

藻類学最前線



海藻類における低塩濃度への適応機構

市原 健介

沿岸域に生育している大型藻類は複雑に変化する環境に常に曝されている。一日あるいは一ヶ月周期で変動する潮の干満によって、特に干潮時には海水から空气中に露出し、乾燥、それに伴う高塩・高浸透圧ストレスに曝される他、雨や河川からの真水の流入があれば極端な低塩濃度に曝される。このような塩濃度の大きな変化は、沿岸域に生育する生物にとって主要な環境圧となっているはずである。沿岸域に豊かな藻場を形成している大型藻類はこのような激しい塩濃度・浸透圧の変動に耐え、生育していると考えられる。

海藻類に一般的に見られる高塩・高浸透圧条件に対する応答として、 K^+ 、 Cl^- の取り込み、水分子の排出、および適合溶質と呼ばれる可溶性の炭素化合物の細胞内への蓄積を行い、こうした反応によって高塩・高浸透圧環境に順応していると考えられている (Karsten *et al.* 1992, Mostaert *et al.* 1995)。適合溶質は分類群によって異なっており、褐藻ではマンニトール、紅藻ではマンニトールやフロリドシド、緑藻ではスクロースが高塩・高浸透圧ストレスの際に適合溶質として機能していることが報告されている (Lüning *et al.* 1990, Mostaert *et al.* 1995)。反対に、低塩・低浸透圧の条件では細胞内への水分子の取り込み、各種イオンの排出、適合溶質の分解によって浸透圧のバランスを取っていると考えられる (Dickson *et al.* 1980, Mostaert *et al.* 1995)。具体例を上げると、例えばオオバアオサ (*Ulva lactuca* L.) では低塩濃度条件下で細胞内の K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 濃度が減少し、高塩濃度条件下では一時的に Na^+ 濃度が上昇した後に、 K^+ 、 Cl^- 濃度が増加すること、また遊離アミノ酸や糖類は塩濃度にそれほど影響されないのに対して、 β -dimethyl-sulfoniopropionate (DMSP) 含有量の増減は塩濃度のそれとよく一致することが報告されている (Dickson *et al.* 1980)。このように、生理的な研究については古くから行われ、様々な事象が報告されているが、遺伝子レベルでの低塩濃度条件への耐性および適応機構については報告例が少ないのが現状であった。しかしながら近年では大型海藻類でもゲノム情報が蓄積され始め、マイクロアレイや発展の著しい次世代シーケンサーを利用した大規模な遺伝子レベルでの適応機構、ストレス耐性機構の研究が盛んに取り組み始めている。本稿ではそのような大型海藻における浸透圧ストレスへの適応機構や淡水環境への適応機構の研究について、緑藻、褐藻、紅藻、それぞれの大型藻類での近年の研究例を紹介したいと思う。

紅藻でのマイクロアレイを利用した研究例

2007年には *Chondrus crispus* Stackhouse を材料としてマ

イクロアレイを利用した環境ストレスに対する遺伝子の発現解析が行われた (Collén *et al.* 2007)。この実験では通常の海水条件をコントロールとして、培養条件下で高低の塩ストレス、高温ストレス、強光ストレスを加えた藻体、温度や光量が比較的高い時期 (自然環境の高ストレス環境) の潮間帯から採集した天然藻体、および温度・光量が比較的低い時期 (自然環境の低ストレス環境) の潮間帯から採集した天然藻体を用いて、発現遺伝子の比較解析を行っている。このアレイには EST ライブラリーから得られた 1295 の遺伝子が用いられた。

実験の結果、全てのストレス処理と天然の藻体を合わせ、全体の約 27% にコントロールとの発現量の相違が見られ、最も大きな違いが見られたのが高温、強光条件下であった。ストレス環境下で最も発現量が増加したのは集光色素タンパクをコードする遺伝子群で、反対に最も低下したのは糖の加水分解に関連する遺伝子群であった。塩ストレスに着目してみると、塩濃度を海水の 50% にした低塩条件と 200% にした高塩条件において、コントロールと比較し、それぞれの条件特異的に発現上昇したものが前者で 13 遺伝子、後者で 33 遺伝子検出された。またストレス応答性遺伝子として知られるヒートショックプロテインのみを用いたクラスタリング解析から、高低の塩・浸透圧ストレス下での発現変動が自然環境の高ストレス環境下での変動と最も類似性が高いことが明らかとなり、野外で藻体に最も影響を与えるのが塩・浸透圧ストレスであることが示唆されている。

