

助成番号 0615

赤潮抑制型キレート剤が及ぼす微細藻の生理生態への影響の解明

牧 輝弥

金沢大学自然科学研究科

概要 【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 parvum*、渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* 及びラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の混合培養に、2,2'-Bipyridine、Ferrozine および DFB の3種の人工有機配位子を添加して培養し、各微細藻の生残率を経時的に顕微鏡観察によって測定した。DD法には、*P. parvum* の培養6日目にDFBを0 μM 、10 μM 及び100 μM となるように加え、DFBを添加した後、経時的(添加直後、添加1日後、添加5日後及び添加9日後)に回収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】 3種の微細藻を混合した培養にキレート剤を添加し、鉄欠乏状態にしたところ、キレート剤無添加区に較べて *H. circularisquama* と *H. akashiwo* の生残率が増大し、*P. parvum* が減少する傾向にあったため、鉄欠乏状態において、先の2種の微細藻種は鉄不足に対して有利に適応でき、優占しやすいと考えられる。キレート剤は特定種の増殖抑制に使用できる可能性が見いだされた。一方、DD法では、鉄欠乏下で転写誘導される全56の遺伝子タイプが得られた(Table 1)。その内、27遺伝子タイプが、既知の機能遺伝子配列と高い相同性を示し、「鉄摂取」、「シグナル伝達」、「エネルギー生成」、「タンパク質修復と分解」及び「細胞構造の変化」に関わる遺伝子群と近縁となった。鉄欠乏によって、微細藻は不足した鉄を補う、あるいは鉄欠乏ストレスに適応するため遺伝子発現を誘導し、鉄欠乏に対処すると考えられる。残りの遺伝子タイプの内、8遺伝子タイプが未知の機能遺伝子配列と類似し、21遺伝子タイプが未知の配列となった。これらの遺伝子タイプも、鉄取り込みに直接関わる機能をコードしている可能性がある。今後、鉄摂取に関わる遺伝子群を解析することによって、微細藻の鉄取り込み機構を分子レベルで明かして行く。

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、鉄と配位結合する有機配位子(有機キレート剤)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られてきた⁽¹⁾。

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⁽²⁾。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高い鉄要求量を示す。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、低濃度の有機物質が鉄と錯

形成しているため、鉄は生物が利用できない化学形態となっている^(3,4)。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^(5,6)。単細胞性緑藻^(7,8)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^(9,10,11)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^(12,13)。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キレート剤の種特異性を検証するため、有機キレート剤を用いたバッチ培養により微細藻の競合実験を行った。また、有機キレート剤によって鉄欠乏にした微細藻の培養を、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ことで、赤潮原因藻が鉄欠乏に適応する機構を考察する。

2. 研究方法

培養実験

培養実験には、赤潮原因藻であるハプト藻 *Prymnesium parvum*、渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* 及びラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の3種を用いた。赤潮原因藻を f/2 培地に接種し、温度20℃、光強度 110 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{sec}$ 、14 時間明-10 時間暗の培養条件下で維持培養した。微細藻を鉄欠乏にするキレート剤として、2,2'-Bipyridine (3-(pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine)、Ferrozine、DFB (defferrioxamine B) の3種の人工キレート剤を実験に供した。それぞれ有機キレート剤は、鉄と錯形成し、植物を鉄欠乏にすることが知られている^(14,15,16)。鉄濃度 0.1 μM を含む f/2 培地に *P. parvum*、*H. circularisquama* 及び *H. akashiwo* を接種した後、維持培養と同様の培養条件下で培養した。6日間培養した各種微細藻を、*P. parvum* と *H. circularisquama*、*H. circularisquama* と *H. akashiwo*、*H. akashiwo* と *P. parvum* 及び3種の微細藻全てと四つの組み合わせで同細胞ずつ混合した。それぞれの培養液に3種のキレート剤 2,2'-Bipyridine、Ferrozine 及び DFB をそれぞれ 1 μM 、10 μM 及び 100 μM となるよう加えた。培養液を 10 μL 取り、2日毎

