

発表番号 34

赤潮原因藻の増殖を抑制する鉄有機配位子の探索その抑制メカニズムの解明

牧 輝弥 金沢大学 自然科学研究科

【目的】赤潮は魚介類を大量に斃死させる深刻な社会問題であり、その水産養殖業への被害額は億単位に登る。こうした赤潮の原因となる微細藻の増殖を抑える技術開発は早急の課題である。そこで、赤潮防除を目的に、赤潮原因藻の鉄取り込みを有機配位子で阻害し、微細藻の増殖をコントロールする技術を提唱する。本研究では、赤潮原因藻が有機配位子によって鉄欠乏に陥り、増殖が抑制されることを生理学実験で実証する。また、鉄制限下で誘導発現される遺伝子群をディファレンシャル・ディスプレイ (DD) 法によって解析し、鉄欠乏下の微細藻の生理状態を分子レベルで明らかにすることで、有機配位子の適切な使用法を講じる。

【方法】ハプト藻 *Prymnesium* sp. を、2,2'-Bipyridy、FerroZine、BPDS および DFB の4種の人工有機配位子を添加した培地で培養し、生長量を経時的に測定した。DD法には、鉄制限条件(鉄濃度約0 μMあるいは人工配位子の添加)および鉄存在条件(鉄濃度約1 μM)で培養した藻細胞を用いた。藻細胞から抽出した全RNAを鋳型にcDNAを合成し、PCRに供した。PCR産物を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、鉄制限条件下の培養に特異的なバンドを精製した後、クローニングを行い、複数クローンの塩基配列を決定し、遺伝子機能を推察した。

【結果と考察】*Prymnesium* sp. は、FerroZine および DFB によって増殖が顕著に阻害され、配位子によって微細藻が鉄欠乏状態になったと考えられる。こうした三価の鉄と配位する配位子が赤潮藻の増殖抑制に適していると見なせる。一方、DD法では、鉄欠乏下で転写誘導される全17の遺伝子タイプが得られた(Table1)。その内、8タイプが既知遺伝子配列と高い相同性を示し、9タイプが未知配列となった。既知配列のなかでも、特に、真核生物翻訳終結因子、エノラーゼ、熱ショック蛋白(HSP90family)のクローンが多く得られ、*Prymnesium* sp. は鉄欠乏へのストレスに適応するためこれらの遺伝子を転写レベルで誘導発現したと推察される。また、未知配列の遺伝子タイプは、鉄取込みに直接関わる機能をコードしている可能性が高い。今後、有機配位子を駆使することで、鉄制限条件を厳密に設定し、DD法によって鉄欠乏に特異的に応答する遺伝子群のクローン化を行い、微細藻の鉄欠乏状態を探る遺伝子マーカーを確立して行く。

Table 1. Genetic types of clones of PCR products in each bands on agarose gel, and hypothetical functions of each genetic type.

Types	T11a				T11g				AP53	hypothetical function	total		
	AP51	AP53	AP56		AP51	AP53	AP56	AP53					
a	2	2						6		Eucaryotic release factor	10		
b	3									40S ribosome protein	3		
c		6	2							unknown	8		
d	1	1								unknown	2		
e				5	6	4			1	unknown	15		
f	1	2	1	8						unknown	13		
g			1				5			Enolase	6		
h							3			Enolase	3		
i							1			unknown	1		
j								1		unknown	1		
k								1		unknown	1		
l					2				9	unknown	11		
m		1								unknown	1		
n									1	unknown	1		
o									1	Aspartic protease	1		
p					5					Heat shock protein (HSP90 family)	5		
q						1				NADH dehydrogenase	1		
total	7	5	8	11	5	6	8	4	9	8	9	3	83

(clones)

24

助成番号 0424

赤潮原因藻の増殖を抑制する鉄有機配位子の探索とその抑制メカニズムの解明

牧 輝弥 (金沢大学 自然科学研究科)

1. 研究目的

沿岸海域における工業排水及び生活排水の増加による富栄養化は、有害な微細藻の大量増殖を促し、赤潮を引き起こす。赤潮は魚介類を大量に斃死させる深刻な社会問題であり、その水産養殖業への被害額は億単位に登る。また、湾内の景観を損ね、悪臭の原因となる。しかし、赤潮発生を防除する有効な技術はほとんどなく、あっても生態系を大きく乱したりやコストがかかるため、有効手段は皆無である。そこで、本研究では、鉄と配位結合する有機配位子によって赤潮原因藻の鉄取り込みを制御し、原因藻を鉄欠乏に導き、赤潮を抑制する技術開発を試みる。

