

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 25 年度博士課程 進学
氏名 吉村 航
指導教員名 鈴木 道生

論文題目

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

序論

スサビノリ (*Pyropia yezoensis*) は紅藻類に属する大型の海藻で、日本から朝鮮半島にかけての沿岸域に自生する。日本では古くから食品として利用されてきた。現在では全国各地で盛んに養殖が行われており、その生産量は生換算重量で年間およそ 30 万トンにのぼる。養殖されたノリのほとんどは乾海苔に加工されて食用に供される。ノリ養殖の規模は大きく経済的にも重要な位置を占めている。

スサビノリはその生活環が解明されており、また多細胞性の藻類の中では比較的培養が容易であることから、海のモデル生物としての利用が提唱されてきた。近年になり、核ゲノムの解読が行われ、ドラフト配列が公開された。これにより、分子生物学的な手法を用いてスサビノリの研究を行うことが容易になった。

近年、ノリ養殖においては「色落ち」の発生が大きな問題となっている。色落ちは養殖の過程でノリの色が極端に薄くなる現象を指して使われている言葉である。通常、ノリは褐色を呈するが、色落ちしたノリは薄緑色からほぼ透明に近いまで褪色する。ノリの色は、板海苔に加工されたときの市場価格に大きく影響し、色の薄いノリは市場価値が低い。このため色落ちの発生はノリ養殖に大きな経済的打撃を与える。色落ちは漁期の終わり頃である春先に多く、また赤潮の発生と同期して起こることが経験的に知られている。このた

め栄養塩の欠乏が色落ちの原因ではないかと考えられてきたが、原因は特定されていない。また、その生物学的、化学的なメカニズムについては明らかになっていない。

本研究では色落ちの原因として必須栄養塩の欠乏を仮定し、必須栄養素の欠乏条件におけるスサビノリの応答を調べた。また、それらの知見をもとに実際に養殖されたノリの栄養状態を評価し、色落ちの原因について新たな知見を得ることを目的として研究を行った。

植物にとっての必須元素は 17 種類が知られているが、本研究では海中で不足しやすいと考えられる 3 種類の栄養素、窒素、リン、鉄に関して実験を行った。このうち肥料の三大要素である窒素、リンは植物にとって大量に必要であるが、海水中の溶存濃度は一般に低い。カリウム、カルシウム、硫黄、マグネシウムなどの元素は、海水中には安定的に十分な濃度で存在するため、スサビノリにとっては不足しにくいと考えられる。微量元素のひとつである鉄は生体が必要とする量に比べて、海水中の溶存濃度がきわめて低く、不足しやすいと考えられることから研究対象に含めた。

実験と結果

タンパク質成分の分析

ノリの色落ちは褪色および光合成色素含量の低下により特徴付けられるが、窒素、リン、鉄の欠乏によりスサビノリ葉状体において、褪色や光合成色素含量の低下が生じることを確認した。各栄養欠乏培地で培養を行ったところ、窒素、リン、鉄のいずれの欠乏条件においても、栄養十分条件と比べてクロロフィル a、フィコビリリン含量ともに有意な減少が認められた。特に窒素欠乏において光合成色素含量の減少は顕著であった。

窒素欠乏でもっとも顕著な光合成色素含量の低下が生じることから、窒素欠乏ではスサビノリ葉状体においてフィコビリソームやフィコビリタンパク質の積極的な分解が生じているのではないかと考えられた。そこでそれらの現象に関わる因子を特定するため、窒素欠乏で特異的に誘導、蓄積する物質の探索を試みた。二次元電気泳動法を用いて、窒素欠乏条件で特異的に変動するタンパク質の特定を試みたが、栄養充分条件と窒素欠乏条件でタンパク質の構成に有意な差は確認できなかった。

そこで、電気泳動では分離が困難な 10 kDa 以下のペプチドや低中分子の化合物に着目し、栄養欠乏条件で蓄積する物質の探索を行った。スサビノリ葉状体から 1 M 酢酸で抽出を行い、主に低中分子の化合物を含む画分を得た。これを、逆相高速液体クロマトグラフィーで分離したところ、窒素欠乏のサンプルに特異的な波長 265 nm に極大吸収波長をもつピークが 2 つ検出された。これらのピークはリン欠乏、鉄欠乏サンプルではみられなかった。これらのピークを分取し、NMR を用いて構造決定を試みた。TOCSY NMR から部分構造について情報が得られたが、構造を決定するには至らなかった。

遺伝子発現解析

スサビノリの栄養状態を評価する方法として遺伝子発現量を定量的 PCR で調べる方法を

用いた[1]。これまで、ノリ養殖においてノリの栄養状態を評価する方法としては、海水中の栄養塩の濃度を測定することが一般に行われてきた。しかし、この方法は時間的にも空間的にも海水のごく一部を分析に供することから、サンプリングの条件に影響を受けやすく、間接的な手法であった。遺伝子発現からの解析では生体がどのような環境を認識しているかを直接的に測定することが出来ることから、栄養状態の評価法としてより適切であると考えた。そこで、窒素、リン、鉄のそれぞれの欠乏条件に対して特異的に応答する遺伝子の探索を行った。