また *Gracilaria changii* (B.M.Xia *et al.* I.A. Abbott) I.A. Abbott, J.Zhang *et al.* B.M.Xia でもマイクロアレイを利用した浸透圧ストレス下での遺伝子発現解析が行われており (Teo *et al.* 2009)、このアレイには前述の *Chondrus* よりも多い 3326 個のプロンプが乗せられている。実験の結果、低浸透圧条件下では 199 遺伝子が発現上昇、200 遺伝子が減少した一方で、高浸透圧条件下では上昇が 154 遺伝子、減少が 184 遺伝子であった。この中で、興味深い挙動を示した遺伝子がいくつかあげられる。一つ目は活性酸素を除去する酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼで、低浸透圧条件下で発現上昇することから、低浸透圧によって誘導される酸化ストレスへの応答であると考えられる。二つ目は水チャネル遺伝子で、この遺伝子は低浸透圧条件下で発現上昇し、高浸透圧条件下で減少している。この遺伝子は名前の通り水の輸送を行っており (Weig *et al.* 1997)、水を輸送することで藻体の浸透圧を調整することに一役買っていると予測される。

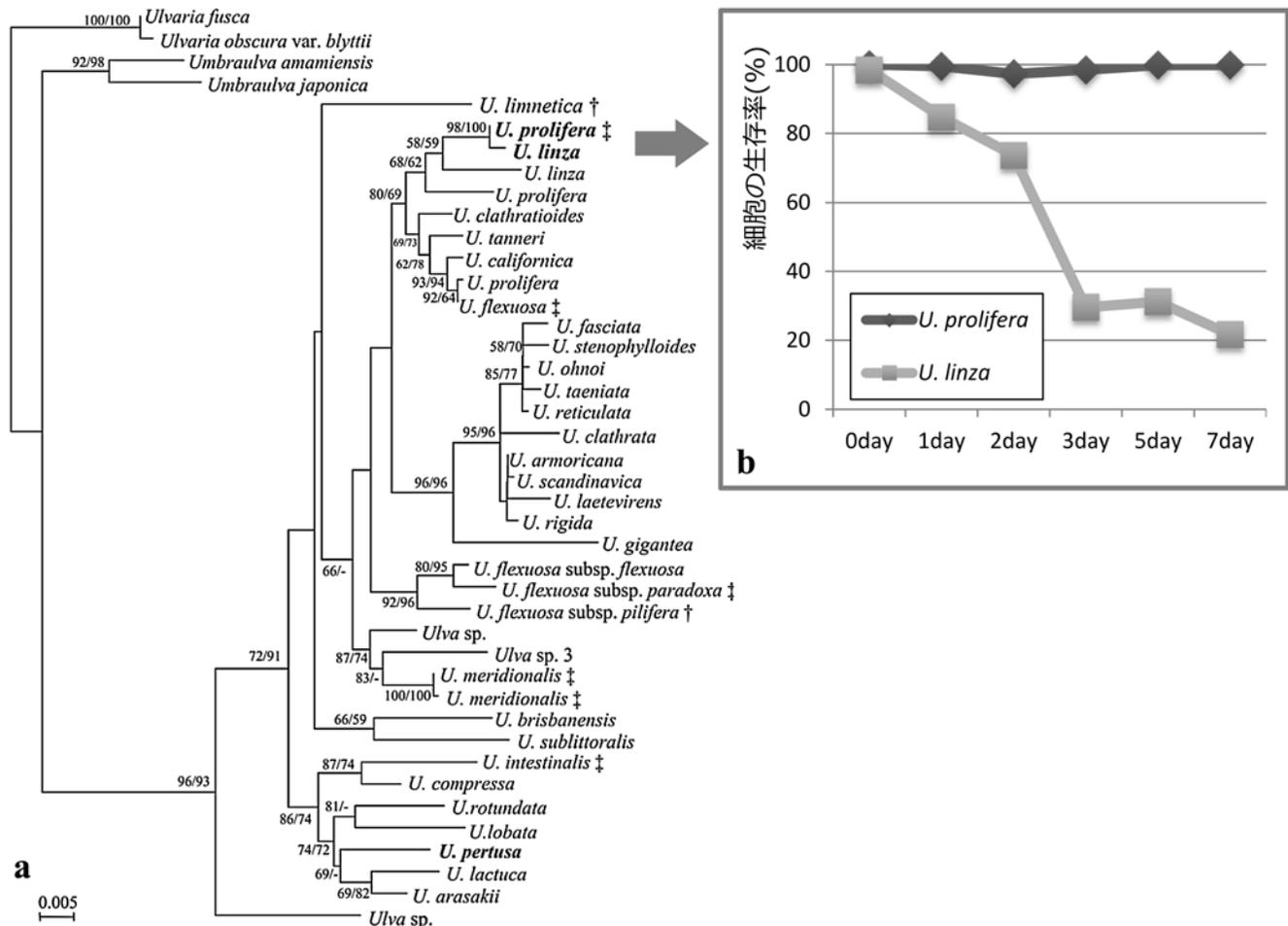


図1. 葉緑体コード *rbcL* 遺伝子を用いたアオサ属の系統樹 (a) とスジアオノリとウスバアオノリの淡水条件下での細胞の生存率の推移 (b)。Ichihara *et al.* (2013) に基づいて作図。

褐藻 *Ectocarpus* での総合的な研究

褐藻では、2010年にゲノム情報が公開された *Ectocarpus* (Cock *et al.* 2010) を用いて低塩濃度への適応機構の研究が進められている。ここでは Dittami らが2012年に報告した論文 (Dittami *et al.* 2012) を取り上げようと思うが、彼らの研究グループでは本論文に限らず、シオミドロ (*Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye) を材料として、浸透圧ストレスや酸化ストレスを受けた際の発現遺伝子解析や代謝産物の増減などを詳細に調べた興味深い研究を報告している (Dittami *et al.