に各微細藻種を顕微鏡観察において一視野あたりの各微細藻種を区別して細胞数を計数し、各微細藻種の生残率(全微細藻細胞数に対する各微細藻細胞数の割合)を算出した。なお、1回あたり5視野を計数し平均した。

ディファレンシャル・ディスプレイ法

鉄濃度 0.1 μM を含む f/2 培地に *P. parvum* を接種し、維持培養と同様の培養条件下で培養した。培養 6 日目に DFB を 0 μM 、10 μM 及び 100 μM となるよう加えた。DFB を添加した後、経時的(添加直後、添加 1 日後、添加 5 日後及び添加 9 日後)に *P. parvum* 培養液 40 mL を 12,500 rpm、2 分間で遠心した。上澄みを取り除いた後、液体窒素を用いて凍結し、-80℃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, T11g) を用いた PCR 増幅に供した。PCR 産物を、8% アクリルアミド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、核酸塩基配列がコードする機能を解析した。

3. 結果及び考察

鉄欠乏下における微細藻種の混合培養実験

微細藻種を4通りの組み合わせた混合培養へ3種のキレート剤 2,2'-Bipyridine、Ferrozine 及び DFB をそれぞれ 1 μM 、10 μM 及び 100 μM の濃度となるよう加え、顕微鏡観察によって計数した細胞数から各微細藻種の生残率を経時的に求めた。*P. parvum* と *H. circularisquama* を混合培養したところ、対照区(キレート剤を添加していない実験区)に比べ、2,2'-Bipyridine 100 μM の添加区では、*H. circularisquama* の生残率が *P. parvum* の生残率を上回り、4日目以降は *H. circularisquama* の生残率は 80% を占めた(Fig. 1)。一方、Ferrozine 及び DFB の添加区では *P. parvum* が優占種となり、50% から 90% の生残率を占めた。*H. circularisquama* と *H. akashiwo* を混合培養したところ、2,2'-Bipyridine 100 μM の添加区では、*H. circularisquama*

の生残率が增大し、4日目以降は100%となった(Fig. 2)。

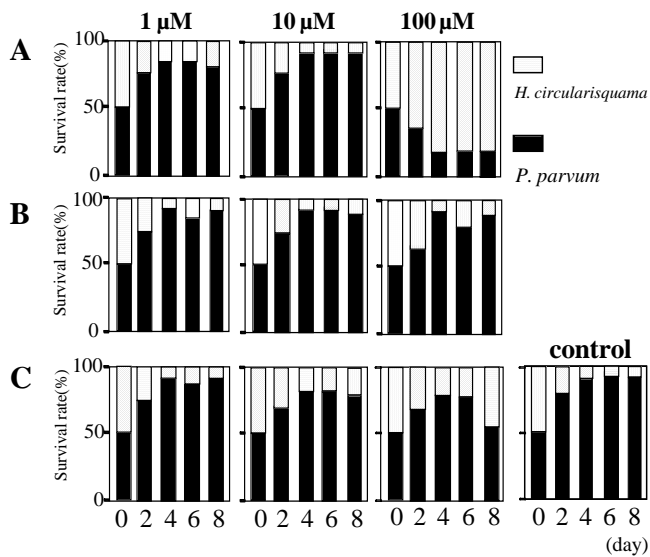


Fig. 1 Change in survival rates of *P. parvum* and *H. circularisquama* in the f/2 culture medium to which chelators, such as 2,2'-Bipyridine (A), Ferrozine (B) and DFB (C), at the concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M.

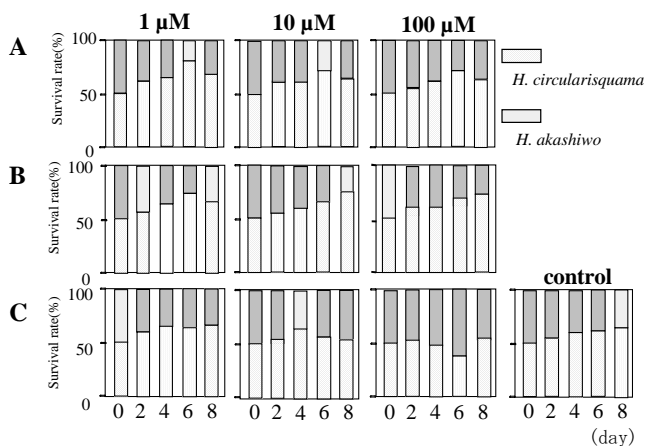


Fig. 2 Change in survival rates of *H. akashiwo* and *H. circularisquama* in the f/2 culture medium to which chelators, such as 2,2'-Bipyridine (A), Ferrozine (B) and DFB (C), at the concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M.

