

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06231

研究課題名(和文) 紅藻スサビノリの生体防御機構におけるNPR1遺伝子の役割

研究課題名(英文) Role of NPR1 gene in regulating Susabi-nori (*Porphyra yezoensis*) immunity

研究代表者

安池 元重 (Yasuike, Motoshige)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・グループ長

研究者番号：20604820

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)：本研究では、ノリの生体防御機構を制御する最重要候補遺伝子として、近年申請者が同定したスサビノリのNPR1様遺伝子に着目し、その遺伝子破壊株を作製することで、NPR1様遺伝子がどのようにして病原体に対するスサビノリの抵抗性獲得に関与しているのかについての解明を進めた。NPR1様遺伝子欠損株と対照株(ゲノム編集していない)に対して免疫賦活剤で刺激し、網羅的な遺伝子発現解析を行なった結果、NPR1様遺伝子欠損により、活性酸素種(ROS)産生のカスケード上にある遺伝子群の発現量が低下していた。したがって、スサビノリNPR1様遺伝子は、ROS産生による防御機構の誘導に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、スサビノリの病原体に対する防御には活性酸素種(ROS)産生が重要であることが示唆されたことから、その知見を活用したノリの耐病性品種の作出に向けた新規事業の創出に繋がることが期待できる。また、本研究により開発された、ゲノム編集により標的遺伝子破壊し、その表現型についてトランスクリプトーム解析を行い、分子ネットワークの推定を行うという手法を活用することで、スサビノリの様々な生理学的な研究を加速することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1)-like gene of Susabi-nori (*Neopyropia yezoensis*) identified by the previous transcriptome study as the most important candidate gene for controlling defense responses of Susabi-nori to pathogens. In order to investigate the function of the NPR1-like gene, we developed a NPR1-like gene-deficient Susabi-nori strain by the genome editing technology (CRISPER/Cas9 system). A comparative transcriptome analysis of NPR1-like gene-deficient and control (wild-type) strains with immunostimulants revealed that the expression level of the genes involved in the reactive oxygen species (ROS) production cascade were decreased due to NPR1-like gene deficiency. These results suggested that the NPR1-like gene play key roles in ROS-mediated defense response in Susabi-nori.

研究分野：水産生物分子機能学

キーワード：ノリ養殖 生体防御 あかぐされ病 ゲノム編集 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

ノリ養殖において、病原体の感染による病害は、ノリの品質や収量を低下させる1つの大きな要因になっている。その中でも、あかぐされ菌 *Pythium porphyrae* (卵菌綱フハイカビ目) により引き起こされる“あかぐされ病”は毎年のように発生し、時には損害額が数億円に及んでいる。現在、ノリ養殖現場では、あかぐされ病の防除対策として、酸処理による殺菌が主に行われている。しかしながら、その処理に多大な労力がかかること、処理条件によりノリ葉体に障害を与えてしまうことや、環境に負荷を与える可能性が指摘されている。もしも、あかぐされ病に対して耐病性のあるノリの品種が作出できれば、上記の問題が解決でき、安全で安定的なノリ養殖業の発展に繋がる。

耐病性品種の作出には、病原体に対するノリの生体防御機構に関する知見が欠かせない。しかしながら、これまでノリの属する紅藻類の生体防御機構については、ほとんど研究されておらず、その存在についても不明であった。そのような中でごく最近、申請者らは、スサビノリゲノム情報から予測した全遺伝子セット(約1万個)を利用することで、あかぐされ菌に対する抵抗性の発現に重要だと考えられる遺伝子候補 NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related genes 1) 様遺伝子を発見した。陸上植物の NPR1 は、“植物免疫ホルモン”として知られるサリチル酸を介した防御システムで中心的な役割を担い、サリチル酸応答遺伝子の実に 99%以上を制御する遺伝子として知られている(吉村ら, 2016)。これらの知見から、申請者らは、“植物免疫ホルモン”として知られるサリチル酸を介した病原体に対する防御応答が紅藻類であるノリにも備わっていることを考察した(安池ら, 2017)。

申請者らの研究により、ノリにも陸上植物のような NPR1 が司令塔として働く生体防御機構が存在することが示唆されたものの、陸上植物の生体防御関連遺伝子との構造の類似性と遺伝子発現パターンを手がかりとした推測にとどまっている。したがって、NPR1 がノリにおいて、どのような経路で、どのような生体防御関連遺伝子を制御して、病原体に対する抵抗性の獲得に関わっているのかについて、さらに詳しく調べる必要がある。

