

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04847

研究課題名(和文) 異質倍数体微細藻類の雑種強勢効果を司るキーレギュレーターの探索

研究課題名(英文) Investigation of key regulators of heterosis in allopolyploid microalgae

研究代表者

前田 義昌 (Maeda, Yoshiaki)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30711155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻 *Fistulifera solaris* は微細藻類の中で唯一報告されている異質倍数体(雑種)生物である。異質倍数体生物は、両親種よりも優れた性質を示す雑種強勢と呼ばれる特性を示す場合があり、動物や植物の異質倍数体でその分子メカニズムが研究されている。本研究では、脂質を高蓄積し、バイオ燃料原料の生産ホストとしても期待される *F. solaris* において、雑種強勢に關与する鍵因子を探索するため、ナノポアシーケンサーを用いた詳細なゲノム解析と、遺伝子発現解析を行った。その結果、タンデムリピート構造を持つ脂質生合成遺伝子など、近縁種珪藻のゲノムには無い、特徴的なゲノム構造を複数発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異質倍数体珪藻 *F. solaris* のゲノム構造は、これまでの研究においても解析されている。しかし、従来のシーケンシング法ではカバーできない領域があり、染色体レベルでのアセンブリは行えていなかった。本研究では、これまでの解析できなかった領域のDNA配列を取得し、染色体構造全体の把握に成功した。新たに配列取得した領域には、タンデムリピート構造を持つ脂質生合成遺伝子など、他の微細藻類には見られない、異質倍数体珪藻に特有の特徴が発見された。新たに得られた知見は、微細藻類の脂質代謝への理解と、バイオ燃料をはじめとする有用物質生産の効率化に有用であることから、学術的、および社会的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：The marine pennate diatom *Fistulifera solaris* is the only allopolyploid microalga, which is believed to be generated by the inter-species hybridization. It is well known that allopolyploid organisms tend to exhibit superior phenotypes as compared to their parent species. This phenomenon is called heterosis, and its molecular mechanism has been investigated using allopolyploid animals and plants. In this study, the key factors potentially involved in the heterosis in *F. solaris*, which also attracts attentions as a promising host of biofuel producer due to the high lipid accumulation phenotype, was investigated by nanopore sequencing for chromosome-level assembly of the genome, and gene expression analyses. As a result, some remarkable genomic features including the tandemly repeated genes involved in the lipid synthesis were found. These features were not found in the genome of the closely related diatom which belongs to the same *Fistulifera* genus but is not an allopolyploid organism.

研究分野：生物工学

キーワード：異質倍数体 雑種強勢 微細藻類 珪藻 ゲノミクス トランスクリプトミクス

1. 研究開始当初の背景

化石燃料利用による温室効果ガスの排出に起因し、地球温暖化の影響は深刻さを増している。世界各国で標榜されている「脱炭素化」の取り組みは最早、達成目標ではなく、必ず達成しなければならない至上命題と言える。このような情勢の中、化石燃料に依存した従来通りのオイルリファイナリーによる化成品のモノづくりから、生物機能をフル活用するバイオリファイナリーによるモノづくりに転換し、生物工学に基づく環境負荷の少ない経済活動であるバイオエコノミーを実現することが求められている。脱炭素化社会に適合するバイオエコノミーにおいて、光合成生物である微細藻類が物質生産ホスト生物として果たす役割は大きい。これは、膨大な多様性を擁する微細藻類は、光合成により固定したCO₂を原料として、陸生多細胞植物より効率的に、様々な有用物質を生産できるためである。しかし、バイオエコノミーで活用される真の実用的ホスト生物とするためには、微細藻類のバイオマスや有価物の生産性の更なる向上や安定化が必須であり、革新的な品種改良技術の創出が求められている。

多くの農作物植物では、異種植物を掛け合わせた異質倍数体(雑種)を作出し、「雑種生物は両親よりも優れた形質を示す」という雑種強勢効果を利用して品種改良を行っている。しかし、雑種強勢効果を利用した微細藻類の品種改良はこれまで検討されていない。これは、異質倍数体の微細藻類がほとんど発見されておらず、知見が乏しいことが要因であった。

研究代表者らはこれまでに、海洋珪藻 *Fistulifera solaris* が異なる2種の珪藻を両親種とする異質倍数体であること報告し、研究を行ってきた。*F. solaris* は微細藻類の中でも特に脂質を高蓄積する特徴を有し、バイオ燃料原料の生産ホストとして注目されている。そこで微細藻類の中で唯一の異質倍数体である *F. solaris* のゲノム構造や遺伝子発現挙動を詳細に解析し、異質倍数体ではない近縁種と比較することで、微細藻類における異質倍数性の特性や雑種強勢に関する知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、雑種強勢効果の適用による微細藻類バイオマス生産性の向上を目指し、その実現のために、*F. solaris* が持つ2種類のサブゲノムの構造や発現挙動といった特徴を解析することにより、雑種微細藻類の雑種強勢に関与する生物学的因子を探索することを目的とした。

