

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16143

研究課題名(和文) 褐藻の卵形成に及ぼす細胞内外のホルモンの作用解明

研究課題名(英文) Hormonal effect of lipids on oogenesis in gametophytes of a brown macroalga, *Saccharina japonica*

研究代表者

岩井 久典 (Iwai, Hisanori)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70733765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マコンブ配偶体()の細胞内の脂質変化から、生殖生長(卵形成)に関わる脂質のホルモン作用を検討した。卵形成度合(成熟度)の増加に伴い、フコステロール、C14:0、C18:1n9、C18:3n3及びC20:3n3の含有量が減少することが分かった。この内、C14:0及びC18:1n9は、TAG中に局在しており、卵形成におけるエネルギーとして代謝されたと考えられる。フコステロールは生長シグナル分子として、3系の多価不飽和脂肪酸は性フェロモンとして代謝されたと考えられる。なお、細胞外のフコステロールによる生殖生長の誘発は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：Hormonal effect on reproductive growth in a brown macroalga was examined, in an attempt to identify the specific lipids that play a role in the oogenesis of female gametophytes. After reproductive growth had occurred, the level of fucosterol, C14:0 C18:1n9 and omega-3 series PUFAs, such as C18:2n3 and C20:3n3, were significantly decreased with strongly related to the percent of mature cells. The decrease in the level of C14:0 and C18:1n9 fatty acids, which are mainly localized in the TAG, were due to consumption via energy metabolism associated with reproductive growth. Based on genomic knowledge and results of this study, fucosterol and omega-3 PUFAs appeared to function as signaling molecules or as an enzymatic activator. Fucosterol could be trapped by sphingomyeline, and long chain PUFAs can activate sphingomyelinase. The sterol added in out of cells was not stimulated on the oogenesis, because that the hormonal function of sterol can be regulated by the function of PUFAs.

研究分野：分析化学、藻類学

キーワード：褐藻 配偶体 生殖生長 フコステロール 脂肪酸 PUFAs

1. 研究開始当初の背景

海藻群落である藻場は、沿岸生態系の中で一次生産者としての重要な役割を担っている。しかし、近年、日本や世界各地での沿岸で、藻場が消滅する「磯焼け」が深刻な問題となっており、藻場の修復及び保全が極めて重要な環境課題の一つとして考えられている。褐藻には1年を通じた生活史の中で、巨視的形態(胞子体)と微視的形態(遊走子、配偶体)を繰り返しており、藻場の修復・保全のためには、配偶体が生殖生長を行うことが不可欠である。本村ら(1984)の褐藻の生活史制御の研究により、配偶体の栄養生長から生殖生長への切り換えは、鉄の摂取が条件になることが明らかになっている(Motomura and Sakai, *Jpn. J. Phycol.* 1984)。

申請者は、藻場修復を背景に、堆肥からの溶出成分が鉄供給へ寄与していることを明らかにし、堆肥中有機物の利用性を説明してきた(Iwai et al., *Anal. Sci.* 2012; Iwai et al., *Anal. Sci.* 2013)。堆肥由来の有機物が鉄に対し錯形成能を有することから、鉄供給に貢献する機能性材料として期待され、その機能に関する研究が産学連携で進められている。一方で、堆肥から海水中へ溶出する成分は、陸上植物、微生物及び動物由来のステロール等の脂質を多く含むこともわかっている(Iwai et al., *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 2013)。ステロールは、それ自体、若しくはその代謝物が性ホルモンとして動植物の生殖機能に作用することは良く知られており、海藻への生長阻害が懸念される。しかし、褐藻の生殖生長メカニズムは未だ不明な点が多く、ホルモン様物質による生殖生長の誘発は検討されていない。

2. 研究の目的

褐藻の生殖生長メカニズムの解明は、藻場修復・保全に不可欠な知見となる。

(1) 本研究では、褐藻の生殖生長に寄与する細胞内の性ホルモンの作用の解明として、褐藻のステロール、“フコステロール”の機能を解明する。また、細胞内の脂質成分の変化から、細胞内での生長変化を検討する。