また、DFBの添加区では、他の添加区に比べ *H. akashiwo* の生残率が增大し、50%から60%を占めた。*H. akashiwo* と *P. parvum* を混合培養したところ、低濃度のキレート剤添加区において、*P. parvum* の生残率が2日目に増大し、4日目以降は100%に達した(Fig. 3)。一方、高濃度のキレート剤添加区では、対照区に較べ、2日目の *H. akashiwo* の生残率が增大し、20%から65%を占めた。3種の微細藻を混合培養したところ、対照区で各微細藻は *P.*

parvum > *H. circularisquama* > *H. akashiwo* の順に生残率が高くなった(Fig. 4)。しかし、2,2'-Bipyridine 100 μ M の添加区では、*H. circularisquama* の生残率が増大し、8日目には *P. parvum* の生残率を凌ぎ、65%を占めた。また、2日目の *H. akashiwo* の生残率も対照区に較べ、2倍から12倍に増大した。

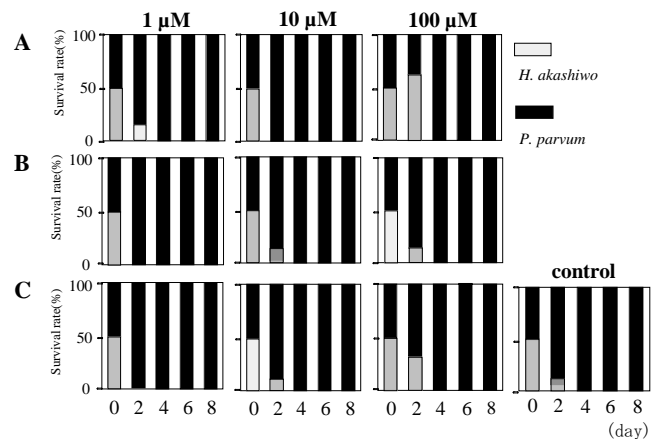


Fig. 3 Change in survival rates of *H. akashiwo* and *P. parvum* in the f/2 culture medium to which chelators, such as 2,2'-Bipyridine (A), Ferrozine (B) and DFB (C), at the concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M.

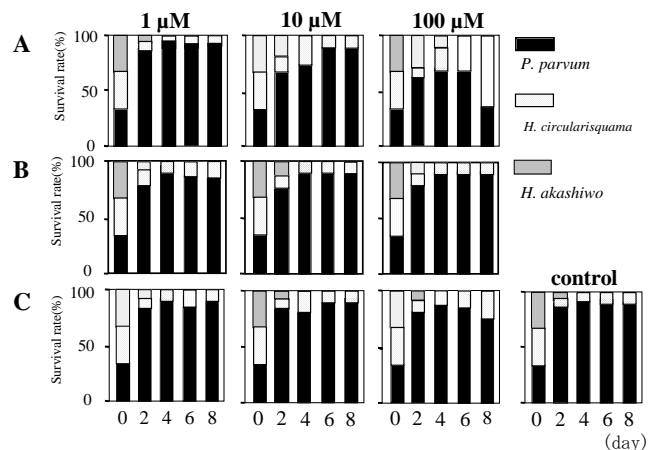


Fig. 4 Change in survival rates of *P. parvum*, *H. akashiwo* and *H. circularisquama* in the f/2 culture medium to which chelators, such as 2,2'-Bipyridine (A), Ferrozine (B) and DFB (C), at the concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M.

