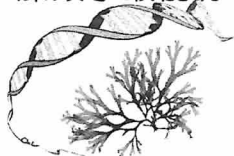


藻類学最前線



寺内 真：褐藻類における細胞壁研究の今

生物進化の歴史で多細胞生物が出現したことは、大きな出来事であったと考えられるが、真核生物全体の中で多細胞体制が認められる生物群はごくわずかに限られている。多細胞体制を有する褐藻類は、動物や陸上植物とは系統的に大きく異なることから、近年褐藻類の独自の多細胞体制の獲得について大きな注目が集まっている。多細胞体制を発達させる上で、細胞間をつなぐための細胞外マトリクスの構築は極めて重要な要素であったと考えられている。褐藻類や陸上植物を含む植物細胞は細胞外マトリクスとして細胞壁を有している。しかしながら、褐藻類の細胞壁を構成する多糖類は、陸上植物のそれとは全く異なった特徴を持っていることが、これまでの形態学的・細胞学的な研究により明らかにされてきた。そして近年の褐藻シオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*, 図1) のゲノムプロジェクトの完了により、褐藻類特有の細胞壁多糖の合成・構造維持のメカニズムについて分子レベルでのアプローチが始まりつつある。本稿では、褐藻類の細胞壁に関連する研究の現状を紹介する。

褐藻類の細胞壁の組み立て

褐藻類は、細胞が一行に連なった単列糸状体制 (図1A, B) から多列形成的な体制までの多細胞体制を有している。褐藻類の細胞壁は、電子顕微鏡下では基本的に密度や繊維状・アモルファス状といった違いから層状構造が認められる (図1C)。褐藻類の細胞壁には主に、アルギン酸やフコイダン等の酸性多糖、セルロース、フェノール性化合物、タンパク質が含まれている (Kloareg & Quatrano 1988, Schoenwaelder & Wiencke 2000)。細胞壁は大きく骨格成分 (skeletal phase) とマトリクス成分 (matrix phase) に分けられ (表1)、褐藻類では前者の主要構成要素であるセルロースの藻体の乾燥重量に占める割合は比較的少ない (1 ~ 8%)。陸上植物では、セルロースは成長途中の細胞等における一次細胞壁では約30%を占め、また成熟した細胞が持つ二次細胞壁では50%以上を占めることもある。一方、褐藻類は後者のマトリクス成分としてアルギン酸とフコイダンを多く含み、特にアルギン酸の割合は非常に多い (10 ~ 40%)。陸上植物の主要なマトリクス成分であるペクチンがガラクトン酸を主鎖の構成要素とする酸性多糖であるの

に対し、アルギン酸はマンヌロン酸 (M) およびその C5 部位の異性体であるグルロン酸 (G) が直鎖状に重合した酸性多糖である。アルギン酸におけるマンヌロン酸とグルロン酸のモル比 (M/G 比) は、種や組織、成長段階で異なり、アルギン酸が形成するゲルの硬さおよびしなやかさが変化することで細胞壁の構造や強度に影響を及ぼすと考えられている。アルギン酸は真核生物では褐藻類で初めて見つかった

