺伝子もシアノバクテリアにおける *Nb1A* と同様の窒素欠乏誘導性は示さないと考えられる。これらの遺伝子がフィコビリソームの分解において機能しているということを示唆する結果は得られなかった。少なくとも、スサビノリはシアノバクテリアとは異なるフィコビリソームの分解制御の仕組みを持っていると考えられた。紅藻がシアノバクテリアと大きく異なる点として、葉緑体の存在が挙げられる。こうした細胞の構造の違いがフィコビリソームの分解機構を異なるものに行っている可能性がある。また、真核生物は、原核生物よりも多様なタンパク質分解の仕組みを持っているため、そうした分解系により代替されていることも考えられる。

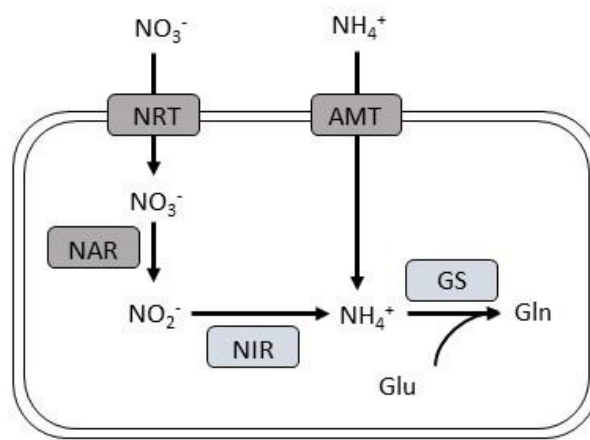


図 3-8 窒素関連遺伝子の働き模式図

NRT：硝酸トランスポーター、NAR：硝酸還元酵素、NIR：亜硝酸還元酵素、AMT：アンモニアトランスポーター、GS：グルタミン合成酵素

Glu：グルタミン酸、Gln：グルタミン

濃い灰色で示したタンパク質の遺伝子は、スサビノリ葉状体において窒素欠乏で発現が特異的に誘導された。

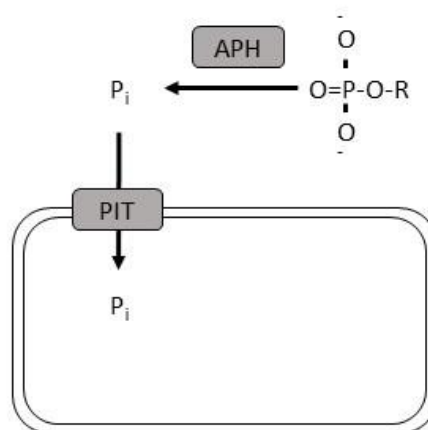


図 3-9 リン関連遺伝子の働き模式図

PIT：無機リン酸トランスポーター、APH：アルカリフォスファターゼ

濃い灰色で示したタンパク質の遺伝子は、スサビノリ葉状体においてリン欠乏で発現が特異的に誘導された。

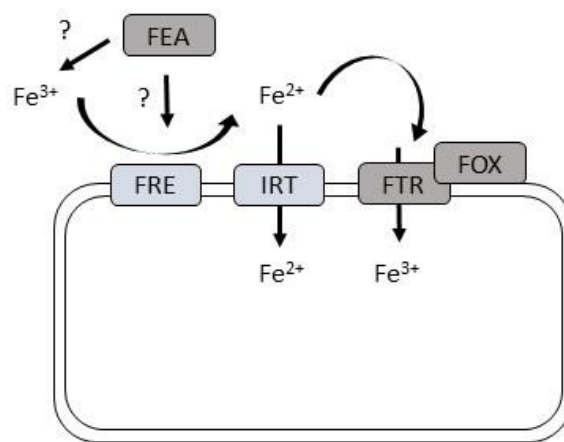


図 3-10 鉄関連遺伝子の働き模式図

IRT：鉄(II)トランスポーター、FRE：鉄(III)還元酵素、FTR：高親和性鉄(III)トランスポーター、FOX：鉄酸化酵素、FEA：鉄同化タンパク質

濃い灰色で示したタンパク質の遺伝子は、スサビノリ葉状体において鉄欠乏で発現が特異的に誘導された。

第 4 章

代謝産物の分析

第4章 代謝産物の解析

4-1 序

4-1-1 実験の目的

スサビノリの栄養欠乏に対する応答について、第2章では主にタンパク質とペプチドに注目して実験を行い、第3章では遺伝子の発現を分析した。本章では、それ以外の主に低分子量の成分に着目して、栄養欠乏に対する応答を調べ、栄養欠乏の指標となる因子の特定を行った。行った実験は、 ^1H NMR を用いたメタボローム解析、 ^{31}P NMR を用いたリン化合物の解析、およびアミノ酸分析装置による遊離アミノ酸の分析である。

食品中の低分子有機物、特に遊離のアミノ酸は旨味成分として働き、食味に大きな影響を与える。それゆえ、スサビノリを食品原料として考えたとき、遊離アミノ酸含量には大きな意味がある。乾海苔中の遊離アミノ酸の分析についてはこれまで多くの報告がある。それらにより、養殖ノリの産地によって遊離アミノ酸のプロファイルに違いがあること（斎藤ら、1975）、一般に等級が高く品質が良いとされる乾海苔の遊離アミノ酸含量は高く品質が悪いものでは低いことが知られている（吉江ら、1993）。しかし、これらの分析のほとんどは食品として加工された乾ノリの遊離アミノ酸含量を測定したものであり、生体のスサビノリ葉状体を分析対象とした研究の報告は少ない。また、コントロールされた栄養条件下で生育したスサビノリの遊離アミノ酸含量を分析した例はほとんど報告されていない。このことから、窒素・リン・鉄のそれぞれの栄養欠乏時に、低分子化合物のプロファイルがどのように変動するかを調べることにより、今までにない有用な知見が得られるのではないかと考えた。各栄養欠乏に特異的な変動を見せる因子を特定することができれば、それを指標として、遺伝子発現の解析とは異なった角度から養殖ノリの栄養状態を評価することが可能になる。

4-2 実験材料と方法

4-2-1 スサビノリ葉状体粗抽出液の ^1H NMR の測定

分析には前培養後、通常培地、窒素欠乏培地、リン欠乏培地、鉄欠乏培地でそれぞれ 6 日間および 9 日間培養したノリ葉状体を用いた。

凍結したサンプルを、凍結乾燥器を用いて一晩乾燥をさせた。乾燥した試料をメタルコーンとともに 15 ml ポリカーボネートチューブに入れ、マルチビーズショッカー (Yasuikikai, Osaka, Japan) を用いて、2,000 rpm で 60 秒間の処理を 2 回行い、粉砕した。粉末を回収して 5 ml 遠心チューブに入れ、アルミホイルで遮光しデシケーターの中で保存した。

代謝成分の抽出に用いるため 200 mM シュウ酸ナトリウム緩衝液(pH 4.3)を調製し(Koda *et al.*, 2012)、凍結乾燥器で完全に乾燥を行った。析出した結晶に乾燥前と同量の重水を加えて、重水で置換した緩衝液を作製した。

上記のスサビノリ乾燥粉末 35 mg を秤量し、重水で置換したシュウ酸緩衝液 1 ml を加えた。ボルテックスによる攪拌と、ソニケーターでの 1 分間の超音波処理を施し、試料を緩衝液中に完全に懸濁した。回転式混合器を用いて 4°C で一晩振盪を行った。4°C、20,000 *g* で 15 分間遠心を行った。上清を分取し、5 mm NMR 管にいれて、測定を行った。

NMR の測定条件は以下の通りである。

核種 : ^1H

Solvent : D_2O

Field_Strength : 600 MHz

X_points : 16384

Relaxation Delay : 5 s

Dante_Offset : 4.67 ppm

Dante_Attenuator : 30 dB

Scans : 128 times

Receiver_Gain : 50

4-2-2 スサビノリ葉状体粗抽出液の ^{31}P NMR の測定

測定には通常培地・リン欠乏培地でそれぞれ 3 日間と 6 日間、窒素欠乏培地・鉄欠乏培地でそれぞれ 6 日間培養したノリ葉状体を用いた。

凍結したノリサンプルを乳鉢と乳棒を用いて破砕した。破砕の方法は第 2 章に準じた。凍結した試料粉末を 5 ml 遠心チューブに移し、試料重量の 5 倍量の抽出バッファー (100 mM Tris-HCl(pH7.5)) を加え、ボルテックスを用いて攪拌した。ソニケーターを用いて、氷上で 1 分間超音波処理を行い、ボルテックスで 1 分間激しく攪拌した。25°C、15,000 *g* で 10 分間遠心を行い、上清をリン抽出液として回収した。リン抽出液 600 μl に重水 100 μl を加えて、測定用試料とし、5 mm NMR 管に入れて測定を行った。

NMR の測定条件は以下の通りである。

核種 : ^{31}P

Solvent : D_2O

Field_Strength : 600 MHz

X_Offset : 0 ppm

X_points : 131072

X_Sweep : 30.48780488 kHz

Relaxation Delay : 1 s

Scans : 512 times

Receiver_Gain : 60

4-2-3 栄養欠乏サンプルにおける遊離アミノ酸分析

分析には前培養後、通常培地・窒素欠乏培地でそれぞれ 3 日間、リン欠乏培地・鉄欠乏培地でそれぞれ 6 日間培養したノリ葉状体を用いた。

凍結したノリサンプルを乳鉢と乳棒を用いて、液体窒素中で破砕した。凍結した試料粉末を 5 ml 遠心チューブに移し、サンプルの湿重量の 5 倍量の 3% TCA を加えて、速やかに攪拌した。ソニケーターで 1 分間の超音波処理を行い、再び

ボルテックスを用いて完全に試料を懸濁した。4°C、20,000 *g* で 15 分間遠心を行い、上清 300 μ l を新しいチューブに移し、60 μ l の 36 mM デオキシコール酸ナトリウム水溶液を加えて混合した。4°C で 30 分間静置し、4°C、20,000 *g* で 60 分間遠心を行った。上清をアミノ酸抽出液として回収し 4°C で保存した。測定は試料の調製から 48 時間以内に行った。アミノ酸抽出液を分析の当日に孔径 0.45 μ m の PVDF 膜スピンカラムフィルターでろ過し、アミノ酸分析装置に供した。アミノ酸分析装置は高速アミノ酸分析計 L-8900 (Hitachi Koki, Tokyo, Japan)を用いた。アミノ酸標準液としてアミノ酸混合標準液 H 型、アミノ酸混合標準液 B 型 (Wako)を用いた。1 回の測定には 20 μ l の試料溶液を使用した。

4-3 結果

4-3-1 ^1H NMR 測定

栄養欠乏下で特異的に変動する代謝産物を特定するため、窒素、リン、鉄欠乏培地で培養したスサビノリ葉状体の粗抽出液の ^1H NMR を測定した。全てのサンプルにおいて、化学シフト 5.5 ppm より低磁場側にはほとんどピークは見られなかった。図 4-1 に 0.0 ppm から 4.0 ppm の範囲のスペクトルを示した。1.0 ppm から 3.0 ppm の間に主にアミノ酸や有機酸に由来すると考えられる多数のピークが観察された。3.7 ppm を中心に主に多糖に由来すると考えられるピークが観察されたが、その帰属は困難であった。通常培地培養したサンプルでは 1.37 ppm にアラニン由来の強いピークが見られた。窒素欠乏培地で培養したサンプルでは特にこのピークが低い値を示した、リン欠乏においても低い傾向が見られた。また窒素欠乏培地で培養したサンプルでは他のサンプルと比較して 1 ppm から 3 ppm の間のピークが全体的に低強度であったが、2.75 ppm 付近にクエン酸由来のピークが特徴的に検出された。

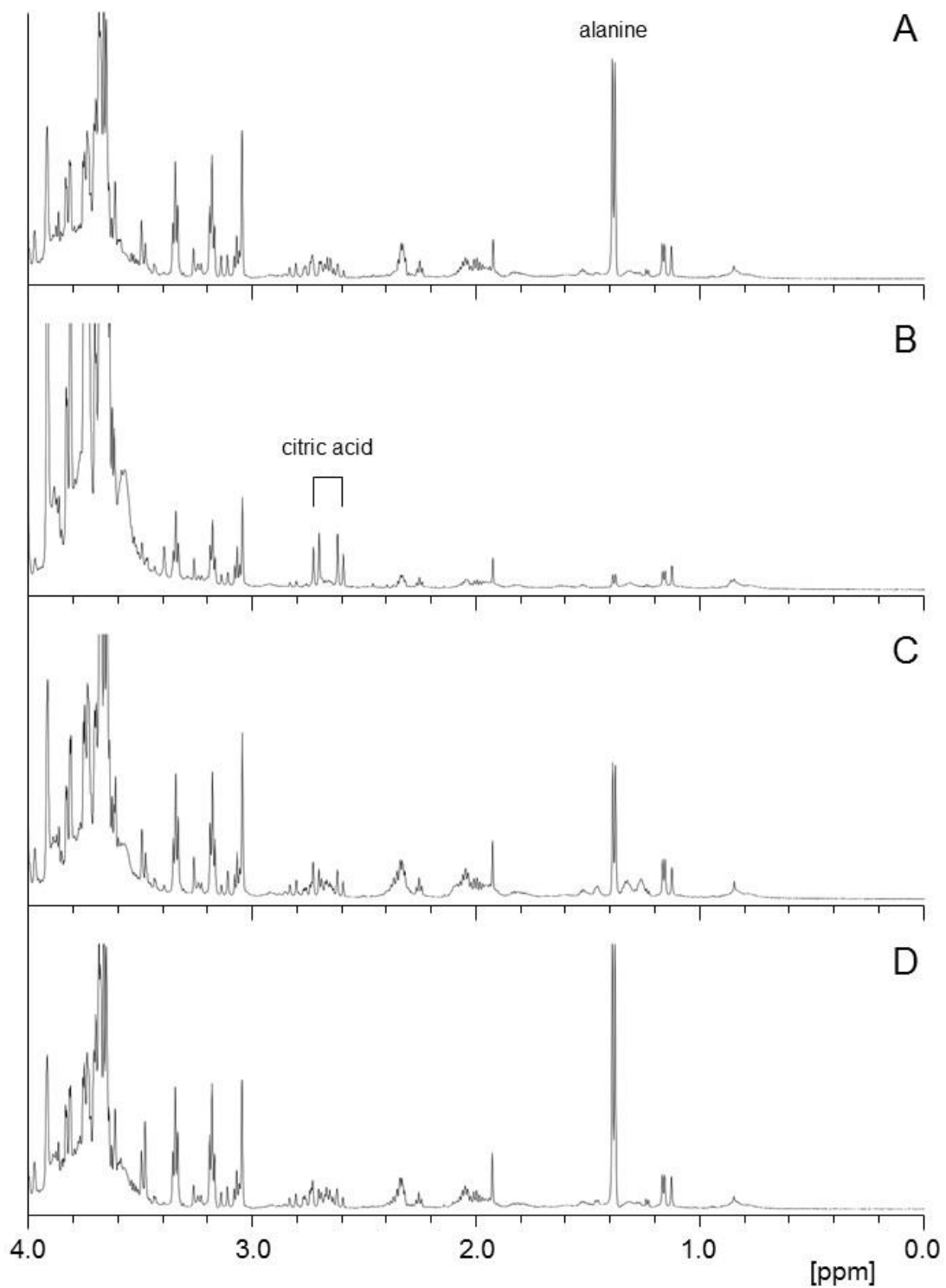


図 4-1-1 スサビノリ葉状体粗抽出液の ^1H NMR スペクトル

A : Ctrl_6d、通常培地で 6 日間培養したサンプル。B : N-_6d、窒素欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。C : P-_6d、リン欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。D : F-_6d、鉄欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。