キレート剤 2,2'-Bipyridine^(1,14)および DFB^(1,15,16)は、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。キレート剤を添加することで、対照区に較べて *H. circularisquama* と *H. akashiwo* の生残率が増大する傾向にあったため、鉄欠乏状態において、この2種の

微細藻種は *P. parvum* に比べ鉄不足に対して有利に適応でき、優占しやすいと考えられる。二価鉄と結合しやすい 2,2'-Bipyridine を添加した培養では、*H. circularisquama* の生残率が增大したため、他の 2 種の微細藻と比較して三価の鉄を取り込みやすいと推察できる。これまで、細菌や酵母などの微生物は、有機配位子(シデロホア)を産出し、三価鉄と錯形成したシデロホアを細胞内に取り込むことが報告されている⁽⁹⁾。*H. circularisquama* も、有機配位子(シデロホア)を介した三価鉄の取り込み機構を有している可能性がある。*H. akashiwo* は、三価鉄と結合しやすい DFB 存在下で、生残率が增大したことから、強い結合力を有するキレート剤存在下でも増殖しやすいと考えられる。植物プランクトンの多くは、鉄を解離させる強力な還元酵素によって膜周辺で三価鉄を二価鉄に還元し、二価鉄を取り込んで主な鉄源としている^(5,6)。*H. akashiwo* は、強い還元酵素を有しており、二価鉄を効率良く取り込めると推測できる。また、*P. parvum* が他の 2 種の微細藻に比べ生残しやすかったが、これは *P. parvum* の生長速度が大きいためと考えられる。さらに、*H. akashiwo* が *H. circularisquama* より生残率が低いのは、*H.*

circularisquama が毒を産出し⁽¹⁷⁾、*H. akashiwo* の増殖を阻害している可能性がある。微細藻種の鉄取り込み機構は、種によって異なることが培養実験レベルで実証されており、それぞれの種が生息する海域が限定されると報告されている^(18,19)。従って、キレート剤によって鉄欠乏になった微細藻では、鉄取り込みに適した微細藻種が優占すると考えられる。

鉄欠乏に応答する遺伝子群のクローン化

P. parvum の細胞から抽出した total RNA を鋳型にして cDNA を合成し、ディファレンシャル・ディスプレイ用プライマーを用いた PCR 増幅を行い、8.0%のポリアクリルアミドゲル上で電気泳動したところ、複数のバンドパターンが得られた。プライマー Ap56 と T11a を組み合わせた PCR 増幅において、DFB を添加した鉄欠乏培養に特異的なバンドは、1,500 bp から 500 bp の間で 8 本検出された (Fig. 5)。また、プライマー Ap51 と T11g を組み合わせた場合、鉄欠乏の培養に特異的なバンドは 1,000 bp から 500 bp の間で 7 本確認できた。プライマー Ap51 と T11a を組み合わせた場合は、鉄欠乏の培養に特異的なバンドは 1,000 bp から 300 bp の間で 10 本検出された。全 25 本のバンドは、