(2) 細胞外のステロールによる生殖生長の誘発を確かめ、細胞外のホルモン様物質による生長への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) マコンブ配偶体の培養

本研究では、北海道大学フィールド科学センター室蘭臨海実験所より譲り受けたマコンブ(*Saccharina japonica*)のメス配偶体の無菌株を用いた。培養条件は、先行研究に従った(Iwai et al., *J. Appl. Phycol.* 2015)。培養液は、ASP₁₂N₂Aを用い、添加する鉄の量によって栄養生長と生殖生長を制御した。培養期間は、単為発生する胞子体の影響を避けるため、12日間とした。培養後の配偶体は、生殖生長した配偶体の細胞数割合を成熟度(M%)

として算出し、-30℃で24時間以上保管した後、透析及び減圧乾燥を経て分析試料とした。

(2) 全脂質抽出法

乾燥した配偶体試料と適量の海砂を乳鉢に入れ、クロロホルム・MtOH混液(2:1, v/v)を加えながら十分に磨り潰し、全脂質を抽出した。遠心分離(10000 rpm, 10 min)によって懸濁物を除き、エバポレーターによって濃縮し、全脂質抽出物を得た。

(3) ステロールの分離・精製方法

濃縮した全脂質は、50%KOH・EtOH混液(1:2, v/v)でけん化(24 h, 室温)させた。これに純水を8-9 mL加え、不けん化物をヘキサンで抽出した。ヘキサン抽出物は、25% EtOHと純水で数回洗浄した後、無水硫酸ナトリウム(約4 mL)・Extrelut(約1 mL)を充填したカラム(脱水カラム)を通過させ、脱水した。ヘキサンはエバポレーターで除去し、全ステロール試料を得た。精製したステロール試料は、イソオクタンに溶解し、内部標準として5 α -コレスタンを2 μ g添加した後、N₂ガスを吹き付けながら約100 μ Lに濃縮し、ガスクロマトグラフィー(GC)によって定量定性を行った。

(4) 脂肪酸の分離・精製方法

全脂質けん化物に6N HClを数 mL加え、pHを4未満にした後、脂肪酸をヘキサンで抽出した。ヘキサン抽出物は、脱水カラムを通過させ、エバポレーターによって濃縮した。濃縮した脂肪酸は、14% BF₃・MtOH 1 mLに溶解し、メチル化した(100℃, 5 min)。メチル化後の試料に、飽和ナトリウム水溶液を8-9 mL加え、ヘキサンで脂肪酸メチルエステル(FAMES)を抽出した。ヘキサン抽出物は、脱水カラムを通し、酸化防止剤としてジブチルヒドロキシルトルエンを1 mg加え、ヘキサンをエバポレーターで除去し、全FAMES試料を得た。精製したFAMES試料は、ヘキサンに溶解し、内部標準としてノナデカン酸メチルエステル(C19:0Me)を25 μ g添加した後、N₂ガスを吹き付けながら約100 μ Lに濃縮し、ガスクロマトグラフィー(GC)によって定量定性を行った。

(5) 脂質の形態別分離精製

ステロールの遊離型・エステル型、及びトリアシルグリセロール(TAG)の組成の検討のため、上記の手法により抽出した全脂質を、数100 μ Lに溶解し、ガラスTLCプレート(20 \times 20 cm, Silica gel 60, Merk)に塗布した。これをヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸混液(70:30:1, v/v/v)で展開した。プリムリンを噴霧し、365 nmの紫外線の下、遊離又はエステル型ステロール及びTAG成分を判別した。これらの成分の判別のため、フコステロール、コレステロールエステル及びトリオレイン

を標準品として用いた。プレートの該当箇所をかきとり、アセトンで脂質成分を溶脱した。遊離型ステロールは、濃縮後、イソオクタンに溶解し、GC 試料とした。ステロールエステル及び TAG は、上記 3.(3)及び 3.(4)に従って精製し、GC 試料とした。