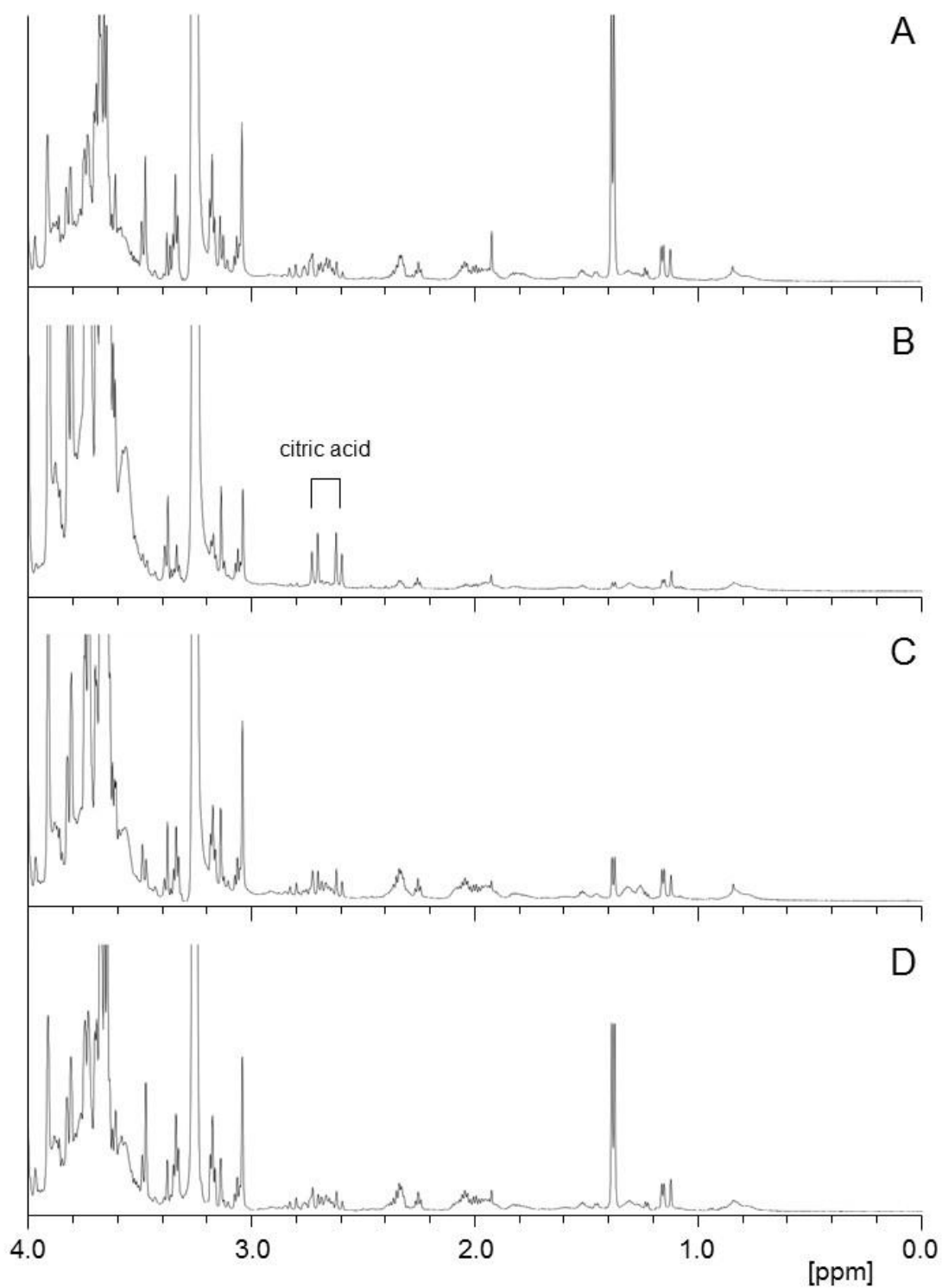


図 4-1-2 スサビノリ葉状体粗抽出液の ^1H NMR スペクトル

A : Ctrl_9d、通常培地で 9 日間培養したサンプル。B : N-_9d、窒素欠乏培地で 9 日間培養したサンプル。C : P-_9d、リン欠乏培地で 9 日間培養したサンプル。D : Fe-_9d、鉄欠乏培地で 9 日間培養したサンプル。

4-3-2 ^{31}P NMR 測定結果

栄養欠乏下での生体内のリン化合物の挙動を調べるため、窒素、リン、鉄欠乏培地で培養したスサビノリ葉状体の粗抽出液の ^{31}P NMR を測定した (図 4-2)。通常培地で 3 日間培養したサンプルでは、化学シフト 2.2 ppm と -0.6 ppm、-22.2 ppm にピークが見られた。化学シフト 2.2 ppm のピークは標準試料の添加実験により、遊離の無機リン酸であると確認された。また、化学シフトから -0.6 ppm のピークはグリセロリン酸、-22.2 ppm のピークはポリリン酸によるものと考えられた (Oh-hama *et al.*, 1986)。グリセロリン酸は培地中にリン源として加えているため、グリセロリン酸のピークは試料に付着していた培地に由来している可能性も考えられた。通常培地で培養したサンプルでは、無機リン酸とポリリン酸のピークの強度に培養期間で大きな差はみられなかった。リン欠乏培地で 3 日間培養したサンプルでは、通常培地で培養したサンプルと比較してポリリン酸のピークが小さく、6 日培養したサンプルではポリリン酸のピークは観察されなかった。また、リン欠乏サンプルでは遊離の無機リン酸のピークも 3 日間、6 日間の培養により減少した。窒素欠乏培地で 6 日間培養したサンプルでは遊離の無機リン酸、ポリリン酸のピークともに通常培地で 6 日間培養したサンプルに比べて強度が低い傾向がみられた。

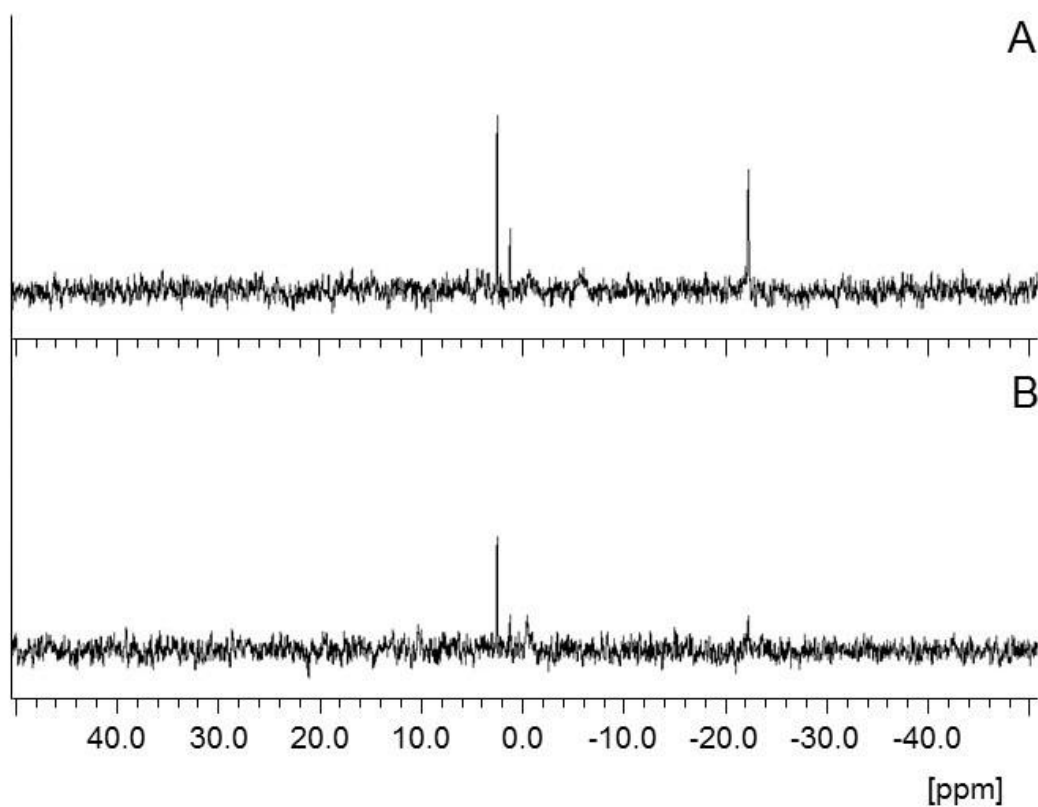


図 4-2-1 スサビノリ葉状体リン抽出液の ^{31}P -NMR

A: Ctrl_3d、通常培地で3日間培養したサンプル。B: P-3d、リン欠乏培地で3日間培養したサンプル。

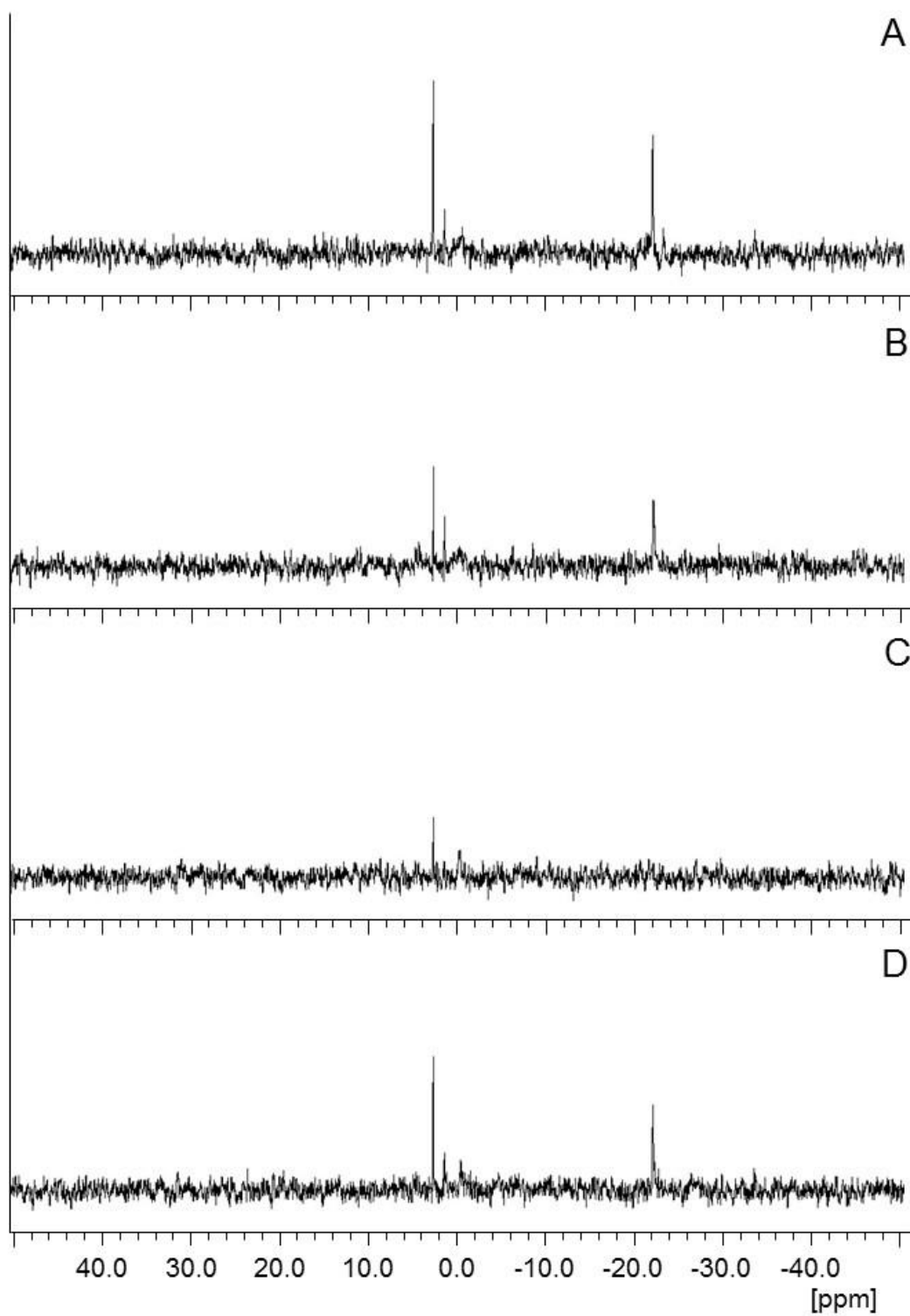


図 4-2-2 スサビノリ葉状体リン抽出液の ^{31}P -NMR

A : Ctrl_6d、通常培地で 6 日間培養したサンプル。B : N-_6d、窒素欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。C : P-_6d、リン欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。D : Fe-_6d、鉄欠乏培地で 6 日間培養したサンプル

4-3-2 アミノ酸分析

栄養欠乏下での生体内の遊離アミノ酸の挙動を調べるため、窒素、リン、鉄欠乏培地で培養したスサビノリ葉状体の遊離アミノ酸含量を測定した（図 4-3）。通常培地で培養したサンプルでは、アラニンの含量がもっとも高く、グリシン、タウリン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸がこれに続いた。

（今回用いた測定方法ではグルタミン酸量は、グルタミン酸とグルタミン、アスパラギン酸量はアスパラギン酸とアスパラギンの総量を示している。）セリンの濃度は通常培地で培養したサンプルにおいてはアスパラギン酸の次に高かったが、他のサンプルからは検出されなかった。

高濃度に含まれていたアミノ酸のうちアラニン、グリシン、プロリン、アスパラギン酸、シトルリンの含量は窒素欠乏培地で培養したサンプルで顕著に減少がみられ、有意に低い値を示した。一方、グルタミン酸とタウリンの含量は、窒素欠乏培地で培養したサンプルで有意に低い値を示したものの、他のアミノ酸に比べ変化が小さい傾向が見られた。また、窒素欠乏培地で培養したサンプルではロイシン、メチオニン、リシンの含量が他のサンプルに比べて有意に高かった。遊離のアンモニアの濃度はリン欠乏培地で培養したサンプルで有意に高く、それ以外のサンプルではほぼ同じ値を示した。リン欠乏培地で培養したサンプルではシステイン、シスタチオニン、 α -アミノ酪酸、 α -アミノアジピン酸の含量が高い傾向が見られた。鉄欠乏培地で培養したサンプルの遊離アミノ酸含量は概ね、通常培地で培養したサンプルと同じ傾向を示した。また β -アラニン、アルギニンの含量は全てのサンプルでほぼ同じ値を示した。