窒素欠乏では *PyNRT* (硝酸トランスポーターの遺伝子)、*PyNAR* (硝酸還元酵素の遺伝子)、*PyAMT1* (アンモニアトランスポーターの遺伝子) の発現が特異的に誘導された。またリン欠乏では *PyPIT3* (無機リン酸トランスポーターの遺伝子)、*PyAPH* (アルカリフォスファターゼの遺伝子) が特異的な発現誘導を示した。鉄欠乏で特異的な発現誘導をみせる遺伝子として、*PyFTR2* (高親和性鉄(III)トランスポーターの遺伝子)、*PyFEA* (鉄同化タンパク質の遺伝子)、*PyFOX2* (鉄酸化酵素の遺伝子) が確認された。これらの遺伝子を栄養欠乏の指標遺伝子とした。

代謝産物の分析

タンパク質や遺伝子以外の栄養欠乏の指標となる因子を特定するため、スサビノリ葉状体の ^1H NMR によるメタボローム解析、 ^{31}P NMR によるリン化合物の分析、及び遊離アミノ酸分析を行った。 ^1H NMR によるメタボローム解析の結果、窒素欠乏サンプルではクエン酸の蓄積と、アラニンの顕著な減少がみられた。また ^{31}P NMR によるリン化合物の分析では、リン欠乏による遊離の無機リン酸とポリリン酸の減少が確認された。遊離アミノ酸分析でも同様に、窒素欠乏によるアラニンの減少が確認されたが、リン欠乏ではシステイン、シスタチオニンの蓄積が生じていることが確認された。これらアミノ酸は窒素欠乏ではむしろ含量が低下していたことから、窒素欠乏、リン欠乏を区別する上で有用な指標になると考えられた。

養殖ノリの分析

以上の結果を踏まえて、実際に現場で養殖されたノリの分析を行った。千葉県の新富津漁業組合に協力して頂き、東京湾の富津沖の漁場で 2015 年の 2 月 4 日、3 月 10 日、4 月 6 日の計 3 回サンプリングを行い、状態の異なる 3 種類のノリ葉状体サンプルを入手した。これらのサンプルを順に CLF1、CLF2、CLF3 とした。

まず 3 つのサンプルの光合成色素含量を測定したところ、クロロフィル a、フィコエリスリン含量ともに CLF2 でもっとも高く、CLF1 でもっとも低いという結果となった。このことから CLF3 を色落ちしたノリのモデルとして考えた。

次に、実験室での栄養欠乏実験により特定した栄養欠乏の指標遺伝子の発現量を養殖ノリサンプルで分析した。その結果、3 つのサンプル間で窒素関連遺伝子、鉄関連遺伝子では

発現量に有意な差がみられなかったが、リン欠乏の指標遺伝子である *PyPIT3* の発現量が CLF3 において有意に高い値を示した。また、もう一つのリン欠乏の指標遺伝子である *PyAPH* の発現量も、CLF3 において高い傾向を示した。このことから CLF3 ではリン欠乏が生じていることが示唆された。

そこで、 ^{31}P NMR によるリン化合物の分析、及び遊離アミノ酸分析を行った。 ^{31}P NMR では CLF3 で生体内の無機リン酸およびポリリン酸の濃度が減少していることが確認された。また、遊離アミノ酸の分析では CLF3 で、他のサンプルに比べシステイン、シスタチオニンの有意な蓄積が見られた。この結果は、実験室におけるリン欠乏のサンプルで見られた傾向と一致している。

以上の結果から、今回分析した養殖ノリのサンプルのうち、CLF3 が色落ちの傾向を示した原因がリン欠乏であることが強く示唆された。

総括

本研究では、色落ちの科学的解明を目指してスサビノリの栄養状態の評価法の確立を目的として行った。その結果、窒素、リン、鉄のそれぞれの欠乏によって特異的に発現が誘導される遺伝子、特異的に蓄積する代謝産物を特定した。その過程から、スサビノリの栄養応答について新たな知見が得られた。海洋性の多細胞藻類については生理的応答に関する研究はあまり進んでいないことから、これらは基礎的な情報として有用な知見であると考えられる。また、遺伝子発現解析やその他の分析手法を実際に養殖ノリに対して用いたところ、色落ち様の状態を示した養殖ノリサンプルにおいて、リン欠乏を示す特徴が確認された。これにより、現場のノリ養殖において色落ちがリン欠乏により引き起こされていることを強く示唆する証拠が得られた。今回の結果は、一地点の一漁期に採取された限定的なサンプルについてのものであるが、実験室での解析の結果が現場での養殖ノリの栄養状態の評価に適用できた前例として、今後のノリ養殖の研究に大いに役立つものであると考えられる。

発表論文

[1] **Ko Yoshimura**, Chika Kosugi, Yuki Imura, Toshiaki Kato, Michio Suzuki, Etsuro Yoshimura, Sample preparation of the macro alga *Pyropia yezoensis* for the determination of messenger RNA, *Analytical letters*, in press. DOI: 10.1080/00032719.2016.1157806