

助成番号 0714

海藻類の耐塩性メカニズムの解明 ～緑藻アオサ属藻類の耐塩性遺伝子群の探索を通して～

畠田 智¹, 堀口 健夫²

¹北海道大学創成科学共同研究機構, ²北海道大学大学院理学研究院

概要 【背景と目的】 緑藻アオサ属藻類は世界中の沿岸域で最も目立つ海藻類の一つで、世界で約 100 種、日本で 18 種が報告されている。海で繁栄しているこの仲間は、何らかの耐塩性・好塩性遺伝子群を発現させ、海水中での生育を可能にしているのであろう。しかし、遺伝子組み換え体が作成できないこの仲間から耐塩性・好塩性に関わる遺伝子を単離することは、これまで不可能であった。ところが我々は、海水ではなく淡水に生育する緑藻アオサ属藻類を沖縄県より発見した。もし本種が海産種から分化した淡水種であることが確認でき、かつ本種が海水中でも生育が可能であれば、淡水下と海水下で発現している遺伝子群を比較し、海藻類の持つ好塩性機構の仕組みを解決する糸口がつかめるのではないかと考えた。

【方法】 そこで本研究では、まず培養実験により淡水下と海水下での生長率を比較した。次に、本種の系統的位置を確定した。さらに淡水下と海水下で生育させた藻体からそれぞれタンパク質や mRNA を抽出・比較し、発現に差のあるバンドをコードする遺伝子の塩基配列を明らかにした。

【結果と考察】 生長率は淡水でも海水でも違いが無いことが明らかになった。また核コード 18S rDNA および葉緑体コード *rbcl* 遺伝子による系統解析の結果、本種は系統的に緑藻アオサ科植物の中に位置する独立した種であることが判明した。本種よりも先に分岐したアオサ科藻類は全て海産種で、本種が海産種から分化した淡水産種であることが強く示唆された。さらに、淡水下と海水下で生育させた藻体からそれぞれタンパク質や mRNA を抽出・比較した結果、海水培養藻体で特異的に発現量が減少するレクチン様遺伝子や、海水培養藻体で特異的に発現量が増加する複数の遺伝子群が明らかになった。

1. 背景と研究目的

約 38 億年前に海で誕生した生命は、長い年月をかけて海水から汽水、淡水さらには陸上へと生育場所を拡大していった。その過程で生物には様々な生理的な適応や形態的な進化が引き起こされ、それら適応進化を得た個体群が種分化し、現在見られる生物多様性が生み出されたと考えられる。ただし、多くの生物種は生育適応範囲が狭く、例えば海水域から淡水域まで広範囲に生育できる生物種は少ない。また生育範囲が広い種であっても、その種にとって生育範囲ぎりぎりの場所では、その場所が最適地である他種との競争に打ち勝つことは難しく、生育範囲は最適

地に狭められる場合が多い。ただし、淡水域でも海水域でも生育できる広塩性生物も少ないが知られている。例えば広塩性魚類では、鰓や腎臓などの浸透圧調節器官における水と塩の排出と吸収により浸透圧調節が行われ淡水域と海水域での生育が可能になる。

真核生物の酸素発生型光合成生物である“植物”は、原核生物のランソウ類を“葉緑体化”した一次共生により誕生したと考えられている¹⁾。一次共生には灰色藻類、紅藻類、緑藻類が含まれ、これら一次共生によって誕生した植物にも海水、汽水、淡水など様々な塩環境に適応した種が存在する。現在、灰色藻類は全て淡水域、紅藻類は

原始的な仲間には淡水産が多く派生的な仲間は海水域に生育している²⁾。緑藻類では祖先的なプラシノ藻綱は海水・淡水ともに生育し、アオサ藻綱はほとんどが海水域、緑藻綱や陸上植物系統に繋がる車軸藻綱は淡水域に分布が集中している。これら藻類の場合も種の生育適応範囲は狭く、例えば海産種が淡水域で生育することはできない場合が多い。ただし、これら植物系統でも緑藻マリモや紅藻タウシケノリなどの広塩性生物の存在が報告されている。しかし、どのような機構によって淡水域でも海水域でも生育できるのか等の研究は進んでいない。