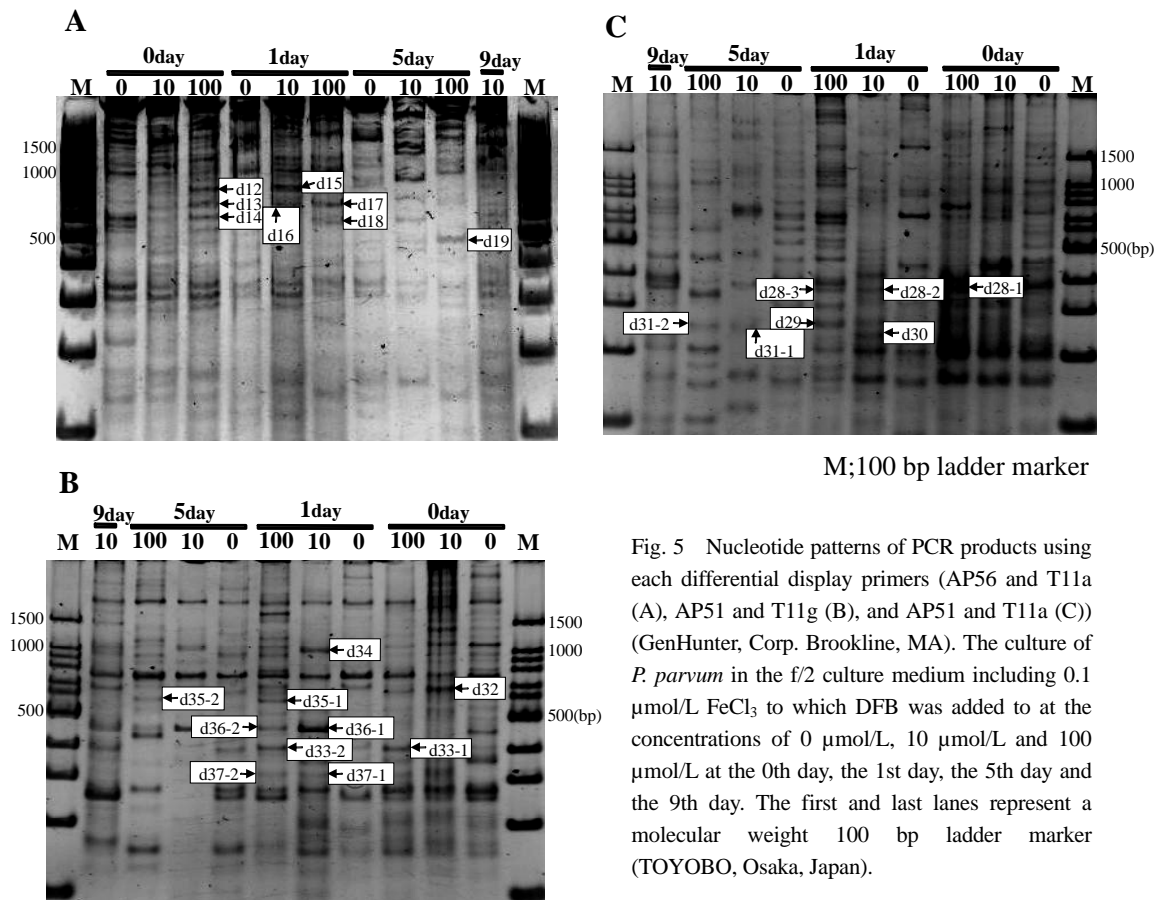


Fig. 5 Nucleotide patterns of PCR products using each differential display primers (AP56 and T11a (A), AP51 and T11g (B), and AP51 and T11a (C)) (GenHunter, Corp. Brookline, MA). The culture of *P. parvum* in the f/2 culture medium including 0.1 μmol/L FeCl₃ to which DFB was added to at the concentrations of 0 μmol/L, 10 μmol/L and 100 μmol/L at the 0th day, the 1st day, the 5th day and the 9th day. The first and last lanes represent a molecular weight 100 bp ladder marker (TOYOBO, Osaka, Japan).

いずれもDFB添加区である鉄欠乏下にある微細藻に特異的に検出されていることから、これらのバンドは、鉄欠乏に適応するための機能をコードした遺伝子の核酸を含んでいると考えられる。

核酸塩基配列に基づく機能解析

ポリアクリルアミドゲルより切り出したバンド、計25本のうち特に明瞭なバンド23本を選択し、TAクローニングに供し、全63クローンの核酸塩基配列を決定した。核酸塩基配列の解析に基づき、高い相同性(90%以上)を示したクローンの配列を同一の遺伝子タイプとした結果、56の遺伝子タイプに分類された。また、一つのバンドから複数の遺伝子タイプが検出されており、ポリアクリルアミドゲル上にバンドとして確認された核酸は複数種であると考えられる。決定した核酸塩基配列をDDBJデータベース上の既知遺伝子配列と比較したところ、27遺伝子タイプが、既知の機能遺伝子配列と高い相同性を示し、8遺伝子タイプが未知の機能遺伝子配列と類似し、21遺伝子タイプが未知の配列となった。既知の遺伝子配列と高い相同性を示した全27の遺伝子タイプは、機能に基づき分類したところ、「鉄摂取」、「シグナル伝達」、「エネルギー生成」、「タンパク質修復と分解」及び「細胞構造の変化」に大別できた(Table 1)。これらの機能遺伝子は、鉄欠乏下において転写誘導され、鉄欠乏下の微細藻細胞で何らかの役割を担うと考えられる。