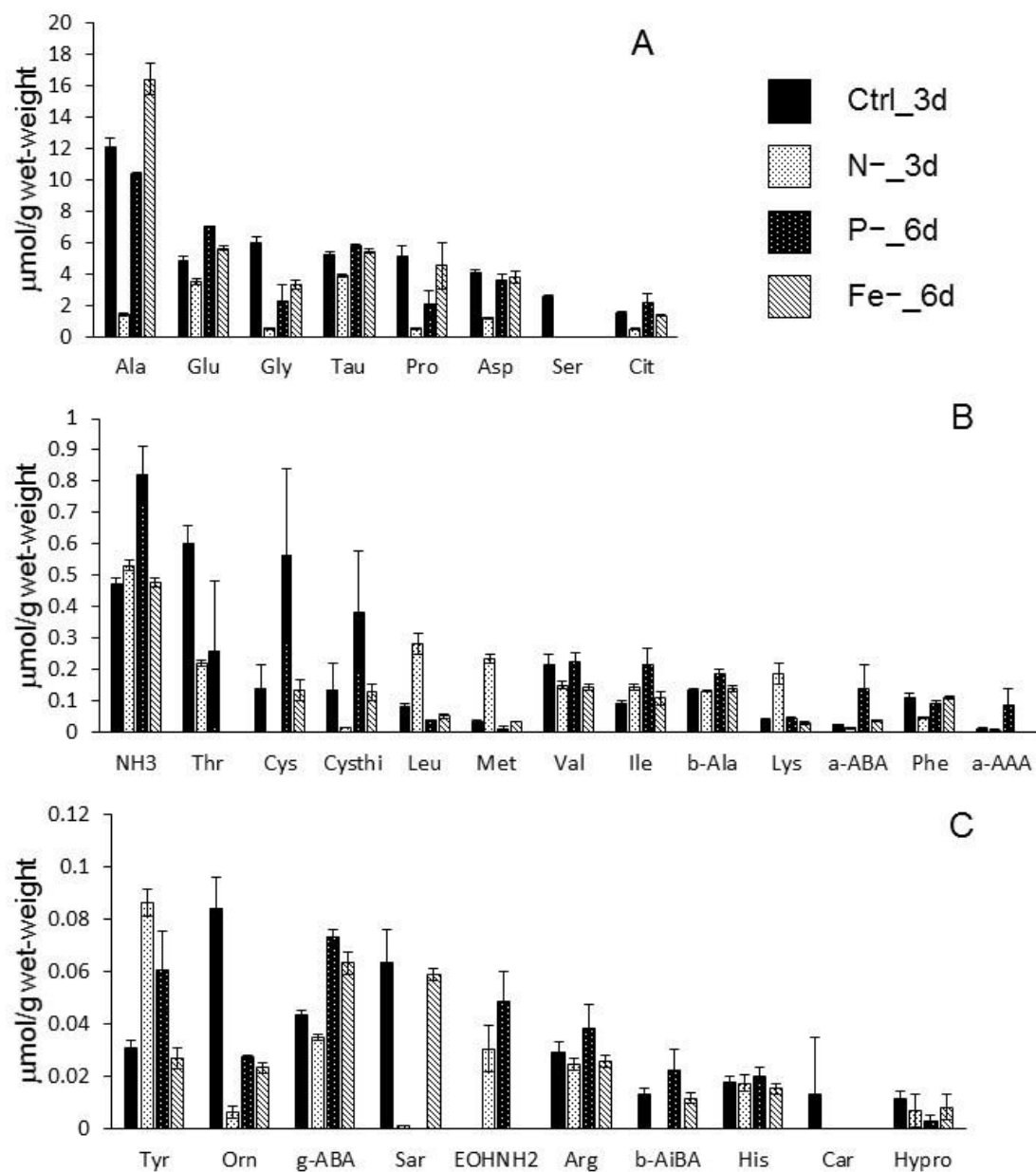


図 4-3 栄養欠乏時のアミノ酸含量

Ctrl_3d：通常培地で 3 日間培養したサンプル。N-_3d：窒素欠乏培地で 3 日間培養したサンプル。P-_6d：リン欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。Fe-_6d：鉄欠乏培地で 6 日間培養したサンプル。

図の A、B、C、は縦軸の調整の為便宜的にグラフを分けた。

図中のアミノ酸の略号については表 4-1 に記載した。

n=3, mean \pm S.D.

図中のバーのないものは、3 つの測定値が全て検出限界以下だった。検出限界以下だった測定値が 1 つまたは 2 つ含まれていたサンプルについては、その測定値を検出限界である 0.003 nmol/injection(900 nmol/g wet-weight)として、平均値及び誤差を算出した。

表 4-1 アミノ酸分析の略号

略号	名前	略号	名前
Ala	アラニン	b-Ala	β -アラニン
Glu	グルタミン酸	Lys	リシン
Gly	グリシン	α -ABA	α -アミノ酪酸
Tau	タウリン	Phe	フェニルアラニン
Pro	プロリン	α -AAA	α -アミノアジピン酸
Asp	アスパラギン酸	Tyr	チロシン
Ser	セリン	Orn	オルニチン
Cit	シトルリン	γ -ABA	γ -アミノ酪酸
NH ₃	アンモニア	Sar	サルコシン
Thr	スレオニン	EOH-NH ₂	エタノールアミン
Cys	システイン	Arg	アルギニン
Cysthi	シスタチオニン	b-AiBA	β -アミノイソ酪酸
Leu	ロイシン	His	ヒスチジン
Met	メチオニン	Car	カルニチン
Val	バリン	Hypro	ヒドロキシプロリン
Ile	イソロイシン		

4-3 考察

^1H NMR による分析から、スサビノリ葉状体において窒素欠乏時にクエン酸の蓄積が生じることが観察された。リン欠乏・鉄欠乏では同様の蓄積は生じなかったことから、クエン酸の蓄積は窒素欠乏を判断する指標として有用であると考えられた。海洋性珪藻である *Thalassiosira pseudonana* では窒素欠乏条件で 12 時間培養することでクエン酸の大幅な蓄積がみられることが報告されている (Bromke *et al.*, 2013)。また *C. reinhardtii* では、窒素欠乏条件で 24 時間培養することでクエン酸が蓄積することが報告されている (Wase *et al.*, 2014)。これらの報告から窒素欠乏時のクエン酸の蓄積は、真核性の藻類において一般的にみられる現象であると考えられる。一方、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. では窒素欠乏時にクエン酸の含量は減少することが報告されている (Osanai *et al.*, 2014)。ただし欠乏の期間が 4 時間であり、今回の実験とは条件が大幅に異なるため単純な比較を行うことは難しい。同論文では、窒素欠乏により TCA サイクル中の他の代謝産物であるリンゴ酸、フマル酸、コハク酸などは蓄積することが報告されている。この蓄積は、エネルギーの分散貯蔵の一環と考えられており、スサビノリにおいてはクエン酸がこの役割を果たしていることも考えられる。一方、クエン酸の生産菌として知られる *Aspergillus niger* では、培地中の窒素の制限がクエン酸の生産量を増加させることが知られている (Alben and Erkman, 2004)。*A. niger* においてリン欠乏は、窒素欠乏と同様にクエン酸の蓄積を促進させるという報告もあるが (Kubicek and Rohr, 1977)、そうではないという報告もあり (Shu *et al.*, 1948)、意見の一致をみていない。おそらく、クエン酸の蓄積が生じるかは成長と代謝のバランスによって決まっており、複数の栄養素の相対的な量に影響されるためであると考えられる。また、これらの欠乏によってクエン酸が蓄積するメカニズムについては多くのことが明らかになっていない。スサビノリにおいてもリン欠乏培地で 9 日間培養したサンプルでは、クエン酸の化学シフトの位置に若干のピークがみられた。スサビノリにおいて

も長期のリン欠乏ではクエン酸の蓄積が生じる可能性は考えられる。

^{31}P NMR による分析から、スサビノリの生体内にはポリリン酸が存在することが示唆された。多細胞紅藻である *Porphyra purpurea* では、ポリリン酸が顆粒を形成し、おそらくリンの貯蔵物質として働くことが報告されている (Chopin *et al.*, 2004)。スサビノリのリン欠乏においては、遊離の無機リン酸に比べて、ポリリン酸の減少が早く生じていた。これは、ポリリン酸を分解することで、細胞に遊離の無機リン酸を供給しているためであると考えられる。このことから、スサビノリにおいてもポリリン酸がリンの貯蔵物質として機能していることが推察された。窒素欠乏時には相対的にリンが過剰になり、ポリリン酸が蓄積することが酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では知られている (Breus *et al.*, 2011)。このため、スサビノリにおいても同様の現象が起きると予測したが、遊離のリン酸とポリリン酸ともに蓄積はみられず、むしろピーク強度が減少していた。このことは、窒素欠乏時に生体内でリンがリン脂質などの別の化合物として同化されるか、新たなリンの取り込みが低下していることを示唆している。第 2 章における実験では、リン欠乏による葉状体の褪色は窒素欠乏と比較して限定的であったが、この原因として 9 日間のリン欠乏処理が著しい褪色を引き起こすのに十分ではない可能性が考えられた。しかし、本章の実験からリン欠乏培地での 6 から 9 日間の培養で、生体内のリン濃度は非常に低下しており、リン欠乏状態になっていることが確かめられた。このことから、リン欠乏では窒素欠乏と異なりフィコビリソームの積極的な分解は生じていないため褪色が緩やかであると考えられる。鉄欠乏においてもポリリン酸のピーク強度に若干の減少が見られた。*Cyanidium caldarium* ではポリリン酸の顆粒が鉄の貯蔵の機能も担っているのではないかと考えられており、鉄欠乏処理によりポリリン酸のピークが減少することが報告されている (Nagasaka and Yoshimura, 2008)。今回の結果は、スサビノリのポリリン酸にも同様の機能が存在している可能性を示唆していた。

アミノ酸分析の結果からスサビノリ葉状体において、窒素欠乏・リン欠乏でそれぞれ異なるアミノ酸の含量が増減することが分かった。窒素欠乏ではフィ

コビリタンパク質を含む多くのタンパク質の含量が低下することから、タンパク質の分解によってアミノ酸が遊離し、一部のアミノ酸の濃度が増加する可能性が考えられた。しかし、量的に主要なアミノ酸の多くは減少を示した。このことから、窒素欠乏においては、分解によって生じた遊離のアミノ酸は、新たなタンパク質や窒素含有化合物の合成に用いられて消費されていると考えられた。主要なアミノ酸のうちアラニン、グリシン、プロリン、アスパラギン酸は窒素欠乏により有意に減少した。このうちアラニンの減少は $^1\text{H NMR}$ から確認された。アラニンの含量は高く、窒素欠乏で顕著に減少するため、アラニンの含量は窒素の栄養状態を評価するための簡易的な指標として利用できる可能性がある。一方、窒素欠乏がタウリンの含量に与える影響は限定的であった。主要なアミノ酸のうちタウリンのみがタンパク質合成に用いられないアミノ酸であることから、生体内のタウリンの代謝は、タンパク質に含まれるアミノ酸とはある程度独立しているのではないかと考えられた。また、窒素欠乏ではロイシン、リシン、メチオニンの含量に増加が見られた。これらのアミノ酸はリン欠乏においては増加が見られないことから窒素欠乏とリン欠乏を区別する上でひとつの指標としても用いることができると考えられた。

窒素欠乏と異なりリン欠乏・鉄欠乏においては、主要なアミノ酸の減少はみられなかった。これはリンや鉄が直接的にアミノ酸の材料となることはなく、窒素欠乏と比較してアミノ酸の代謝に与える影響が少ないためと考えられる。一方で、一部の微量アミノ酸では、リン欠乏サンプルに特異的な蓄積がみられた。リン欠乏では含硫アミノ酸であるシステインとシスタチオニンが増加していた。これらのアミノ酸の分析値は誤差が大きかった。これらのアミノ酸は酸化されやすいため、測定試料が調製時に酸化の影響を受けて分析値が不正確になっている可能性がある。これらのアミノ酸は、窒素欠乏ではむしろ減少する傾向がみられることから、窒素欠乏とリン欠乏を区別する指標として有用であると考えられた。

第 5 章

養殖ノリの分析

第 5 章 現場養殖ノリの分析

5-1 序

5-1-1 本章の目的

ここまで、実験室で培養したスサビノリ葉状体の栄養欠乏時の応答について様々な観点から実験を行ってきた。第 2 章では実験室で窒素、リン、鉄欠乏処理を施したスサビノリの色調の変化を観察し、光合成色素含量の測定を行い、栄養欠乏ごとの特徴を把握することができた。第 3 章において、窒素、リン、鉄欠乏の指標となる遺伝子の探索を行い、栄養欠乏の指標となる遺伝子を特定した。また第 4 章では、 ^1H NMR、 ^{31}P NMR による分析と遊離アミノ酸の分析を行い、窒素欠乏およびリン欠乏を特徴付ける代謝産物をいくつか特定することが出来た。これらの結果を踏まえ、本章では実際の養殖現場から採取したスサビノリ葉状体のサンプルに対して、これまで検討した分析手法を適用することで、養殖ノリにおける色落ちと栄養欠乏との関係を明らかにしたいと考えた。東京湾の同じノリ養殖場において、2 月から 4 月にかけて定期的に 3 回のサンプリングを行い、状態の異なる 3 種類のスサビノリ葉状体サンプルを手に入れた。同一地点で養殖されたサンプルを継続的に分析することで、その地点での環境の変化に対するノリの応答を調べることも可能になると考えた。これまで、養殖ノリに関する研究は主に、食品科学や栄養学的な観点から行われてきており、乾海苔に加工した状態の試料を分析することが多かった。本研究ではサンプルは採取後、迅速に凍結処理を施し、冷凍で保存することで、先行研究とは異なり環境中でのスサビノリの生理的状态をより直接的に分析することを試みた。

5-2 実験材料と方法

5-2-1 養殖ノリのサンプリング

養殖ノリのサンプリングには千葉県新富津漁業組合に協力していただいた。東京湾に位置する千葉県富津沖のノリ養殖場において、2015年2月4日、2015年3月10日、2015年4月6日の計3回、サンプリングを行った。以下、これらのサンプルをそれぞれ CLF1、CLF2、CLF3 とした (CLF: Cultivated Laver Futtsu)。午前7時ごろ、のり網から採取した養殖ノリを現場海域の海水とともに2L容のプラスチックボトルに入れ、4°Cで運搬した。できるだけ無傷で全体が保存されている葉状体を選び、ペーパータオルで水気を拭き取り、湿重量を測定した。一枚の葉状体を一個体として扱った。試料はチャックつきのビニール袋に入れ、液体窒素中で凍結し、-80°Cで保存した。採取から凍結処理までは4時間以内に行った(Yoshimura *et al.*, 2016)。