鉄は、生命体にとって必須元素であり、呼吸、光合成及び DNA 合成、窒素固定、ホルモン生成などその他多くの細胞機能において重要不可欠な役割を果たす⁽¹⁾。特に、鉄は光合成におけるクロロフィル合成に使用されており、光合成生物は、非光合成生物に比べて鉄要求性が高い。しかし、水圏中では、鉄は不溶態になるため、微細藻の鉄摂取は非常に困難である。海洋の“高栄養素低クロロフィル”海域においては、低濃度の有機物質の錯体形成によって生物が鉄を利用できない形態になっている^(2,3)。そこで、微細藻は不溶態の鉄を取り込むため、鉄形質膜上に鉄キレート還元酵素を産出し、細胞外鉄(III)キレートを鉄(II)へ還元し、鉄(II)を細胞膜内に取り込む^(4,5)。単細胞性緑藻^(6,7)や海洋珪藻でこの還元取り込みが報告されている。一方、鉄(III)に特異的なシデロホアを細胞外へ産出し、鉄と錯形成したシデロホアを細胞内に取り込む機構もある。シアノバクテリア^(8,9,10)および真核微細藻の数種でシデロホアの産出が確認されている^(11,12)。そこで、これら鉄取り込み機構に競合する鉄錯生成定数を持つ人工有機配位子で環境中の鉄をとらえ、赤潮原因藻を鉄欠乏に追い込めば、赤潮発生を抑圧できる。

本研究では、赤潮の抑制防除剤となる人工有機配位子を特定するため、有機配位子を用いたバッチ培養により微細藻の鉄欠乏を実証する。また、鉄欠乏下の微細藻の培養を、ディファレンシャル・ディスプレイ法に供し、鉄欠乏下で発現する遺伝子群をスクリーニングする。得られた遺伝子機能をもとに、微細藻が有機配位子によって鉄制限を受けることを確認すると共に、鉄欠乏下での赤潮原因藻の生理機構を考察する。

2. 研究方法

2.1 培養実験

赤潮藻として、ハプト藻 *Prymnesium* sp. を実験対象生物として選択した。ハプト藻は、増殖が早く、海洋において優占種となる微細藻種である⁽¹³⁾。 *Prymnesium* sp. を f/2 培地に接種し、温度 20°C、光強度 110 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 、12 時間明-12 時間暗の培養条件下で維持培養した。 *Prymnesium* sp. を鉄制限する有機配位子として、2,2'-Bipyridy、FerroZine (3-(pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine)、BPDS (bathophenanthroline disulphonate)、DFB (defferrioxamine B) の4種の人工有機配位子を実験供した。それぞれ有機配位子は鉄と錯形成し、植物を鉄欠乏にすることが知られている。実験条件として、1 μM の鉄を含む培地に *Prymnesium* sp. を摂取した後、各有機配位子を 1 μM 、10 μM あるいは 100 μM となるように添加し、維持培養と同様の培養条件下で培養した。2 日ごとに 550 nm の吸光度を測定し、 *Prymnesium* sp. の増殖量とした。また、1 μM の鉄を含む培地で *Prymnesium* sp. を 8 日間培養した後、各有機配位子を 1 μM 、10 μM あるいは 100 μM となるよう加え、2 日ごとに微細藻の増殖量を測定した。

2.2 ディファレンシャル・ディスプレイ法

Prymnesium sp. を、FeCl 濃度 0 μM 、0.05 μM あるいは 1 μM の f/2 培地、FeCl 濃度 0.05 μM の f/2 培地で 20 日間培養した。また、有機配位子による鉄欠乏培養を得るため、FeCl 濃度 1 μM の f/2 培地で 8 日間培養した後、100 μM の 2,2'-Bipyridy を添加し、20 日目まで培養した。培養条件は維持培養と同様である。培養後、15 ml の *Prymnesium* sp. 培養を 3,000 rpm、15 分間の遠心に供し、微細藻細胞を回収した。微細藻の沈殿を、液体窒素を用いて凍結した後、-80°C で冷凍保存した。

凍結保存した微細藻細胞から、セパゾール (Nakalai) を用いて total RNA を抽出した後、オリゴプライマーによって cDNA を合成した。Suprec-02 (サイズの小さい核酸をより分けるカラム; TAKARA) でプライマーを取り除き、ディファレンシャル・ディスプレイ用 Forward primer (Ap51、Ap53、Ap56) 及び Reverse primer (T11a、T11c、T11g) を用いた PCR 増幅に供した。PCR 産物を、低融点 1.5% アガロースゲル電気泳動によって泳動し、鉄欠乏下の培養で特異的に見られるバンドを切り出し精製した。精製した核酸を TA クローニングに供し、得られたクローンの塩基配列を決定した。核酸塩基配列およびアミノ酸配列を DDBJ データベース上の既知配列と比較すること (BLASTA 及び FASTA 検索プログラム使用) で、機能を解析した。