(6) GC 条件：フコステロール

ステロールは、95%ジメチル 5%ジフェニルポリシロキサンキャピラリーカラム(DB-5ms, 0.25 mm i.d. × 30m, 膜厚 0.10 μm)を用いたガスクロマトグラフィー (GC-2010, Shimadzu) で分離した。キャリアガスは N₂、温度プログラムは、200 °C で 1 min、200 – 300 °C まで 6 °C min⁻¹ で昇温し、300 °C で 6 min 保持した。ステロールは、フコステロールの標準品 (Sigma Aldrich) を用いて定性・定量した。

(7) GC 条件：FAMES 組成

FAMES は、90%ビスシアノプロピル 10%シアノプロピルフェニルシロキサンキャピラリーカラム (SP-2380, 0.20 mm i.d. × 60m, 膜厚 0.25 μm) を用いたガスクロマトグラフィー (GC-2010, Shimadzu) で分離した。キャリアガスは N₂、温度プログラムは、50 °C で 1 min、50 – 120 °C まで 5 °C min⁻¹、120 – 240 °C まで 3 °C min⁻¹ で昇温し、240 °C で 2 min 保持した。FAMES は、Supelco 37 FAMES mix (Sigma Aldrich) を基に定性し、C19:0Me のピーク面積を基に定量した。

(8) フコステロールの抽出・精製と細胞外フコステロールによる生殖誘発試験

生殖誘発試験に用いたフコステロールは、マコンプ胞子体乾燥粉末 (道南伝統食品協同組合) から、3.(2),(3)及び(5)に従って抽出精製したものを使用した。精製度を高めるため、TLC による分離 (3.(5)) は 2 回行った。

生殖アッセイの条件は、3.(1)の条件に従って行った。フコステロールは、MeOH に溶解したものを培養液に添加した。なお、この MeOH は、オートクレーブ (121 °C, 20 min) によって除去される。この実験では、鉄による成熟反応を防止するため、HBED を鉄のマスキング剤として加え、3.(1)に従って成熟アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) マコンプ配偶体 () の脂質組成

Table 1 に、マコンプ配偶体 () の栄養生長及び生殖生長時の脂質組成をまとめた。

栄養生長及び生殖生長共に、ステロールはフコステロールのみが検出された。また、フコステロールは、生殖生長後には大きく減少することが確認された。

脂肪酸の組成は、生長状態による大きな変化は見られなかった。飽和脂肪酸では、C16:0 及び C18:0 が主成分としてあげられ、他には C14:0 が少量含まれていた。一価の不飽和脂

肪酸は、C18:1n9 及び C16:1n9 で構成されている。多価不飽和脂肪酸は、炭素数 18 及び 20 の不飽和脂肪酸で構成されていた。全脂肪酸含有量 (μg mg⁻¹-dry sample) は、生長状態による大きな変化は見られなかったが、生殖生長した配偶体では不飽和脂肪酸の含有量が減少していた (Table 1)。これは、C18:1n9、C18:2n6、C18:3n3 及び C20:3n3 の大きな減少に起因する。

Table 1

Total lipid compositions (mean ± S.D., n = 18) for immature and mature female gametophyte (*Saccharina japonica*) cultured for 12 day

Lipids	Growth stages of gametophytes	
	Vegetative [†]	Reproductive [‡]
Fucosterol (μg mg ⁻¹ dry sample)	1.32 ± 0.92	0.84 ± 0.66
FAs (relative are to ISTD mg ⁻¹ dry sample)		
C14:0	15.2 ± 3.5	11.4 ± 2.7
C16:0	179 ± 87	188 ± 71
C16:1n9	4.31 ± 1.58	3.60 ± 2.19
C18:0	117 ± 64	133 ± 53
C18:1n9	24.7 ± 5.2	15.2 ± 3.5
C18:2n6	4.69 ± 3.38	1.95 ± 1.44
C18:3n6	2.08 ± 0.50	1.74 ± 0.48
C18:3n3	4.17 ± 3.75	1.07 ± 0.97
C20:3n3	4.60 ± 1.60	2.36 ± 1.53
C20:4n6	2.02 ± 0.85	1.76 ± 0.63
Total FAs*	358	360
Total SFAs*	311	332
Total USFAs*	46.6	27.7

[†] Cultured in Fe-free medium. Maturity (%) was 2 ± 2.