そもそも生物界では少ないこの様な広塩性生物は、広塩性と狭塩性の違いを分子レベルで明らかにすることのできる貴重な生物種であり、また、淡水でも海水でも生育できる広塩性生物を用いて海産生物種の好塩性に関する分子機構についても明らかにできる可能性がある。いまだ広塩性と狭塩性の違いや耐塩性・好塩性について理解が進まない植物系統で、広塩性生物種を用いてそれら研究を進めることは、生物の塩に対する作用を理解することに大いに貢献すると考えられる。

緑藻アオサ属藻類は世界中の沿岸域で最も目立つ海藻類の一つで、世界で約100種、日本で18種が報告されている³⁾。この藻群には、食品として利用されているスジアオリや⁴⁾、水質浄化のためのバイオフィルター、血液凝固抑制剤などの医薬品としての有効利用が考案されているアナアオサなどが含まれる⁵⁾。また一方では、ミナミアオサなどのグリーンタイド種が博多湾や東京湾で大量発生し、環境問題になっている⁶⁾。

海で繁栄しているこの仲間は、何らかの耐塩性・好塩性遺伝子群を発現させ、海水中での生育を可能にしているのであろう。しかし、遺伝子組み換え体が作成できないこの仲間から耐塩性・好塩性に関わる遺伝子を単離すること

は、これまで不可能であった。

ところが最近、我々は海水ではなく淡水に生育する緑藻アオサ属藻類を沖縄県より発見した。もし本種が海産種から分化した淡水種であることが確認でき、かつ本種が海水中でも生育が可能であれば、淡水下と海水下で発現している遺伝子群を比較し、海藻類の持つ耐塩性・好塩性機構の仕組みを解決する糸口がつかめるのではないかと考えた。

2. 研究方法

2.1 採集・生育地の水成分分析

淡水産の緑藻アオサ属藻類 *Ulva limnetica* は、沖縄県石垣島オモトトンネル脇の小川および与那国島田原川で採集した (Table 1)。石垣島の生育地は標高約 50 m、与那国島の生育地は標高約 10 m であり、通年海水の流入はない (Fig. 1)。採集した藻体は北海道大学標本室 (SAP) に保管した (SAP 105561-105576) (Fig. 2)。石垣島の生育地で採集した天然水のイオン組成について Shodex IC YK-421 cation column および Shodex IC SI-90 4E anion column (昭和電工) を用いて調査した。

2.2 培養株の確立・生長率の比較

石垣島で採集した藻体 (P36 株) から単藻培養株を確立した。天然藻体を 1 mm のディスクに打ち抜き、30 PSU 人工海水 (Sea Life, Marine Tech) で 5 回ほど洗い、20°C、12:12 hL/D cycle、100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 条件下で、PES 培地⁷⁾ を加えた 5 PSU 人工海水で成熟誘導した⁸⁾。放出した遊走子は上述条件下で生育し実験に供した。

30 PSU 人工海水、5 PSU 人工海水および石垣島生育地の天然水 (0 PSU) で生長率を比較した。それぞれの培養水はオートクレーブで滅菌し PES 培地を加え、藻体約 1 cm の種苗を 10 日間生育させ、それぞれの日間生長率

Table 1. Collection information of *Ulva limnetica* used in this study

Locality	Collection date (sample no.)
Tabaru River, Yonaguni Is., Okinawa Pref.	19/May/2006 (YNG1-YNG8), 27/Apr./2007 (C743-C750)
Brook flowing through the park near Omoto-tunnel, Fukai, Ishigaki Is. Okinawa Pref.	28/Sep./2004 (NY146-NY155), 10/May/2005 (P36), 20/May/2006 (ISG1-ISG4)



Fig. 1. Tabaru River, Yonaguni Is., Okinawa Pref.



