

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07935

研究課題名(和文) 紅藻サビノリ高水温耐性品種の生物学的特性発現の分子機構解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism involved in the development of biological characteristics in a high-temperature tolerant strain of *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta)

研究代表者

柿沼 誠 (KAKINUMA, Makoto)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：60303757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：紅藻サビノリ高水温耐性品種の生物学的特性発現の分子機構を明らかにするために、次世代シーケンサーを利用して高水温耐性品種と基準品種のトランスクリプトーム解析を行った。約2 Gbpの塩基配列情報から8,533コンティグが得られ、高水温耐性形質の発現や高水温障害の発症に關与する候補遺伝子(51コンティグ)が検出された。候補遺伝子のBLAST解析や各種パスウェイ解析の結果から、高水温耐性形質の発現には抗酸化系、ユビキチン-プロテアソーム系、DNA修復系などの機能亢進、高水温障害の発症には分子シャペロン系、酸化還元系などの機能低下が關与していると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖ノリの生産量や品質は、養殖用ノリ網に付けた殻胞子を発芽させて幼葉まで育成する育苗期(ノリ葉状体の生長初期)に作製される種網の品質の良否に大きく左右される。本研究では、育苗期の高水温環境に対して耐性を示す高水温耐性品種と基準品種の間で発現遺伝子の比較解析を行い、高水温耐性形質の発現や高水温障害発症の分子機構の一端を明らかにした。海水温上昇などによりノリ養殖環境が激変し、近隣諸国との養殖ノリ生産の国際競争が本格化していくなかで、本研究成果は高水温耐性品種の選抜育種や特性評価に有効な遺伝子マーカーの開発につながる重要なものである。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the molecular mechanism involved in the development of biological characteristics in a high-temperature tolerant strain of *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta), transcriptome analysis was performed between the high-temperature tolerant and standard strains using a next-generation sequencer. Consequently, 8,533 contigs were generated from the approximately 2 Gbp (total bases) by de novo assembling, and 51 contigs corresponding to candidate genes involved in the development of high-temperature tolerant/disorder traits were detected. Results of BLAST and various pathway analyses of the candidate genes suggest that hyperfunction of antioxidation, ubiquitin-proteasome, and DNA repair systems is involved in the development of high-temperature tolerant characteristics, and that hypofunction of molecular chaperon and redox systems is the cause of high-temperature disorders.

研究分野：農学

キーワード：紅藻 サビノリ 環境応答 トランスクリプトーム 高水温耐性 高水温障害 選抜育種 養殖品種

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

紅藻スサビノリの生活環は、有性世代である葉状体(配偶体)と無性世代である糸状体(胞子体)の2つの世代からなる。食用となるスサビノリ葉状体の養殖(ノリ養殖)は日本の海面養殖業の中で重要な位置を占め、養殖ノリの生産量は糸状体から放出させた殻胞子をノリ網に付けて養殖を行う人工採苗法の確立をはじめとする養殖技術の発達・改良、高生長性を示す多収穫性品種の選抜育種、摘採・加工工程の機械化などにより飛躍的に増大した。しかしながら、沿岸海域で行われるノリ養殖は気象や海況に大きく影響されるため、依然として養殖期には多くの病害が頻発し、生産量や品質(加工板ノリ製品の商品価値)は不安定なものとなっている。

ノリ養殖は通常10~3月に行われるが、近年の海水温の上昇傾向によりノリ養殖初期の採苗(ノリ網への殻胞子付け)、育苗(殻胞子を幼葉まで育成して種網を作製)、秋芽網栽培(育苗後の幼葉を直ちに成葉まで育成して収穫)が著しい悪影響を受けている。特に育苗はノリ養殖の根幹であり、育苗期に作製された種網の一部は秋芽網栽培(11~12月)に用いられるが、大部分は冷凍保存され冷凍網栽培(1~3月)に利用される。したがって、育苗期に作製される種網の品質の良否が養殖ノリの生産量や品質を大きく左右する。