* 2009, 2011)。Dittami *et al.* (2012) では、全ゲノム配列が明らかとなった海産の株と、その株に比較的近縁な淡水産の株を材料とし、海産株 (MS) を海水条件、淡水産株 (FWS) を海水条件と淡水条件で培養し、外部形態、光合成活性、細胞内のイオン組成、代謝産物組成、マイクロアレイによる遺伝子の発現プロファイルといった様々な要素を比較している。実験の結果、海水条件下での MS と FWS は、非常によく似た傾向の遺伝子の発現プロファイルを示したが、代謝産物とイオン組成には大きな違いがあった。FWS では細胞内のアミノ酸含有量や不飽和脂肪酸である n-3 脂肪酸が増加していた一方で、適合溶質であるマンニトールや Na⁺ の

量は MS のそれと比べ、低く保たれていた。次に FWS の海水条件下と淡水条件下での遺伝子発現を比較したところ、細胞壁に含まれる硫酸化多糖を合成する酵素の発現が変化していることが明らかになった。FWS は、低塩条件下では硫酸化多糖を分解する酵素を発現上昇させ、反対に高塩条件下では合成に関連する酵素を発現上昇させていることから、細胞壁や細胞外マトリックスの組成の違いが細胞外の塩・浸透圧の変化に適応するための重要な要素であることが示唆された。硫酸化多糖は海藻類や海草の細胞壁に多く含まれ、陸上植物や淡水藻には含まれていないことから、高塩・高浸透圧条件への適応に重要だと考えられている (Kloreg & Quatrano 1988, Aquino *et al.* 2005, Popper *et al.* 2011)。また、FWS を海水条件で培養した場合には、塩ストレスのマーカーとされるプロリン、アルギニン、グルタチオンなどが増加していた。以上のことから、FWS は淡水環境に適応し、細胞内のイオンや有機物のホメオスタシスが MS とは異なっているのに対し、海水条件への順応では同じ遺伝子が発現、機能している可能性が示された。さらに研究を進めることで、褐藻類における淡水環境への進化とそれに伴う種分化機構に関する新しい知見が得られることが期待される。