5-2-2 養殖ノリの色素測定

凍結保存した養殖ノリサンプルの光合成色素含量を測定した。抽出および測定の手順は2-2-5に従った。

5-2-3 養殖ノリの全タンパク質含量測定

凍結保存した養殖ノリサンプルから全タンパク質を抽出し、タンパク質含量を測定した。抽出および測定の手順は2-2-6に従った。

5-2-4 養殖ノリからの中低分子画分の抽出と分析

凍結した養殖ノリサンプルから1 M 酢酸で低中分子画分を抽出し、逆相高速液体クロマトグラフィーで分離した。抽出および分析の手順は2-2-13に従った。

5-2-5 養殖ノリの指標遺伝子の発現解析

凍結した養殖ノリサンプルからで3-2-11と同様の手順でtotal RNAの抽出、逆転写を行った。第3章の実験から栄養欠乏特異的な発現を示した遺伝子につ

いて養殖ノリサンプルでの発現量を 3-2-12 と同様の手順で解析した。発現を調べた遺伝子は以下の通りである。

表 5-1 発現を解析した栄養欠乏の指標遺伝子

Name	ID ^{*1}	Predicted Function
18S rRNA ^{*2}	gi:557883180	18S ribosomal RNA
<i>PyNRT</i>	g3774	Nitrate transporter
<i>PyNAR</i>	g3705	Nitrate reductase
<i>PyAMT1</i>	g3953	Ammonia transporter
<i>PyPIT1</i>	g7306	Inorganic phosphate transporter
<i>PyAPH</i>	g5529	Alkaline phosphatase
<i>PyFTR2</i>	g3321	High affinity ferric iron transporter
<i>PyFEA</i>	g7341	Iron assimilating protein

^{*1}18S rRNA は NCBI の Gene ID に、それ以外はゲノムデータベース中の遺伝子番号に相当する。^{*2} 定量 PCR の内標準として用いた。

5-2-6 養殖ノリの光合成色素タンパク質遺伝子の発現解析

5-2-5 と同じサンプルを用いて、養殖ノリサンプルでの光合成色素遺伝子の発現量を調べた。発現を調べた遺伝子は 3-2-10 と同様である。

5-2-7 養殖ノリの金属濃度測定

凍結保存した養殖ノリサンプルを硝酸分解し、ICP-OES を用いて試料中の鉄・亜鉛の濃度を測定した。養殖ノリサンプルを、重量を測定したテフロン製内容器に約 300 mg 程度入れ、湿重量を測定した。80℃ のオーブンで一晩乾燥させ、オーブンから取り出してすぐ乾燥重量を測定した。テフロン製内容器を、1 ml の濃硝酸を加えたテフロン製外容器に入れて蓋をし、金属容器でさらに密閉した。オーブンに入れ、150℃ で 10 時間、硝酸蒸気による湿式分解を行った。分解終了後、テフロン製内容器中の試料分解溶液を 10 ml 容メスフラスコに移し

た。さらに内容物を 0.1 M の硝酸で数回洗いこみ、溶液を同じメスフラスコに移し、0.1 M 硝酸で定容した。これを試料溶液とした。検量線には 0 ppm 溶液として 0.1 M 硝酸を、1 ppm 溶液として 1000 ppm 鉄標準液および亜鉛標準液を 0.1 M 硝酸で 1000 倍に希釈したものを用い、二点で検量線を作製した。測定には ICP-OES(Hitachi High-Tech Science, Tokyo, Japan)を用いた。

5-2-8 養殖ノリのリン濃度測定

凍結保存した養殖ノリサンプルを硝酸分解し、ICP-OES を用いて試料中のリンの濃度を測定した。測定には金属濃度の測定で調製した試料を用い、0.1 M の硝酸で 10 倍に希釈した溶液を測定に供した。検量線には 0 ppm 溶液として 0.1 M 硝酸を 1 ppm 溶液として 1000 ppm リン標準液を 1000 倍に希釈したものを用い、二点で検量線を作製した。測定は金属濃度測定と同様に行った。

5-2-9 養殖ノリ粗抽出液の ^1H NMR 測定

凍結保存した養殖ノリサンプルから粗抽出液を調製し、 ^1H NMR の測定を行った。試料の調製および測定の手順は 4-2-1 に従った。

5-2-10 養殖ノリ粗抽出液の ^{31}P NMR 測定

凍結保存した養殖ノリサンプルから粗抽出液を調製し、 ^{31}P NMR の測定を行った。試料の調製および測定の手順は 4-2-2 に従った。

5-2-11 養殖ノリのアミノ酸分析

凍結保存した養殖ノリサンプルから遊離アミノ酸を抽出し、アミノ酸分析を行った。試料の調製および測定の手順は 4-2-3 に従った。

5-3 結果

5-3-1 養殖ノリの光合成色素分析

養殖ノリサンプルの色調を観察し、光合成色素含量を抽出して定量した。写真を図 5-1 に、光合成色素含量を図 5-2 に示した。目視で認識することが可能な色調の差がサンプル間に存在した。CLF2 はもっとも色が濃く、やや赤みを帯びた褐色を呈した。CLF1 は次に色が濃く、薄茶色を呈した。CLF3 はもっとも色が薄く、薄緑色を呈した。CLF3 は、葉状体の平均的な大きさが他の 2 サンプルに比べて小さかった。光合成色素含量はクロロフィル a、フィコエリスリン含量ともに CLF2 で最も多く、CLF3 で最も低かった。これは目視による観察の結果と一致した。CLF3 の光合成色素含量は CLF1 のと比較して、クロロフィル a、フィコエリスリンともに半分以下であり、「色落ち」の傾向がみられた。

5-3-2 養殖ノリの全タンパク量測定

養殖ノリサンプルから全タンパク質を抽出し、定量した（図 5-3）。全タンパク質量は CLF2 で最も高く、CLF3 で最も低かった。これは、光合成色素含量の傾向と一致した。

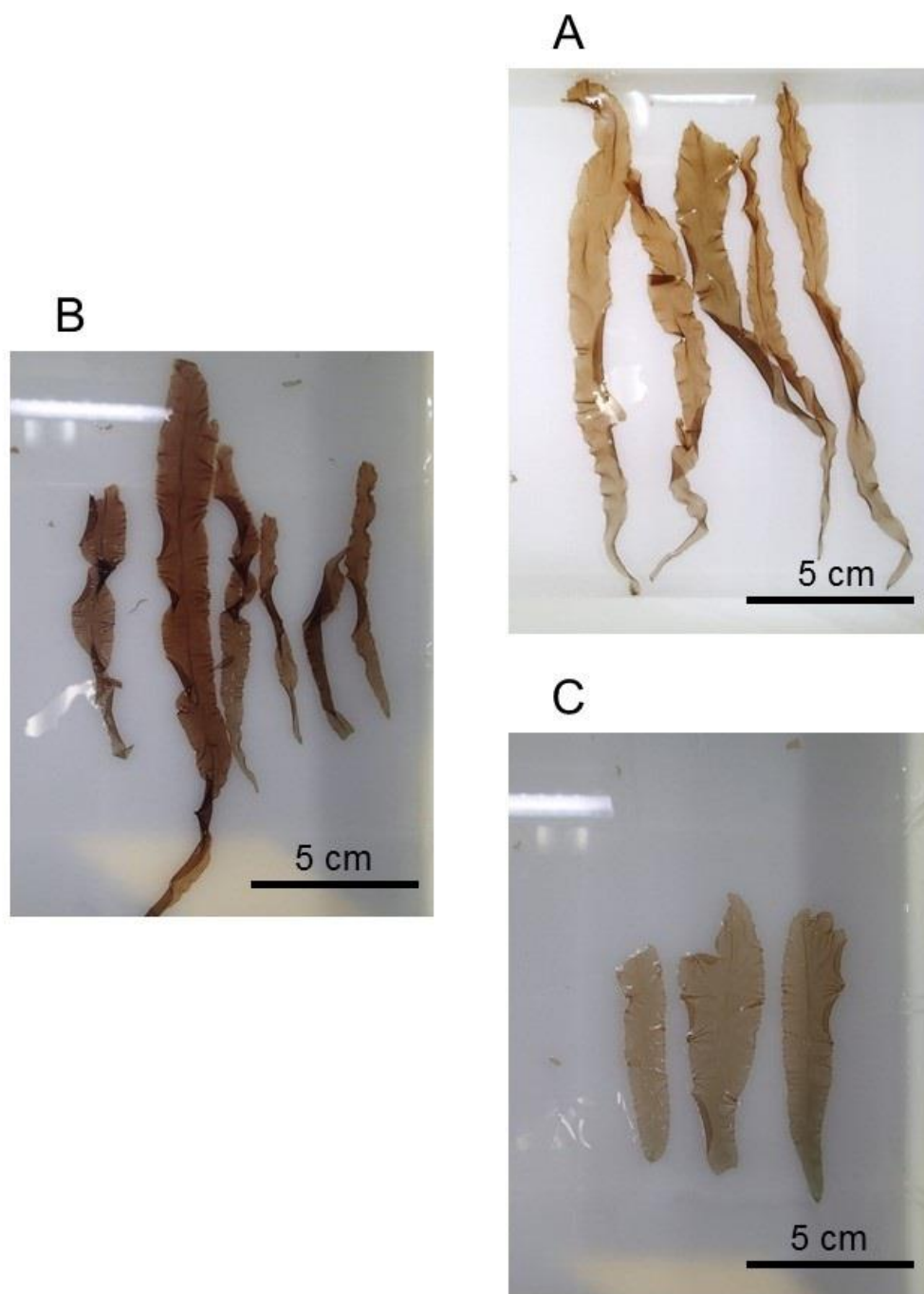


図 5-1 養殖ノリの写真

東京湾の新富津養殖場において採取した養殖ノリサンプル。A：CLF1、2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル。B：CLF2、2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル。C：CLF3、2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル。

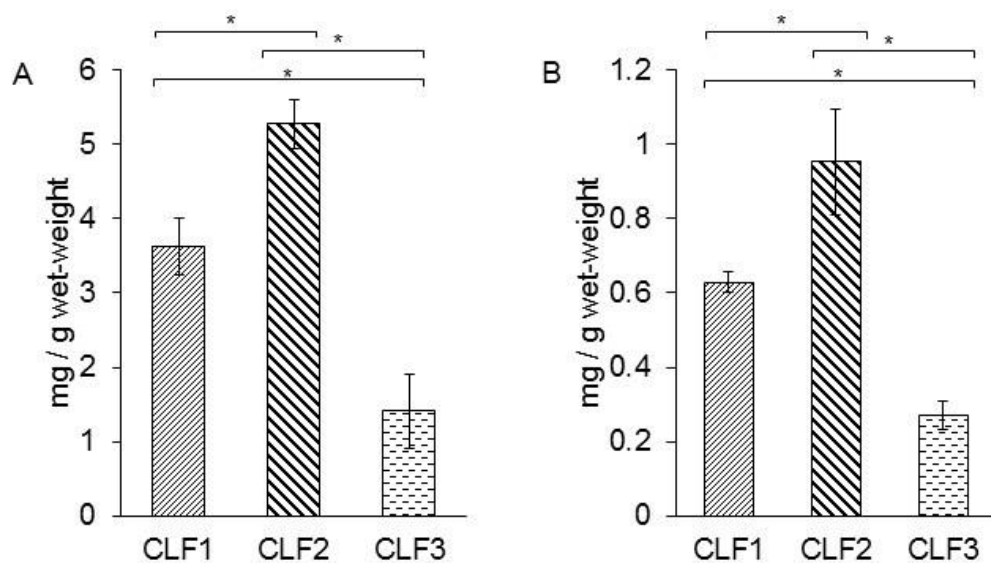


図 5-2 養殖ノリの光合成色素含量

A: フィコエリスリン含量 B: クロロフィル *a* 含量

CLF1: 2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル、CLF2: 2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル、CLF3: 2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル

n=3、mean \pm S.D.、* $p < 0.05$

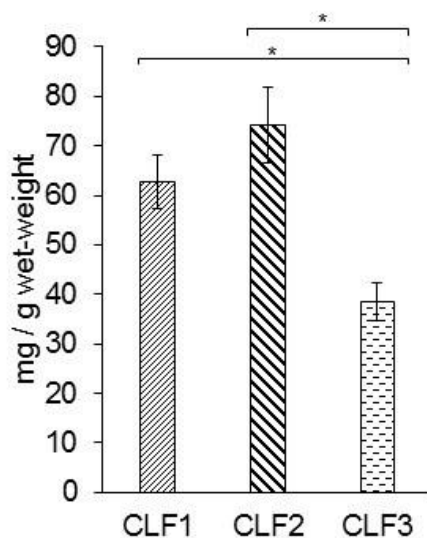


図 5-3 養殖ノリの全タンパク質含量

CLF1: 2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル、CLF2: 2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル、CLF3: 2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル

n=3、mean \pm S.D.、* $p < 0.05$

5-3-4 養殖ノリの低中分子画分の分析

養殖ノリの 1 M 酢酸抽出画分を逆相高速液体クロマトグラフィーで分離した (図 5-5)。どのサンプルのクロマトグラムにも、実験室において窒素欠乏培地で培養したサンプルでみられた Peak1、Peak2 は観察されなかった。