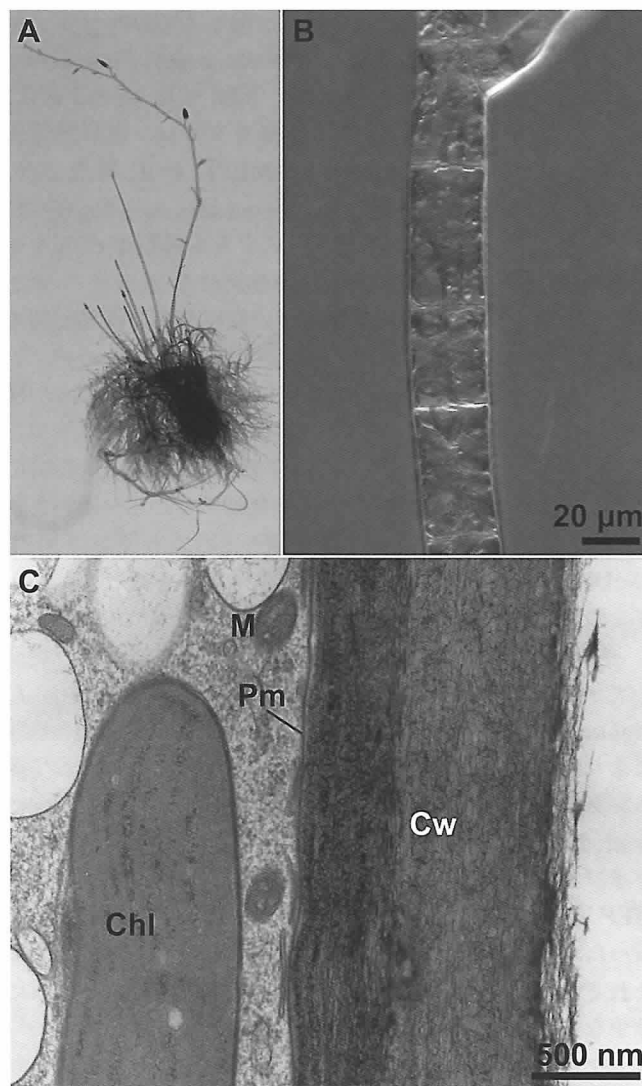


図1 褐藻シオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*) 胞子体 (32m 株)。A 直立体の実体顕微鏡写真。B 直立部の光学顕微鏡写真。細胞が糸状に連なっている。C 直立部の透過型電子顕微鏡写真 (急速凍結置換法により固定)。Chl は葉緑体, Cw は細胞壁, M はミトコンドリア, Pm は細胞膜をそれぞれ示す。

表1 褐藻類と陸上植物における主要な細胞壁成分の比較

	骨格成分	マトリクス成分
褐藻類	セルロース ~ 8%	アルギン酸 ~ 40%
陸上植物	セルロース ~ 30%	ペクチン ~ 30%

が, Chi らはアルギン酸に対するポリクローナル抗体を作製し, 免疫電子顕微鏡法により褐藻類に近縁な黄緑藻等の細胞壁にもアルギン酸が存在することを報告している (Chi *et al.* 1999)。原核生物では, *Pseudomonas* や *Azotobacter* 等の一部の細菌類がアルギン酸を合成することが知られており, これまでアルギン酸合成に関与する多くの遺伝子が同定されてきた (Ramsey *et al.* 2005)。褐藻類がアルギン酸を主成分とする細胞壁を獲得したことは多細胞生物では極めて特異なことであり, 褐藻類が多細胞体制を発達させる上で重要なカギであったに違いない。

アルギン酸ができるまで

細菌類におけるアルギン酸合成に関する研究により, 合成に関与する遺伝子群とその経路の詳細が明らかになった (図2)。褐藻類では, Lin & Hassid (1966) が *Fucus gardneri* を用いてマンノース-1-リン酸から GDP-マンノースを合成する mannose-1-phosphate guanylyltransferase (AlgA) の酵素活性を測定した。2003 年に Nyvall らは, 細菌のアルギン酸中のマンヌロン酸をグルロン酸に異性化する mannuronan-C5-epimerase (MEP) の配列を基に *Laminaria digitata* 胞子体の Expressed sequence Tag (EST) ライブラリーから, MEP をコードする 6 種類の cDNA を単離した (Nyvall *et al.* 2003)。MEP は多遺伝子ファミリーを形成しており, MEP 遺伝子の転写産物の塩基配列の比較とサザンブロッティング解析から *L. digitata* のゲノムには少なくとも 21 以上の MEP 遺伝子が存在することが推定された。さらに, 一つの MEP 遺伝子の転写産物に対するノーザンブロッティングおよび RT-PCR による発現解析により, 季節によって MEP の発現が変動することが示唆された。次に Tonon らは, 2003 年に報告された 6 種類の MEP の cDNA の塩基配列を基に縮重プライマーを設計し, アルギン酸の分解産物であるホモグルロン酸を培養液に添加した *L. digitata* の胞子体および未処理の胞子体からそれぞれ発現している MEP を新しく単離した (Tonon *et al.* 2008)。*L. digitata* では細胞壁の分解産物であるホモグルロン酸の処理により感染防御応答 (酸化的バースト) が起こり, それに係るシグナル伝達が誘導されることが報告されている (Küpper *et al.* 2001)。そして *L. digitata* のプロトプラストの EST ライブラリーから抽出した MEP 遺伝子と合わせて 77 個の MEP 遺伝子の部分的 cDNA 配列を用いたクラスター解析を行った。その結果, 大きく 4 つのグループに分かれ, さらにそれぞれのアミノ酸配列の比較から *L. digitata* のゲノムには少なくとも 45 個以上の MEP が存在することが明らかになった。4 つのグループの中で, グループ 1 にはホモグルロン酸処理時の胞子体から単離された MEP が, グループ 2・3 にはホモグルロン酸未処理の胞子体から単離された MEP が, そしてグループ 4 にはプロトプラストから単離された MEP が多く含まれていた。このことから, Tonon らはグループの間で発現パターンが異なるという仮説を立て, グループ