Fig. 2. *Ulva limnetica* collected at Tabaru River

(DGR)を測定した⁹⁾。

2. 3 分子系統解析

DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いて天然藻体もしくは培養藻体からDNAを抽出した(Table 1)。系統解析には18S rDNA¹⁰⁾ および *rbcL* 遺伝子⁶⁾ を用いた。本研究で決定した塩基配列にGenBankに登録されている塩基配列データを加え、最尤法で用いる最適なモデルをMODELTEST version 3.7にて検索し¹¹⁾、PAUPにてHeuristic search (simple addition)、TBR branch swapping optionのもと最尤系統樹を構築した¹²⁾。Bootstrap値は最尤法で100回、最大節約法で2,000回繰り返して算出した。

2. 4 タンパク質の抽出・SDS PAGEでの比較

上述培養条件下で種苗を1週間30 PSU人工海水および石垣島生育地の天然水(0 PSU)で生育させた。それぞれの藻体300 mgからタンパク質を抽出した¹³⁾。抽出物は3,000 g、10分間遠心し、上澄みを0.1% SDSを含む12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。SDS PAGE後、それぞれの藻体間で発現に差が出た19 kDa付近のバンドをPVDM膜に移し(miniVE Vertical Electrophoresis System, GE healthcare)、N末端のアミノ酸配列をアミノ酸シーケンサー(Procise 492, PERKIN ELMER)で決定した。

2. 5 cDNA クローニング・ノーザン解析

RNAqueous Kit(Ambion)を用いて藻体200 mgからRNAを抽出し、poly(A)PuristTM(Ambion)にてtotal RNA(100 µg)からPoly A⁺ RNAを精製した。上述のように決定したN末端配列からdegenerateプライマー(5'-GCNGAYTGYYAACNGAY-3')を作成し、BD SMARTTM RACE

cDNA Amplification Kit(Clontech)を用いて3'RACEを行い、3'側の塩基配列を明らかにした。次に、決定できた配列からプライマー(5'-GCGGATCTGGCCGGTGAAAA-3')を作製し、5'RACEを行い、5'側の塩基配列を明らかにした。決定できた全長アミノ酸配列をNCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>)にて相同性検索した。

30 PSU人工海水および石垣島生育地の天然水(0 PSU)で生育させた藻体から、それぞれRNAを抽出し(RNAqueous Kit, Ambion)、精製して得られたPoly A⁺ RNA(0.5 µg)を1.0% agarose-formaldehyde gelで電気泳動し、HybondTM-N⁺ nylon membrane(GE Healthcare)に移した。cDNAを鋳型としてUlecpo-f(5'-ATACACTGTGTGGCAGATTCATG-3')およびUlecpo-r(5'-GAGACATCATGTGACACCTGCGTCCA-3')でPCR反応を行い、精製したPCR断片(100 ng)をラベルした(ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System, GE Healthcare)。42°Cで16時間ハイブリダイゼーションし、HyperfilmTM ECL(GE Healthcare)にてシグナルを検出した。コントロールとして *tufA* 遺伝子を用いた(ULtufA-f: 5'-TTAGCTAAACAAGTAGGTGT-3', ULtufA-r: 5'-GAAGTAATACACCTACATTA-3')。

2. 6 ディファレンシャル・ディスプレイ解析

上述と同様の方法で、30 PSU人工海水および石垣島生育地の天然水(0 PSU)で生育させた藻体からRNAを抽出し、Poly A⁺ RNAを精製し、cDNAを作成した。mRNAフィンガープリンティングキット(ニッポンジーン)に含まれるプライマーセットを用いてPCR反応を行い電気泳動にてバンドを比較した。発現の差が出たバンドを切り出し塩基配列を決定し相同性検索した。

3. 研究結果

3.1 生育地の水成分分析

石垣島の生育地で採集した天然水のイオン組成を Table 2 に示す。トータル塩濃度は 0.13 PSU で通常海水 (35 PSU) と比較すると、1/300 程度の塩濃度しかない淡水 (1 PSU 以下) であることが判明した。ただし、カルシウムイオンに関していえば通常海水の 1/8 も存在していた。つまり本種生育地はカルシウムイオンに富んだ淡水域であるといえる。

Table 2. Comparison of the composition of the brook water at Ishigaki Is. and seawater (g/kg)

