

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07148

研究課題名(和文) 遺伝子注釈の高度化に基づく渦鞭毛藻の増殖と有用化合物生合成に関するオミクス解析

研究課題名(英文) Omics analysis for cultivation and useful metabolite biosynthesis of dinoflagellates based on the improvement of gene functional annotation

研究代表者

櫻井 哲也 (Sakurai, Tetsuya)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・准教授

研究者番号：90415167

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)：研究対象生物種の渦鞭毛藻2種を光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いた形態的特徴の把握とリボソームRNAをコードするゲノム領域の塩基配列決定により、アンフィディニウム属の一種は *Amphidinium gibbosum*、シンビオディニウム属の一種は *Effrenium voratum* と推定した。この2種の渦鞭毛藻について、ミネラル組成が異なる培地を用いた培養試験の結果、いずれの渦鞭毛藻でもホウ素よりもカルシウムが増殖効率に影響を及ぼすことを示した。同様の培養条件下の藻体サンプルを用い、RNA-seqを実施し、各種ミネラルを欠くことによる遺伝子発現プロファイルを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

渦鞭毛藻が産生する代謝物の単離や構造決定、培養法や赤潮発生原因等に関係する報告と比べ、産生する代謝物の生成や藻体の増殖等と関連する遺伝子についての報告は限定的である。本研究では、生物活性化合物の単離等の報告されている渦鞭毛藻について、増殖率、化合物内生量が異なる生育条件下の藻体からサンプリングしたRNAの配列データを高速シーケンサで獲得、解析することで遺伝子機能の概観を把握する。さらには、各々のサンプル由来のRNAの配列データを用い、各生育条件による遺伝子転写レベルの差異を捉えることで生育環境に応答する遺伝子の理解を目指すものである。

研究成果の概要(英文)：The two dinoflagellate species under study were morphologically characterized using optical microscopy and scanning electron microscopy, and the genomic region encoding ribosomal RNA was sequenced to identify *Amphidinium gibbosum* as one species of the genus *Amphidinium* and *Effrenium voratum*. Cell growth tests of these two dinoflagellate species in media with different mineral compositions showed that calcium, rather than boron, affected the growth efficiency of both dinoflagellates. Using algal samples under similar culture conditions, RNA-seq was performed to obtain gene expression profiles due to the lack of various minerals. Some of the results obtained were in agreement with those reported in similar experiments in terrestrial plants.

研究分野：ゲノム情報科学

キーワード：ゲノム トランスクリプトーム 遺伝子機能

1. 研究開始当初の背景

去る 2015 年 9 月に開催された国連サミットにおいて策定された持続可能な開発のためのアジェンダに「環境」、「海洋資源の多様性保全」に関する目標が 2000 年策定の国連ミレニアム開発目標に引き続いて設定された。地球上の一次生産の 50%を海洋光合成が担っている (Field et al. 1998 Science) という背景からも、海洋微細藻類の利活用はこれらアジェンダを実現する鍵の一つとなっている。微細藻類には、高い脂質・糖類蓄積能力や高い増殖能力を持つことものが存在することから、循環可能なエネルギー資源としての実用化を目指し世界各国で研究が進んでいる。特に渦鞭毛藻は、様々な生物活性化合物を産生することが知られており、シガトキシン (ciguatoxin)¹ やマイトトキシン (maitotoxin)² といったポリエーテル毒素化合物が単離される等、原核生物の放線菌に引けを取らない多様な代謝物産生能力について古くから研究が行われている。近年も、研究協力者の津田等により単離、構造決定された抗腫瘍化合物 Amphirionin-2³ や Iriomoteolide-2a⁴ をはじめ、破骨細胞分化阻害化合物 Symbioimine⁵ 等、医薬リード化合物の発見を目指した探索研究は盛んである。

参考文献

1. Nukina M, Koyanagi LM, Scheuer PJ. Two interchangeable forms of ciguatoxin. *Toxicon*. 1984;22(2):169-76. doi: 10.1016/0041-0101(84)90017-5.
2. Murata M, Gusovsky F, Sasaki M, Yokoyama A, Yasumoto T et al. Effect of maitotoxin analogues on calcium influx and phosphoinositide breakdown in cultured cells. *Toxicon*. 1991;29(9):1085-96. doi: 10.1016/0041-0101(91)90206-7.
3. Kumagai K, Minamida M, Akakabe M, Tsuda M, Konishi Y et al. Amphirionin-2, a novel linear polyketide with potent cytotoxic activity from a marine dinoflagellate *Amphidinium* species. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015 Feb 1;25(3):635-8. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.12.003. Epub 2014 Dec 8.
4. Sakamoto K, Hakamata A, Iwasaki A, Suenaga K, Tsuda M et al. Total Synthesis, Stereochemical Revision, and Biological Assessment of Iriomoteolide-2a. *Chemistry*. 2019 Jun 26;25(36):8528-8542. doi: 10.1002/chem.201900813.
5. Kita M, Kondo M, Koyama T, Yamada K, Matsumoto T et al. Symbioimine exhibiting inhibitory effect of osteoclast differentiation, from the symbiotic marine dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *J Am Chem Soc*. 2004 Apr 21;126(15):4794-5. doi: 10.1021/ja049277f.