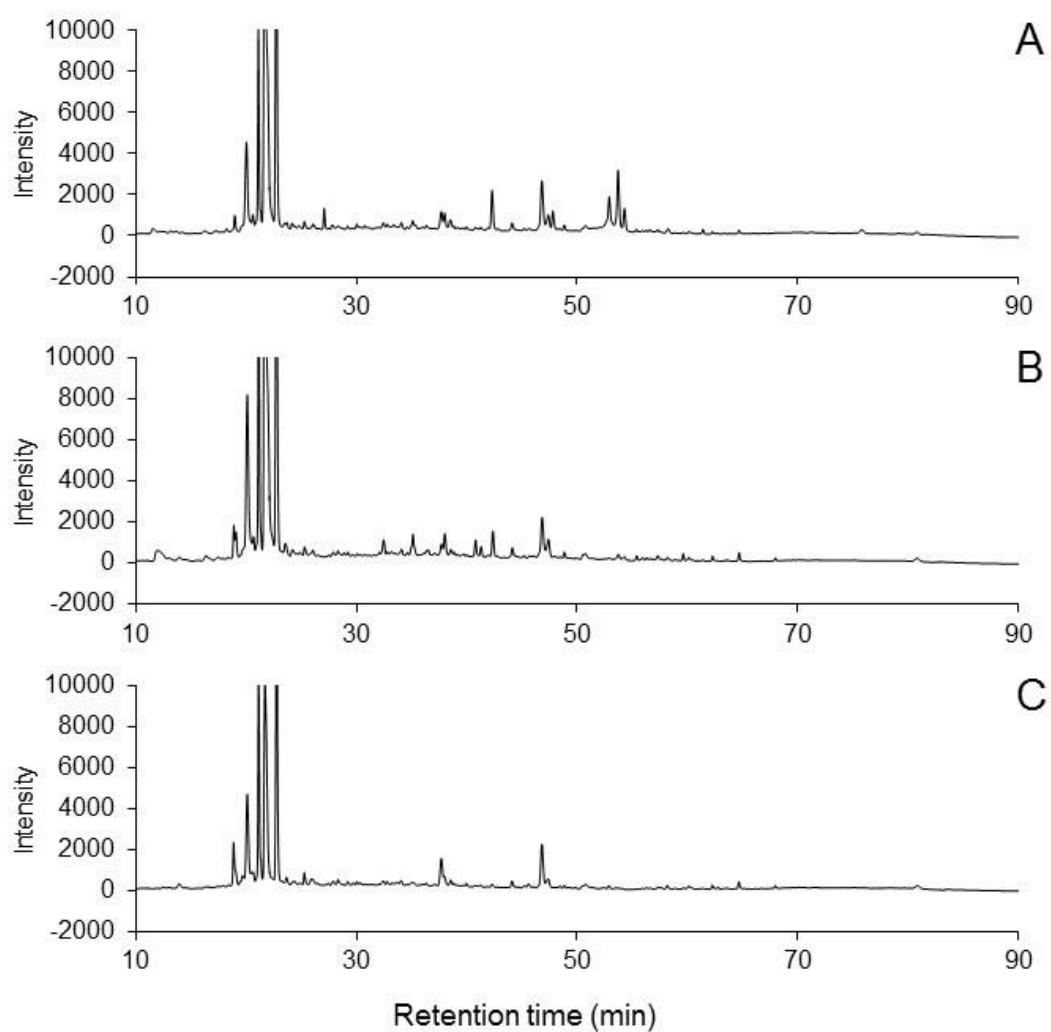


図 5-5 養殖ノリから抽出した低中分子画分の分離

養殖ノリサンプルの 1 M 酢酸抽出画分を逆相高速液体クロマトグラフィーで分離し、波長 280nm で検出した。CLF1：2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル、CLF2：2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル、CLF3：2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル

5-3-5 養殖ノリにおける栄養欠乏指標遺伝子の発現解析

第 3 章において窒素、リン、鉄欠乏サンプルにおいて特異的な発現誘導を示した遺伝子について、養殖ノリサンプルにおける発現量を調べた (図 5-6)。比較のため、実験室において通常培地で前培養したサンプル(Ctrl_0d)における発現量を 1 としたときの相対的発現量を示した。*PyNRT* および *PyNAR* の発現量は養殖ノリサンプルにおいて高く、互いに有意な差はなかった。*PyAMT1* の発現量は CLF1、CLF2 において有意に低かった。*PyPIT3* の発現量は CLF3 で有意に高く、*PyAPH* の発現量は CLF3 で高い傾向がみられた。*PyFTR2*、*PyFEA* の発現量には互いに有意な差はなかった。

5-3-6 養殖ノリにおける光合成色素タンパク質遺伝子の発現解析

養殖ノリサンプルにおける光合成色素遺伝子の発現量を調べた (図 5-7)。比較のため、実験室において通常培地で前培養したサンプル(Ctrl_0d)における発現量を 1 としたときの相対的発現量を示した。*PyCpeA* の発現量は CLF3 で低い傾向がみられた。*PyCpcB*、*PyApcA* の発現量は CLF1、CLF2、CLF3 の順に低下する傾向がみられた。*PyPsaA*、*PyPsbA* の発現量は CLF2、CLF3 で CLF1 と比較して有意に低かった。*PyPsbA* の発現量は養殖ノリサンプルにおいて高い傾向がみられた。

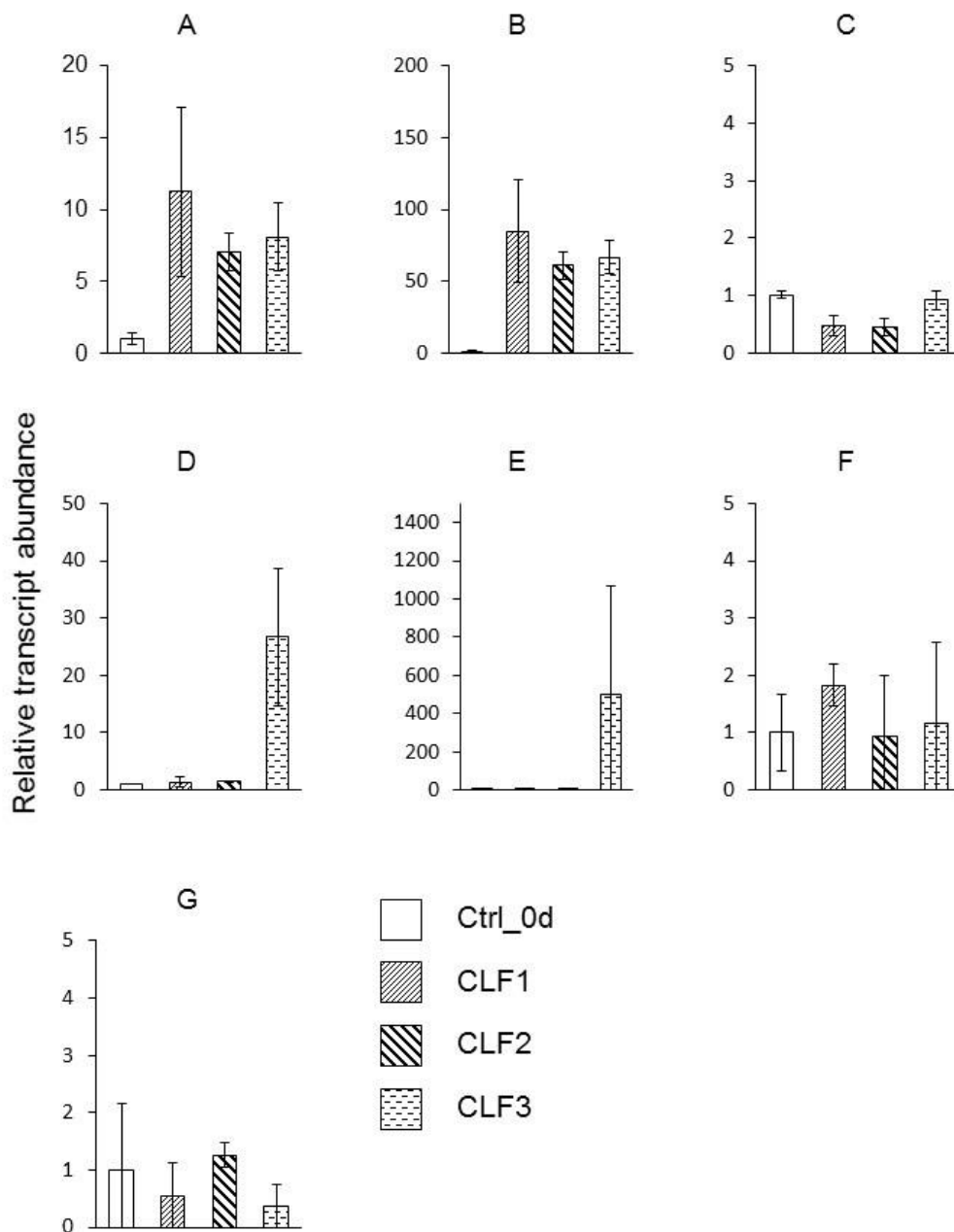


図 5-6 養殖ノリの栄養欠乏指標遺伝子の発現量

Ctrl_0d : 実験室において通常培地で生育したノリサンプル

CLF1 : 2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル、CLF2 : 2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル、CLF3 : 2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル、

A : *PyNRT*, B : *PyNAR*, C : *PyAMT1*, D : *PyPIT3*, E : *PyAPH*, F : *PyFTR2*, G : *PyFEA*
n = 3、mean ± S.D.

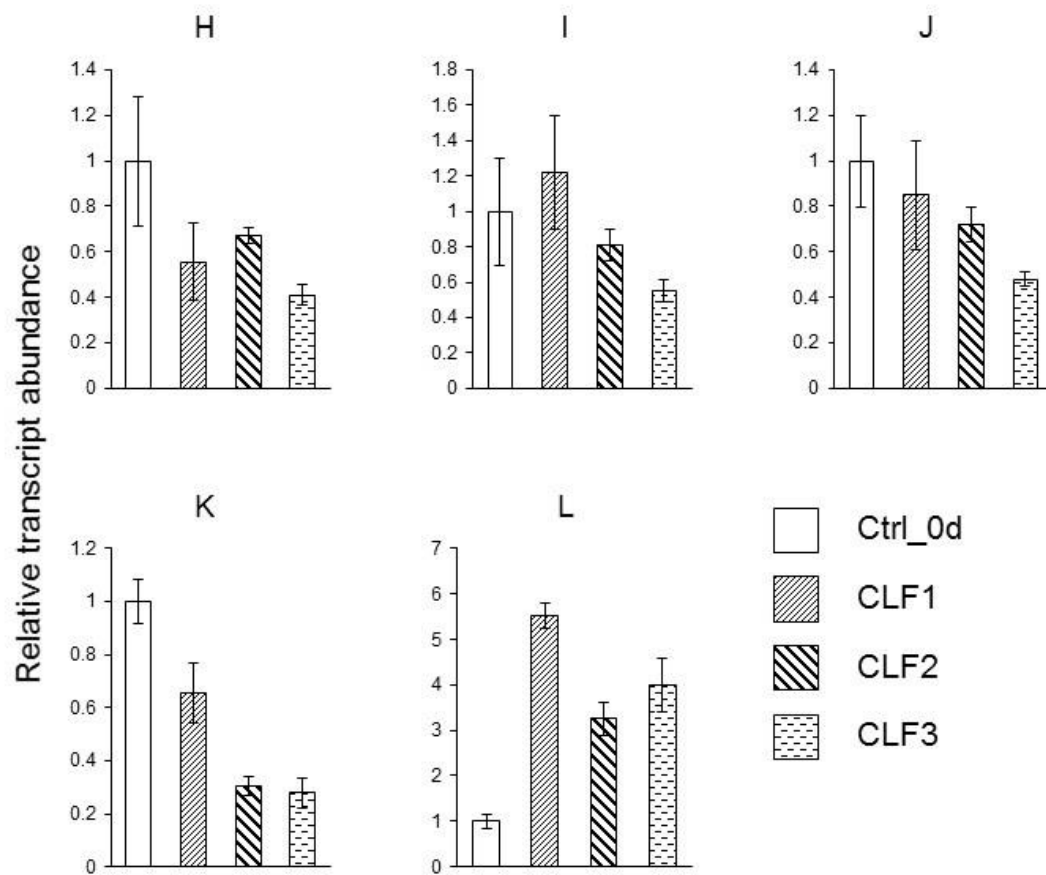


図 5-7 養殖ノリの光合成色素タンパク質遺伝子の発現量

Ctrl_0d : 実験室において通常培地で前培養したスサビノリ葉状体サンプル

CLF1 : 2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル。CLF2 : 2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル。CLF3 : 2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル。

H : *PyCpeA*, I : *PyCpcB*, J : *PyApcA*, K : *PyPsaA*, L : *PyPsbA*

n = 3、mean \pm S.D.

5-3-7 養殖ノリの金属濃度測定

養殖ノリサンプルの鉄・亜鉛濃度を測定した（図 5-8）。鉄濃度は CLF1 で最も高く、CLF3 で最も低かった。亜鉛濃度は CLF2 で最も高く、CLF3 で最も低かった。

5-3-8 養殖ノリのリン濃度測定

養殖ノリサンプルのリン含量を測定した（図 5-9）。リン濃度は CLF2 で最も高く、CLF3 で最も低かった。CLF3 のリン含量は CLF1 の半分以下、CLF2 の約 4 分の 1 だった。

5-3-9 養殖ノリ粗抽出液の ^1H NMR

養殖ノリ粗抽出液の ^1H NMR を測定した（図 5-10）。第 2 章の結果からアラニンと推定された化学シフト 1.38 ppm のダブレットのピーク強度にサンプル間で差がみられた。このピーク強度は、CLF2 で最も高く、CLF3 で最も低かった。また、CLF3 ではクエン酸に由来するピーク(2.62, 2.78 ppm)がみられた。これらのピークは他の二つのサンプルでは確認できなかった。

5-3-10 養殖ノリの ^{31}P NMR

養殖ノリの粗抽出液の ^{31}P NMR を測定した（図 5-11）。CLF1 では遊離の無機リン酸のピーク強度は、実験室において通常培地で培養したサンプルと同程度であったが、ポリリン酸の濃度は比較して低い値となった。CLF2 では遊離の無機リン酸のピーク強度、ポリリン酸のピーク強度ともに CLF1 より高く、実験室において通常培地で培養したサンプルと同程度の強度を示した。CLF3 では遊離の無機リン酸のピーク強度は、他の二つのサンプルと比較して低く、またポリリン酸のピークは確認できなかった。