	Ishigaki water	Seawater ¹⁴⁾
Cl ⁻	0.027	19.353
Na ⁺	0.021	10.760
SO ₄ ²⁻	0.017	2.712
Mg ²⁺	0.011	1.294
Ca ²⁺	0.052	0.413
K ⁺	0.001	0.387
HCO ₃ ⁻	0	0.142
Br ⁻	0	0.067
Sr ²⁺	0	0.008
H ₃ BO ₃	0	0.026
F ⁻	0	0.001
NO ₃ ⁻	0.002	0
Total	0.131	35.163

3.2 生長率の比較

30 PSU 人工海水、5 PSU 人工海水および石垣島生育地の天然水 (0 PSU) での日間生長率 (DGR) を比較したところ、海水でも汽水でも淡水でも DGR に違いが無かった (Fig. 3)。

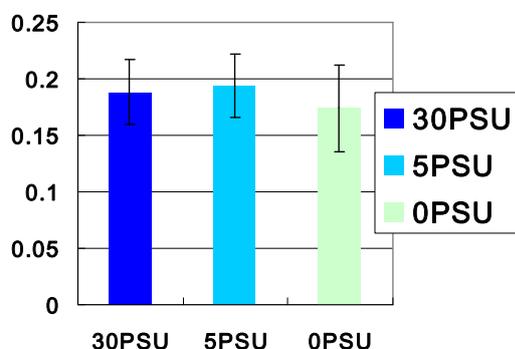


Fig. 3. DGR (Daily Growth Rate) of *Ulva limnetica* during 10 days

3.3 分子系統解析

核コード 18S rDNA および葉緑体コード *rbcL* 遺伝子による系統解析の結果、本種は緑色植物門アオサ藻綱アオサ目アオサ科アオサ属のクレード内に含まれた (Fig. 4)。本研究で得られた分子系統樹において、本種を含むアオサ属クレードよりも先に分岐したアオサ科藻類は全て海産種であった。*rbcL* 遺伝子における変異率を計測したところ、本種は約 250 万年前に種分化したと推定できた。

3.4 タンパク質の抽出・SDS PAGE での比較

本種を 30 PSU 人工海水および石垣島生育地の天然水 (0 PSU) で生育させ、それぞれの藻体 300 mg からタンパク質を抽出し、SDS PAGE で比較したところ、海水で生育させた藻体で発現が減少していたバンド (矢印) が検出できた (Fig. 5)。この 19 kDa 付近のタンパク質バンドの N 末端配列を調べたところ、Ala-Asp-Cys-Asn-Thr-Asp-Ser-Ala-Phe-Gln-Leu-Leu というアミノ酸配列が明らかになった。

3.5 cDNA クローニング・ノーザン解析

上述の解析で明らかになった 19 kDa 付近のタンパク質バンドの N 末端配列から degenerate プライマーを作成し、3'RACE および 5'RACE 法にてこのタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を明らかにすることができた (Fig. 6)。アミノ酸配列の相同性検索を行った結果、緑藻アオサ属アアナオサのレクチン遺伝子¹⁵⁾と 30% との相同性が示された。ノーザン解析でも、海水で生育させた藻体で RNA 発現量が減少していた (Fig. 7)。

3.6 ディファレンシャル・ディスプレイ解析

30 PSU 人工海水および石垣島生育地の天然水 (0 PSU) で生育させた藻体間の発現遺伝子をディファレンシャル・ディスプレイ法で比較したところ、複数の遺伝子に差があることが明らかになった (Fig. 8)。そのうちの海水培養藻体で発現が上昇していた幾つかのバンドの塩基配列を明らかにした。相同性検索した結果、例えばイネ *Oryza sativa* の ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase との相同性が示されたものや、オオムギ *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* の glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase との相同性が示されたものが検出された。