室内培養において殻胞子付けしたノリ網を低水温で育苗した場合、正常な生理状態を保ちつつ殻胞子は幼葉まで生長するが、高水温で育苗すると芽落ち(殻胞子や幼葉の脱落)、幼葉の生長や色調の低下、形態異常などの高水温障害が発症する。高水温障害を発症した幼葉を低水温条件に移しても、生理状態や形態が正常に回復することはないため、ノリ養殖の現場は育苗期の高水温に耐え得る優良品種(高水温耐性品種)の早期作出を切望している。

このような背景のもと、日本各地の水産試験場において高水温耐性品種の選抜育種が進められ、独自の基準で高水温耐性能が評価されてきた。その中でも三重県水産研究所が選抜育種した高水温耐性品種(MET11)は、実際のノリ養殖にも既に利用されており、基準品種(U-51)を比較対象として高水温耐性能の詳細が明らかにされている。これまでに我々は、育苗期のMET11で見られる高水温耐性形質の発現に關する遺伝子の単離・同定を目的として、高水温で育苗したMET11およびU-51の幼葉間で発現遺伝子の比較解析(cDNAサブトラクション法)を行い、複数の候補遺伝子がMET11の高水温耐性に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかしながら、cDNAサブトラクション法には発現遺伝子の網羅性や微小な発現変動を示す遺伝子の検出に限界があるため、高水温耐性や高水温障害発症の分子機構の全容解明や、高水温耐性品種の選抜育種と形質評価に有効な遺伝子マーカーを特定するには至らなかった。

### 2. 研究の目的

近年、生物種を問わず高精度且つ高感度で転写産物(トランスクリプトーム)の全体像や発現量を捉えることを可能にする次世代シーケンサー(NGS)を利用した網羅的トランスクリプトーム(RNA-Seq)解析が注目されている。この解析手法は、遺伝子情報の基盤整備が未だ不十分である紅藻スサビノリの高水温耐性や高水温障害発症の分子機構解析、優良品種の選抜育種や特性評価の効率化に必要な遺伝子マーカーの特定に有効と考えられた。

そこで本研究では、NGSを利用したRNA-Seq解析を主軸として、スサビノリ育苗期(葉状体の生長初期)における転写産物の全容把握、高水温耐性品種(MET11)の高水温耐性や基準品種(U-51)の高水温障害発症の分子機構解明、高水温耐性品種の選抜育種や特性評価の効率化につながる遺伝子マーカーの特定を目的として、以下の3つの研究を計画した。

(1) 基準品種および高水温耐性品種のRNA-Seq解析: U-51およびMET11の殻胞子をノリ網に採苗後、高水温または低水温条件で育苗して得た各幼葉につきNGSを利用したRNA-Seq解析を行い、育苗期における転写産物の全体像と発現量を明らかにする。

(2) 高水温耐性および高水温障害発症に關する遺伝子マーカーの特定: RNA-Seq解析データを利用して、MET11幼葉の高水温耐性やU-51幼葉の高水温障害発症の分子機構、両品種の生物学的特性発現の分子機構を明らかにするとともに、各分子機構の鍵遺伝子(遺伝子マーカー)を特定する。

(3) 遺伝子導入・発現系を利用した遺伝子マーカーの機能解析: MET11幼葉の高水温耐性やU-51幼葉の高水温障害発症に關する遺伝子の発現ベクターを構築してU-51あるいはMET11の殻胞子(あるいは単胞子)に導入後、高水温条件で育苗して得た幼葉の生長特性や発現形質を調べ、高水温耐性品種の選抜育種や特性評価における遺伝子マーカーの機能性と有効性を明らかにする。

本研究では、育苗期の高水温環境に対して優れた耐性を示すMET11幼葉を遺伝子解析のモデル品種として位置付け、そのトランスクリプトーム情報をU-51幼葉のそれと比較することにより、高水温耐性や高水温障害発症の分子機構を解明していく。NGSを利用してスサビノリ養殖品種の転写産物の全体像や発現量を把握する試みはこれまでに無く、転写産物の発現を高精度・高感度で定量化できるため、本研究成果はモデル陸上植物と海産藻類の高水温耐性・高水温障害発症の分子機構を比較する上で重要な知見となり得ると推測される。また、各種データ解析手法を駆使することで、高水温耐性品種の選抜育種や特性評価に有効な遺伝子マーカーが特定されるのみならず、これまでの関連研究で見落とされていた新規遺伝子やアイソフォームが単離・同定される可能性もある。さらに本研究では、U-51に対して高水温耐性遺伝子マーカーを、MET11に対して高水温障害発症遺伝子マーカーを導入・発現させ、遺伝子マーカーが生物学的特性に及ぼす影響や選抜マーカーとしての有効性を明らかにしていく計画である。海水温上昇などによりノリ