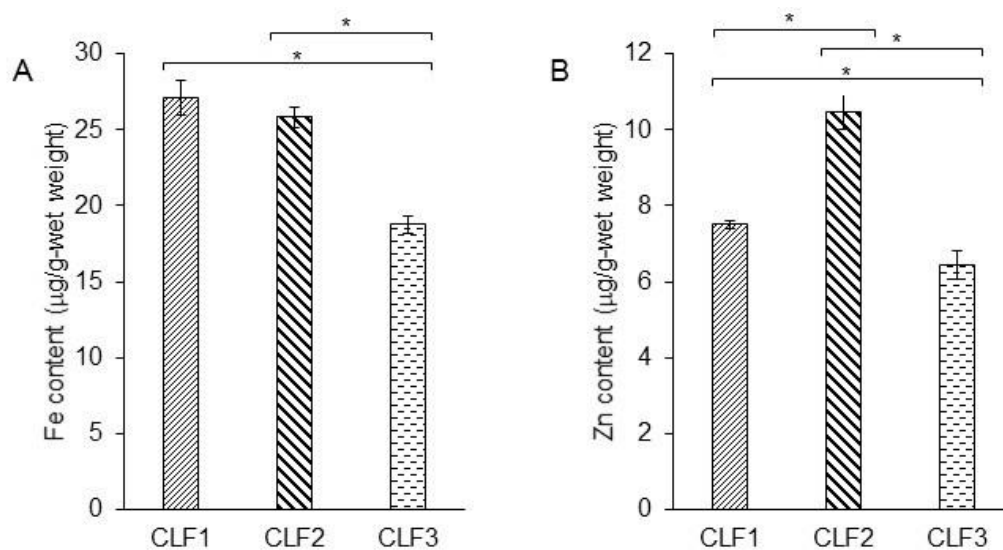


図 5-8 養殖ノリの鉄・亜鉛含量

A : 養殖ノリサンプルの鉄含量 B : 養殖ノリサンプルの亜鉛含量

CLF1 : 2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル。CLF2 : 2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル。CLF3 : 2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル。

n = 3, mean ± S.D. *p < 0.05

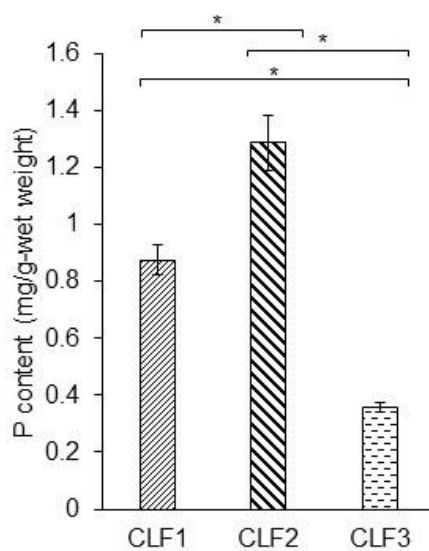


図 5-9 養殖ノリのリン含量

CLF1 : 2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル。CLF2 : 2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル。CLF3 : 2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル。

n = 3, mean ± S.D. *p < 0.05

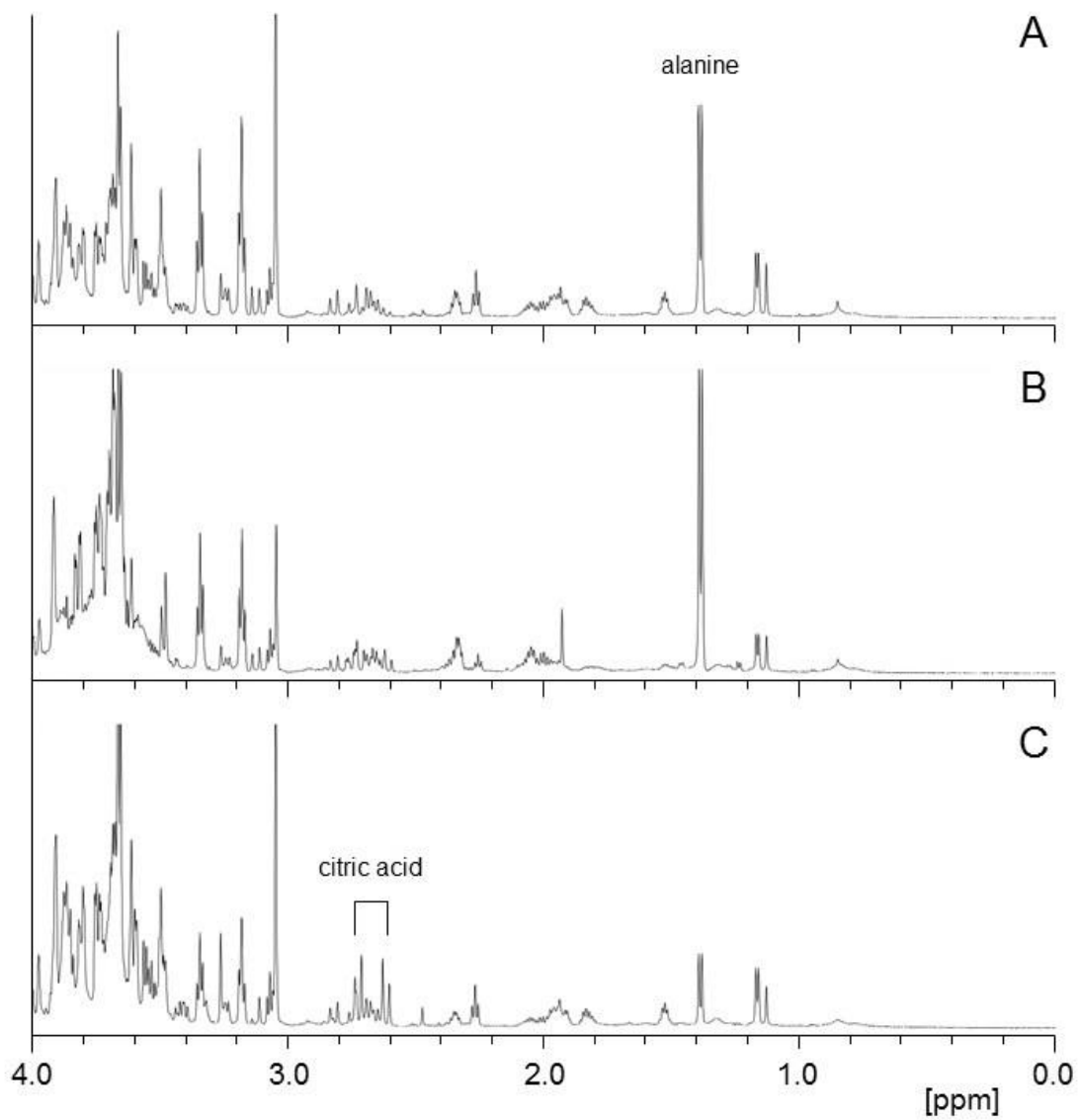


図 5-10 養殖ノリ粗抽出液の ^1H NMR

CLF1 : 2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル、CLF2 : 2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル、CLF3 : 2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル

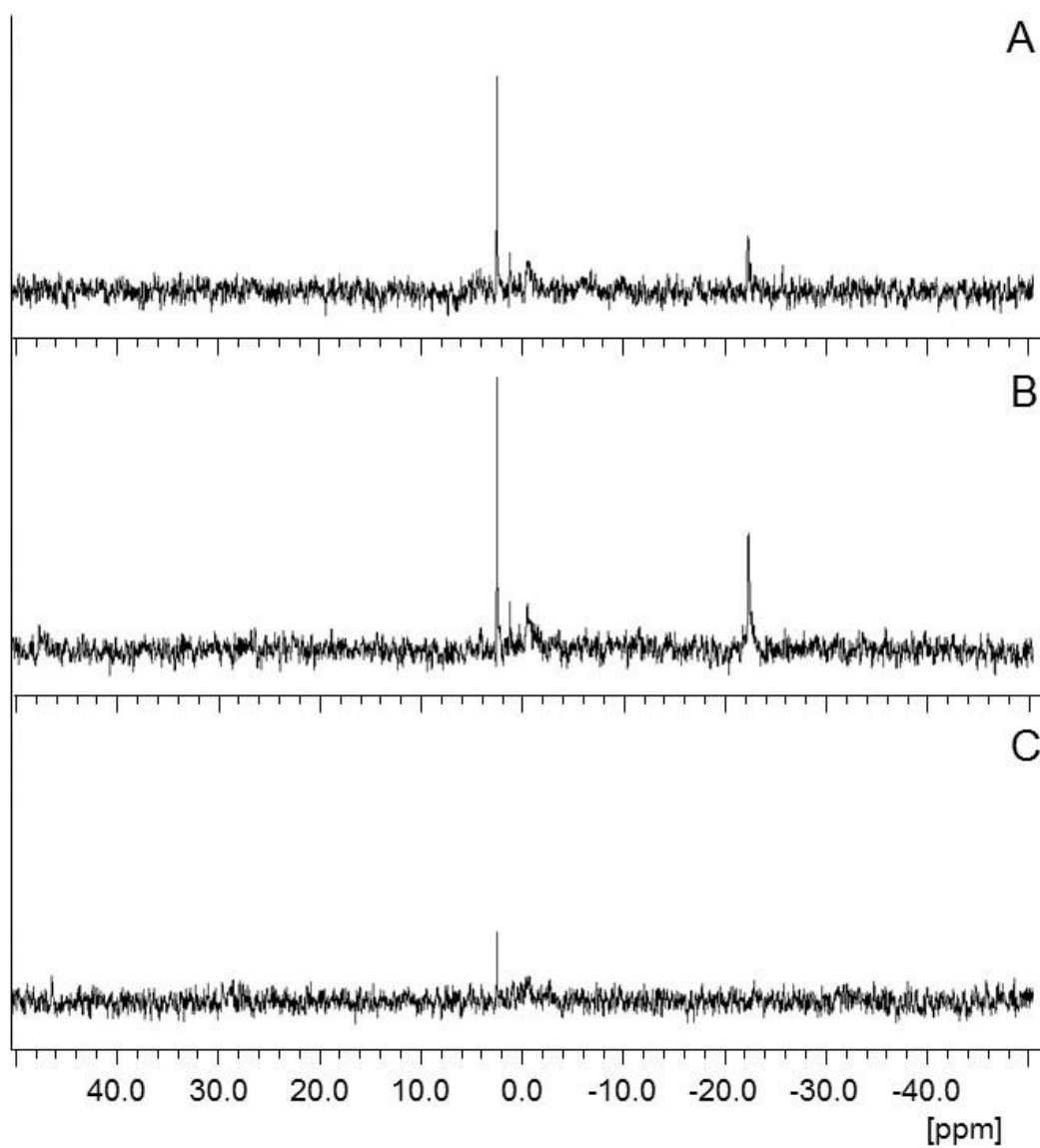


図 5-11 養殖ノリの ^{31}P -NMR

A: CLF、2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル。B: CLF、2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル。C: CLF3、2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル。

5-3-11 養殖ノリの遊離アミノ酸分析

養殖ノリサンプルの遊離アミノ酸の含量を測定した（図 5-12）。相対的に含量が高いアラニン、グルタミン酸、グリシン、タウリン、アスパラギン酸、セリン、シトルリンにおいては、CLF2 のサンプルでもっとも高く、CLF3 で最も低い値を示す傾向がみられた。CLF3 のサンプルのアラニン含量は他二つのサンプルと比較して有意に低い値を示した。4 月採取のサンプルではシステイン、シスタチオン、 α -アミノアジピン酸が他二つのサンプルと比較して有意に高い値を示した。プロリンは、実験室で培養したスサビノリ葉状体サンプルにおいては高濃度に含まれたが、養殖ノリサンプルでは検出限界以下の含量であった。遊離アンモニアの含量は、全ての養殖ノリサンプルでほぼ変化がなかった。

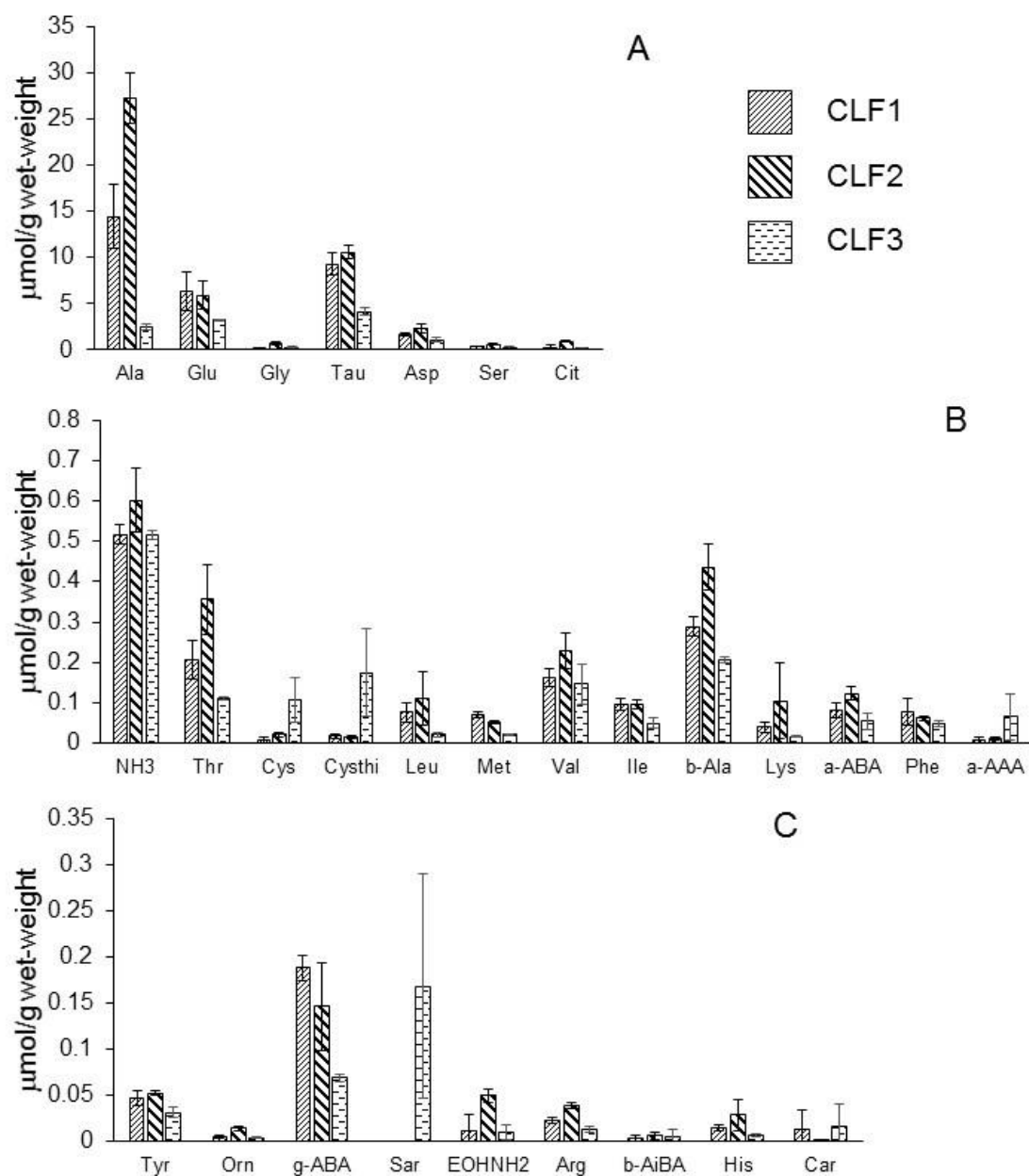


図 5-12 養殖ノリの遊離アミノ酸含量

CLF1 : 2015 年 2 月 4 日に採取したサンプル。CLF2 : 2015 年 3 月 10 日に採取したサンプル。CLF3 : 2015 年 4 月 6 日に採取したサンプル。

図の A、B、C は縦軸の調整の為便宜的にグラフを分けた。

図中のアミノ酸の略号については表 4-1 に記載した。

n = 3, mean ± S.D.