緑藻（アオサ藻綱）：淡水域に生育する新種の発見

緑藻（アオサ藻綱）では、筆者自身がこれまで取り組んできたアオサ属に見られる例を紹介しようと思う。アオサ属は世界中の沿岸域で最も目立つ海藻類の一つであり、潮間帯を中心に広く分布しているが、属の一部には汽水域などの低塩濃度地域へ適応した種が存在する。潮間帯という環境変動の多い場所で生育していることやバイオマスの多さ、採集・培養の簡便さから、アオサ属では塩濃度の藻体への生理学的な影響を調べた研究が盛んに行われてきており、細胞内の無機イオン濃度、光合成活性や色素量、遊離アミノ酸や炭素、窒素量などが塩濃度・浸透圧の変化に伴い、どのように変化していくかが調べられている (Reed & Russell 1979, Davison & Pearson 1996, Martins *et al.* 1999, Kamer & Fong 2000, Kakinuma *et al.* 2004, 2006, Xia *et al.* 2004)。

著者らは、近年になって淡水域で生育する新種ウムトゥチュラノリ (*U. limetica* Ichihara *et Shimada*; Ichihara *et al.* 2009a) を沖縄県石垣島、与那国島の両島で発見した。本種は両島の淡水域にのみ生育が確認されており、海域はもちろん汽水域の河川でも発見されていないが、培養実験を行ったところ、淡水、汽水、海水の全ての条件で培養が可能であった。さらに核コード ITS 領域や葉緑体コード *rbcL* 遺伝子を用いた分子系統解析から、本種は系統的に海産種に挟まれ、海水域に生育していた緑藻アオサ属の仲間が淡水域に適応した種であることが示唆された (Ichihara *et al.* 2009a)。また、汽水域に生育するスジアオノリ (*U. prolifera* O. F. Müller) とは系統的に離れたクレードに含まれ、本種はスジアオノリとは独立に海水から淡水へ適応した種であると考えられた。それでは本種はどのような機構によって淡水へと適応しているのだろうか？まず、本種を海水条件 (30 psu) と低塩条件 (10, 5, 0 psu) とで培養し、全タンパク質の比較を行ってみた。この比較から、塩濃度が低くなるに伴い量が増加する約 20kDa のタンパク質が検出された。このタンパク質をコードする遺伝子を単離し、相同性検索を行ったところアナアオサ (*U. pertusa* Kjellman) のレクチンと最も高い相同性が示された。また、ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、淡水下でこの遺伝子の転写量が増加していることを明らかにした (Ichihara *et al.* 2009b)。しかし、残念ながらこの遺伝子の具体的な機能については現在までに明らかに出来ない。

次に、淡水への適応に貢献しているであろう候補遺伝子群をより網羅的に単離することを目的とし、cDNA subtraction 法を利用し、適応候補遺伝子群の単離を試みた。cDNA subtraction 法は 2 つの異なる条件由来の mRNA から、一方の条件でのみ発現量が多くなっている遺伝子を選択的に単離できる手法である。この実験では 219 個の淡水適応候補遺伝子の単離に成功し、このうち 39 個の遺伝子については藻体を海水条件下で一定期間前培養した後に淡水条件下へ移し、継時的な発現量変化 (1, 4, 24 時間, 3, 7 日後) を調べた。これら遺伝子群の発現変化には大別すると 3 つのパターンが

存在し、淡水移行後に見られた発現の上昇が 7 日目まで維持される遺伝子群 (グループ①)、淡水移行直後の短い期間 (1 ~ 4 時間後) に発現が上昇し、その後海水条件と同じ程度の発現量まで減少する遺伝子群 (グループ②)、グループ①と似た発現パターンを示したが発現量のピークが後半 (3, 7 日後) に見られる遺伝子群 (グループ③)、に分けられた。グループ①や③は淡水環境へ移行後、遺伝子の発現量が維持されることから本種の淡水への適応機構に関係していると考えられた。グループ①には活性酸素除去酵素、適合溶質関連酵素、分子シャペロン等が含まれており、適合溶質の分解により浸透圧を下げることや活性酸素を除去すること等が淡水への適応に寄与している可能性が示された。またグループ②およびグループ③には主に機能未知遺伝子が含まれていた。これらの結果により、タンパク質の比較のみでは検出できなかった遺伝子発現の差が明らかにされ、淡水環境に適応するために複雑な遺伝子発現ネットワークが関わっていることが明らかにされた (Ichihara *et al.* 2011)。