養殖環境が激しく変化し、ノリ養殖を行う近隣諸国との国際競争が本格化していくなかで、本研究は優れたノリ養殖品種の作出やノリ養殖の持続維持に資する極めて重要なものと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 基準品種および高水温耐性品種の RNA-Seq 解析

これまでに我々は、スサビノリ基準品種 (U-51) とスサビノリ養殖品種から選抜育種された高水温耐性品種 (MET11) の室内培養試験を実施し、両品種の育苗期における生物学的特性の差異を明らかにしている。U-51 の殻胞子を採苗後、低水温 (18 °C) 条件下で 14~21 日間の育苗を行った場合は正常な生理状態を維持して幼葉まで生長するが、高水温 (24 °C) 条件下で育苗した場合は芽落ち (殻胞子や幼葉の脱落)、生長低下、形態異常 (一層細胞層の多層化による幼葉のちじれ) や色調異常などの高水温障害が高頻度で起こる。一方、MET11 の殻胞子を採苗後に高水温条件下で育苗した場合、芽落ちや形態・色調異常はほとんど認められず、U-51 の約 2 倍の生長性を示す。

そこで室内培養により U-51 および MET11 の殻胞子を採苗後、各品種のノリ網を 2 つに分け、それぞれを高水温 (24 °C) 条件下あるいは低水温 (18 °C) 条件下に移して 14 日間の育苗を行った。なお、高水温育苗により得られた U-51 および MET11 の幼葉をそれぞれ U51-HT および MET-HT、低水温育苗により得られた U-51 および MET11 の幼葉をそれぞれ U51-N および MET-N とした。育苗後のノリ網から各幼葉を回収して全 RNA を抽出し、mRNA の精製と断片化を行った。断片化 mRNA を鋳型としてランダムプライマーを用いて断片化 cDNA を調製し、両端にアダプターを付加して各幼葉 (U51-HT, MET-HT, U51-N, MET-N) の cDNA ライブラリーを構築した。次に、NGS (Ion PGM) システムを利用して、構築した 4 種類の cDNA ライブラリーについて RNA-Seq 解析を行い、各 cDNA ライブラリーから塩基配列情報を取得した。

#### (2) 高水温耐性および高水温障害発症に関する遺伝子マーカー (候補遺伝子) の抽出

RNA-Seq 解析データを利用して、U51-HT, MET-HT, U51-N, MET-N における転写産物を比較した。まず、PRINSEQ を利用して取得した塩基配列情報 (リードデータ) についてクオリティトリミング処理を行った後、Trinity によるアセンブル解析 (コンティグの作成) と Trinotate によるアノテーション解析 (コンティグへの遺伝子情報の付加) を行い、リファレンス配列 (リファレンス・コンティグ) を作成した。

次に、TMAP を利用してリファレンス・コンティグに対してクオリティトリミング処理済のリードデータをマッピングした後、Cufflinks によるマッピング結果のアセンブルと Cuffdiff による発現量解析 (RPKM の算出)、edgeR パッケージによる発現変動遺伝子 (DEG) の検出を行った。さらに、解析ソフト R の CummeRbund パッケージを利用した各種データ分析により、MET11 幼葉の高水温耐性や U-51 幼葉の高水温障害発症に関する候補遺伝子の抽出を試みた。

#### (3) 候補遺伝子の発現特性解析と cDNA クローニングによる同定

培養調製した各幼葉 (U51-HT, MET-HT, U51-N, MET-N) から全 RNA を抽出し、ランダムプライム法によりリアルタイム PCR (qPCR) 用 cDNA を調製した。qPCR 用 cDNA を鋳型とし、各候補遺伝子発現を特異的に検出する PCR プライマーセットを用いて qPCR 解析を行い、各幼葉における候補遺伝子の発現特性を詳細に調べた。