図中のバーのないものは、3 つの測定値が全て検出限界以下だった。検出限界以下だった測定値が 1 つまたは 2 つ含まれていたサンプルについては、その測定値を検出限界である 0.003 nmol/injection(900 nmol/g wet-weight)として、平均値及び誤差を算出した。

5-4 考察

本章では、同じ養殖場で異なる時期に採取した 3 種類の養殖ノリ（CLF1、CLF2、CLF3）について分析を行った。目視の観察で CLF3 が最も色が薄く、光合成色素含量の分析結果もこの観察と一致した。このことから CLF3 を「色落ち」ノリのモデルとして考え、以降の考察を行った。

遺伝子発現の解析結果から、CLF3 では他の 2 サンプルに比べて、リン欠乏の指標遺伝子である *PyPIT3* の発現量が有意に高いこと、有意差はないが *PyAPH* の発現量が高い傾向があることが確認された。これは、実験室において通常培地で培養したサンプルと比較しても高い値だった。その他の栄養欠乏の指標遺伝子の発現量については 3 つのサンプルの間で特徴的な差は見られなかった。このことから、CLF3 では CLF1、CLF2 と比較してリンが欠乏していることが示唆された。一方、すべての養殖ノリサンプルにおいて *PyNRT*、*PyNAR* の発現量が、研究室において通常培地で培養したノリに比べて高い値を示した。この発現量は、実験室において窒素欠乏培地で 3 日間培養したノリにおける発現量とほぼ同じ程度であり、このことから養殖ノリが硝酸欠乏にさらされていることが推察された。しかし、*PyAMT1* の発現量は実験室において通常培地で培養したノリとの発現量と同程度かそれよりも低く、発現誘導は見られなかった。窒素欠乏培地では、*PyAMT1* の発現にも誘導が見られたことから、この発現パターンは窒素欠乏の発現パターンとは異なる。そこで、このような発現パターンを示す栄養状態として硝酸態窒素の供給がなく、アンモニア態窒素が十分にある条件を検討した。しかし、第 3 章の実験から、培地中の窒素が硝酸態・アンモニア態のいずれかのみの場合でも、*PyNRT*、*PyNAR*、*PyAMT1* の発現誘導は起こらないことが示された。このことから、養殖ノリサンプルにおける窒素関連遺伝子の発現パターンは、この条件（硝酸欠乏・アンモニア十分）では説明できないことが示された。ただし、今回の実験においては、硝酸態窒素、アンモニア態窒素ともに充分または無添加の二つの条件しか検討していない。*PyAMT1* の発現誘導が生じないが、*PyNAR*、*PyNRT* の発現が誘導されるような、アンモニア態窒素の濃度条件が存在する可能性は否定できない。

養殖ノリサンプルにおける窒素関連遺伝子の発現パターンを実験室で再現することはできなかった。しかし、窒素欠乏の指標遺伝子の発現量は各サンプル間でほとんど変化が見られなかったことから、単なる窒素欠乏は CLF3 でのみ褪色がみられることを説明するものではない。他の 2 サンプルと異なり CLF3 でのみリン欠乏の指標遺伝子に誘導がみられたことから、CLF3 の色落ちの原因としてリンの欠乏が強く示唆された。

CLF3 においてリン欠乏が生じているという説を検証するため、前章までで検討した実験手法を用いて、養殖ノリサンプルの栄養状態を調べた。まず、鉄・亜鉛・リンの含量を ICP-OES によって測定した。亜鉛はスサビノリの生体内における濃度が鉄と比較的近い金属であることから、比較のため測定した。リンの含量は CLF3 で最も値が低く、CLF1 で最も値が高かった。この傾向は光合成色素含量と一致した。亜鉛含量もリンと同様の傾向を示した。鉄含量も CLF3 でもっとも低かったが、最も含量が高かったのは CLF1 であり、光合成色素含量の傾向とは異なった。これらのことから、CLF3 でリン含量が低下していることが明らかになったため、さらに ^{31}P -NMR により遊離のリン酸とポリリン酸のシグナルを確認した。CLF3 ではポリリン酸のピークは見られず、遊離のリン酸のピークも CLF1、CLF2 と比べ低かった。これは、実験室のリン欠乏のノリで見られた傾向で、CLF3 では貯蔵形態のリンが枯渇していることが推察された。また、CLF1 と CLF2 を比較すると CLF2 ではポリリン酸の蓄積が見られ、CLF2 がもっともリンの濃度が濃い環境で生育したことが示唆された。さらに、養殖ノリから抽出した中低分子画分を分析したところ、実験室の窒素欠乏でみられた Peak1、Peak2 はともに観測されなかった。また、粗抽出液の ^1H NMR においては、養殖ノリでは CLF3 でのみ、クエン酸のピークが確認された。実験室では、窒素欠乏条件で生育したノリではクエン酸の蓄積が生じたことから、CLF3 では窒素欠乏の影響が存在することが示唆された。また、アミノ酸分析の結果から、CLF3 ではシステイン、シスタチオン、 α -アミノアジピン酸の蓄積が生じていることがわかった。これら 3 種類のアミノ酸はいずれも、リン欠乏培地で培養したサンプルで蓄積が見られたアミノ酸である。以上のことから、CLF3 で

はリン欠乏が生じていると考えられる多くの結果が得られた。

東京湾のノリ養殖における色落ちの発生件数は、溶存窒素よりも溶存リンの濃度との相関が高いという報告がなされている（石井ら、2008）。今回、色落ちを示した養殖ノリのサンプルについて、リン欠乏を強く示唆する結果が得られたが、これはこの報告と一致する結果となった。ただ、実験室における栄養欠乏実験では、リン欠乏で引き起こされる光合成色素含量の低下は、窒素欠乏によるものと比べて、緩やかであった。一方、色落ちは2、3日のうちに比較的急速に起こるとされており、リン欠乏だけではこの急激な褪色を説明することは難しい。CLF3においてはクエン酸の蓄積もみられたことから、CLF3の色落ちでは窒素欠乏の影響も存在している可能性も考えられた。サンプル採取時と同期して養殖現場近くで採取された海水の成分分析（表 5-1）によると、CLF3を採取した時点では、海水中の溶存窒素、溶存リンの濃度はどちらも大きく低下していることが分かる。CLF3を採取した漁期の後半には、東京湾では慢性的にリンが不足しており、突発的に生じる窒素欠乏により急速な色落ちが生じるなど、窒素とリンの欠乏が複合的に色落ちを引き起こしている可能性が考えられる。窒素の影響の大きさなど不明な点はまだ多いが、今回分析した養殖ノリサンプルから、リン欠乏が色落ちの原因であることの有力な証拠がいくつか得られたことは、大きな進展であると考えられる。

表 5-1 養殖ノリ採取時の現場海水の成分分析

採取日	pH	TOC	NH ₄ -N	NO ₂ -N	NO ₃ -N
単位		mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
2015/2/2	7.82	1.05	<0.01	0.03	0.24
2015/3/10	7.99	1.00	<0.01	<0.01	0.21
2015/4/6	8.01	1.38	<0.01	<0.01	0.03
採取日	DIN	PO ₄ -P	Fe	Chlorophyll <i>a</i>	
単位	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	
2015/2/2	0.27	0.016	<0.5	6.07	
2015/3/10	0.21	0.022	<0.5	0.91	
2015/4/6	0.03	0.006		4.29	

養殖ノリサンプルと同期してサンプリングした現場海水の成分分析。新日鐵住金の小杉千佳博士より提供。採取日：海水サンプルをサンプリングしたに年月日。TOC：全有機炭素。NH₄-N：アンモニア態の窒素濃度。NO₂-N：亜硝酸態の窒素濃度。NO₃-N：硝酸態の窒素濃度。DIN：溶存無機窒素濃度。PO₄-P：リン酸態のリン濃度。Fe：鉄濃度。Chlorophyll *a*：クロロフィル *a* 濃度。

第 6 章

総括

第6章 総括

本研究では、養殖ノリにおける「色落ち」という実際的な問題から、スサビノリの栄養欠乏応答に着目して実験を行った。藻類は単細胞から多細胞まで進化的に非常に多様性に富んでいるが、現在研究が進んでいる種はほとんど一部のモデル生物、特に単細胞藻類に限られている。また、陸上植物に比べて海洋性の植物の研究は不足している。それゆえ、本研究で得られたスサビノリの栄養欠乏応答に関する知見は、多細胞性の藻類や海洋性の植物を対照とした研究を進めていくうえで、基本的な情報として有用であると考えられる。

窒素欠乏によって生じる光合成色素、特にフィコビリンの急速な減少は、生物学的には非常に興味深い現象である。同様の現象がシアノバクテリアで知られており、シアノバクテリアでは窒素欠乏下でのフィコビリソームの分解について多くの研究がおこなわれてきた。しかし、この現象に関わる遺伝子(*NblA*)の特定がなされて以降、詳細な分子メカニズムの解明に至っていない。スサビノリに *NblA* と類似の遺伝子が存在することは、スサビノリとシアノバクテリアに共通するフィコビリソーム、フィコビリタンパク質の分解の仕組みの存在を示唆していた。しかし第3章の実験結果から、その遺伝子の発現様式が両者で異なることが明らかになった。スサビノリにおけるこの遺伝子の役割は不明であり、スサビノリにおけるフィコビリソームの分解の仕組みについて手がかりは得られなかった。それゆえ第2章では、スサビノリの窒素欠乏におけるフィコビリソーム、フィコビリタンパク質の分解について新しい知見が得るべく実験を行った。特に、シアノバクテリアにおける *NblA* のように窒素欠乏時に蓄積する因子を探索した。しかし、二次元電気泳動の結果からは有意な差は得られなかった。そこで、分子量の小さい成分に注目し、分析を行った。その結果、逆相クロマトグラフィーにおいて、波長 265 nm に極大吸収をもつピーク(Peak1, Peak2)が、窒素欠乏サンプルに特異的に観察された。これらのピークが窒素欠乏時の生理的応答について新しい手がかりを与えるものだと考えた。そこで、それらのピークに含まれる物質の同定を目指したが、部分構造についてある程度情報を得ることができたものの同定には至らなかった。これは、サンプルに含まれる量が非

常に少なく、分析に十分な量を精製するのに必要なスサビノリ葉状体試料を得ることが困難であったためである。特に ^{13}C NMR を用いた構造決定を行うためには、今回の実験で使用した試料の 10 倍以上の量が必要になると推定された。窒素欠乏で蓄積する分子量が 1,800 程度の物質についてスサビノリでこれまで報告がないことから、この物質は新規なものである可能性が高いと考えられた。NMR で得られた部分構造から、フィコビリタンパク質に関連した分解産物などである可能性も考えられた。この物質を同定することで、スサビノリの窒素欠乏時の生理的応答を解明するうえで、大きな手がかりとなる知見を得られるのではないかと考えている。

実験室で得られたスサビノリの栄養欠乏に関する知見を、第 5 章では東京湾のノリ養殖場で採取したサンプルに応用することで、リン欠乏が色落ちの原因として強く示唆される結果を得ることができた。この結果は、東京湾における海水中のリン濃度と色落ちの相関関係に関する報告（石井ら、2008）を支持する結果となった。これまでの色落ちの研究は主に、環境中の栄養塩濃度との相関を調べる間接的な手法を用いて行われてきた。しかし、海水の分析は時間的、空間的に限られたサンプルを分析せざるを得ず、流れがある海洋で絶えず変動する栄養塩濃度を正確に定量することは難しい。さらに、海水中の栄養塩濃度を測定しても、その栄養塩濃度を環境中の生体がどのように感じるか（充分であるか、不足であるかなど）を評価することはできない。そうした手法では栄養欠乏と色落ちの相関関係をみることはできても、因果関係を議論することは難しいという問題点があった。そこで本研究では、スサビノリ生体中の生理状態を解析するという新しいアプローチを採用した。それにより色落ちにおけるリン欠乏の影響を強く示唆する、より直接的な証拠を得た。この点で、本研究には価値があると考えられる。またこれまでの研究では養殖ノリだけを分析対象にしていることが多く、その結果の一般性に乏しかった。一方、本研究で検討した栄養欠乏を判断する指標は、実験室において管理された条件下で培養したスサビノリに対する分析に基づいている。そのため、これらの手法は今回分析したサンプルに限らず、別の養殖ノリサンプルにも応用することが可能である。今回の結果は、一

つの地点における一漁期限りのサンプルによるものである。リン欠乏という原因が、ノリの色落ちに普遍的なものであるかを検証するためには、分析するサンプルの採取地点と時期を増やしてデータを取る必要があるだろう。実際に、東京湾と異なり瀬戸内海や有明海におけるノリ養殖では、窒素欠乏が色落ちの原因であると考えられていることから（反田ら、2014）（熊谷と内藤、2007）、色落ちには複数の原因が存在する可能性が高いと考えられる。今後、本研究で検討した手法を用いることで、色落ちの原因を特定することができれば、その発生原因によって色落ちを分類することが可能になる。そうすれば、色落ちという感覚的に括られていた現象が整理され、より科学的に説明することが可能になるのではないかと期待される。色落ちの原因の解明は、それだけで色落ちの対策につながるわけではない。しかし、原因を知ることは対策への第一歩であり、本研究の結果はノリ養殖の今後に役立つものであると考える。

参考文献一覽

- ALBEN, E. & ERKMEN, O. 2004. Production of citric acid from a new substrate, undersized semolina, by *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology*, 42, 19-22.
- ALLEN, M. D., DEL CAMPO, J. A., KROPAT, J. & MERCHANT, S. S. 2007. FEA1, FEA2, and FRE1, encoding two homologous secreted proteins and a candidate ferrireductase, are expressed coordinately with FOX1 and FTR1 in iron-deficient *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6, 1841-1852.
- BARBIER, G., OESTERHELT, C., LARSON, M. D., HALGREN, R. G., WILKERSON, C., GARAVITO, R. M., BENNING, C. & WEBER, A. P. M. 2005. Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant Physiology*, 137, 460-474.
- BHATTACHARYA, D., PRICE, D. C., CHAN, C. X., QIU, H., ROSE, N., BALL, S., WEBER, A. P. M., ARIAS, M. C., HENRISSAT, B., COUTINHO, P. M., KRISHNAN, A., ZAUNER, S., MORATH, S., HILLIOU, F., EGIZI, A., PERRINEAU, M. M. & YOON, H. S. 2013. Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nature Communications*, 4, 10.

- BLABY-HAAS, C. E. & MERCHANT, S. S. 2012. The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1823, 1531-1552.
- BREUS, N. A., RYAZANOVA, L. P., SUZINA, N. E., KULAKOVSKAYA, N. V., VALIAKHMETOV, A. Y., YASHIN, V. A., SOROKIN, V. V. & KULAEV, I. 2011. Accumulation of inorganic polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae* under nitrogen deprivation: Stimulation by magnesium ions and peculiarities of localization. *Microbiology*, 80, 624-630.
- BROMKE, M. A., GIAVALISCO, P., WILLMITZER, L. & HESSE, H. 2013. Metabolic analysis of adaptation to short-term changes in culture conditions of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plos One*, 8, 11.
- BUNDI, A. & WUTHRICH, K. 1979. H-1-NMR parameters of the common amino-acid residues measured in aqueous-solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers*, 18, 285-297.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T. & PFAFFL, M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 597-601.
- CHAPMAN, D. J., COLE, W. J. & SIEGELMA, H. W. 1967. Structure of phycoerythrobilin. *Journal of the American Chemical Society*, 89, 5976-&.
- CHOPIN, T., MORAIS, T., BELYEA, E. & BELFRY, S. 2004. Polyphosphate

and siliceous granules in the macroscopic gametophytes of the red alga *Porphyra purpurea* (Bangiophyceae, Rhodophyta). *Botanica Marina*, 47, 272-280.