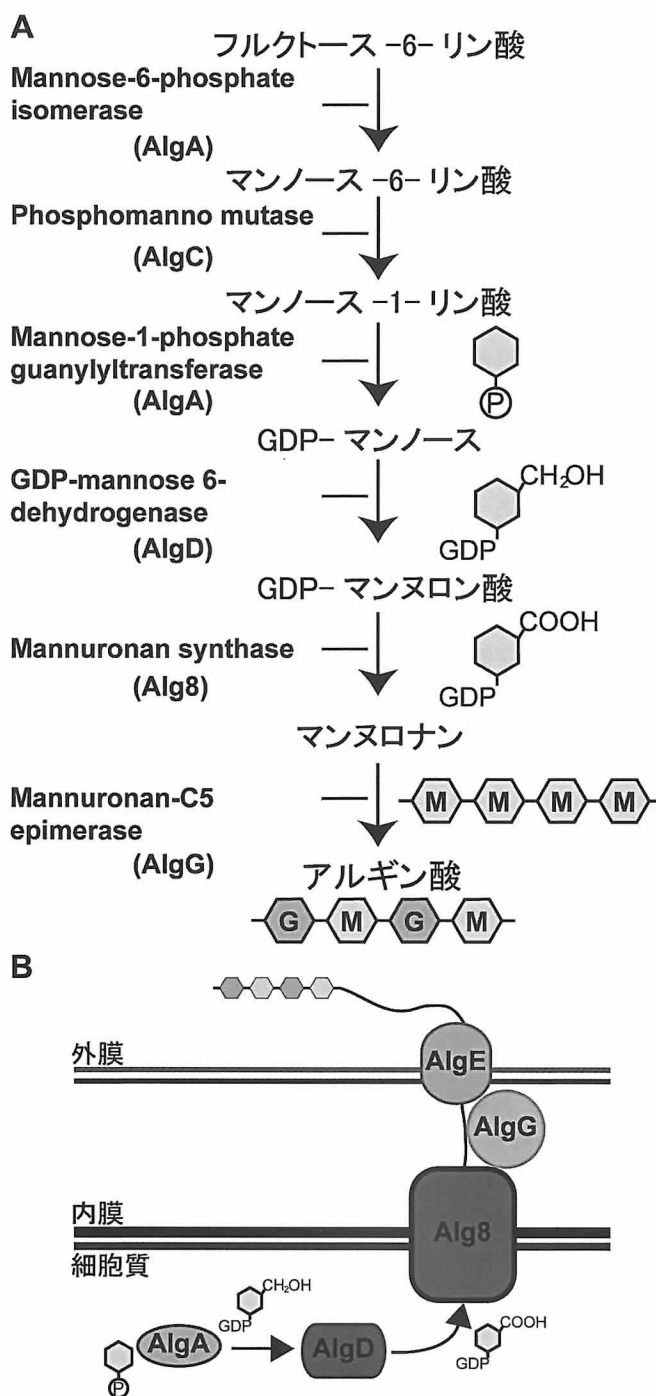


図2 細菌で明らかになったアルギン酸合成経路。A アルギン酸合成経路図。左側にそれぞれの反応を触媒する酵素名を示す。括弧内はそれぞれの酵素の慣用名を示す。B アルギン酸合成における AlgA, AlgD, Alg8, AlgG の局在を示す模式図 (Ramsey *et al.* 2005 より改変)。AlgE は合成に直接関与しないので A には示されていない。