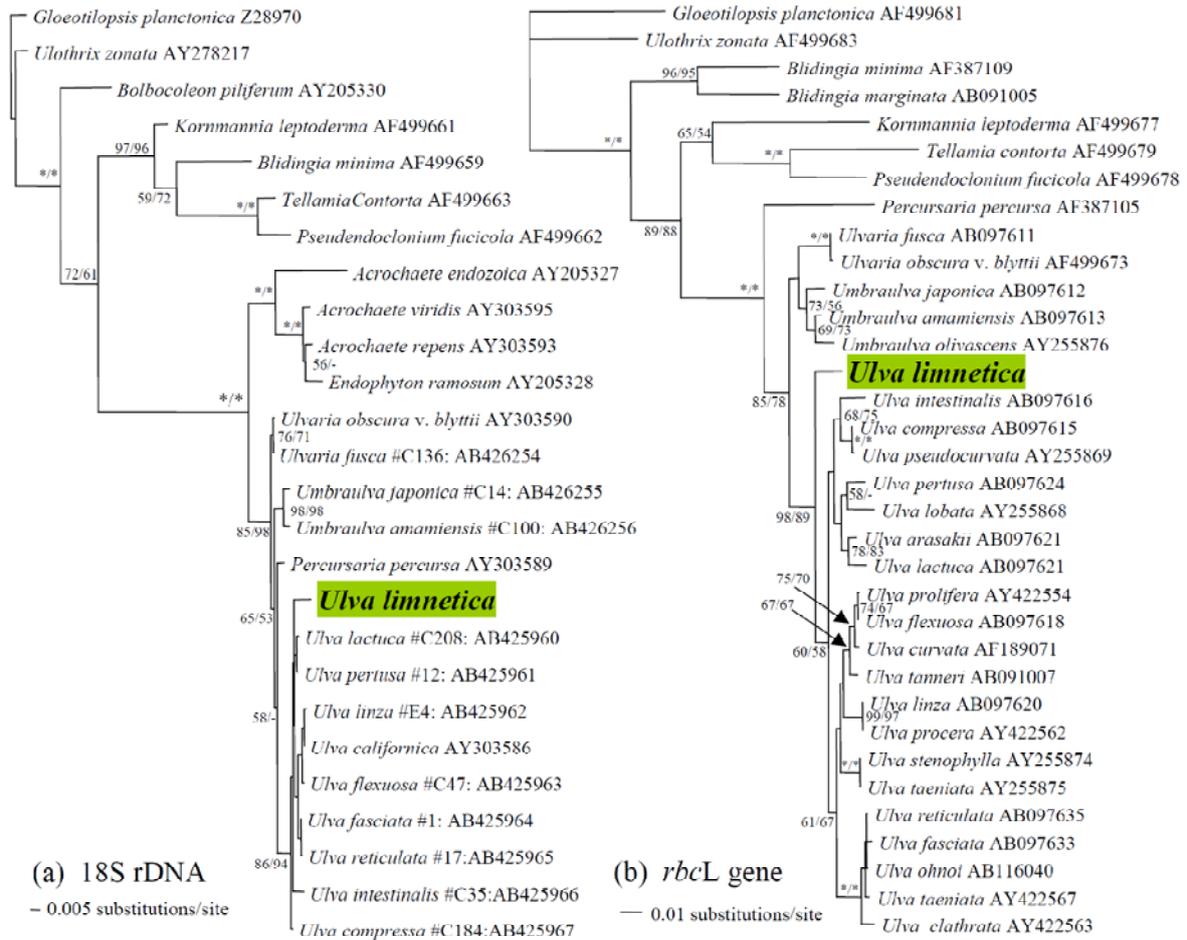


Fig. 4. Phylogenetic trees of the Maximum likelihood (ML) analysis inferred from: a) the nuclear-encoded 18S rDNA and b) plastid-encoded *rbcL* gene. Numerals at internal nodes are bootstrap values > 50% for 100 replicates in ML and 2000 replicates in maximum parsimony (MP) analyses (ML/MP). * = 100.