これまでノリの生体防御機構に関する研究が十分に行われてこなかった大きな要因の一つに、解析ツールが限られていたことが挙げられる。前述のように申請者らは、全スサビノリゲノム情報を解読し、予測しうる全ての遺伝子セットを同定している(Nakamura et al., 2013)。そのゲノム情報を利用することで、スサビノリにおいても、ゲノム編集技術を用いた遺伝子機能解析や網羅的な遺伝子発現解析によるパスウェイ解析・分子ネットワーク推定が可能になった。そこで、これら最新技術を利用して、スサビノリの NPR1 の機能を明らかにすることで、スサビノリの生体防御機構の一端を解明でき、耐病性品種作出に向けた基礎的な知見が得られると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、スサビノリゲノム情報を活用し、ノリの生体防御機構の構築において、最重要遺伝子候補として申請者らが発見した NPR1 様遺伝子の果たす役割について、分子レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) スサビノリの NPR1 様遺伝子欠損株の作出

スサビノリの NPR1 様遺伝子欠損株を作出するため、本遺伝子の3つの保存された機能ドメインについて、ゲノム編集(CRISPR-Cas9システム)により切断する標的塩基配列(20塩基)候補を探索した。選出した標的塩基配列について、相補的な一本鎖ガイド RNA (sgRNA) を人工合成した。それら sgRNA と DNA 切断酵素 Cas9 タンパク質の複合体を調製し、標的領域を含む PCR 断片を切断することが可能であるか *in vitro* (試験管内) の試験で検証した。

次に、実際にスサビノリの NPR1 様遺伝子欠損株を作出するために、上記 *in vitro* の実験で標的配列の切断が確認できた sgRNA と DNA 切断酵素 Cas9 タンパク質の複合体を調製し、電気穿孔法(エレクトロポレーション法)によりノリのプロトプラスト(細胞壁を酵素処理により取り除いた細胞)に導入した。それらプロトプラストを葉状体にまで培養した後、DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる全ゲノム解読を行い、実際に標的遺伝子が切断されて NPR1 様遺伝子が欠損した株が作出できたかどうかについて調べた。

### (2) NPR1 が関与するパスウェイ・分子ネットワークの推定

作製した NPR1 様遺伝子機能欠損株を用いて、ノリ生体防御機構における NPR1 様遺伝子の機能の解明を進めるために、スサビノリ全ゲノム情報を利用した網羅的な遺伝子発現解析(トランスクリプトーム解析)を行った。まず、作出した欠損株と対照株(ゲノム編集していない)の葉体を直径 8mm の生検トレパンでくり抜き、円状の組織片を摘出した。それら組織片を一晩培養することで馴致させた。そして組織片の培養液にサリチル酸(植物の生体防御のシグナル伝達物質)およびキチン(病原体の構成成分)を添加し、2、4、および8時間後にサンプリングを行った。それらサンプルを用いてトランスクリプトーム解析を行い、欠損株と対照株の遺伝子発現デー

夕を比較し、NPR1 の破壊により影響を受ける遺伝子群を探索した。そして、同定した遺伝子群を精査し、NPR1 が関与するパスウェイ・分子ネットワークを推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) スサビノリの NPR1 様遺伝子欠損株の作出

スサビノリ NPR1 様遺伝子の 3 つの保存された機能ドメインについて、ゲノム編集標的塩基配列 (20 塩基) を 5 個ずつ (合計 15 個) 設計した。それら、標的領域の位置や活性予測、オフターゲット (標的配列以外の類似の配列) が無いかどうかを考慮して、最終的に 5 つの標的塩基配列を選出した。そして、それら 5 つの標的塩基配列に相補的な sgRNA を人工合成した。それら sgRNA と DNA 切断酵素 Cas9 タンパク質の複合体を調製し、標的領域を含む PCR 断片を切断することができるのかについて検証した。その結果、切断効率が良い 3 つの標的塩基配列に絞り込むことができた。

実際にスサビノリの NPR1 様遺伝子欠損株を作出するために、設計した 3 つの標的塩基配列に相補的な sgRNA と DNA 切断酵素 Cas9 タンパク質の複合体を調製し、エレクトロポレーション法により、それぞれノリのプロトプラストに導入した。それらプロトプラストを葉状体にまで培養した後、DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる全ゲノム解読を行い、実際に標的遺伝子が切断されて NPR1 様遺伝子が欠損した株が作出できたかどうか調べたところ、一つの株で約 300 塩基も欠損している株が見つかった。約 300 塩基も欠損させることができたのは、この株に用いた標的配列の 20 塩基が本遺伝子の約 300bp 領域内に 4 箇所存在したためである。以上のように、NPR1 様遺伝子欠損株の作出に成功し、NPR1 様遺伝子がノリの生体防御機構の構築に果たす役割について分子レベルで解析するための材料が整った。