3. 研究結果

3.1 培養実験

赤潮藻であるハプト藻 *Prymnesium* sp. を、4 種の有機配位子、2,2'-Bipyridy、FerroZine、BPDS および DFB をそれぞれ 1 μM 、10 μM あるいは 100 μM の濃度で加えた培地で培養し

た。その結果、2,2'-Bipyridyl および FerroZine では、1 μM および 10 μM を添加した場合、対象区と同様に生長量が増大し、100 μM を添加した際、全く吸光度が増えなかった(Fig. 1)。BPDS では、対象区と同様の生長量の増加を示した。DFB では、1 μM の添加で対象区よりも増殖がおさえられ、10 μM あるいは 100 μM の添加では増殖が見られなかった。

一方、10 日めに、各有機配位子を 1 μM 、10 μM あるいは 100 μM の濃度で添加したところ、2,2'-Bipyridyl を 100 μM 添加した際、5 日間で生長量が 1/10 まで減少した(Fig. 2)。DFB の 10 μM および 100 μM 添加区で、添加 9 日から 17 日にかけて生長量が 1/10 まで減った。

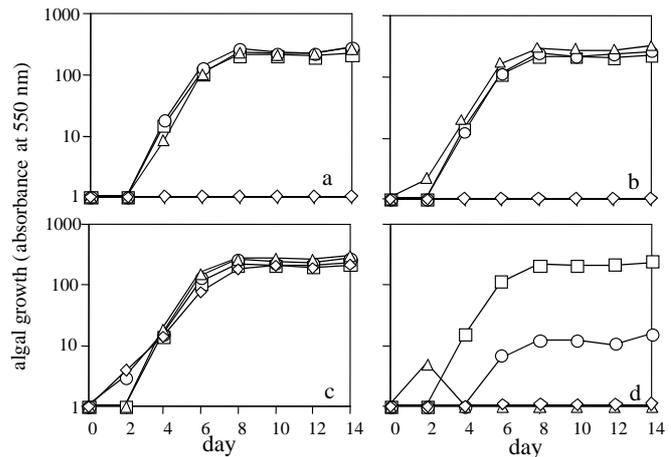


Fig.1 Growth of *Prymnesium* sp. in modified f/2 culture medium including 2,2'-Bipyridyl (a), FerroZine (b), BPDS (c), and DFB (d) at concentrations of 0 μM (square), 1 μM (circle), 10 μM (triangle), and 100 μM (diamond).

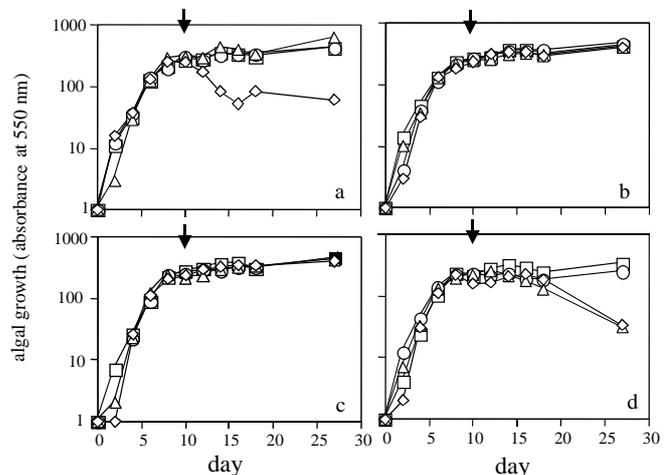


Fig.2 Growth of *Prymnesium* sp. in modified f/2 culture medium to which 2,2'-Bipyridyl (a), FerroZine (b), BPDS (c), and DFB (d) were added after 10 day incubation at concentrations of 0 μM (square), 1 μM (circle), 10 μM (triangle), and 100 μM (diamond). Arrows indicate the day when each chelate was added.

