

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580211
 研究課題名（和文） レトロトランスポゾンによるスサビノリ分子育種法の開発
 研究課題名（英文） Application of retrotransposons for molecular breeding of *Porphyra yezoensis*
 研究代表者
 瀧尾 進（TAKIO SUSUMU）
 熊本大学・沿岸域環境科学教育研究センター・教授
 研究者番号：60188109

研究成果の概要：本研究によりスサビノリから完全長の LTR レトロトランスポゾン（*PyRE1G1*）が分離された。これは、大型海藻類からのレトロトランスポゾン分離の初めての例である。*PyRE1G1* は硫酸銅添加やプロトプラスト処理などのストレス処理に応答し転写が増大したことから、養殖ノリの分子育種や遺伝子解析への利用が期待される。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：海藻・転移因子・遺伝子・ストレス・養殖ノリ

1. 研究開始当初の背景

レトロトランスポゾンは RNA を介してゲノム上の他の部位に転移する遺伝因子である。それらは、末端反復配列（LTR）をもち、自身の複製に必要な酵素をコードし自律的に複製できる LTR レトロトランスポゾンと LTR をもたない Non-LTR レトロトランスポゾンに大別される。Non-LTR 型因子には、逆転写酵素遺伝子などをもち自律的に複製する LINE と自身はタンパクをコードせず、複製は他の因子（おもに LINE）の働きに依存すると考えられている SINE が含まれる。これらの大部

分は転移能を失っているが、一部の因子はストレスにより活性化し転移することが知られている。

イネでは、転移能をもつ LTR 型レトロトランスポゾンが同定され、変異体作出や遺伝子の機能解析に活用されている。また、ゲノム中に多量に存在する SINE は、品種鑑定や系統解析に有用であることが示されている。申請者は、養殖ノリの分子育種にレトロトランスポゾンが活用できるのではないかと考え、スサビノリからレトロトランスポゾンの分離を試みてきた。その後、2種の SINE 様配列（*PySNI* および *PySN2*）、緑藻の LTR レトロ

トランスポゾンと相同性のある逆転写酵素様遺伝子 (*PyRE2A*) と LTR 型レトロトランスポゾン遺伝子 (*PyRE10G*) を分離した。*PySN1/PySN2* はゲノム中に数千コピー以上存在することから、それらの中から転移能をもつ遺伝子を同定することは困難であると考えられた。また、*PyRE2A* と *PyRE10G* はシングルコピー遺伝子であったが遺伝子両端に明瞭な LTR 配列が確認できないことから転移能を消失している可能性が高かった。従って、研究開始当初では、完全な構造をもつ LTR レトロトランスポゾンは分離されていなかった。

2. 研究の目的

レトロトランスポゾンによるスサビノリ分子育種法の開発を目的し、その第一歩として、スサビノリから (1) ゲノム中のコピー数が比較的小さく、正常な遺伝子構造をもつ LTR 型レトロトランスポゾンを分離し、(2) 転写を活性化させるストレス条件の検索を行った。

3. 研究の方法



LTR 型レトロトランスポゾンはポリプロテイン遺伝子の配列順序と相同性の違いからコピャ型とジブシー型に大別される (図 1)。縮重プライマーを用いたゲノム PCR により、4 種の逆転写酵素遺伝子断片が分離されていた。これらの配列をもとにインバース PCR により全長遺伝子 (*PyRE1G1*) が分離された。サザン解析により *PyRE1G1* のゲノムコピー数を推定した。また、通常培養状態および各種ストレス処理後の葉状態から全 RNA を抽出し、RT-PCR により遺伝子発現量を推定した。

4. 研究成果

(1) コピャ型レトロトランスポゾンの遺伝子構造

PyRE1G1 は、全長 4,801bp で、両端に 204bp の LTR をもち、内部には 1401bp の ORF が存在した。ポリプロテイン遺伝子の配列順序か

ら *PyRE1G1* はコピャ型レトロトランスポゾンと考えられた。また、逆転写酵素 (図 2)、RNaseH およびインテグラーゼのアミノ酸配列による分子系統樹から、*PyRE1G1* は緑色植物のコピャ型因子の祖先的因子であることが示唆された。一方、*PyRE10G* はホヤ、深海性のエビ、ゼブラフィッシュなど一部の水生動物に偏在する新規のコピャ型レトロトランスポゾン (*GalEa* グループ) と高い相同性があった。今のところ、*GalEa* グループと相同性のある植物レトロトランスポゾンはスサビノリの *PyRE10G* だけであり、レトロトランスポゾンの進化を考える上で興味ある結果であった。