「鉄摂取」には、チオエステラーゼを、リン酸トランスポーター、膜タンパク質、アエロバクチン合成酵素、Cuトランスポーターをコードする配列と高い相同性を示す遺伝子タイプが含まれる。鉄欠乏下にある微生物は、トランスポーターを誘導的に産出し、鉄摂取を促進することが報告されている⁽²⁰⁾。上記の機能をコードする遺伝子群は、鉄欠乏下において、鉄取り込みを促進するために転写され、鉄欠乏を受け上位で誘導発現すると見なせる。リン酸トランスポーター、膜タンパク質、Cuトランスポーターは、不足した鉄を取り込み補うために、転写量が増大したと考えられる。また、微細藻は、鉄と強い錯生成力を有するシデロホアを産出し、シデロホアと結合した鉄(III)を細胞内に取り込む機構を有することが報告されている⁽⁹⁾。チオエステラーゼは、アエロバクチンをアミノ酸から合成する際に必須の酵素である⁽²¹⁾。また、他のアエロバクチン合成酵素も今回分離された。従って、*P. parvum* は、シデロホアを産出して鉄を取り込んでいる可能性が示された。

「シグナル伝達」の分類群には、キナーゼを、ノイラミニ

ナーゼ、サイトカイン・レセプター、調整因子 LysR、シタキシシン結合タンパク質をコードする配列と高い相同性を示す遺伝子タイプが含まれる。これらの遺伝子タイプは、シグナル伝達に関わる機能をコードすると判断でき、鉄の欠乏情報を受け取る他のタンパク質を誘導的に発現する際に転写を促進させる因子として働くと考えられる。特に、LysR は、シデロホア合成に関わる遺伝子を誘導発現させる転写因子であるため⁽²²⁾、微細藻の鉄欠乏に適応するための遺伝子発現を制御している可能性がある。

「エネルギー生成」の分類群には、シクロムオキシダーゼ、酸化還元酵素、シクロオキシゲナーゼ成熟酵素およびピロリン酸加水分解酵素をコードする配列と高い相同性を示す遺伝子タイプが属した。これらの機能は、鉄欠乏下において欠乏したエネルギーを補充する際に誘導発現すると推察できる。特に、ピロリン酸加水分解酵素は、解糖系に関わる酵素であり、ATPの生産を促す。生物は鉄が不足すると、ヘムタンパク質の生成が滞り、酸素呼吸によるエネルギー供給が低下する。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、解糖系酵素であるピロリン酸加水分解酵素が転写レベルで誘導発現されたと考えられる。一方、シクロムオキシダーゼ及び酸化還元酵素は、ヘムタンパクを含み、一般的にこれらのタンパク質は鉄欠乏下で誘導されないと見なされている⁽²³⁾。今回は、DFBを用いて微細藻を鉄欠乏状態にしたため、鉄欠乏が生じるまでに誘導発現する遺伝子も分解でき、ヘムの不足を補うためにヘムの合成が転写レベルで促進された可能性がある。

「タンパク質修復と分解」の分類群には、プロテアソームおよびヒートショックタンパク質をコードする配列と高い相同性を示す遺伝子タイプが属した。ヒートショックタンパク質は、変性したタンパク質構造を修復する。プロテオソームは、変性した不要なタンパク質を分解除去する働きを持つ。鉄欠乏下では、微細藻は環境ストレスを受け、多くの機能性タンパク質が損傷する⁽²⁴⁾。そのため、鉄欠乏状態にある微細藻は、タンパク質の生合成を促進すると共に、変性タンパク質を修復し、除去する必要がある。そこで、上記のタンパク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。

「タンパク質修復と分解」の分類群には、タンパク質の合成として、葉緑体リボソームタンパク質、真核生物翻訳終結因子を、DNAポリメラーゼおよびtRNA還元酵素をコードする配列と高い相同性を示す遺伝子タイプが含まれる。

Table 1. The hypothetical functions of the consensus amino acid sequence deduced from clones which include the nucleotide in the band specific to iron-deficient samples on the polyacrylamide gel.