3.2 ディファレンシャル・ディスプレイ法

3.2.1 アガロース電気泳動

得られた RNA について cDNA 合成、更に、DD-PCR を行い、1.2-1.5%の低融点アガロースゲルでの電気泳動でバンドの確認を行った。プライマー-T11a および T11g を組み合わせて行った PCR において、PCR 産物が確認でき、プライマー-T11c では増幅産物が得られなかった (Fig.3)。プライマー-T11a と AP51 あるいは AP53 の組み合わせたでは、鉄欠乏下で特有のバンドはそれぞれ 4 本および 3 本確認できた。いずれのバンドも、500 bp から 1,500 bp の間であった。なお、プライマー-T11g と Ap56 の組み合わせでは、はっきりとしたバンドの違いは確認できなかった。結果、鉄欠乏下に特有の全 19 本のうち 14 本のバンドを切り出し、精製した後、TA クローニングに供した。

また、キレートを添加した培養では、T11a と AP53 あるいは AP56 を組み合わせた際、特定のバンドが各 1 本ずつ得られ、これらのバンドは鉄濃度 0 μM の培地での培養でも観

察された。

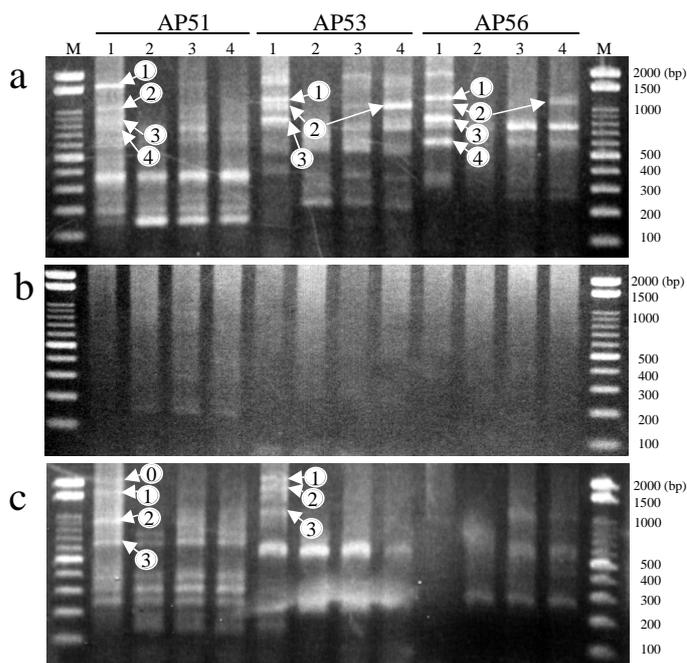


Fig. 3 Nucleotide patterns of PCR products using each differential display primer T11a, T11c, or T11g, combined to each primer AP51, AP53, or AP56. The algal culture in f/2 culture medium including iron at the concentrations of 0 μ M (lanes 1), 0.05 μ M (lanes 2) and 1 μ M (lanes 3) and the algal culture to which chelate was added at 10 day incubation (lanes 4) were used. The first and last lanes represent a molecular weight 100 bp marker (TOYOBO).

3.2.2 核酸塩基配列の解析

精製した PCR 産物を組み込んだクローンの塩基配列を決定したところ、全 83 クローンの核酸塩基配列が得られた。クローン間で、塩基配列を比較し相同性を解析したところ、17 の遺伝子タイプに分類された (Table.1)。なお、クローン間で 98.0% 以上の高い相同性を示すクローンを同遺伝子タイプとした。

Table 1. Genetic types of clones of PCR products in each bands on agarose gel, and hypothetical functions of each genetic type.

Types	T11a				T11g					hypothetical function	total			
	AP51		AP53		AP51			AP53						
	3	4	2	3	1	2	4	0	1	2	3	1+2		
a	2	2								6			Eucaryotic release factor	10
b	3												40S ribosome protein	3
c			6	2									unknown	8
d	1	1											unknown	2
e					5	6		4					unknown	15
f	1	2	1	8								1	unknown	13
g			1						5				Enolase	6
h									3				Enolase	3
i									1				unknown	1
j										1			unknown	1
k										1			unknown	1
l						2					9		unknown	11
m			1										unknown	1
n												1	unknown	1
o												1	Aspartic protease	1
p						5							Heat shock protein (HSP90 family)	5
q						1							NADH dehydrogenase	1
total	7	5	8	11	5	6	8	4	9	8	9	3		83

(clones)

を示すクローンを同遺伝子タイプとした。各バンドごとでは、T11a-AP51-3 で 4 タイプ (a,b,d,f)、T11a-AP51-4 で 3 タイプ (a,d,f)、T11a-AP53-2 で 3 タイプ (c,f,m)、T11a-AP53-3 で 3 タイプ (c,f,g)、T11a-AP56-1 で 1 タイプ (e)、T11a-AP56-2 で 1 タイプ (e)、T11a-AP56-4 で 3 タイプ (l,p,q)、T11g-AP51-0 で 1 タイプ (e)、T11g-AP51-1 で 3 タイプ (g,h,i)、T11g-AP51-2 で