1・2・4 から選定した 4 つの MEP を標的として, ホモグルロン酸処理時とプロトプラストの細胞壁再合成時における経時的な発現変動を定量リアルタイム PCR により解析を行っ

た。その結果、ホモグルロン酸処理時にのみ発現する MEP は同定できなかったものの、処理後一部の MEP の発現が上昇することから、ホモグルロン酸処理によって防御応答が起こり細胞壁の改変が行われることが示唆された。また、プロトプラストでは4つの標的 MEP のうち3つがホモグルロン酸処理時よりも高い発現量を示した。このことから、MEP ファミリーの各メンバーは外的要因によりその発現が制御されていることが明らかになった。

ゲノムプロジェクトからの新展開

現在、多くの生物でゲノムプロジェクトが完了し膨大な遺伝子配列情報が蓄積されている。近年褐藻シオミドロにおいて、フランスのロスコフ研究所が中心となりゲノムプロジェクトが進められ、褐藻類で初めて全ゲノム情報が明らかになった (Cock *et al.* 2010)。シオミドロは、単列形成型の体制を持つ糸状の褐藻であり、ゲノムプロジェクトに使用されたのはシオミドロ 32m 株で、単相の胞子体である。シオミドロは、実験室内で扱いやすい、世代時間が短い、生活環や有性生殖等の研究に以前より用いられている等の点から褐藻類のモデル生物として選定された (Charrier *et al.* 2008)。ゲノムサイズは約 214Mbp、約 16,000 個の遺伝子がコードされており、一遺伝子当りのイントロンの数が多いことや 3' 非翻訳領域が比較的長いこと等種々の特徴が見られる。Cock らは、褐藻類の独自の多細胞体制の獲得についてシグナル伝達系の発達という観点から考察を行った。シグナル伝達系において重要な役割を担うものの一つにレセプターキナーゼがある。レセプターキナーゼは膜貫通型のプロテインキナーゼの一種で、細胞外のシグナル分子を細胞外側にあるレセプター部位で受容し、細胞内側にあるキナーゼ部位により細胞内へシグナルを伝達する。動物と陸上植物はそれぞれタイプの異なるレセプターキナーゼを持っており、それぞれ独自のレセプターキナーゼを進化させたと考えられている。シオミドロもレセプターキナーゼを持っており、分子系統解析においてこれらは動物および陸上植物のレセプターキナーゼとは異なるクレードを形成したことから、褐藻類も独自の

