

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770117

研究課題名(和文) 海洋性微細藻類における微量元素セレンの利用戦略

研究課題名(英文) Utilization strategy of trace element selenium in marine microalgae

研究代表者

新家 弘也 (ARAIE, Hiroya)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：30596169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：微細藻類が環境中に極微量しか存在しない必須元素セレン(Se)を効率よく利用するため編み出した、Se輸送体の同定を試みた。現在まで、亜セレン酸に特異的な輸送体の報告はなく、今回は同定のための活性測定系の構築を目指した。本藻の塩基配列がGCに偏っていることと、輸送体が膜タンパク質であることを考慮し、無細胞系による発現解析を試みた。その結果、リボソームを足場とすることで、膜タンパク質を合成することが出来た。また、種々の微細藻類が持っているSe化合物に共通性がある可能性を見出した。そのため、遺伝子操作が可能な藻類を用いた、ノックダウンによるSe輸送体の同定も活性測定と共に進める予定である。

研究成果の概要(英文)：There is only trace amounts of essential element selenium (Se) in environment. Therefore, microalgae thought to possess specific Se transporter for efficient utilization of Se. I tried to identify this Se transporter. To date, there are no reports of transporters specific for selenite. This time, I aimed at building activity measurement system for the identification. Considering the fact that the nucleotide sequence of the algae is GC rich and the transporter is a membrane protein, I tried expression analysis by using a cell-free system. As a result, it was possible to synthesize a membrane protein by using liposomes as basis. In addition, I have found that there may be a similarity between Se compounds in various microalgae. Therefore, it is expected to identify Se transporter that uses algae that can be genetically engineered for knockdown assay.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：セレン トランスポーター セレン含有化合物 *Emiliania huxleyi* リボソーム 微量元素

1. 研究開始当初の背景

藻類が Se を利用するためには環境中から Se を細胞内に取り込むことが必要不可欠である。実際の海洋中における無機 Se (セレン酸: SeO_4^{2-} 、亜セレン酸: SeO_3^{2-}) の濃度は約 1 nM 前後と極めて低い。この事は、これらの藻類が Se に対して特別な取り込み機構を利用していることを覗かせる。申請者らは既に、円石藻 *Emiliania huxleyi* が亜セレン酸に高親和性 (K_m が nM レベル) を示す特異的な輸送体を有することを示した (**Araie H et al. 2011, *Plant Cell Physiol.***)。現在まで知られている亜セレン酸の輸送に関わる輸送体は、陸上植物で 2 つ、酵母で 2 つが報告されている。しかし、そのどれもが亜セレン酸を非特異的に競合して取り込んでいるものであり、**本藻で示された亜セレン酸特異的な輸送体が新規である可能性が高い**。申請者らは既に、Se の有無による発現解析の結果より、9 つの亜セレン酸輸送体候補遺伝子を見い出しており、うち 7 つについては全長配列を、2 つについてはほぼ全長配列を決定済みである。そこで、これら候補遺伝子の**輸送活性解析を行う**。

また、円石藻 *E. huxleyi* が Se を細胞内に環境中の 1500 倍程に蓄積する能力を有していること、蓄積した Se を機能態であるセレノプロテインに供給する新規 Se 代謝系を有していることを明らかにしている (Obata, **Araie** and Shiraiwa 2004, *Plant Cell Physiol.*)。陸上植物で知られる Se に対する解毒機構は、主に 2 つに分類される、1) 無毒化した Se-methylselenocysteine 等で蓄積する機構、2) 揮発物質である dimethylselenide 等へと代謝することで毒性を回避する機構である。最も重要な代謝分岐点は、蓄積物質への流れに関わるセレノシステインのメチル化酵素であり、最初のセレン無毒化合物 (Se-methylselenocysteine) への制限要因となっている。申請者は既に、本藻でもセレン

含有化合物として Se-methylselenocysteine を蓄積していることを明らかにした (not published)。そこで、本藻における**無毒化蓄積した Se 含有化合物を同定する**。

2. 研究の目的

海産性微細藻類にとって Se は、数多くの種で生育の必須元素であることが知られており、赤潮の消長への関与も示唆されている重要な成長因子である。しかし、機能態である Se 含有タンパク質にばかり注目が集まっており、Se の細胞内への輸送や代謝についての報告は少ない。申請者は、新規の Se 輸送体及び高濃度に蓄積された Se 含有化合物の存在を見出した。本研究は、微細藻類が環境中に極微量しか存在しない必須元素 Se を効率よく利用するため編み出した、Se 輸送体及び Se 蓄積代謝系を明らかにすることが目的である。

Se の研究は様々な生物で行われているが、陸上植物が Se を要求しないことから光合成生物における Se の研究はその毒性について言及したものが主である。藻類における Se 研究は、その要求性や毒性についての報告がほとんどであり、その詳細についての研究は乏しい。そのため申請者は、世界で藻類におけるセレン利用を詳細に調べた第 1 人者である。本研究により亜セレン酸特異的な輸送体が同定できた時は、世界初の知見となる点で大いに意義がある。また、蓄積した Se 含有化合物を再利用する系は藻類に特有であり、これらの研究結果をまとめることで藻類における Se 利用のモデルを作り上げることが期待される。