異質倍数体の陸生植物は異なる両親植物種からそれぞれのゲノムを継承しており、転写調節因子により異なる2種類のサブゲノムを使い分けることで、高いバイオマス生産性や環境適応性といった雑種強勢効果を生み出していることが知られている。一方で、珪藻は陸生植物とは進化的距離が遠いため、これまで研究されてきた陸生植物とは異なる因子により雑種強勢効果を生み出している可能性が高く、学術的に独自性があると考えられる。

また、特定した生物学的因子を発現制御することで、将来的に異質倍数体ではない微細藻類で雑種強勢効果を再現することができると考える。微細藻類の工学的応用(バイオ燃料、飼料、食料等)のためには、環境変動があっても安定的に大量にバイオマスを生産することが最も重要であることから、実学的側面からも意義のある研究であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) *F. solaris* からの DNA 抽出

海洋珪藻 *F. solaris* 及び同属近縁種の珪藻である *F. pelliculosa* の培養には f/2 培地を用いた。500 ml の f/2 培地を含む扁平フラスコで7日間培養した後、生育した細胞を遠心分離し、湿藻体を獲得した。湿藻体(約490 mg)からのDNA抽出には、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)法を採用した。湿藻体ペレットを液体窒素で凍結しつつ乳鉢及び乳棒で破碎し、9.5 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 ml の 10% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液、50 µl の 20 mg/ml Proteinase K の混合液で懸濁した。37°C で1時間インキュベーションした後、100 µl の 10 mg/ml RNase A (RNase Cocktail Enzyme Mix, 120U/mg, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を添加し、37°C で30分間インキュベートした。この懸濁液に1.8 ml の 5M NaCl 及び1.5 ml の 10% CTAB/0.7 M NaCl 混合液を添加し、65°C の温浴槽で20分間インキュベートした。その後、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、ボルテックスで十分懸濁した後、13,000g で15分間遠心分離を行った。得られた水層を分取し、等量のクロロホルムを加え、ボルテックスした後13,000g で10分間遠心分離を行った。得られた水層を分取し、十分の量の3M 酢酸ナトリウム、及び三倍量の100% エタノール(室温)を添加し、室温で20分間静置した。13,000g で30分間遠心分離後に上清を除去し、15 ml の 70% エタノール(室温)を加えペレットを転倒混和により洗浄した後、13,000g で5分間遠心分離を行った。上清を除去後に得られたペレットを200 µl の Nuclease free water (New England BioLabs, Massachusetts, USA) で2日間かけて溶解し、藻体の核酸抽出物とした。得られた核酸抽出物は1% アガロースゲルを用いて電気泳動し、長鎖ゲノムの解析を行う MinION に対し適切な鎖長であるかを評価した。DNA 濃度の測定には Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用い、520 nm の蛍光強度から濃度を算出した。

(2) *F. solaris* ゲノムのナノポアシーケンシング

MinION (Oxford nanopore technologies) を用いて、得られた *F. solaris* 及び *F. pelliculosa* の核酸抽出物の塩基配列の解析を行った。MinION に用いるライブラリーの調製において、*F. solaris* のゲ

ノムの解析には Rapid sequencing kit (SQK-RAD004)、*F. pelliculosa* のゲノムの解析には 1D2 Sequencing Kit (SQK-LSK308) を用いた。MinION での解析には、フローセル FLO-MIN106 R9Version を用いた。また MinION の操作プラットフォームとして Oxford nanopore technologies が提供する MinKNOW を用いた。解析で得られた fast5 ファイルは、同社が提供する変換ソフト Albacore v2.3.3 を用いてベースコーリングし、fastq ファイルに変換した。さらに fastq ファイル中の各リードの塩基配列を、アセンブリツール Canu を用いてアセンブリした。アセンブリ後は、最初に得られた fast5 形式の波形データとアセンブリ結果を再度照合するポリッシングツール Nanopolish により、配列の修正を行った。これにより、*F. solaris* 及び *F. pelliculosa* における全ゲノムの塩基配列を Fasta 形式で獲得した。全ゲノムの塩基配列に対して、リード配列や、これまでに予測されている遺伝子の配列をアライメントする際には、アライメントツールである minimap2 を利用した。