レセプターキナーゼを進化させたことが示唆された。

褐藻類の細胞壁合成に関与する遺伝子についても全ゲノム情報が明らかになったことで大きな手掛かりが得られた。Michel らは、これまで陸上植物等の解析で明らかになった炭水素代謝関連遺伝子のデータベース (CAZY, Carbohydrate-Active enZYMes) を基に、パイオインフォマティック解析によりシオミドロゲノムにおける細胞壁合成関連遺伝子の詳細な探索を行った (Michel *et al.* 2010a, b)。セルロースは細胞膜にあるセルロース合成酵素複合体によって合成されるが、シオミドロゲノムにもセルロース合成酵素をコードする遺伝子が存在する。しかしながら、セルロース分解酵素であるセルラーゼや細胞壁の loosening に関与する expansin 等を欠いており、褐藻類は独自の細胞壁改変のための機構を持つ可能性が示唆された。アルギン酸合成関連遺伝子については、*Pseudomonas aeruginosa* 等の細菌類における遺伝子との配列比較および分子系統解析からその候補遺伝子が推定された (表 2)。アルギン酸合成に直接関与する 6 種類の酵素の内、4 種類については細菌類のそれらと相同性が高く、分子系統解析で細菌類のそれらとクレードを形成することから、同等の機能を持つ遺伝子である可能性が高いと考えられている。MEP は、前述の通り *L. digitata* では少なくとも 45 個以上存在するのに対し、シオミドロゲノムには 28 個の遺伝子がコードされており、シオミドロにおいても MEP ファミリーにおける各 MEP の発現は、体の部位や成長段階等で異なり、複雑な細胞壁合成・改変に関与していると考えられる。一方で、分子系統解析等に基づき、残りの 2 種類の酵素、mannnose-1-phosphate guanylyltransferase および mannuronan synthase については、細菌類のそれらに対するホモログ遺伝子はシオミドロゲノムには存在しないことが明らかになった。Mannnose-1-phosphate guanylyltransferase については Lin & Hassid (1966) によって *F. gardneri* において酵素活性があることが確認されている。mannnose-1-phosphate guanylyltransferase は動物や陸上植物ではよく保存されており、GDP-マンノースの合成に関与する酵素である。GDP-マンノースは、タンパク質の糖鎖付加や他の多糖合成の基質として重要な糖ヌクレオチドの一つであり、シオミドロゲノムが mannose-1-phosphate guanylyltransferase 遺伝子を欠くことは興味深い点である。したがって、褐藻類には一般的に知られている mannose-1-phosphate guanylyltransferase 遺伝子に代わる同等の機能を持つ未知の遺伝子があり、動物や陸上植物とは異なる GDP-マンノース合成経路が存在する可能性が示唆されている。Mannuronan synthase は基質である GDP-マンヌロン酸を重合しポリマンヌロン酸 (マンヌロナン) を合成する酵素である (図 2A)。細菌類における mannuronan synthase (Alg8) は細胞膜に存在する膜タンパク質であり (図 2B)、その内部のアミノ酸配列やモチーフ構造等から glycosyltransferase family 2 に属する。シオミドロゲノムには 11 個の glycosyltransferase family 2 タンパク質を

表 2 シオミドロゲノムにおけるアルギン酸合成関連遺伝子の有無

遺伝子名	細菌類	褐藻類
mannose-6-phosphate isomerase	AlgA	○, 4*
phosphomannomutase	AlgC	○, 1*
mannose-1-phosphate guanylyltransferase	AlgA	×
GDP-mannose 6-dehydrogenase	AlgD	○, 3*
mannuronan synthase	Alg8	×
mannuronan C5-epimerase	AlgG	○, 28*

○: ホモログ遺伝子あり, ×: ホモログ遺伝子なし。

* mannose-1-phosphate guanylyltransferase, mannuronan synthase を除く他の遺伝子については、アミノ酸配列解析および分子系統解析により選定された候補遺伝子の数を示す。Alg8 は、他の要素も含め候補遺伝子が選定されている (本文参照)。

コードする遺伝子が存在するが、いずれも *Pseudomonas* の Alg8 とは高い相同性は示さなかった。しかしながら、この内 2 つの遺伝子は放線菌 (Actinobacteria) のフランキア (Flankia) のゲノム上の glycosyltransferase family 2 タンパク質をコードする遺伝子と高い相同性を示した。フランキアの glycosyltransferase family 2 タンパク質は *Pseudomonas* の Alg8 との相同性は低い、AlgD や AlgG 等のアルギン酸合成関連遺伝子と共にフランキアゲノム上でクラスターを形成している。細菌のゲノム上では機能的に関連する遺伝子群はしばしばクラスターを形成することが知られており、この glycosyltransferase family 2 タンパク質は mannuronan synthase であると考えられている。したがって、フランキアの Alg8 様 glycosyltransferase family 2 タンパク質と高い相同性を示したシオミドロゲノム上の 2 つの遺伝子が褐藻類の mannuronan synthase をコードしていることが示唆されている。また分子系統解析において、シオミドロゲノム上の MEP 遺伝子および GDP-マンノースから GDP-マンヌロン酸を合成する GDP-mannose 6-dehydrogenase をコードする遺伝子は、いずれも放線菌のそれらと同じクレードに入ることが明らかになった。これらのことから、褐藻類は GDP-mannose 6-dehydrogenase, mannuronan synthase, MEP を放線菌からの水平伝播により獲得したことが示唆されている。

