

Studies on the light-inductivity and expression control mechanisms of antioxidant enzyme genes in the raphidophyte *Chattonella marina*

向井, 幸樹

<https://hdl.handle.net/2324/4060219>

出版情報：九州大学, 2019, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏名	向井 幸樹			
論文名	Studies on light-inductivity and expression control mechanisms of antioxidant enzyme genes in the raphidophyte <i>Chattonella marina</i> (ラフィド藻 <i>Chattonella marina</i> の抗酸化酵素遺伝子の光誘導性および発現制御機構に関する研究)			
論文調査委員	主査	九州大学	准教授	島崎洋平
	副査	九州大学	教授	大嶋雄治
	副査	九州大学	准教授	太田耕平
	副査	九州大学	准教授	石橋勇志

論文審査の結果の要旨

西日本を中心に養殖魚等に甚大な漁業被害をもたらしてきたラフィド藻 *Chattonella marina* は、夏季の高照度下で赤潮を形成するとともに、他種植物プランクトンに比べて高濃度の活性酸素種を産生する。本種は高度な酸化ストレスに曝されながら増殖を維持するため、抗酸化機能に関する知見は本種の増殖機構を解明する上で極めて重要である。本論文は、*C. marina* の抗酸化酵素群を同定し、光や酸化ストレスに対するこれら遺伝子の発現変動を調べて発現制御機構および機能を解析するとともに、RNA-seq 解析により増殖能力を評価可能な遺伝子指標を検討したものである。

まず、*C. marina* の peroxiredoxin (PRX) の N 末端アミノ酸配列を基に cDNA 配列を決定後、アミノ酸配列を推定した結果、本 PRX は 2 つのシステイン残基を持つ 2-Cys 型 PRX であった。また、inverse PCR 法により調べた PRX 遺伝子近傍の遺伝子配置から、本遺伝子は葉緑体ゲノムに存在すると推定した。さらに、RNA-seq 解析により他の抗酸化酵素 (Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase, thioredoxin) の cDNA 配列を決定し、計 6 種の抗酸化酵素を同定した。

これら抗酸化酵素遺伝子の光誘導性を調べた。光量子束密度 100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (photon flux density, PFD)、14 h 明:10 h 暗の光条件下で定常期初期まで前培養した *C. marina* (NIES-1 株) を、3 つの PFD 区 (0、100 および 1000 PFD) に分けて培養後、6 種抗酸化酵素の遺伝子発現量を定量 PCR により調べた。その結果、1000 PFD 区において PRX のみ発現量が他の光強度区に比べて有意に増加した。一方、前培養後暗条件下 (0 PFD) で 24 時間培養した *C. marina* を、さらに 0 または 100 PFD (14 h 明:10 h 暗) で 2 日間培養した結果、ascorbate peroxidase を除く全ての抗酸化酵素遺伝子の発現が培養 1 日目に 0 PFD 区に比べて 100 PFD 区で有意に上昇し、より強い光 (1000 PFD) では PRX のみさらに誘導された。よって、PRX は光強度依存的な酸化ストレスの軽減に関与していると推測した。

次に、抗酸化酵素遺伝子の発現制御機構を調べるため、前培養後に 24 時間暗条件下 (0 PFD) で培養した *C. marina* に対し、異なる濃度の H_2O_2 (6.1, 7.6, 11.7, 14.8, 17.1 および 21.5 μM) を曝露して 2 日間培養した。その結果、21.5 μM 区において全ての抗酸化酵素の遺伝子発現が有意に増加したことから、酸化ストレスが抗酸化酵素遺伝子の発現に関与していることを見出した。また、葉緑体シグナルによる核遺伝子発現制御を検証するため、24 時間暗条件下 (0 PFD) で培養した *C. marina* に光化学系 II の阻害剤 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU, 0 および 10 μM) を曝露し、100 PFD の光強度下で 6 時間培養した結果、DCMU 曝露区における全ての抗酸化酵素遺伝子の発現

が対照区に比べて有意に抑制された。以上の結果から抗酸化酵素遺伝子の発現制御には活性酸素種や葉緑体の光合成電子伝達系の酸化還元状態等が関与していると推測され、葉緑体シグナルによる核遺伝子発現制御が示唆された。

さらに、酸化ストレス下における過酸化脂質生成量および光合成活性 (Fv/Fm 比) に及ぼす PRX の影響を調べるため、既往の知見で明らかとなっている *C. marina* の PRX 低発現株 (NIES-3) および通常発現株 (NIES-1) を用い、異なる光強度下 (20, 110 および 520 PFD, 14 h 明:10 h 暗) で 2 日間培養した。両株とも明期における光強度依存的な過酸化脂質の増加が認められたが、その生成量に株間で顕著な違いはなかった。一方、両株とも 20 PFD 区に比べて 520 PFD 区の Fv/Fm 比が有意に低下したが、その割合が NIES-1 株では 20.2%であったのに対し、NIES-3 株では 38.8%と光合成活性阻害の程度が有意に大きく、PRX が本種の光阻害耐性に関与する可能性を示した。

最後に、本種の増殖能力を評価できる遺伝子を探索するため、RNA-seq 解析により増殖段階 (増殖期、定常期の初期、中期および後期) で発現が変動する遺伝子を網羅的に調べた。RNA-seq および *de novo assembly* により得られた配列について、既存のストラメノパイル遺伝子情報を用いてアノテーションを行い、発現量が増殖期から定常期中期にかけて増加または減少傾向を示す遺伝子約 2000 を得た。光合成の光捕集、光化学系および ATP 合成に関連する遺伝子の多くは増殖期に高い発現を示し、定常期中期にかけて徐々に減少した。本論文で調べた抗酸化酵素の殆どは増殖段階依存的な変動を示さなかったが、PRX は定常期初期以降では増殖期の 30%未満まで低下し、増殖能評価指標として有用である可能性を示した。

以上要するに、本論文は有害赤潮藻 *C. marina* の光合成活性や増殖維持に関与すると予想される抗酸化酵素の光および酸化ストレス誘導性を解析し、発現制御機構と機能を推定するとともに、本種の増殖能力を評価する遺伝子指標の解明を試みたものであり、水産生物環境学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究は博士 (農学) の学位を得る資格を有するものと認める。