3タイプ(a,j,k)、T11g-AP51-3で1タイプ(l)、T11g-AP53-1+2で3タイプ(f,m,o)の遺伝子タイプが検出された。各バンドには複数の遺伝子タイプが含まれ、アガロースゲル上の一つのバンドが複数の各酸配列で構成されていることが示された。また、各バンドに共通した遺伝子タイプも見られ、バンドにまたがって複数の遺伝子タイプが存在することも示唆された。

次に、PCR産物クローンの核酸塩基配列およびアミノ酸配列をもとに、BlastaとFastaによって既知配列との相同性検索を行った。その結果、全17遺伝子タイプのうち、7遺伝子タイプが既知の遺伝子配列と高い相同性を示し、10遺伝子タイプが未知の配列となった(Table.1)。特に、クローン数が多く得られた遺伝子タイプでは、タイプaが真核生物翻訳終結因子と、タイプgとhがエノラーゼと、タイプpが熱ショック蛋白(HSP90family)とアミノ酸配列に対して高い保存性を示した。また、近隣結合法によって系統樹を作製した結果、いずれも微細藻と近縁となり、微細藻特有の配列であることが実証された(Fig.4)。

一方、クローン数が少ないものの、タイプbが40Sリボソーム蛋白質と、タイプoがアスパラギン酸プロテアーゼと、タイプqがNADH脱水素酵素と高い相同性を示した。

4. 考察

培地に人工配位子を初日に添加した際、*Prymnesium* sp.の増殖は、2,2'-Bipyridy、FerroZineおよびDFBによって著しく阻害されることが明かとなった。特に、DFBは低濃度でも増殖抑制効果が期待できる。一方、*Prymnesium* sp.の10日目の培養に2,2'-BipyridyおよびDFB

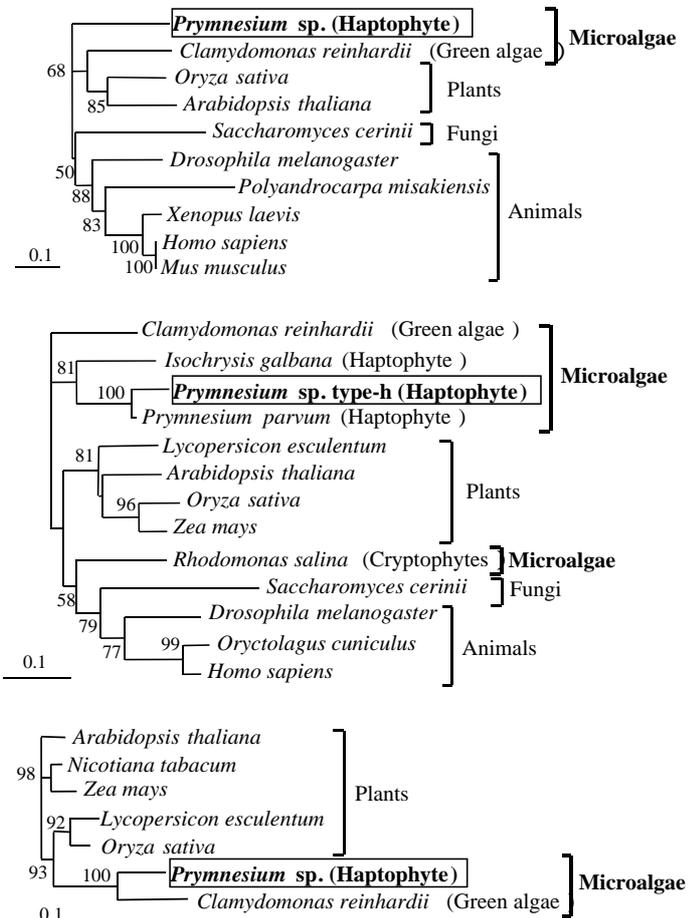


Fig. 4 Phylogenetic tree for amino acid sequence of the eucaryotic release factor, the enolase, and the heat shock protein of *Prymnesium* sp. The tree was calculated from a dissimilarity matrix of ca.125 bp, 83 bp and 152 bp alignment, respectively, using a neighbor-joining algorithm. Bootstrap values larger than 50% (after 1000 resampling) are indicated on the branch.