##### (2) NPR1 が関与するパスウェイ・分子ネットワークの推定

トランスクリプトーム解析の結果、サリチル酸とキチンの添加刺激により、それぞれ約 1,000 遺伝子において NPR1 様遺伝子欠損株と対象株で発現量の違いが見られた。それら発現差のある遺伝子を精査したところ、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 産生のカスケードに載っている遺伝子群の発現量が対照株に比べて低下していた。ROS 産生は、植物免疫において、病原体の侵入を局所的あるいは全身に伝えるメッセンジャーとして働き、生体防御反応を誘導する重要な反応であることが知られている (安達・吉岡, 2017)。したがって、スサビノリの生体防御機構において NPR1 様遺伝子は ROS 産生に関与している、ROS 産生が病原体の排除に重要な役割を果たしていることが示唆された (図 1)。

一方で、発現差のあった遺伝子の約 50% は他の生物とは相同性が無い遺伝子であり (スサビノリに特有な遺伝子) 相同性が見られた残りの約 50% の遺伝子についても大部分は機能未知のものであった。スサビノリの分子生物学的な研究は、近年、ゲノム情報の整備により急速に進められているものの、ほとんどの遺伝子の機能についてはわかっていない。将来、スサビノリの遺伝子の機能についての知見が蓄積していき、スサビノリの生理現象についての分子機構の理解が深まることで、本研究で得られたトランスクリプトームデータから新たな発見が得られることが期待される。

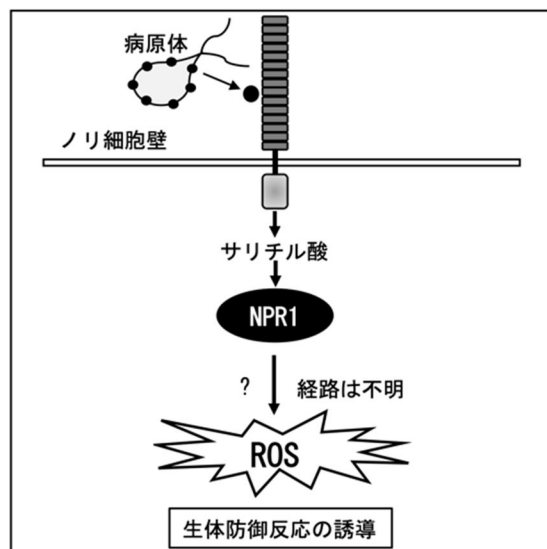


図1. 推察されたスサビノリNPR1の生体防御における役割  
NPR1遺伝子がROS産生を促し、生体防御反応を誘導する？

##### (3) まとめ

本研究により、スサビノリ NPR1 様遺伝子は、ROS 産生による防御機構の誘導に関与していることが示唆された。今後、NPR1 様遺伝子欠損株と対照株の ROS を定量し、比較することで、実際に NPR1 様遺伝子が ROS 産生に関与していることを検証する必要がある。また、本研究で開発したゲノム編集を利用した遺伝子破壊の手法は、生体防御に関する研究にとどまらず、他の様々な生理現象に関わる遺伝子に対しても応用することできることから、スサビノリの遺伝子機能の研究を加速することが期待できる。

#### < 引用文献 >

吉村 亮, 野元美佳, 多田安臣, サリチル酸とジャスモン酸シグナルのクロストーク機構の解明, 2016, 植物科学最前線, 7 巻, p. 131-141

安池元重, 淵上 哲, 福井洋平, 中村洋路, 小林正裕, あかぐされ菌 (*Pythium porphyrae*) に対するスサビノリ応答遺伝子の検索, 平成 29 年度 日本魚病学会秋季大会 プログラム および講演要旨, p. 31

Nakamura, Y., Sasaki, N., Kobayashi, M., Ojima, N., Yasuike, M., Shigenobu, Y., Satomi, M. et al. 2013. The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, Susabi-nori (*Pyropia yezoensis*). PLoS ONE 8:e57122

安達広明, 吉岡博文, 植物免疫における活性酸素生成誘導のしくみ, 化学と生物, 2017, 55 巻, 9 号, p. 590-592

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	福井 洋平  (Fukui Youhei)  (40565561)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・主任研究員   (82708)	
研究分担者	中村 洋路  (Nakamura Yoji)  (90463182)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・主任研究員   (82708)	

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