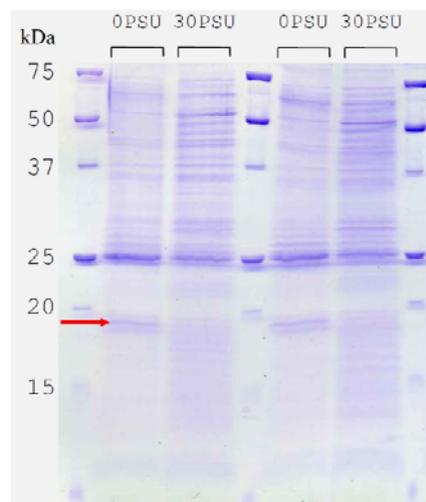


Fig. 5. Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) pattern of total proteins from *Ulva limnetica* cultured in 30 PSU and 0 PSU conditions, respectively. The arrow indicates the protein (19 kDa) of which N-terminal amino acid sequence we determined. Two representative images of SDS-PAGE were shown.

```

1 ATGGGGCTTCTCTCACTCAACAATATTGCTGCTCATCAATCTGGTCTTGGCGCC 274
1 M G L L L H S T I F A V S S I L V L A A 20
275 AACCGGATGCTGGAGTATCATGGCTTCACTGTTGAGCAGGACAGGTGCTGACGATG 334
21 N Q D A G A I M A S P V E Q D R C L T M 40
335 TGCCCGACCTGCTGCCTGGACAAGGACTCATCTGACTTCGGCCTGTGCCTCGAATCTGCC 394
41 C P T C C L D K D S S D F G L C L E S A 60
395 GACTCACTGAGCGTCGCAAAATGCTTCGTTGGTGATCCAATGGCCGATCCAGTGACCGAA 454
61 D S L S V A N C F V G D P M A D P V T E 80
455 GTGGACGCGAGGTGCTACTGATGTCTCAGCCGACTGCAACACGGACAGCGCCTTCCAGCTG 514
81 V D A G V T D V S A D C N T D S A F Q L 100
515 TTGCAGAACAGCTGGAGCTGGATGACGAGCCTGCCATCGGTGTTCCAGATGTCGATTGAG 574
101 L Q N S W S W M T S L P S V F Q M S I Q 120
575 GCACCTGGCTCAAGCAGGCGCTACTTCGGCGCCAGCTACTATGGTTCGGACAACCGC 634
121 A P G S S R R Y F A A H V Y Y G S D N R 140
635 GACTCTGCCAGCAGTTCGTGTGCACCCAGCACGGGCTCGAAGAAGCCATCCTGCTG 694
141 D S A S T F V C S H D T G S K K A I L L 160
695 ACGGTCCGCGCGCGCAGGAGCGCTGAAGCTCATGGTCTGAGAGACCCGACACC 751
161 T V P A A Q G G V K L M V L E N R D T T 180
755 GGCAGGGCAGACCGAGGCGAGTACCTGTCAGCTCACAACTACTATCCAGCGACCGC 814
181 G K G K T E G R Y L S A H N Y Y S S D R 200
815 GTTTTCAGCGCCAGATCCGCTGATGCCACCCGACCCGAACAAGGCTGCAAGTGTGG 874
201 V F S G Q I R L M I H T D P N K A A V W 220
875 CGGTATGAAGGCAACAAGCTGAAGGTGGTGCAGAANTTTGATGCCACCGCCCGGACACA 934
221 R Y E G N K L K V V Q N L D A I A P D I 240
935 GCCGGATGTTACCTCAGGCTCCGTCCGAGGCTCGCGGGACTCTGCATCCACCTTCTG 994
241 A G W Y L T A P S E A R R D S A S T F L 260
995 ACGGTGAGCTGACGCGCAGCAAGCCGCGCTGGTATTGCTGAGACCGCTCACGGCCTAG 1054
261 T V Q S D A S K A A L V I A E T V T A * 280
    
```

Fig. 6. Nucleotide sequences of cDNA of the 19 kDa protein

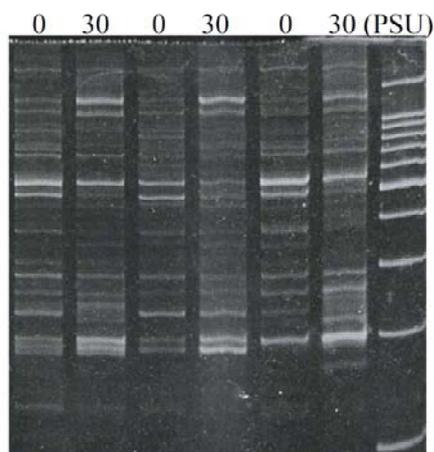


Fig. 8. Differential display analysis between 0 PSU- and 30 PSU-cultivated samples