を加えた結果、2,2'-Bipyridy では添加直後に増殖阻害がみられ、DFB では添加 10 日後に生長量が減少した。2,2'-Bipyridy⁽¹⁴⁾および DFB^(15,16)は、いずれも鉄と錯形成し、植物および微細藻を鉄欠乏状態にすることが報告されている。従って、赤潮藻である *Prymnesium* sp. も鉄欠乏に陥り、成長が阻害されたと考えられる。しかも、2,2'-Bipyridy の効力には速効性があり、DFB は低濃度でも効力を発揮する傾向があった。一方、FerroZine および BPDS を *Prymnesium* sp.の培養 10 日目に添加しても、生長量に変化が見られなかった。FerroZine⁽¹⁷⁾および BPDS⁽¹⁸⁾は二価鉄と主に結合しやすいため、微細藻が三価鉄を細胞数を維持したと推察できる。*Prymnesium* sp.は、シデロホアを産出し、錯体となった三価鉄を取り込んだと見なせる。あるいは、膜上のキレート還元酵素によって、膜周辺で三価鉄を二価鉄に還元し、速やかに細胞内に取り込んだ可能性もある。赤潮原因藻を鉄制限するには、2,2'-Bipyridy および DFB 等の三価鉄と錯体を形成する配位子が適当であると考えられる。

ディファレンシャル・ディスプレイ法に *Prymnesium* sp.の培養を供した結果、真核生物翻訳終結因子、エノラーゼ、熱ショック蛋白 (HSP90family)、40S リボソーム蛋白質、アスパラギン酸プロテアーゼおよび NADH 脱水素酵素と高い相同性を示す核酸配列が、鉄欠乏培養の PCR 産物から特異的に検出された。特に、真核生物翻訳終結因子、エノラーゼおよび熱ショック蛋白 (HSP90family) の配列で、クローン数が多く、系統樹上で微細藻と近縁となった。真核生物翻訳終結因子および熱ショック蛋白のアミノ酸配列のデータベースが充実しており⁽¹⁹⁾、*Prymnesium* sp.のアミノ酸配列はモチーフを高く保存していた。エノラーゼの配列にはハプト藻に特異的な配列の挿入が見られた^(20,21)。従って、*Prymnesium* sp.の真核生物翻訳終結因子、エノラーゼおよび熱ショック蛋白が核酸配列として得られたことは確かである。

得られた機能遺伝子は、鉄欠乏下において転写誘導され、鉄欠乏下の藻細胞で何らかの役割を担うと考えられる。真核生物翻訳終結因子および 40S リボソーム蛋白質は、mRNA から蛋白質を翻訳する際に機能する。特に 40S リボソーム蛋白質は、翻訳の促進に従い遺伝子が転写誘導されることが報告されている^(22,23)。また、熱ショック蛋白 (HSP90family) は、変性した蛋白質構造を修復する。アスパラギン酸プロテアーゼは、変性した不要な蛋白質を分解除去する働きをもつ。鉄欠乏下では、微細藻は環境ストレスを受け、多くの機能性蛋白質が損傷する。そのため、蛋白質の生合成を促進すると共に、変性蛋白質を修復し、除去する必要がある。そこで、上記の蛋白質群の遺伝子が転写誘導され、鉄欠乏ストレスに適応していると推察できる。一方、エノラーゼは、解糖系に関わる酵素であり、ホスホグリセリン酸をホスホエンオールピルビン酸へと変換し、ATP の生産を促す。生物は鉄が欠乏すると、ヘム蛋白質の生成が滞り、酸素呼吸によるエネルギー供給が低下する⁽¹⁾。微細藻においても酸素呼吸が停止し、無酸素呼吸である解糖系でエネルギーを補うこととなり、解糖系酵素であるエノラーゼが転写レベルで誘導発現されたと考えられる。鉄欠乏下にある *Arabidopsis* の誘導遺伝子を DNA マイクロアレイで解析した結果、全遺伝子の 1/3

の遺伝子が誘導されることが報告されている⁽²⁴⁾。今回得られた遺伝子群も、*Arabidopsis* で転写誘導されており、鉄が不足したことが間接的に転写を誘導したと見なせる。ただし、全遺伝子タイプの内、9タイプは未知遺伝子であったため、これらの未知遺伝子は、鉄取込みに直接関わる機能をコードしているかも知れない。また、有機配位子を添加した培養で誘導された遺伝子タイプ c, e, f および m は、未知遺伝子であり、鉄欠乏で特異的に転写誘導され、鉄取込み自体に関わる遺伝子群である可能性が高い。

本研究では、*Prymnesium* sp. を人工有機配位子によって増殖を抑制することができた。こうした有機配位子は、赤潮原因藻の増殖制御に役立てられるであろう。また、ディファレンシャル・ディスプレイ法に供したところ、鉄欠乏下で誘導される遺伝子群のクローニングに成功した。得られた既知遺伝子は、環境ストレスに応答する遺伝子群であった。従って、微細藻は、鉄不足によりストレスを受け、転写レベルで遺伝子を誘導発現させ、ストレスによって被る損傷を修復していると結論付けられる。