2. 研究の目的

今日では、様々な生物種の全ゲノムまたは全遺伝子転写領域の配列決定が行われ、遺伝子機能に関する注釈付けが行われている。上述のように生物資源として注目されている渦鞭毛藻を含む真核藻類についても 30 を超える生物種でゲノム解読が行われているが、環境応答や有用代謝物の生合成メカニズム等の理解に必要な遺伝子機能注釈情報は乏しい。図 1 は、3 大公共配列データベース管理機関の 1 つである欧州分子生物学研究所 (EMBL) 提供の既知アミノ酸配列データベース UniProt における各生物種の遺伝子データについて機能注釈を持つ遺伝子の割合を示す。渦鞭毛藻の 1 種であるサンゴに共生する褐虫藻 (図 1 の 1 番右) の遺伝子機能注釈は他の生物種と比べ、とても乏しいことを示している。したがって、本研究は、他生物種のように渦鞭毛藻のゲノム・トランスクリプトームデータおよび遺伝子機能注釈を充実させ、その多様な化合物生産等の有用形質の理解といった機能ゲノム研究を推進するものである。

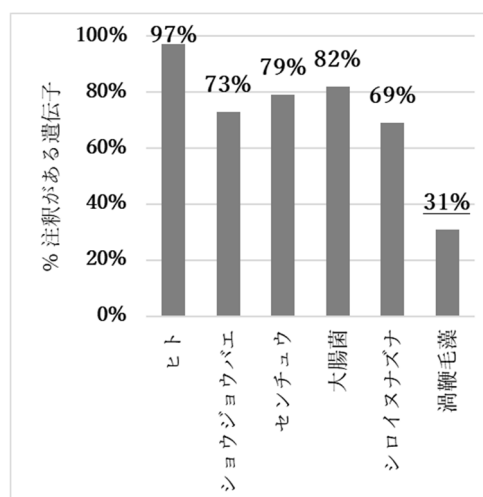


図 1 各生物種における機能注釈がある遺伝子の割合 (アミノ酸配列データベース UniProtKB 中の注釈に基づく申請者調べ)。渦鞭毛藻はサンゴに共生する褐虫藻 (*Symbiodinium minutum*)。

3. 研究の方法

本研究では、研究協力者が生物活性化合物の単離、構造決定を行った渦鞭毛藻 2 種 *Amphidinium* sp. と *Symbiodinium* sp. を対象とし、各渦鞭毛藻の全遺伝子領域の概観獲得、遺伝子機能注釈、遺伝子発現解析を行う。

- (1) 研究対象渦鞭毛藻の種推定
研究対象の渦鞭毛藻 2 種を光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いた形態的特徴の把握およびリボソーム RNA をコードするゲノム領域(18S、5.8S、28S rRNA 遺伝子および ITS 領域)の DNA 配列データから種推定を行う。
- (2) ミネラル組成による培養効率比較
海洋深層水、ホウ素を除去した海洋深層水(以降、深層水-B)、カルシウムを除去した海洋深層水(以降、深層水-Ca)、ホウ素とカルシウムを除去した海洋深層水(以降、深層水-B-Ca)、の 4 種類の培地を使用し、渦鞭毛藻の単位容積あたりの細胞数を計測し、培養効率を比較する。25℃、光度 35 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、16 時間-8 時間の明暗サイクルで培養し、細胞数測定は概日リズムを考慮して同時刻に実施する。
- (3) 遺伝子領域配列の構築
ミネラル組成が異なる各培地で 2 週間培養した藻体から RNA を精製し、mRNA を対象とした RNA-seq を実施する。RNA-seq は各実験区で独立した 3 サンプルを対象に行う。得られた RNA-seq 配列データを用いて de novo トランスクリプトームアセンブリを構築し、遺伝子機能注釈および遺伝子発現解析時の参照配列データとする。
- (4) 遺伝子発現解析
海洋深層水で藻体培養したサンプルの RNA-seq データを基準として、ミネラル組成が異なる各培養環境下における遺伝子発現プロファイルを獲得する。遺伝子機能注釈や各種データベースを参照し、各培養条件と遺伝子の発現レベル変化の関係を抽出する。