候補遺伝子の一部については、コンティグの塩基配列情報が少なくオープンリーディングフレーム (ORF) が不完全であった。そこで、RACE PCR などを利用して全 ORF をコードする cDNA を単離した。得られた cDNA の塩基配列情報を利用して BLAST 解析、遺伝子オントロジー (GO) 解析、KEGG パスウェイ解析などを行い、各候補遺伝子の同定と機能予測を試みた。

#### (4) 遺伝子導入・発現系を利用した候補遺伝子の機能解析法の開発

MET11 幼葉の高水温耐性や U-51 幼葉の高水温障害発症に関する候補遺伝子の細胞内機能解析には、候補遺伝子をスサビノリ細胞に導入して発現させることで生物学的特性がどのように変化するかを調べる逆遺伝学的解析が必要不可欠となる。候補遺伝子発現ベクターの導入対象は、スサビノリ葉状体の成熟誘導により得られる単胞子が有効と考えられたため、MET11 および U51 幼葉からの単胞子放出の誘導条件、培地中に放出された単胞子の回収方法、パーティクルデリバリーシステムを利用した単胞子への候補遺伝子発現ベクターの導入条件について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 基準品種および高水温耐性品種の RNA-Seq 解析

室内培養により U-51 および MET11 の殻胞子を採苗後、各品種のノリ網を高水温あるいは低水温で 14 日間育苗したところ、葉長 2~4 mm、湿重量 0.2~0.8 g の幼葉 (U51-HT, MET-HT, U51-N, MET-N) を得ることができた。各幼葉から抽出された全 RNA (約 10~36 µg) から mRNA を精製後、U51-HT, MET-HT, U51-N, MET-N の cDNA ライブラリーを構築した。Ion PGM システムを利用して各 cDNA ライブラリーの RNA-Seq 解析を行ったところ、U51-HT, MET-HT, U51-N, MET-N についてそれぞれ、0.27, 1.21, 0.27, 0.41 Gbp の塩基配列情報 (総塩基数 2.16 Gbp) を得ることができた。

#### (2) 高水温耐性および高水温障害発症に関する候補遺伝子の抽出

取得した塩基配列情報 (リードデータ) についてクオリティトリミング処理を行ったところ、U51-HT, MET-HT, U51-N, MET-N についてそれぞれ、0.25, 1.15, 0.26, 0.39 Gbp の塩基配列情報 (総塩基数 2.05 Gbp) を得ることができた。各 cDNA ライブラリーのクオリティトリミング処

理済リードデータのアセンブル・アノテーション解析により、8,553 のリファレンス・コンティグ（平均 370 bp/コンティグ，範囲 200~3,236 bp，GC 含量 61%）を得ることができた。

リファレンス・コンティグに対して各 cDNA ライブラリーのクオリティトリミング処理済リードデータをマッピングした後，Cuffdiff 解析および edgeR 解析に供したところ，U51-HT，MET-HT，U51-N，MET-N の間で重複を含めずに 51 コンティグ（201~1,314 bp）が DEG として検出された。全コンティグの Volcano plot を確認したところ，U51-N と U51-HT，MET-N，MET-HT との比較においては 5~20 コンティグが DEG として検出されたが，U51-HT，MET-N，MET-HT の各比較で DEG として検出されたコンティグは極めて少なかった（1~3 コンティグ）。相関分析の結果，U51-N と U51-HT，MET-N，MET-HT との間で DEG の相関係数（絶対値）は 0.05~0.38 と低く，発現パターンに高い相関性はみられなかったが，U51-HT，MET-N，MET-HT の間では DEG の発現パターンに比較的高い相関性が認められた（相関係数 0.83~0.86）。これらの結果から，U51-N の遺伝子発現パターンは，U51-HT，MET-N，MET-HT のそれらと大きく異なっていると推察された。

検出された DEG のヒートマップ分析の結果，MET-HT と MET-N の間で発現変動が大きく，且つ高水温培養で発現誘導されるコンティグは 3，発現抑制されるコンティグは 4 であった。一方，U51-HT と U51-N の間で発現変動が大きく，且つ高水温培養で発現誘導されるコンティグは 23，発現抑制されるコンティグは 21 であった。これらの結果から，U-51 幼葉と比較して MET11 幼葉の遺伝子発現レベルは水温変化による影響を受けにくく，DEG として検出された 51 コンティグは MET11 幼葉の高水温耐性（7 コンティグ）あるいは U-51 幼葉の高水温障害発症（44 コンティグ）に関与する候補遺伝子に対応していると推察された。