5. 今後の課題

各遺伝子タイプが、鉄欠乏に応答して転写誘導されることをノーザンブロットングで検証する。この際、リンや窒素等の栄養塩が不足した培養を、鉄欠乏の培養と比較することで、未知遺伝子タイプの鉄欠乏に対する特異性も確認する。ディファレンシャル・ディスプレイ法の技術改善として、アクリルアミドゲルを使用し、1バンドから1遺伝子タイプが得られるように、ゲル上での核酸分離能を上げる。

今後は、鉄欠乏に高い特異性を示す遺伝子群をクローン化し、赤潮を有機配位子で防除する際、鉄欠乏を示すマーカーとして使用する予定である。マーカー遺伝子としては、鉄欠乏で特異的に転写誘導される転写因子、鉄キレート還元酵素や鉄トランスポーターの遺伝子が有効である。植物では、鉄欠乏下に移行して1時間程度で転写誘導が開始されることが分かっている⁽²⁵⁾。したがって、有機配位子を添加した直後の培養をディファレンシャル・ディスプレイ法に供すべきである。

普遍化された取込み機構に基づき、赤潮の原因種のみを鉄欠乏させる有機配位子を選択する。微細藻は種や生息場所が異なれば、鉄取込み機構も多様になると報告されている⁽²⁶⁾。そこで、赤潮藻の種を変えて、ディファレンシャル・ディスプレイ法を施行し、鉄欠乏下で転写誘導される遺伝子ライブラリーを構築することで、鉄取り込み機構の種特異性を解明して行く。

参考文献

- 1) J.A. Raven, Prediction of Fe and Mn use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and C assimilation pathway. *New Phytologist*, 116 (1990) 1-17.
- 2) J. Wu, E. Boyle, W. Sunda, and L.S. Wen, Soluble and colloidal iron in the oligotrophic North Atlantic and North Pacific. *Science*, 293 (2001) 847-849.

- 3) M. Boye, C.M.G. van den Berg, J.T.M. de Jong, H. Leach, P. Croot, and H.J.W. de Baar, Organic complexation of iron in the Southern Ocean. *Deep Sea Res. Part I: Oceanographic Research Papers*, 48 (2001) 1477-1497.
- 4) C. Curie, and J.F. Briat, Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, (2003) 183-206.
- 5) W. Schmidt, Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci.*, 8, (2003) 188-193.
- 6) H.G. Weger, Ferric and cupric reductase activities in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: experiments using iron-limited chemostats. *Planta*, 207 (1999) 377-384.
- 7) J.A. Lynnes, T.L.M. Derzaph, and H.G. Weger, Iron limitation results in induction of ferricyanide reductase and ferric chelate reductase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 204 (1998) 360-365.
- 8) S.W. Wilhelm, and C.G. Trick, Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophore production is a common response. *Limnol. Oceanogr.*, 39 (1994) 1977-1984.
- 9) C.G. Trick, S.W. Wilhelm, and C.M. Brown, Alterations in cell pigmentation, protein expression, and photosynthetic capacity of the cyanobacterium *Oscillatoria tenuis* grown under low iron conditions. *Can. J. Microbiol.*, 41 (1995) 1117-1123.
- 10) H. Hasegawa, T. Maki, K. Asano, K. Ueda, and K. Ueda, Detection of iron(III)-binding ligands originating from marine phytoplankton using cathodic stripping voltammetry. *Anal. Sci.*, 20 (2004) 89-93.
- 11) G.C. Trick, R.J. Andersen, N.M. Price, A. Gillam, and P.J. Harrison, Examination of hydroxamate-siderophore production by neritic eukaryotic marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 75 (1983) 9-17.
- 12) K.M. Benderliev, and N.I. Ivanova, High-affinity siderophore-mediated iron-transport system in the green alga *Scenedesmus incrassatulus*. *Planta*, 193 (1994) 163-166.
- 13) K.H. Coale, X. Wang, S.J. Tanner, and K.S. Johnson, Phytoplankton growth and biological response to iron and zinc addition in the Ross Sea and Antarctic Circumpolar Current along 170W. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 50 (2003) 635-653.
- 14) G.A. Vert, J.F. Briat, and C. Curie, Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol.*, 132 (2003) 796-804.
- 15) M.L. Eldridge, C.G. Trick, M.B. Alm, G.R. DiTullio, E.L. Rue, K.W. Bruland, D.A. Hutchins, and S.W. Wilhelm, Phytoplankton community response to a manipulation of bioavailable iron in HNLC waters of the subtropical Pacific Ocean, *Aquat. Microb. Ecol.*, 35 (2004) 79-91.
- 16) M.L. Wells, and C.G. Trick, Controlling iron availability to phytoplankton in iron-replete coastal waters. *Marine Chem.*, 86 (2004) 1-13.
- 17) D. Eide, M. Broderius, J. Fett, and M.L. Guerinot, A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93 (1996) 5624-5628.
- 18) H.G. Weger, J.K. Middlemiss, and C.D. Petterson, Ferric chelate reductase activity as affected by the iron-limited growth rate in four species of unicellular green algae (chlorophyta). *J. Phycol.*, 38 (2002) 513-519.
- 19) Y. Inagaki, C. Blouin, W.F. Doolittle, and A.J. Roger, Convergence and constraint in eukaryotic release factor 1 (eRF1) domain 1: the evolution of stop codon specificity. *Nucleic Acids Res.*, 30 (2002) 532-544.
- 20) P.J. Keeling, and J.D. Palmer, Lateral transfer at the gene and subgenomic levels in the evolution