4. 研究成果

(1) 研究対象渦鞭毛藻の種推定

渦鞭毛藻 2 種 *Amphidinium* sp. と *Symbiodinium* sp. の光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡画像を図 2 に示す。この形態的特徴とリボソーム RNA コードする DNA 領域の配列データから *Amphidinium* sp. は *Amphidinium gibbosum*(図 2a と b)と、*Symbiodinium* sp. は *Effrenium voratum*(図 2c と d)と推定した。

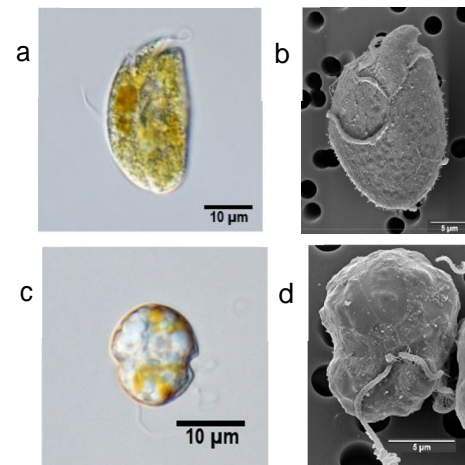


図 2 渦鞭毛藻の光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡画像を順に示す。*Amphidinium* sp.(a、b)、*Symbiodinium* sp.(c、d)。

(2) ミネラル組成による培養効率比較

培地のミネラル組成による渦鞭毛藻の培養効率を比較した結果を図 3 に示す。海洋深層水、ホウ素を除去した海洋深層水(以降、深層水-B)、カルシウムを除去した海洋深層水(以降、深層水-Ca)、ホウ素とカルシウムを除去した海洋深層水(以降、深層水-B-Ca)、の 4 種類の培地使用における培養効率の比較実験を行い、いずれの渦鞭毛藻においても、ホウ素よりもカルシウムが増殖効率に影響を及ぼすことを示した。

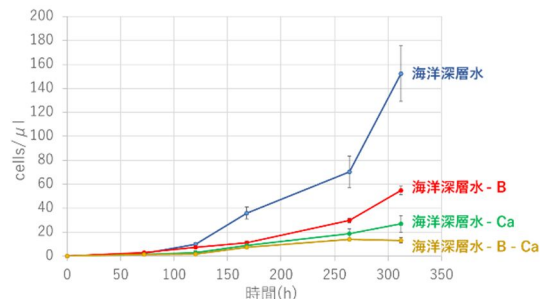


図 3 ミネラル組成による培養効率比較。各ミネラル組成が異なる培地で 2 週間培養した藻体を一定質量中の細胞数から推算した培養効率を示す。

(3) 遺伝子領域配列の構築

ミネラル組成が異なる各培地で 2 週間培養した藻体から RNA を精製し、mRNA を対象とした RNA-seq を実施した。得られた RNA-seq 配列データを用いて de novo トランスクリプトームアセンブリを構築し、*A. gibbosum* は約 12 万個、*E. voratum* は約 8 万個のコンティグ(連結配列)を得、これらを本研究では遺伝子として扱うこととし、以降の解析の参照配列データとした。

(4) 遺伝子発現解析

RNA-seq は、ミネラル組成が異なる各実験区で独立した 3 サンプルを対象に行った。各実験区との遺伝子発現解析の結果、*A. gibbosum* では、海洋深層水と深層水-B の実験区の間で発現レベルが増加した遺伝子は 95 個、減少した遺伝子は 65 個だった。海洋深層水と深層水-Ca の実験区の間で発現レベルが増加した遺伝子は 386 個、減少した遺伝子は 369 個だった。この結果からも渦鞭毛藻の細胞増殖に際しホウ素よりもカルシウムが影響を及ぼすことを示した。いずれの解析結果

においても、光化学系 と 、シトクロム b6/f 複合体に関する遺伝子の発現レベルが減少しており、これらの遺伝子群が関与する葉緑体での電子伝達、ATP 合成、糖代謝が細胞増殖に影響を及ぼすことが示唆された。

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
研究協力者	津田 正史 (Tsuda Masashi)		
研究協力者	ウラノバ ダナ (Ulanova Dana)		

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