近縁種間での比較 RNA-seq

～ウスバアオノリとスジアオノリの場合～

これまでは著者らが発見したウムトゥチュラノリの淡水適応に注目して研究を進めてきたが、この淡水産種は系統的に汽水産種、海産種とは離れていたため、その他の種との比較解析が難しい面があった。そこで、あらためてアオサ属の系統樹を眺めてみると、スジアオノリとウスバアオノリ (*U. linza* L.) が目についた (図 1a)。両種は日本でも広い地域に生育が確認されているアオサ属の仲間で、スジアオノリは汽水域に生育し、一方でウスバアオノリは海水域に生育している。両種は種の認識に有効とされている DNA マーカー (ITS 領域や *rbcL* 遺伝子) で系統解析を行うと、同一のクレードに含まれる。しかし、より解像度の高いマーカー (5S Spacer 領域) でクレード内の系統解析を行うと、スジアオノリとウスバアオノリがそれぞれ含まれる 2 つの異なるサブクレードに分かれる (Shimada *et al.* 2008)。また、両種は片側交雑が可能で生殖的隔離が不完全な状態であることが示されており、比較的最近になって汽水域に適応した集団が現れ、生育範囲の拡大に成功し、種分化した例であると考えられている (Hiraoka *et al.* 2011)。一方で、培養実験の結果、スジアオノリは海水、汽水および淡水の全ての条件下で生育可能であったが、ウスバアオノリは淡水条件下では長期間生育することが出来ず、両種は生理的に異なることが示された (図 1b)。このように、スジアオノリとウスバアオノリは遺伝的には極めて近縁であるが、異なる環境に生育し、生理的特性 (低塩濃度への適応・耐性) も明らかに異なっていることから、低塩濃度環境への適応進化を研究するには非常に適した生物である。

そこで現在、スジアオノリとウスバアオノリを用い、海水、汽水、淡水条件下で培養した藻体の発現遺伝子プロファイルと比較することを目的として、RNA-seq 解析をすすめてい

るところである。RNA-seq は次世代シーケンサーを利用し、細胞内の RNA 分子の配列を網羅的に解読し、発現量の定量や新規配列の発見が期待できる手法であり、ゲノム情報がない生物種でも多くの情報を一挙に得ることができる。これまでの予備的な解析から、いくつかの興味深い挙動を示す遺伝子が見つかってきている。例えば、スジアオノリは淡水条件下において細胞壁関連の加水分解酵素が多数発現上昇する一方、ウスバアオノリはヒートショックプロテインの発現が非常に多くなる。また両者に共通するものとしては、淡水条件下において Na⁺ symporter 遺伝子が発現上昇しており、低塩・低浸透圧条件への順応に重要であることが示唆されているが、発現量や低塩濃度になるにつれての発現挙動に種間で差がある。今後はさらに詳しく解析を進めるとともに、細胞内のイオンホメオスタシスや代謝産物の比較を行うことで、より総合的な淡水への適応機構の理解に迫っていきたいと考えている。