- of eukaryotic enolase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98 (2001) 10745-10750.
- 21) J.T. Harper, and P.J. Keeling, Lateral gene transfer and the complex distribution of insertions in eukaryotic enolase. *Gene*, 340 (2004) 227-235.
- 22) A. Karsi, A. Patterson, J. Feng, and Z. Liu, Translational machinery of channel catfish: I. A transcriptomic approach to the analysis of 32 40S ribosomal protein genes and their expression. *Gen*, 291 (2002) 177-186.
- 23) R. Shemer, I. Eibschitz, and B. Cavari, Isolation and characterization of medaka ribosomal protein S3a (fte-1) cDNA and gene. *Gene*, 250 (2000) 209-217.
- 24) O. Thimm, B. Essigmann, S. Kloska, T. Altmann, and T.J. Buckhout, Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.*, 127 (2001) 1030-1043.
- 25) Y.H. Wang, D.F. Garvin, and L.V. Kochian, Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiol.*, 130 (2002) 1361-1370.
- 26) R.F. Strzepek, and P.J. Harrison, Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature*, 431 (2004) 689-692.

Organic ligands regulating growth of microalgae and the regulation mechanisms

Teruya Maki

Kanazawa university , Graduate School of Natural Science and Technology

Summary

(Introduction) The growth of harmful microalgae causes red tides in Japanese embayments, and has given severe damage to both natural and cultured fish and shellfish. Fishery society requires powerful strategies reducing the occurrences of red tide. The ligands limiting the iron uptake of microalgae and reducing the algal growth were useful tool for regulating the microalgal biomass. In this study, the four organic ligands were evaluated for preventing the microalgae from uptaking iron and growing under iron limitation. Furthermore, for the molecular mechanism of microalgal cells adapting to iron deficiency, the functional genes induced the transcription by iron deficiency were cloned using differential display analysis.

(Materials and Methods) *Prymnesium* sp. causing red tide was incubated in modified f/2 medium including 2,2'-Bipyridy, FerroZine, BPDS (bathophenanthroline disulphonate), or DFB (defferrioxamine B). After incubation, the growth yields were determined using absorbance of 550 nm at every two days. The algal culture in f/2 culture medium including iron at the concentrations of 0 μ M, 0.05 μ M and 1 μ M and the algal culture to which chelate was added at 7 day incubation were used for differential display analysis. Total RNA was obtained from each culture, and cDNA was synthesized from total RNA. The PCR products of cDNA were observed using the agarose gel electrophoresis. The specific bands to iron limited culture were purified and cloned. Nucleotide sequences of the clones were determined and investigated using FAST research on genbank database.

(Results and Discussion) The two ligands, 2,2'-Bipyridy and DFB, inhibited the growth of *Prymnesium* sp., while the other two ligands, FerroZine and BPDS, showed no effects on the algal growth. The 2,2'-Bipyridy and DFB which bind Fe (III) would prevent *Prymnesium* sp from uptaking iron and lead to iron deficiency. At the differential display analysis, 17 specific bands to iron limited culture appeared on the agarose gel, and nucleotide sequences of 83 clones of the specific bands were determined. The 83 clones were classified into 17 genetic types, of which 8 types similar to the known functional genes and 9 types indicated unknown sequences. Especially, the 3 types of the known functional genes, such as eucaryotic release factor, enolase, and heat shock protein, occupied 24 clones of all 83 clones, suggesting that the algal cells under the stress of iron deficiency induce to transcript these functional genes to adapt the environmental stress.