3. 研究の方法

既に取得した亜セレン酸輸送体候補遺伝子を用いて、その輸送活性を測定することで、亜セレン酸輸送体を同定することを目的とした。まず、発現解析より得られた亜セレン

酸輸送体候補遺伝子 8 つの全長配列を決定した。一般的に、トランスポーター解析にはカエルの卵母細胞や酵母を用いた発現系を使用する。それは、トランスポーターが膜に局在するタンパク質であるため、異種発現系で正確に細胞膜に配置されないことが多いためである。しかし、*in vitro* 翻訳によるリポソームを用いることにより、膜タンパク質をリポソーム上に細胞膜に膜タンパク質が配置される様に埋め込むことができる (Nozawa *et al.* 2007, *Plant Cell Physiol.*)。そこで今回は、セルフリースサイエンス社のコムギ抽出液用いた無細胞発現系を試みた。この *in vitro* 合成系では、膜タンパク質を輸送活性測定に使用するため、リポソームを添加して行った。また、本藻の塩基配列が GC に偏っており、発現系がうまく機能しないことを考慮し、亜セレン酸トランスポーター候補遺伝子のコドン、発現系に用いる生物のコドンに改変したものも同時に試した。タンパク質合成の際、¹⁴C-Leucine を用いることで、リポソーム画分への膜タンパク質の合成を確認した。輸送活性測定は、放射性亜セレン酸を用い、リポソームと放射性亜セレン酸を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分離した後、リポソーム内に取り込まれた放射性亜セレン酸を測定することで評価した。

次に、Se 含有化合物を同定するため、放射性亜セレン酸で *E. huxleyi* の Se 含有化合物をラベルした。Se 含有化合物は、クロロホルム：メタノール (2:1) と 0.88% KCl の 2 層分配により抽出した。この際、比較対象として Se を要求するマミエラと Se を要求しないイソクリシス、マミエラの Se 含有化合物も同様に薄層クロマトグラフィーを用い、フェノール溶媒 (88% フェノール：蒸留水：氷酢酸：0.2 M EDTA = 166 : 31 : 2 : 1) で分離した。その後、得られた Se 含有化合物のスポットを同定するため、薄層プレートより削り出し同定を試みた。また、TLC を行わず直接 Se

含有化合物を LC/MS や CE/MS で同定しようと試みた。

4. 研究成果

Se 輸送体を同定するため、発現解析より得られた亜セレン酸輸送体候補遺伝子 8 つの全長配列を決定した。その結果、それら遺伝子は硫酸 / H⁺、リン酸 / Na⁺ 及びリン酸 / H⁺ 共輸送体の 3 グループに分かれた。次にこれらの遺伝子を、*in vitro* 合成用の vector (His-tag 有りと無し) に組み込み *in vitro* 合成を試みた。*In vitro* 合成結果は、リポソーム画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離後、¹⁴C-Leucine でラベルされたタンパク質をイメージングプレートで視覚化し、評価した。その結果、His-tag のついた vector で 8 つ全ての膜タンパク質の合成を確認した。一方、His-tag のついていない vector では、コドン改変遺伝子でもリポソームへの安定したタンパク質合成が確認できなかった。そこで、His-tag 付の発現タンパク質を用いて、亜セレン酸輸送活性測定を行った。結果、残念ながら有意な取り込み活性を得ることは出来なかった。現在は、輸送活性測定系を調整中である。今まで、亜セレン酸に特異的な輸送体の報告はなく、本研究により同定できた時は世界初の知見となりえる。次に、Se 含有化合物を同定するため、放射性セレンで *Emiliana* (NIES837 株と CCMP2090 株) の Se 含有化合物をラベルした。この際、比較対象として Se を要求する *Ostreococcus* (NIES2674 株) と Se を要求しない *Isochrysis* (T-Iso)、*Ostreococcus* (NIES2673 株) の Se 含有化合物も同様に薄層クロマトグラフィーを用い分析した。その結果、*Emiliana* と Se を要求する *Ostreococcus* (NIES2674 株) から 5 つのスポット (LMW1~5) が検出された。一方、Se を要求しない 2 種では、LMW4 が主な割合を占めていた。このことは、微細藻類における

Se 代謝系が似通っている可能性を示唆している。これら LMW1~5 を同定するため、薄層プレートより削り出し同定を試みたが、不純物が多く同定には至っていない。また、LC/MS や CE/MS を用いた同定も試みたが、量的な問題や解析プログラムの問題から同定には至らなかった。近年マグロの血液からセレノニンという新規 Se 含有化合物が発見されており、LMW1~5 の中でも新規 Se 含有化合物が含まれていることが期待できる。また、微細藻類の Se 含有化合物は、魚への Se 供給源と考えられるため、LMW1~5 を同定することで海洋生態系における Se 循環を知る手がかりとなることが期待できる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者 :

新家 弘也 (ARAIE, Hiroya)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号 : 30596169