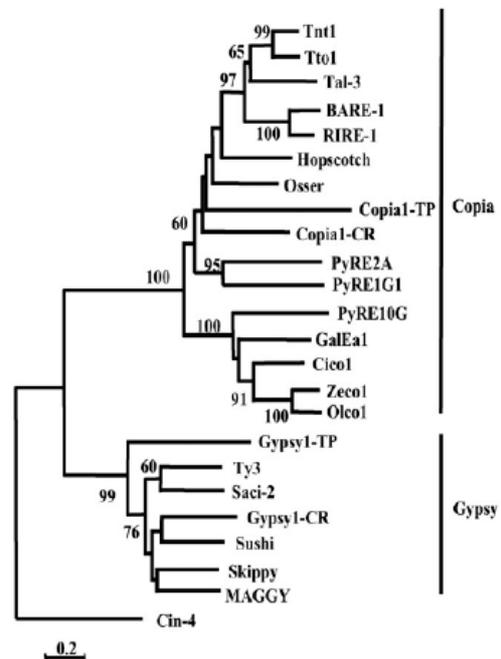


図 2 逆転写酵素アミノ酸配列の分子系統樹

ゲノミックサザン解析の結果から、*PyRE1G1* はゲノム中に 5 コピー存在すると推定された。インテグラーゼの 450bp および逆転写酵素の 280bp の配列を 5 種のクローンで比較したところクローン間で 2 塩基しか違いがみられなかったことから、*PyRE1G1* ファミリー遺伝子は全長にわたり高い相同性を保持していると推定された。

(2) *PyRE1G1* のストレス応答能

PyRE1G1 の発現レベルを RT-PCR により調べた。通常状態での発現は著しく低かったが、プロトプラスト処理や硫酸銅処理により転写は増大した。一方、*PyRE10G* の発現レベルは上記のストレス処理によっても増大する

ことはなかった。硫酸銅処理で発現する mRNA より *PyREIG1* cDNA を分離し、その構造を調べたところ 5' 末端および 3' 末端の非転写部位を除き *PyREIG1* ゲノム配列と同一であった。この結果から、*PyREIG1* はストレスに応答する LTR 型因子であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Zhang, W., Lin, X., Suresh, P., Takechi, K., Takano, H., Takio, S., Characterization of short interspersed elements (SINEs) in a red alga, *Porphyra yezoensis*, Biosci. Biotech. Biochem., 71, 618-622 (2007). 査読有
- ② Nozaki, H., Takano, T., Misumi, O., Terasawa, K., Matuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, S., Tamura, K., Chung, S. J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., and Kuroiwa, T., A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*, BMC Biol., 5, 28 (2007). 査読有
- ③ Ono, Y., Sakai, A., Takechi, K., Takio, S., Takusagaea, M. and Takano, H., *NtPolI*-like1 and *NtPolI*-like2, bacterial DNA polymerase I homologues isolated from BY-2 cultured tobacco cells, encode DNA polymerases engaged in DNA replication in both plastids and mitochondria, Plant Cell Physiol., 48, 1679-1692 (2007). 査読有
- ④ Sekmen, A. H., Turkan, I., and Takio, S., Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*, Physiol. Plant., 131:399-411(2007). 査読有
- ⑤ Peddigari, S., Zhang, W., Sakai, M., Takechi, K., Takano, H., and Takio, S., A *copia*-like retrotransposon gene encoding *gypsy*-like integrase in a red alga, *Porphyra yezoensis*, J. Mol. Evol., 66, 72-79 (2008). 査読有
- ⑥ Garcia, M., Myouga, F., Takechi, K., Sato, H., Nabeshima, K., Nagatra, N., Takio, S., Shinozaki, K., and Takano, H., An Arabidopsis homolog of the bacterial

peptidoglycan synthesis enzyme MurE has an essential role in chloroplast development., Plant J. 53, 924-934 (2008). 査読有