(3) 染色体構造の解析と遺伝子発現解析

アセンブリの結果得られた contig から、葉緑体ゲノムとミトコンドリアゲノムに対応する contig を除いた全 contig を解析に使用し、*F. solaris* における染色体構造の再構築を行った。パイロシーケンス法により取得した *F. solaris* のサブゲノム配列¹を、相同性の高い MinION 由来の配列に対しアライメントした。アライメントは、オンラインサイト D-GENIES 上で行った。また、各 contig の末端における CCCTAA 繰り返し配列の有無を確認することで、テロメア配列を探索した。遺伝子発現解析は、先行研究¹で取得したトランスクリプトーム情報を利用した。

4. 研究成果

(1) *F. solaris* のゲノム情報の染色体レベルでのアセンブリ

ナノポアシーケンサー MinION を用いた解析 (表 1) により、獲得した総リード数は 502,286 となり、そのうちベースコーリングの過程を通過したリードは 414,268 となった。全リード総塩基数は約 4.8 Gbp となった。パイロシーケンス法により解析された *F. solaris* のドラフトゲノムは約 49.7 Mbp であったことから、約 97 倍の塩基情報を得ることができた。同様に MinION を用いた線虫 *C. elegans* のゲノム解析では、参照ゲノム (約 100.2 Mbp) に対して約 134 倍の 13.4 Gbp の塩基情報が獲得され、その後、良好なアセンブルが可能であることが示されている²。また、MinION で得られたリード長を、先行研究で *F. solaris* におけるゲノム解析に用いられたパイロシーケンス法で得られたリード長と比較したところ、MinION で得られたリード長の分布が長鎖であることが示された¹。平均のリード長は約 11.6 kbp であり、MinION を用いた *C. elegans* のゲノム解析における平均のリード長 (約 17 kbp) と同じオーダーの長さであった。このことから、本研究で MinION により得られた総塩基数約 4.8 Gbp のリードは、*F. solaris* のゲノム構造をアセンブルするために十分であると判断した。

表 1 珪藻 *Fistulifera solaris* のナノポアシーケンシング

珪藻	
生物種	<i>Fistulifera solaris</i>
リファレンスゲノムのサイズ	49.74 Mb
シーケンシング	
ケミストリー	Rapid Sequencing Kit (SQK-RAD004)
フローセル	FLO-MIN106
総リード数	502,886
QC通過リード数	414,268
通過リードの総塩基数	4,822,848,575
リードデプス	97
N50	22,336
通過リードの平均塩基数	11,642
通過リードの最大塩基数	115,760
アセンブリ	
ソフトウェア	Canu v1.7 + nanopolish
コンティグ数	62
全コンティグの総塩基数	51,725,046
N50	1,355,535

MinION で得られたリードを Canu でアセンブリし、Nanopolish でポリッシングした後に出力された contig の数は 62 となり、総塩基数は約 51.7 Mbp となった。アセンブルされた contig の N50 は約 1.3 Mbp であった。MinION を用いた *C. elegans* のゲノム解析における contig の N50 は約 4.0 Mbp であり、同じオーダーの値であった。これより、本実験により得られた contig が十分な長さでアセンブルされたことが示唆された。

(2) *F. solaris* の異質倍数体ゲノムに特徴的な染色体構造

得られた 62 個の contig のうち核ゲノムに相当する contig の数は 45 個であり、それぞれ相同性の高い 22 対 44 本の染色体対に収束した。MinION により得られた *F. solaris* の核ゲノムの 45 contig と、パイロシーケンシング法により得られた scaffold をアライメントし、ドットプロットで表示した (図 1)。45 contig の内、23 contig が一方の祖先種に由来する Fso_h サブゲノムと高い相同性を示し、22 contig がもう一方の祖先種に由来する Fso_l サブゲノムと高い相同性を示した³。このことは、MinION により得られた contig を二つのサブゲノム Fso_h と Fso_l に分離できたことを意味する。さらにパイロシーケンシングでの解析において独立した染色体であると考えられていた配列が、MinION で得られた一つの contig とアライメントされる場合が数多く確認された。各サブゲノム間で対となるホメオログス染色体の配列同一性は 87.13~95.6%であった。