CHUNG, C. C., HWANG, S. P. L. & CHANG, J. 2003. Identification of a high-affinity phosphate transporter gene in a prasinophyte alga, *Tetraselmis chui*, and its expression under nutrient limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 754-759.

COLE, W. J., CHAPMAN, D. J. & SIEGELMA.HW 1967. Structure of phycocyanobilin. *Journal of the American Chemical Society*, 89, 3643-&.

COLLEN, J., PORCEL, B., CARRE, W., BALL, S. G., CHAPARRO, C., TONON, T., BARBEYRON, T., MICHEL, G., NOEL, B., VALENTIN, K., ELIAS, M., ARTIGUENAVE, F., ARUN, A., AURY, J. M., BARBOSA-NETO, J. F., BOTHWELL, J. H., BOUGET, F. Y., BRILLET, L., CABELLO-HURTADO, F., CAPELLA-GUTIERREZ, S., CHARRIER, B., CLADIERE, L., COCK, J. M., COELHO, S. M., COLLEONI, C., CZJZEK, M., DA SILVA, C., DELAGE, L., DENOEUDE, F., DESCHAMPS, P., DITTAMI, S. M., GABALDON, T., GACHON, C. M. M., GROISILLIER, A., HERVE, C., JABBARI, K., KATINKA, M., KLOAREG, B., KOWALCZYK, N., LABADIE, K., LEBLANC, C., LOPEZ, P. J., MCLACHLAN, D. H., MESLET-CLADIERE, L., MOUSTAFA, A., NEHR, Z., COLLEN, P. N., PANAUD, O., PARTENSKY, F., POULAIN, J., RENSING, S. A., ROUSVOAL, S., SAMSON, G., SYMEONIDI, A., WEISSENBAACH, J., ZAMBOUNIS, A., WINCKER, P. & BOYEN, C. 2013. Genome

structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 5247-5252.

COLLIER, J. L. & GROSSMAN, A. R. 1992a. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp strain pcc-7942 - not all bleaching is the same. *Journal of Bacteriology*, 174, 4718-4726.

CRAWFORD, N. M. 1995. NITRATE - Nutrient and signal for plant-growth. *Plant Cell*, 7, 859-868.

CRAWFORD, N. M. & GLASS, A. D. M. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3, 389-395.

CURIE, C. & BRIAT, J. F. 2003. Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 183-206.

DAWSON, M. J., GADIAN, D. G. & WILKIE, D. R. 1977. Contraction and recovery of living muscles studied by P-31 nuclear magnetic-resonance. *Journal of Physiology-London*, 267, 703-735.

FERNANDEZ, E. & GALVAN, A. 2007. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2279-2287.

GLASS, A. D. M., BRITTO, D. T., KAISER, B. N., KINGHORN, J. R., KRONZUCKER, H. J., KUMAR, A., OKAMOTO, M., RAWAT, S.,

- SIDDIQI, M. Y., UNKLES, S. E. & VIDMAR, J. J. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 855-864.
- GROSSMAN, A. R., SCHAEFER, M. R., CHIANG, G. G. & COLLIER, J. L. 1993. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental-conditions. *Microbiological Reviews*, 57, 725-749.
- HAN, S. W., NAHAS, E. & ROSSI, A. 1987. Regulation of synthesis and secretion of acid and alkaline-phosphatases in neurospora-crassa. *Current Genetics*, 11, 521-527.
- HELL, R. & STEPHAN, U. W. 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 216, 541-551.
- IMAMURA, S., KANESAKI, Y., OHNUMA, M., INOUE, T., SEKINE, Y., FUJIWARA, T., KUROIWA, T. & TANAKA, K. 2009. R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in Cyanidioschyzon merolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 12548-12553.
- JEONG, J. & CONNOLLY, E. L. 2009. Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant Science*, 176, 709-714.
- KAKINUMA, M., COURY, D., NAKAMOTO, C., SAKAGUCHI, K. & AMANO, H. 2008. Molecular analysis of physiological responses to

changes in nitrogen in a marine macroalga, *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Cell Biology and Toxicology*, 24, 629-639.

KAWAKAMI, T., SAKAGUCHI, K., TAKECHI, K., TAKANO, H. & TAKIO, S. 2009. Ammonium Induced Expression of the Red Algal Chloroplast Gene Ycf18, a Putative Homolog of the Cyanobacterial NblA Gene Involved in Nitrogen Deficiency-Induced Phycobilisome Degradation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73, 740-743.

KITADE, Y., FUKUDA, S., NAKAJIMA, M., WATANABE, T. & SAGA, N. 2002. Isolation of a cDNA encoding a homologue of actin from *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 14, 135-141.

KITADE, Y., YAMAZAKI, S. & SAGA, N. 1996. A method for extraction of high molecular weight DNA from the macroalga *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 32, 496-498.

KODA, M., FURIHATA, K., WEI, F. F., MIYAKAWA, T. & TANOKURA, M. 2012. Metabolic discrimination of mango juice from various cultivars by band-selective NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1158-1166.

KROUK, G., TILLARD, P. & GOJON, A. 2006. Regulation of the high-affinity NO₃⁻ uptake system by NRT1.1-mediated NO₃⁻ demand signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142, 1075-1086.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene

expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25, 402-408.

MATSUZAKI, M., MISUMI, O., SHIN-I, T., MARUYAMA, S., TAKAHARA, M., MIYAGISHIMA, S. Y., MORI, T., NISHIDA, K., YAGISAWA, F., YOSHIDA, Y., NISHIMURA, Y., NAKAO, S., KOBAYASHI, T., MOMOYAMA, Y., HIGASHIYAMA, T., MINODA, A., SANO, M., NOMOTO, H., OISHI, K., HAYASHI, H., OHTA, F., NISHIZAKA, S., HAGA, S., MIURA, S., MORISHITA, T., KABEYA, Y., TERASAWA, K., SUZUKI, Y., ISHII, Y., ASAKAWA, S., TAKANO, H., OHTA, N., KUROIWA, H., TANAKA, K., SHIMIZU, N., SUGANO, S., SATO, N., NOZAKI, H., OGASAWARA, N., KOHARA, Y. & KUROIWA, T. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*, 428, 653-657.

MINAMINO, N., TANAKA, J., KUWAHARA, H., KIHARA, T., SATOMI, Y., MATSUBAE, M. & TAKAO, T. 2003. Determination of endogenous peptides in the porcine brain: possible construction of Peptidome, a fact database for endogenous peptides. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 792, 33-48.

MUCHHAL, U. S. & RAGHOTHAMA, K. G. 1999. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 5868-5872.

NAGASAKA, S. & YOSHIMURA, E. 2008. External iron regulates

polyphosphate content in the acidophilic, thermophilic alga *Cyanidium caldarium*. *Biological Trace Element Research*, 125, 286-289.

NAGY, J. O., BISHOP, J. E., KLOTZ, A. V., GLAZER, A. N. & RAPOPORT, H. 1985. Bilin attachment sites in the alpha-subunits, beta-subunits, and gamma-subunits of r-phycoerythrin - structural studies on singly and doubly linked phycourobilins. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 4864-4868.

NAKAMURA, Y. & IKAWA, T. 1993. Purification and properties of nadh - nitrate reductase from the red alga *Porphyra yezoensis*. *Plant and Cell Physiology*, 34, 1239-1249.

NAKAMURA, Y., SASAKI, N., KOBAYASHI, M., OJIMA, N., YASUIKE, M., SHIGENOBU, Y., SATOMI, M., FUKUMA, Y., SHIWAKU, K., TSUJIMOTO, A., KOBAYASHI, T., NAKAYAMA, I., ITO, F., NAKAJIMA, K., SANO, M., WADA, T., KUHARA, S., INOUE, K., GOJOBORI, T. & IKEO, K. 2013. The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, susabi-nori (*Pyropia yezoensis*). *Plos One*, 8, 11.

NIWA, K., FURUITA, H. & YAMAMOTO, T. 2008. Changes of growth characteristics and free amino acid content of cultivated *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales Rhodophyta) blades with the progression of the number of harvests in a nori farm. *Journal of Applied Phycology*, 20, 687-693.

- OHHAMA, T., SIEBELT, F., FURIHATA, K., SETO, H., MIYACHI, S. & OHMORI, M. 1986. P-31-NMR studies on inorganic polyphosphates in microalgae. *Journal of Phycology*, 22, 485-490.
- ORSEL, M., FILLEUR, S., FRAISIER, V. & DANIEL-VEDELE, F. 2002. Nitrate transport in plants: which gene and which control? *Journal of Experimental Botany*, 53, 825-833.
- OSANAI, T., OIKAWA, A., SHIRAI, T., KUWAHARA, A., IIJIMA, H., TANAKA, K., IKEUCHI, M., KONDO, A., SAITO, K. & HIRAI, M. Y. 2014. Capillary electrophoresis-mass spectrometry reveals the distribution of carbon metabolites during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Environmental Microbiology*, 16, 512-524.
- RICHAUD, C., ZABULON, G., JODER, A. & THOMAS, J. C. 2001. Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 183, 2989-2994.
- SCHACHTMAN, D. P., REID, R. J. & AYLING, S. M. 1998. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology*, 116, 447-453.
- SCHMIDT, W. 1999. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141, 1-26.
- SCHWARZ, R. & FORCHHAMMER, K. 2005. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex

- network of cellular responses. *Microbiology-Sgm*, 151, 2503-2514.
- WANG, L., MAO, Y. X., KONG, F. N., LI, G. Y., MA, F., ZHANG, B. L., SUN, P. P., BI, G. Q., ZHANG, F. F., XUE, H. F. & CAO, M. 2013. Complete sequence and analysis of plastid genomes of two economically important red algae: *pyropia haitanensis* and *Pyropia Yezoensis*. *Plos One*, 8, 10.
- WASE, N., BLACK, P. N., STANLEY, B. A. & DIRUSSO, C. C. 2014. Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling. *Journal of Proteome Research*, 13, 1373-1396.
- WATANABE, M. & IKEUCHI, M. 2013. Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynthesis Research*, 116, 265-276.
- YAMANAKA, G. & GLAZER, A. N. 1980. Dynamic aspects of phycobilisome structure - phycobilisome turnover during nitrogen starvation in *Synechococcus* sp. *Archives of Microbiology*, 124, 39-47.
- YOSHIMURA, K., KOSUGI, C., IMURA, Y., KATO, T., SUZUKI, M. & YOSHIMURA, E. 2016. Sample Preparation of the Macro Alga *Pyropia yezoensis* for the Determination of Messenger RNA. *Analytical letters*,
- YUAN, L. X., LOQUE, D., KOJIMA, S., RAUCH, S., ISHIYAMA, K., INOUE, E., TAKAHASHI, H. & VON WIREN, N. 2007. The

organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell*, 19, 2636-2652.

石井光廣、長谷川健一、松山幸彦、2008、東京湾のノリ生産に影響を及ぼす環境要因：栄養塩の長期変動および最近の珪藻赤潮発生、水産海洋研究 72: 22-29

石塚量見、池内昌彦、2009、フィコビリンの単離と分析、低温科学、67: 355-358

植木 知佳、村上 明男、加藤 敏朗、嵯峨 直恆、本村 泰三、2010、紅藻スサビノリの光合成色素と葉緑体微細構造における栄養欠乏応答、日本水産学会誌、76:375-382

熊谷 香、内藤 剛、2007、有明海福岡県地先への栄養塩供給量の動向、福岡県水産海洋技術センター研究報告 17: 73-80.

近藤久益子、佐藤,桃子、広瀬侑、渡邊麻衣、池内昌彦、2009、フィコビリソーム、低温科学、67: 295-301

斎藤 宗勝、荒木 繁、桜井 武磨、大房 剛、1975、乾海苔における光合成色素含量および全窒素・全遊離アミノ酸・全遊離糖含量の時期的変動と産地間の相違、日本水産学会誌 41: 365-370

嵯峨 直恆、2008、水産科学のためのモデル植物としてのスサビノリ、日本水産学会誌 74: 363-366.

反田 實、赤繁 悟、有山啓之、山野井英夫、木村 博、團 昭紀、坂本 久、

佐伯康明、石田祐幸、壽 久文、山田卓郎、2014、瀬戸内海の栄養塩環境と漁業、水産技術 7: 37-46.

張 経華、佐藤 友規、丸山 亮馬、高尾 雄二、畝中 佑、藤田 雄二、山崎 素直、2009、有明海のノリの色落ちと微量元素欠乏ー特に鉄欠乏について、日本海水学会誌 63: 158-166.

土屋 靖彦、鈴木 芳夫、佐々木 劭、1961、底温による乾海苔貯蔵試験、日本水産学会誌 27: 919-933.

平田 孝、石谷 孝佑、竹山 恵美子、兵藤 道子、古木 美恵子、1978、海苔フィコビリ色素の簡易定量法、日本食品工業学会誌、25:584-586

吉江由美子、鈴木健、白井隆明、平野敏行、1993、生産地ならびに価格の異なる乾のりの遊離アミノ酸および脂肪酸組成、日本水産学会誌 59: 1769-1775

Mengel K., Kirkby E.A., Kosegarten H., Appel T., 2001, Principles of Plant Nutrition, Springer

Turekian K.K., 1968, Oceans, Prentice-Hall

大石圭一、1993、海藻の科学、朝倉書店

西澤一俊 千原光男、1979、藻類研究法、共立出版

能登谷正浩、2000、海苔の生物学、成山堂書店

平成 23 年度 水産白書 水産の動向

http://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/h25_h/trend/1/t1_1_2_2.html

平成 25 年度 水産白書 水産の動向

http://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/h23_h/trend/1/t1_2_3_4.html

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のお力添えを賜りました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

吉村悦郎教授には、学部4年生の研究室配属のときから研究生活を通して、あらゆる面で細やかなご指導をいただきました。心より感謝いたします。

鈴木道生講師には、研究の方向性から具体的な実験操作に至るまで多くの点で的確なご指導をいただきました。心より感謝いたします。

井村祐己助教には研究室での過ごし方から、研究の方法まで多くの点でご指導をいただきました。心より感謝いたします。

熊本大学の滝尾進教授にはスサビノリの培養についてご指導いただきました。心より感謝いたします。

北海道大学の宇治利樹助教にはスサビノリの培養株を提供していただきました。心より感謝いたします。

新日鐵住金の加藤敏郎博士、小杉千佳博士には、養殖ノリサンプルの採取、海水の分析など多くの点でご協力いただきました。心より感謝いたします。

千葉県の新富津漁業組合の皆様には、養殖ノリサンプルの採取にご協力いただきました。心より感謝いたします。

降旗一夫助教には NMR について一からご指導いただきました。心より感謝いたします。

平成 28 年

吉村 航