- ⑦ Peddigari, S., Zhang, W., Takechi, K., Takano, H., and Takio, S., Two different clades of *copia*-like retrotransposons in the red alga, *Porphyra yezoensis*, Gene 424, 153-158 (2008). 査読有
- ⑧ Kawakami, T., Sakaguchi, K., Takechi, K., Takano, H. and Takio, S., Ammonium induced expression of the red algal chloroplast gene *Ycf18*, a putative homolog of the cyanobacterial *Nb1A* gene involved in nitrogen deficiency-induced phycobilisome degradation. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 740-743 (2009). 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① 鍋島一真・明賀史純・武智克彰・森山靖子・佐藤博・滝尾進・篠崎一雄・高野博嘉, シロイヌナズナ *apg (albino or pale-green) 17* 変異ラインの機能解析, 第 50 回日本植物生理学会年会, 名古屋市, 2009. 3. 21-23.
- ② 沖田友美・武智克彰・山本滋恵・佐藤博・滝尾進・塚谷裕一・高野博嘉, ヒメツリガネゴケにおける *ANGUSTIFOLIA* 相同遺伝子の機能解析, 第 50 回日本植物生理学会年会, 名古屋市, 2009. 3. 21-23.
- ③ 高橋良子・武智克彰・保見祥子・佐藤博・滝尾進・高野博嘉, ヒメツリガネゴケ葉緑体分裂に関与するペプチドグリカン合成系遺伝子 *PpDRP5B-1, 2, 3* 遺伝子の機能解析, 第 50 回日本植物生理学会年会, 名古屋市, 2009. 3. 21-23.
- ④ 高橋良子・武智克彰・佐藤博・滝尾進・高野博嘉, コケ植物葉緑体はペプチドグリカンを持つのか?, 日本植物学会第 72 回大会, 高知市, 2008. 9. 25-27.
- ⑤ 坂口恵美・武智克彰・佐藤博・滝尾進・高野博嘉, ヒメツリガネゴケの葉緑体型ダイナミン *PpDRP5B-1, 2, 3* 遺伝子の機能分化. 日本植物学会第 72 回大会, 高知市, 2008. 9. 25-27.
- ⑥ 東佑弥・武智克彰・高野博嘉・滝尾進, ヒメツリガネゴケ葉緑体型 Cu/Zn-SOD 遺伝子破壊株の解析. 日本植物学会第 72 回大会, 高知市, 2008. 9. 25-27.
- ⑦ Ozgur Rengin・Wambo Zhang・Katsuaki Takechi・Hiroyoshi Takano・Susumu Takio, Increased expression of bromoperoxidase gene in sporophytes of a red alga, *Porphyra yezoensis*. 第 11 回マリンバイオテクノロジー学会, 京都市, 2008. 5. 24-25.

- ⑧ 奥佑磨・張文波・武智克彰・高野博嘉・滝尾進，紅藻スサビノリにおける葉緑体遺伝子のアンモニアによる発現誘導．第11回マリンバイオテクノロジー学会，京都市，2008.5.24-25.
- ⑨ 鍋島一真，Marlon Garcia，明賀史純，武智克彰，佐藤博，永田典子，滝尾進，篠崎一雄，高野博嘉．葉緑体形成不全を示すシロイヌナズナ MurE 変異体の色素体構造．日本植物学会第71回大会，野田市，2007.9.6-9.
- ⑩ 武智克彰，保見祥子，高橋良子，佐藤博，滝尾進，高野博嘉．ヒメツリガネゴケ葉緑体分裂に関与するペプチドグリカン合成系 Ppbp の機能解析．日本植物学会第71回大会，野田市，2007.9.6-9.
- ⑪ 東佑弥，武智克彰，高野博嘉，滝尾進，ヒメツリガネゴケ巨大葉緑体株のストレス防御能の解析．日本植物学会第71回大会，野田市，2007.9.6-9.
- ⑫ Takio, S., Zhang, W., Peddigari, S., Takechi, K. and Takano, H., Retrotransposon-related sequences in a red alga, *Porphyra yezoensis*. Workshop: Recent progress in marine biology and biotechnology in Korea and Japan. 第10回日本マリンバイオテクノロジー学会，山形市，2007.5.26-27.
- ⑬ 東佑弥，武智克彰，高野博嘉，滝尾進．ヒメツリガネゴケ巨大葉緑体株のストレス防御能の解析．第57回日本植物学会九州支部大会，福岡市，2007.5.19-20.
- ⑭ 武智克彰，保見祥子，高橋良子，佐藤博，滝尾進，高野博嘉．ヒメツリガネゴケ葉緑体におけるペプチドグリカン合成系と葉緑体分裂，福岡市，第57回日本植物学会九州支部大会．2007.5.19-20.

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/bio.iden/takio/index.html>

<http://engan.kumamoto-u.ac.jp/research/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧尾 進 (TAKIO SUSUMU)

熊本大学・沿岸域環境科学教育研究センター・教授

研究者番号：60188109