[‡] Cultured in Fe-added (20 μM with 1:1 EDTA) medium. Maturity (%) was 85 ± 8.

* The sum of the average values.

(2) 生殖生長に寄与する脂質

生殖生長に寄与する脂質成分を検討するため、各々の配偶体株につき、栄養生長時の脂質含有量に対する各脂質の含有量を比含有量として、その増減と成熟度の関係を検討した。脂質の比含有量変化と成熟度の関係は、ピアソン相関係数によって判断した。

フコステロールは、成熟に伴い明らかに減少し、その間には良い相関が得られた ($r = -0.880, p < 0.001$)。

C14:0 は、成熟度に伴って減少する傾向がみられた ($r = -0.704, p < 0.001$)。一方、C16:0 及び C18:0 では、比含有量が分散し、成熟度との間に相関は見られなかった ($r = 0.113 \sim 0.184, p > 0.4$)。一価の不飽和脂肪酸では、C16:1n9 は生殖生長との深い関わりは無いように見えるが ($r = -0.311, p > 0.1$) C18:1n9 と成熟度の間には良い負の相関が得られた ($r = -0.921, p < 0.001$)。多価不飽和脂肪酸では、ω6 系では C18:2n6 が成熟に伴って減少する傾向がみられたが ($r = -0.779, p < 0.001$) C18:3n6 及び C20:4n6 は成熟と強い関係は見られなかった ($r = -0.257 \sim 0.322, p > 0.1$)。

一方、 ω 3 系不飽和脂肪酸、C18:3n3 及び C20:3n3、では、共に成熟度と良い負の相関関係があらわれており ($r = -0.888 \sim -0.953$, $p < 0.001$)、生殖生長との深い関係がある脂肪酸と考えられる。

これらの実験及び解析により、褐藻配偶体 () の生殖生長には、フコステロール、C14:0、C18:1n9、C18:2n6、C18:3n3 及び C20:3n3 の代謝が深く関わっていることが明らかになった。

(3) 脂質の局在と生殖生長に伴う脂質代謝

脂質の代謝を考察するため、TLC による遊離・エステル型ステロール及び TAG の分離を行い、その組成を確かめた。Table 2 に、栄養生長及び十分に生殖生長した配偶体に含まれていた遊離型及びエステル型のフコステロール含有量、及び TAG の脂肪酸組成をまとめた。生長状態にかかわらず、フコステロールは遊離型で存在していることが分かった。また、TAG は、生殖生長した配偶体では栄養生長したものとは比べ、その含有量が減少した。これは、主に C14:0 及び C18:1n9 の減少によるものと考えられる。

フコステロールは、褐藻に特異的なステロールであるが、その機能については明らかになっていない。しかし、褐藻のゲノム情報では、ステロールの生長シグナル分子としての機能が示唆されている (Esi_0339_0015, Esi_0217_0002, Esi_0239_0013) (Cock et al., *Nature* 2010)。本研究でのフコステロールの生殖生長に伴う減少は、フコステロールが生長シグナル分子として使用されたためと考えられる。また、遊離型のステロールは、細胞膜マイクロドメインのスフィンゴミエリンに局在する。褐藻では、スフィンゴミエリン

Table 2

Free- and ester-fucosterol content, and fatty acid composition in TAG for immature and mature female gametophytes (*Saccharina japonica*) cultured for 12 days

Lipids	Growth stages of gametophytes	
	Vegetative [†]	Reproductive [‡]
Fucosterol ($\mu\text{g mg}^{-1}$ dry sample)		
free	1.24	0.428
ester	n.d.*	n.d.*
TAG (relative area to ISTD mg^{-1} dry sample)		
C14:0	10.3	6.33
C16:0	28.8	26.6
C16:1n9	1.12	0.854
C18:0	12.1	16.8
C18:1n9	33.9	20.9
C18:2n6	10.2	8.17
C18:3n6	0.560	n.d.*
C18:3n3	3.74	3.62
Total-TAG	101	83.4

[†] Cultured in Fe-free medium. Maturity (%) was 0.