4. 考察

本研究によって、生物界では少ない広塩性生物の新たな生物種の各種生物学的な基礎知識を得ることができた。分子系統解析の結果、本種を含むアオサ属クレードよりも系統的に先に分岐した種は海産であり、本種が海産種から分化した淡水産種であることが強く示唆された。生長率を比較した結果、淡水でも海水でも同様の生長率が得られた。以上の結果から、本種はもともと海藻類で、淡水適応を得た現在でも海水での生育能力を維持している広塩

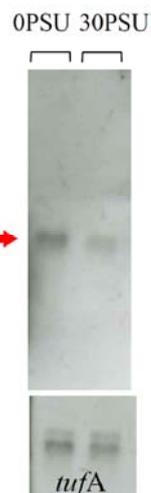


Fig. 7. Northern blot analysis of cDNA of the 19 kDa protein. Poly A⁺ RNA was prepared from 0 PSU- and 30 PSU -cultivated samples and analyzed by Northern hybridization. The *tufA* gene was used as a control for equal loading of each lane.

性生物であることが明らかになった。

さらに本研究では、本種の塩に対する作用を理解する目的で、発現タンパク質や発現 mRNA の比較を行った。最も顕著に見られた違いとして、海水培養藻体で特異的にタンパク質の発現量が減少する 19 kDa 付近のタンパク質バンドが検出でき、クローニングによりこのタンパク質バンドをコードする遺伝子の塩基配列が単離できた。相同性検索によりレクチン様遺伝子であることが示唆された。この遺伝子は転写レベルでも海水培養藻体で特異的に発現量が減少していることが明らかになった。ただし、なぜ海水下で発現量が減少してしまうのか、どのような機能を持ったタンパク質なのかは現在のところ不明である。逆に海水培養藻体で特異的に発現量が増加する遺伝子群も単離できた。例えば相同性が示された ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase は 16 日間低温処理したイネの実生で発現が確認されている¹⁶⁾。本種においても、この遺伝子が高塩というストレス下において発現促進されたと推定される。

5. 今後の課題

本種は世界的にも珍しいアオサ属藻類の淡水産種である。アオサ属藻類では例えばボウアオノリ等も淡水での生育が確認され、またスジアオノリが採集されたときの生育地

の塩濃度が0 PSUであった、という報告もある。ただし、ゴウアオノリやスジアオノリは一時的に淡水での生育は可能だが、長期的に生育することは不可能なことが報告されている¹⁷⁾。つまり、本種はアオサ属藻類の中で最も生育塩濃度の範囲の広い広塩性生物であるといえる。また、マリモ等アオサ藻綱の仲間に広塩性生物が知られているが、本種はマリモに比べて生長が早く、成熟誘導により多量の配偶子が得られる利点があり、各種実験に適した生物材料といえる。

今後は、本種を用いてさらに海水条件下での遺伝子発現に関する研究を進め、広塩性と狭塩性の違いを分子レベルで明らかにし、また好塩性に関する分子機構についても明らかにしていきたいと考えている。沖縄で発見した植物系統の広塩性生物が、近い将来、生物の塩に対する作用を理解することに大いに貢献することを期待している。