ファンクショナルゲノミクスへの挑戦

ゲノム解析によりアルギン酸合成関連候補遺伝子群が見つけたが、実際にどれが真の酵素活性を有するのか、細胞の中でどのような挙動をして細胞壁合成が進行するのかについては不明な点が多い。したがって、候補それぞれに注目し詳細な機能解析を行う必要がある。Tenhaken らは、シオミドロの GDP-mannose 6-dehydrogenase の酵素活性を生化学的に測定した (Tenhaken *et al.* 2011)。シオミドロから一つの GDP-mannose 6-dehydrogenase 候補遺伝子の cDNA を単離し、組み換えタンパク質を取得して、GDP-マンノースを基質として反応を行い、HPLC および質量分析によって反応産物である GDP-マンヌロン酸を検出した。シオミドロ GDP-mannose 6-dehydrogenase は細菌型の GDP-mannose 6-dehydrogenase とアミノ酸配列の相同性が見られるが、一部のドメインを欠く点や塩存在下で活性化される点、細菌型は六量体で機能するのに対しシオミドロでは二量体で機能する点等の異なる特徴を持つことが明らかとなった。今後、他の候補遺伝子についても、その酵素活性測定等の直接的な検証が行われれば、褐藻類におけるアルギン酸合成経路の全体像が見えてくるだろう。全ゲノム情報が開いたことにより分

子生物学および形態学的な見地の双方向からのアプローチが可能となり、褐藻の細胞壁研究は加速していくと思われる。

参考文献

- Charrier, B., Coelho, S. M., Le Bail, A., Tonon, T., Michel, G., Potin, P., Kloareg, B., Boyen, C., Peters, A. F. & Cock, J. M. 2008. Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. *New Phytol.* 177: 319-332.
- Chi, E. S., Henry, E. C., Kawai, H. & Okuda, K. 1999. Immunogold-labeling analysis of alginate distributions in the cell walls of chromophyte algae. *Phycol. Res.* 47:53-60.
- Cock, J. M., Sterck, L., Rouze, P., Scornet, D., Allen, A. E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J. M., Badger, J. H. et al. 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in the brown algae. *Nature* 465: 617-621.
- Kloareg, B. & Quatrano, R. S. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 26: 259-315.
- Küpper, F. C., Kloareg, B., Guern, J. & Potin, P. 2001. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 125:278-91.
- Lin, T. Y. & Hassid, W. Z. 1966. Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. *J. Biol. Chem.* 241: 5284-5297.
- Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M. & Kloareg, B. 2010a. Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytol.* 188: 67-81.
- Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M. & Kloareg, B. 2010b. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol.* 188: 82-97.
- Nyval, P., Corre, E., Boisset, C., Barbeyron, T., Rousvoal, S., Scornet, D., Kloareg, B. & Boyen, C. 2003. Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 133: 726-735.
- Ramsey, D. M. & Wozniak, D. J. 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* 56: 309-322.
- Schoenwaelder, M. E. A. & Wiencke, C. 2000. Phenolic compounds in the embryo development of several northern hemisphere fucoids. *Plant Biol.* 2: 24-33.
- Tenhaken, R., Voglas, E., Cock, J. M., Neu, V. & Hiuber, C. 2011. Characterization of GDP-mannose Dehydrogenase from the Brown Alga *Ectocarpus siliculosus* Providing the Precursor for the Alginate Polymer. *J. Biol. Chem.* 286:16707-16715.
- Tonon, T., Rousvoal, S., Roeder, V., & Boyen, C. 2008. Expression profiling of the mannuronan C5-epimerase multigenic family in the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) under biotic stress conditions. *J. Phycol.* 44: 1250-1256.

(北海道大学)