引用文献

- Almgren, K. 1966. Ecology and distribution in Sweden of algae belonging Aquino, R. S., Landeira-Fernandez, A. M., Valente, A. P., Andrade, L. R. & Mourão, P. A. 2005. Occurrence of sulfated galactans in marine angio-sperms: evolutionary implications. *Glycobiology* 15: 11–20.
- Cock M. & 76 authors. 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465: 617–621.
- Collén, J., Guisile-Marsollier, I., Léger, J. J. & Boyen, C. 2007. Response of the transcriptome of the intertidal red seaweed *Chondrus crispus* to controlled and natural stresses. *New Phytol.* 176:45-55
- Davison, J. R. & Pearson, G. A. 1996. Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J. Phycol.* 32: 197-211.
- Dickson, D. M., Jones, R. G. W., & Davenport, J. 1980. Steady state osmotic adaptation in *Ulva lactuca*. *Planta* 150: 158-165.
- Dittami, S. M. & 14 authors. 2009. Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress. *Genome Biol.*10: R66.
- Dittami, S. M., Gravot, A., Renault, D., Goullitquer, S., Eggert, A., Bouchereau, A., Boyen, C. & Tonon, T. 2011. Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant Cell Environ.* 34: 629–642.
- Dittami, S. M., Gravot, A., Goullitquer, S., Rousvoal, S., Peters, A. F., Bouchereau, A., Boyen, C. & Tonon, T. 2012. Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in *Ectocarpus* (brown algae). *Plant J.* 71: 366-377.
- Hiraoka, M., Ichihara, K., Zhu, W., Ma, J. & Shimada, S. 2011. Culture and hybridization experiments on an *Ulva* Clade including the Qingdao strain blooming in the Yellow sea. *PLoS ONE* 6: e19371.
- Ichihara, K., Arai, S., Uchimura, M., Fay, E. J., Ebata, H., Hiraoka, M. & Shimada, S. 2009a. A new species of freshwater *Ulva*, *Ulva limnetica* (Ulvales, Ulvophyceae) from Ryukyu archipelago, Japan. *Phycol. Res.* 57: 94–103.
- Ichihara, K., Arai, S. & Shimada, S. 2009b. cDNA cloning of a lectin-like gene preferentially expressed in freshwater from the macroalga *Ulva limnetica* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 57: 104–110.
- Ichihara, K., Mineur, F. & Shimada, S. 2011. Isolation and temporal expression analysis of freshwater induced genes in *Ulva limnetica* (Ulvales, Chlorophyta). *J. Phycol.* 47: 584-590.
- Ichihara, K., Miyaji, K. & Shimada, S. 2013. Comparing the low-salinity tolerance of *Ulva* species distributed in different environments. *Phycol. Res.* 61: 52-57.
- Kakinuma, M., Kuno, Y. & Amano, H. 2004. Salinity stress responses of a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Fish. Sci.* 70: 1177-1179.
- Kakinuma, M., Coury, D. A., Kuno, Y., Itoh, S., Kozawa, Y., Inagaki, E., Yoshiura, Y. & Amano, H. 2006. Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stress in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). *Mar. Biol.* 149: 97-106.
- Kamer, K. & Fong, P. 2000. A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine macroalga, *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254: 53-69.
- Karsten, U., West, J. A., Mostaert, A. S., King, R. J., Barrow, K. D. & Kirst, G. O. 1992. Mannitol in the red algal genus *Caloglossia* (Harvey) J. Agardh. *J. Plant Physiol.* 140: 292–297.
- Kloareg, B. & Quatrano, R. S. 1988. Structure of the cell-walls of marine-algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol.* 26: 259–315.
- Lüning, K., Charles, Y. & Kirkman, H. 1990. Seaweeds: Their Environment, Biogeography and Ecophysiology. John Wiley, New York, 334 pp.
- Martins, I., Oliveria, J. M., Flindt, M. R. & Marques, J. C. 1999. The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal). *Acta Oecol.* 20: 259-265.
- Mostaert, A. S., Karsten, U. & King, R. J. 1995. Physiological responses of *Caloglossa leprieurii* (Ceramiales, Rhodophyta) to salinity stress. *Phycol. Res.*43: 215–222.
- Popper, Z. A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., Kloareg, B. & Stengel, D. B. 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 62: 567–590.
- Reed, R. H. & Russell, G. 1979. Adaptation to salinity stress in populations of *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Estuar. Coast Mar. Sci.* 8: 251–258.
- Shimada, S., Yokoyama, N., Arai, S. & Hiraoka, M. 2008. Phylogeography of the genus *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa. *J. Appl. Phycol.* 20: 979–989.
- Teo, S.-S., Ho, C.-L., Teoh, S., Rahim, R. A. & Phang, S.-M. 2009. Transcriptomic analysis of *Gracilaria changii* (Rhodophyta) in response to hyper- and hypoosmotic stresses. *J. Phycol.* 45: 1093–1099.
- Weig, A., Deswarte, C. & Chrispeels, M. J. 1997. The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol.*114: 1347–1357.
- Xia, J. R., Li, Y. J. & Zou, D. H. 2004. Effect of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. *Aquat. Bot.* 80: 129-137.