染色体の全 88 カ所の末端のうち、テロメアが 82 カ所で確認された。また 8 本の染色体対において、GC 含量の分布に基づきセントロメアが予測できた⁴。以上のことから、*F. solaris* の異質倍数体ゲノムの構造を決定できたと結論付けた。このゲノム構造の中で、脂肪酸合成経路の主要酵素をコードする遺伝子がタンDEMリピート構造をとることが示唆された。遺伝子のタンDEMリピート構造は異質倍数体に共通する構造的特徴である。リピートする遺伝子の間のインターバル領域の PCR 増幅により、遺伝子が少なくとも 2 回タンDEMリピートすることを確認した。また複数のリードが遺伝子のタンDEMリピートを含む領域をカバーしていたことから、本遺伝子が実際にタンDEMリピート構造をとっていることが示された。異質倍数体ではない近縁種の珪藻 *F. pelliculosa* ゲノムでは、本遺伝子のタンDEMリピート構造は確認できなかった。このことから、この遺伝子のタンDEMリピート構造は、異質倍数体である *F. solaris* のゲノムに特徴的な構造変化であると考えられた。

タンDEMリピート構造をとる脂質合成遺伝子の発現挙動をトランスクリプトーム情報から抽出し、ゲノム内の相同遺伝子の発現挙動と比較した。その結果、タンDEMリピート構造をとる遺伝子は相同遺伝子の中で最大の発現量を示すものではなかった。しかし、*F. solaris* が脂質を蓄積する過程において常に一定量の発現を示すことから、脂質合成代謝において一定の役割を果たすことが示唆された。以上のことから、この遺伝子のタンDEMリピート構造は、雑種強勢を示す異質倍数体の珪藻の高い脂質蓄積能に寄与すると考えられた。

その他、ナノポアシーケンサーのリードデプス情報の詳細な解析から、ゲノム構造の中でコピー数が高い領域が存在することを新たに見出した。高コピー領域には光合成に関連する遺伝子が含まれており、バイオマス生産を強化することに貢献している可能性がある。このことから、高コピー領域も *F. solaris* の雑種強勢に寄与し得る新たなゲノム構造の一つであると考えられた。

(3) 大規模な代謝改変を可能とする人工染色体の構築に向けた基礎的知見の獲得

本研究で当初想定していなかった成果として、ゲノム中のイントロンの分布や配列の特徴を解析することで、イントロン配列を利用した異種遺伝子の発現強化法を開発することができた⁵。また、ナノポアシーケンシングで決定した *F. solaris* の染色体中で推定したセントロメア配列の中から、共通する配列モチーフを見出すことに成功した。これまで複数の珪藻のゲノム解析が実施されているが、セントロメア配列の共通モチーフが見出された例は無い。これらの知見は、珪藻の大規模な代謝改変を可能とする人工染色体ベクターの開発に応用できると期待される。

<参考文献>

- 1 Tanaka, T. *et al.* Oil accumulation by the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* as revealed by the genome and transcriptome. *Plant Cell* **27**, 162-176 (2015).
- 2 Tyson, J. R. *et al.* MinION-based long-read sequencing and assembly extends the *Caenorhabditis elegans* reference genome. *Genome Res* **28**, 266-274 (2018).
- 3 Nomaguchi, T. *et al.* Homoeolog expression bias in allopolyploid oleaginous marine diatom *Fistulifera solaris*. *BMC Genomics* **19**, 330 (2018).
- 4 Diner, R. E. *et al.* Diatom centromeres suggest a mechanism for nuclear DNA acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E6015-e6024 (2017).
- 5 Tanaka, T. *et al.* Intron-mediated enhancement of transgene expression in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* towards bisabolene production. *Algal Res* **57**, 102345 (2021).

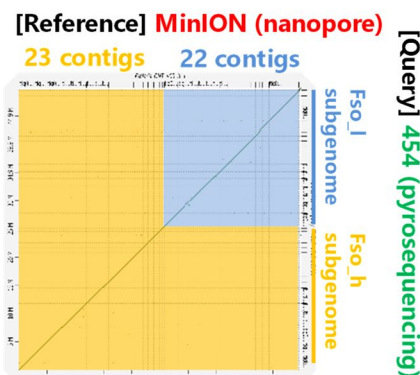


図 1 ナノポアシーケンシングによる *F. solaris* の異質倍数体ゲノムの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Tsuyoshi, Maeda Yoshiaki, Suhaimi Noraiza, Tsuneoka Chiharu, Nonoyama Tomomi, Yoshino Tomoko, Kato Naohiro, Lauersen Kyle J.	4. 巻 57
2. 論文標題 Intron-mediated enhancement of transgene expression in the oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i> towards bisabolene production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102345 ~ 102345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.algal.2021.102345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshiaki Maeda, Ryosuke Kobayashi, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka
2. 発表標題 Genomic landscape of the allopolyploid genome of the oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i> as revealed by long read nanopore sequencing
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiaki Maeda, Ryosuke Kobayashi, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka
2. 発表標題 Structure and functions of the allopolyploid genome of the oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i>
3. 学会等名 5th Molecular Life of Diatoms（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------