[‡] Cultured in Fe-added (20 μM with 1:1 EDTA) medium. Maturity (%) was 93.

ンの存在は未だ不明なままだが、スフィンゴミエリン合成酵素の遺伝子は見つかっていない (Esi_0217_0007, Esi_0157_0035, Esi_0383_0007)。このことから、フコステロールは、遊離型で存在し、遊離型のままでシグナル分子として働くことができると考えられる。通常は、細胞膜マイクロドメイン中のスフィンゴミエリンに局在しており、その機能が制御されていると考えられる。

TAG 中の C14:0 及び C18:1n9 の含有量及び生殖生長による減少は、Table 1 の値の変化と同様の変化を示している (Table 1 and 2)。これは、C14:0 及び C18:1n9 が TAG に局在しており、また、生殖生長 (卵形成) に伴うエネルギー源として代謝されたことを示している。

C18:2n6 及び ω 3 系多価不飽和脂肪酸などの多価不飽和脂肪酸は、一般にエネルギー源としての優先度は低く、生殖生長に伴うそれらの含有量の減少は、エネルギー代謝からは説明できない。C18:2n6 及び C18:3n3 は、褐藻配偶体 () において、性フェロモンの前駆体となることが知られている。C18 及び C20 の多価不飽和脂肪酸が性フェロモンなどの生理活性物質へ代謝する遺伝子 (Esi_0060_0078, Esi_0111_0095) があることから、生殖生長に伴う性フェロモンなどの生理活性物質への代謝により減少したと考えられる。また、長鎖多価不飽和脂肪酸は、スフィンゴミエリン分解酵素を活性化させることが知られており、マイクロドメインからのフコステロールの解放にも寄与していると考えられる。

(4) 細胞外フコステロールによる生殖誘発の検討

4.(2)及び(3)より、遊離体のフコステロールが生殖生長のシグナル分子として働くと考えられた。そこで、細胞外での生殖活性を確認するため、フコステロール ($0 \sim 1000 \mu\text{g L}^{-1}$) を添加した培養液を用いた成熟アッセイを行った。しかし、フコステロールの添加による生殖生長の誘発は、どの濃度のもでも確認できなかった。これは、4.(3)で示唆したように、フコステロールの機能がスフィンゴミエリンと PUFAs で制御されているためと考えられる。

<引用文献>

T. Motomura and Y. Sakai, Regulation of gametogenesis of *Laminaria* and *Desmarestia* by iron and boron. *Jpn. J. Phycol.* 32, 1984, 209-215.

H. Iwai, M. Fukushima, M. Yamamoto, Binding characteristics and dissociation kinetics for iron(II) complexes with seawater extractable organic matter and humic substances in a compost. *Anal. Sci.*, 28, 2012, 819-821.

H. Iwai, M. Fukushima, M. Yamamoto,

Determination of labile Fe(II) species complexed with seawater extractable organic matter under seawater conditions based on the kinetics of ligand-exchange reaction with ferrozine, *Anal. Sci.*, 29, 2013, 723-728.

H. Iwai, M. Fukushima, M. Yamamoto, T. Komai, Y. Kawabe, Characterization of seawater extractable organic matter from bark compost by TMAH-py-GC/MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 99, 2013, 9-15.

H. Iwai, M. Fukushima, T. Motomura, T. Kato, C. Kosugi, Effect of iron complexes with seawater extractable organic matter on oogenesis in gametophytes of a brown macroalga (*Saccharina japonica*). *J. Appl. Phycol.* 27, 2015, 1583-1591.

Cock et al., The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, 465, 2010, 617-621.

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 2 件)

岩井 久典、褐藻配偶体の卵形成における脂質代謝、平成 29 年日本水産学会春季大会、2017 年 3 月、東京海洋大学(東京、品川)

岩井 久典、マコンブ配偶体の卵形成に伴う脂質組成の変化、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月、龍谷大学(京都、深草)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井 久典 (IWAI, Hisanori)

大阪府立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70733765