文 献

- 1) 井上勲. 2007. 藻類30億年の自然史 第二版 藻類からみる生物進化・地球・環境. 東海大学出版会.
- 2) 岩槻邦男・馬渡駿輔(監修)千原光雄(編集). 1999. バイオダイバーシティ・シリーズ藻類の多様性と系統. 裳華房.
- 3) 吉田忠生. 1998. 新日本海藻誌. 内田老鶴圃.
- 4) 平岡雅規、寫田智. 2004. 四万十川の特産品スジアオノリの生物学. 海洋と生物 **155**:508-15.
- 5) 能登谷正浩. 1999. アオサの利用と環境修復. 成山堂.
- 6) Shimada S., Hiraoka M., Nabata S., Iima M. and Masuda M. 2003. Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. *Phycol. Res.* **51**: 99-108.
- 7) Provasoli, L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In Watanabe, A. and Hattori, A. (Eds) *Cultures and Collections of Algae*. Proceedings of U.S.- Japan Conference, The Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo. pp. 63-75.
- 8) Hiraoka, M. and Enomoto, S. 1998. The induction of reproductive cell formation of *Ulva pertusa* Kjellman (Ulvales, Ulvophyceae). *Phycol. Res.* **46**: 199-203.
- 9) 江端弘樹、佐藤義夫、寫田智、平岡雅規、四ツ倉典滋. 2007. 地下海水を用いた緑藻スジアオノリのタンク養殖. *水産増殖* **55**: 103-8.
- 10) Shimada, S., Horiguchi, T. and Masuda, M. 1999. Phylogenetic affinities of the genera *Acanthopeltis* and *Yatabella* in the Gelidiales (Rhodophyta) inferred from molecular analyses. *Phycologia* **38**: 528-40.
- 11) Posada, D. and Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinf.* **14**: 817-8.
- 12) Swofford, D. L. 2002. *PAUP**. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 13) Miwa, Y., Yoshimizu, M., Iijima, S. and Yamagishi, Y. 2004. Cloning and expression of alkaline phosphatase in red algae *Porphyra yezoensis*. *Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.* **3**: 39-48.
- 14) Kester, D. R., Duedall, I. W., Connors, D. N. and Pytkowicz, R. M. 1967. Preparation of Artificial Seawater. *Limnol. Oceanogr.* **12**: 176-9.
- 15) Wang, S., Zhong, F. D., Zhang, Y. J., Wu, Z. J., Lin, Q. Y. and Xie, L. H. 2004. Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **36**: 111-7.
- 16) Sasaki, T. et al. 2002. The genome sequence and structure of rice chromosome 1 *Nature* **420** (6913): 312-6.
- 17) Shimada, S., Yokoyama, N., Arai, S. and Hiraoka, M. 2008. Phylogeography of the genus *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa. *J. Appl. Phycol.* in press

No. 0714

Elucidation of Halotolerant Mechanism of Seaweeds, with Special Reference to the Search of Halotolerant Genes of *Ulva*

Satoshi Shimada¹, Takeo Horiguchi²

¹Creative Research Initiative “Sousei”, Hokkaido University,

²Department of Natural History Sciences, Faculty of Science, Hokkaido University

Summary

The green macroalgal genus *Ulva* (Ulvales, Ulvophyceae, Chlorophyta) is well known for its wide distribution from marine to brackish water all over the world. Freshwater macroalgal species, *Ulva limnetica* Ichihara et Shimada (Ulvales, Ulvophyceae) showed same level of DGR (Daily Growth Rate) during 10 days between 30, 5 and 0 PSU cultured conditions. Sequence analyses of the nuclear encoded 18S rDNA and chloroplast encoded *rbcL* gene strongly support the independent status of *U. limnetica*, and this species was included in the *Ulva* clade with high bootstrap values other genera of Ulvaceae usually distributed in marine were recognized as the earliest diverging lineage within the order. This results indicate that *U. limnetica* might be derived from a marine ancestor.

Ulva limnetica was investigated to understand molecular mechanism of its tolerance or adaptation to seawater. A 19 kDa protein was detected by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), which was accumulated in freshwater-cultured samples than seawater-cultured samples. The band was excised and the partial amino acid sequence was determined by Edman degradation. Based on the sequences, the corresponding cDNA was isolated by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. The protein encoded by the cDNA showed 30% identity to lectin isolated from *Ulva pertusa* Kjellman. Northern blot analysis demonstrated that the expression level of the gene in the freshwater-cultured sample was higher than in the seawater-cultured sample. Differential display analysis indicated that some genes accumulated in seawater-cultured samples than freshwater-cultured samples, and the cDNAs showed similarity to ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isolated from *Oryza sativa* L., or glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase isolated from *Hordeum vulgare* L.