#### （3）候補遺伝子の発現特性解析と cDNA クローニングによる同定

新たに培養調製した幼葉（U51-HT，MET-HT，U51-N，MET-N）から qPCR 用 cDNA を調製し，DEG として抽出された 51 コンティグに対応する候補遺伝子の発現特性を qPCR 解析により詳細に調べた。その結果，MET-HT および U51-HT の両幼葉で発現誘導される候補遺伝子（7 コンティグ），MET-HT 特異的な発現誘導がみられる候補遺伝子（10 コンティグ），MET-HT および U51-HT の両幼葉で発現抑制される候補遺伝子（3 コンティグ），U51-HT 特異的な発現抑制がみられる候補遺伝子（8 コンティグ）が特定され，qPCR 解析データから得られた各候補遺伝子の発現特性は RNA-Seq 解析データから推定された発現特性と概ね一致していた。一方，残りの候補遺伝子（23 コンティグ）については qPCR 解析の結果，U51-HT，MET-HT，U51-N，MET-N の間で発現量に有意な差が認められず，RNA-Seq 解析データから推定された発現特性と一致しなかった。

qPCR 解析で有意な発現変動がみられた候補遺伝子（計 28 コンティグ）については，RACE PCR による cDNA クローニングを行った。得られた cDNA の塩基配列情報を用いて BLAST 解析や各種パスウェイ解析を行い，各候補遺伝子の同定を試みるとともに細胞内機能を予測した。その結果，MET-HT において発現誘導される候補遺伝子群は，グルタチオンペルオキシダーゼ，F-box タンパク質，ユビキチン結合酵素，損傷 DNA 結合タンパク質，グリコシルトランスフェラーゼ，ヌクレオシド二リン酸キナーゼ遺伝子などと同定され，抗酸化系，ユビキチン-プロテアソーム系，DNA 修復系，タンパク質修飾系，シグナル伝達系の機能亢進が MET11 幼葉における高水温耐性形質の発現に重要な役割を果たしている と推察された。一方，U51-HT で発現抑制される候補遺伝子群は，シャペロニン，シトクロム P450，アセチル CoA カルボキシラーゼ，TATA 結合タンパク質遺伝子などと同定され，U-51 幼葉における高水温障害発症には分子シャペロン系，酸化還元系，脂肪酸合成系の機能低下が関係していると推察された。

#### （4）遺伝子導入・発現系を利用した候補遺伝子の機能解析法の開発

室内培養により U-51 および MET11 の殻胞子を採苗後，低水温で 21 日間育苗して各品種の幼葉を調製し，1 日 1 回の高塩分処理（塩分濃度 10~25%，15~90 min/回）または干出処理（30~120 min/回）により単胞子放出を誘導した。各処理後 24 h 培養し，その間に培地中に放出された単胞子を各種メンブレン濾過により捕集して計測した。その結果，単胞子放出の誘導には塩分濃度 15% で 15 min の高塩分処理や 60~120 min の干出処理が有効であること，各処理開始後 5~7 日目に単胞子放出量が最大になることが分かった。また，単胞子の回収には親水性ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）メンブレン（孔径 5 μm）濾過が有効であり，単胞子を捕集した PTFE メンブレンを直接パーティクルデリバリーシステムにセットして遺伝子導入に利用できることが分かった。しかしながら，本遺伝子導入・発現系を利用した候補遺伝子の逆遺伝学的解析に取り組むには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸本 亮, 柿沼 誠, 五十嵐洋治, 篠原幹拓, 木下滋晴, 浅川修一, 岩出将英, 山田大貴
2. 発表標題 異なる温度条件下における紅藻スサビノリ高水温耐性品種のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸本 亮, 柿沼 誠, 五十嵐洋治, 篠原幹拓, 木下滋晴, 浅川修一, 岩出将英, 山田大貴
2. 発表標題 スサビノリ高水温耐性品種の高水温耐性形質に関与する候補遺伝子の発現解析
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岩出 将英  (IWADE Shouei)		
研究協力者	山田 大貴  (YAMADA Daiki)		