Functional category	Hypothetical function	Similarity (%)	Organism	Kingdom
Iron uptake	ABC phosphate transporter	31	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria
	membrane protein	33	<i>Synechococcus</i> sp.	Syanobacteria
	Aerobactin biosynthesis protein, IucA/IucC family	29	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria
	Putative ATP dependent copper transporter	41	<i>Zea mays</i>	Plant
	Thioesterase family protein	29	<i>Stappia aggregata</i>	Bacteria
Signal	Kelch repeat and BTB domain-containing protein C16orf44	100	<i>Bos taurus</i>	Animal
	Trans-sialidase	31	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protozoa
	Class I helical cytokine receptor number 30	44	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Animal
	Regulatory protein, LysR	38	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Bacteria
	Syntaxin binding protein 1, putative	42	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protozoa
	LysM domain protein widely conserved protein with eukaryotic protein kinase domain	36 33	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	Bacteria Bacteria
Energy production	Cytochrome c oxidase subunit 3	58	<i>Emiliana huxleyi</i>	Protozoa
	NADH:ubiquinone oxidoreductase	84	<i>Solanum tuberosum</i>	Plant
	Cyclooxygenase (COX)1T1a maturase	36	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Plant
	Thiamine pyrophosphate enzyme, N-terminal TPP binding region	30	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Bacteria
Repair and production of protein	Putative proteasome alpha subunit	63	<i>Emiliana huxleyi</i>	Protozoa
	Chroloplast 30S ribosomal protein S7	74	<i>Porphyra yezoensis</i>	Plant (algae)
	ubiquitin	34	<i>Symbiodinium</i> sp.	Protozoa
	Heat shock protein (GrpE protein)	55	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	Bacteria
	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	71	<i>Podospira anserina</i>	Fungi
	DNA polymerase zeta catalytic subunit	34	<i>Mus musculus</i>	Animal
	Glutamyl-tRNA reductase	32	<i>Helicobacter hepaticus</i>	Bacteria
	dehydrogenase	55	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Bacteria
Alpha amylase, catalytic region	47	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacteria	
Change of cell structure	oocyst wall protein 3	28	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Protozoa
	mei2-like RNA binding proteins	43	<i>Triticum aestivum</i>	Plant

真核生物翻訳終結因子及び葉緑体リボソームタンパク質は、mRNA からタンパク質を翻訳する際に機能する。特に葉緑体リボソームタンパク質は、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^(5,17)。鉄欠乏ストレスに応答したタンパク質を合成するため、上記のタンパク質合成に関わる遺伝子群が転写誘導されたと推測できる。

「細胞構造の変化」として、細胞壁の生成および細胞分裂の制御にかかわる遺伝子の配列と高い相同性をもつ遺伝子タイプが含まれた。微細藻は、貧栄養や高温低温などの悪環境状況において細胞構造を変化させ、休眠細胞であるシストを形成することが報告されている。鉄欠乏状態にある微細藻も、休眠状態にシフトするために、上記の機能を発現させたと推察できる。

他の 8 遺伝子タイプは、タンパク質であると推測されるアミノ酸配列であるものの、機能は不明である。一方、残り 21 タイプでは、データベース上で近縁配列がなく、機能は不明である。こうした未知遺伝子が、鉄欠乏に対して、新奇の機能を有している可能性がある。以上の結果より、鉄欠乏状況下では様々な遺伝子が、転写レベルで誘導され、鉄欠乏に対処する生理機能を発現させることが実証された。鉄欠乏下にある高等植物 *Arabidopsis thaliana* 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⁽²⁵⁾。今回得られた遺伝子群も、*Arabidopsis thaliana* で転写誘導されており、鉄欠乏が直接的あるいは間接的に転写を誘導したと見なせる。鉄取り込みに関わっていると考えられる新奇の遺伝子群と既知の遺伝子群は、複雑なネットワークを形成し、鉄欠乏状態に適応する機能を有する可能性がある。

4. 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。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。普遍化された鉄取り込み機構に基づき、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、鉄取り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) 牧輝弥, 赤潮原因藻の増殖を抑制する鉄キレート剤の探索とその生理生態への影響、「閉鎖性海域の汚濁の現状と今後の課題」日本海水学会 60(4)243-252 (2006)
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) C. Curie, and J.F. Briat, Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, (2003) 183-206.
- 6) W. Schmidt, Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci.*, 8, (2003) 188-193.
- 7) H.G. Weger, Ferric and cupric reductase activities in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: experiments using iron-limited chemostats. *Planta*, 207 (1999) 377-384.
- 8) 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.
- 9) S.W. Wilhelm, and C.G. Trick, Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophore production is a common response. *Limnol. Oceanogr.*, 39 (1994) 19779-7984.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 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) 赤潮グループ, ヘテロカプサ特集, 日本プランクトン学会報 46(1999)153-181
- 18) D.D. Kramer, and J.H. Ryther, The iron requirement of some marine plankton algae. *Biol. Bull. Wood Hole, Mass.* 119(1960)324
- 19) L.E. Brand, W.G. Sunda, and R.R.L. Guillard, Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese, and iron. *Limnol. Oceanogr.* 28(1983) 1182-1198
- 20) 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.
- 21) Z. Suo, Thioesterase portability and peptidyl carrier protein swapping in yersiniabactin synthetase from *Yersinia pestis*. *Biochemistry.* 44(2005) 4926-4938.
- 22) M.L. Vasil, U.A. Ochsner, Z. Johnson, J.A. Colmer, and A.N. Hamood, The fur-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator ptxR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180 (1998) 6784-6788.
- 23) J. Kaplan, D. McVey Ward, R. J. Crisp, and C. C. Philpott, Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*, *Biochim Biophys Acta*, 1763 (2006) 646-651.
- 24) C. Chatterjee, R. Gopal, and B. K. Dube, Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum Tuberosum L.*), *Scientia Horticulturae*, 108 (2006) 1-6.
- 25) 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.
- 26) R.F. Strzepek, and P.J. Harrison, Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature* 431 (2004) 689-692.

No. 0615

Organic Ligands Regulating Growth for Microalgal Species and the Iron Regulation Mechanisms of *Prymnesium parvum*

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 three organic ligands preventing the algal growth were evaluated for the specificity to microalgal species. Furthermore, for the molecular mechanism of algal cells adapting to iron deficiency, the functional genes, which induced the transcription by iron deficiency, were cloned using differential display analysis.

(Materials and Methods) After two or three species of the red tide algae *Prymnesium parvum*, *Heterocapsa circularisquama* and *Heterosigma akashiwo* were inoculated into modified f/2 medium including Bipyridine, Ferrozine, or DFB (defferrioxamine B), the growth yields were determined using microscopy observation. For differential display analysis, the culture of *P. parvum* in the culture medium was added DFB at the concentrations of 0 μ M, 10 μ M and 100 μ M at the 0th day, the 1st day, the 5th day and the 9th day. The PCR products of cDNA synthesized from total algal RNA were observed using the polyacrylamide gel electrophoresis. The specific bands to iron limited culture were purified and cloned. Nucleotide sequences of the clones were determined and analyzed.

(Results and Discussion) In the culture medium including chelators, the survival rates of three algal species were changed comparing the culture medium without chelator addition. Under iron deficiency, *H. circularisquama* and *H. akashiwo* increased the survival rates, while *P. parvum* decreased the survival rates. Presumably, the two algal species can effectively adapt the iron deficient condition and survive under iron deficiency. At the differential display analysis, 20 specific bands to iron limited culture appeared on the polyacrylamide gel, and nucleotide sequences of 69 clones of the specific bands were determined. The 63 clones were classified into 56 genetic types, of which 27 types similar to the known functional genes, 8 types similar to the sequences of hypothetical protein, and 21 types indicated unknown sequences. Some genes were relate to iron uptake, energy production, repair and production of protein, and change of cell structure, which would be induced under the stress of iron deficiency.