

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580203

研究課題名（和文） DNA 型トランスポゾンによる養殖ノリ分子育種法の開発

研究課題名（英文） Application of DNA transposons 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（和文）：スサビノリ EST データベースに見いだされた 6 種の DNA トランスポゾン様配列をもとに、それらの構造とストレス応答性を調べた。6 種の配列のうちのひとつは細菌の挿入因子と相同性があった。この因子はゲノム中に複数存在し、ストレス応答性を示した。また、この因子は平成 25 年 3 月に公開されたスサビノリ全ゲノム配列中にも複数存在していたことから転移能をもつことが予想され、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。

研究成果の概要（英文）：Six contig sequences related to DNA transposons were present on the EST database of *Porphyra yezoensis*. Gene structure and the expression of these elements were analyzed. One element (PyTP3) had sequence similarity to bacterial insertion element (IS). Of family genes of PyTP3, the native gene with the complete ORF was transcriptionally activated by copper stress, suggesting that it will be used for application for molecular breeding of *P. yezoensis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：養殖ノリ，転移因子，ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 海苔養殖に利用されているスサビノリは大型海藻のモデル植物として注目されており、研究開始時においてゲノムプロジェクトもほぼ終了し本研究課題進行中にはゲノム情報が利用可能であることが期待されていた。しかし、遺伝子導入法や形質転換体作出法など遺伝子資源を活用するための基礎技術が確立していなかった。申請者はスサビ

ノリから転移能をもつと考えられるレトロトランスポゾンを分離していたが、DNA 型トランスポゾンについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、スサビノリから DNA 型トランスポゾン遺伝子を分離し、ストレス処理による活性化を用いて効率的な変異体作出法を開発することを目的としていた。

3. 研究の方法

かずさDNA研究所に登録されているスサビノリ EST データベースから6種のトランスポゾン様遺伝子 PyTP1~6 を見だし、それらの部分配列をもとに発現様式を調べた。それぞれの代表的 EST クローン番号と相同配列は次のとおりである。

PyTP 1 (AV429429, 糸状菌 *Talaromyces* のトランスポゼース), PyTP 2 (AV432612, シロイヌナズナのトランスポゼース), PyTP3(AV434229, 細菌 *Magnetospirillum* の挿入因子), PyTP 4 (AU193119, イネのトランスポゾン CACTA), PyTP5(AV433326, イネの CACTA), PyTP 6 (AV436370, イネの Pong)

4. 研究成果

研究期間を通じて前述の6種の候補遺伝子の単離や遺伝子構造の解析をスサビノリの全ゲノムが公開される時期を視野に入れながら進めてきたが、結局は研究期間の終了間際に全ゲノムが公開された。スサビノリは細胞表面に多数の細菌が付着しており、ゲノム解析においてこれらの細菌が十分に除去されていることが重要であった。したがって、本研究で解析した6種のトランスポゾン様配列がスサビノリのゲノムに由来するのか、それとも一部は付着細菌に由来するのかという問題は、研究期間内には検証できなかった。この成果報告では、本研究の成果と最新のスサビノリゲノム情報の比較を中心にそれぞれの候補遺伝子の特徴を以下にまとめた。

(1) PyTP1: 一致する配列はゲノム中に1カ所 (Scaffold_8608) あり、完全な ORF (391 アミノ酸) をもち、イントロンが3カ所あった。菌類 *Talaromyces stipitatus* のトランスポゾン(500 アミノ酸)とC末端側に相同性があった。

(2) PyTP2: mRNA による ORF (235 アミノ酸) は部分配列であり、当初はシロイヌナズナのトランストランスポゼースとの相同性が予想されたが、再解析の結果トランスポゾンとの相同性は確定できなかった。また、ゲノム配列については登録されていなかった。

(3) PyTP 3: EST クローン AV434229 は完全な ORF (339 アミノ酸) をもち、細菌の挿入因子と相同性があることやストレス処理により発現が増大することが明らかになった。ORF 領域のゲノミック PCR では、増幅産物の大部分は欠損配列を示したが、2種の正常な配列も検出されていた。公開ゲノムでは、PyTP3 相同遺伝子はゲノム中に3カ所存在し

ていた。また、それらは欠損遺伝子と正常な遺伝子の2種を含んでいた。なお、公開ゲノムに見られた3つの PyP 3 相同配列はいずれも部分配列であったが異なるゲノム部位に存在したことから、PyTP 3 のファミリー遺伝子の一部には転移能をもつクローンが存在する可能性が示唆された。

(4) PyTP 4: ゲノム中に1コピー存在し、完全長 ORF (746aa) を持っていた。N末端のアミノ酸配列が紅藻の *Chondrus crispus* やシゾンの RNA 結合タンパクと相同性がみられたが全長にわたりトランスポゾンとの相同性は得られなかった。

(5) PyTP5: EST クローン AV433326 は当初はイネのトランスポゾン CACTA とわずかに相同性が見られた。この配列はゲノム中に1コピー存在 (Scaffold_8609) 存在したが、ゲノム情報に登録されている CDS はトランスポゾンとの相同性は低かった。しかし、Scaffold_8609 には菌類 *Talaromyces stipitatus* のトランスポゼースと相同な配列が隣接していた。この配列は PyTP 1 と相同性がみられた。この配列と PyTP 1 は異なるゲノム領域に存在することから、これらはファミリー遺伝子と考えられる。

(6) PyTP 6: ゲノム中に1コピー (Scaffold_15198) 存在し、完全な ORF (334 アミノ酸) をもち、トウモロコシやイネのトランスポゾン Pong と相同性があった。ただし、EST クローン、ゲノム情報どちらにおいても、アンチセンス鎖が転写されていた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Hirayama, K., Wang, D., Namihira, T., Takano, H., Takio, S., and Akiyama, H., Effects of pulsed electric field and pulsed current on transcriptional activation of retrotransposon of *Porphyra yezoensis*, International Journal of Plasma Environmental Science & Technology, 査読有, Vol. 6, pp272-277 (2012).
http://www.iesj.org/html/service/ijpest/vol6_no3_2012/ijpest_vol6_no3_2012_pp272-277.html
- ② Yamaguchi, M., Takechi, K., Myouga, F., Imura, S., Sato, H., Takio, S., Shinozaki, S. and Takano, H., Loss of the plastid envelope protein AtLrgB

causes spontaneous chlorotic cell death in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 査読有, Vol.53, pp125-134 (2012),

DOI: 10.1093/pcp/pcr180.

- ③ Matsumoto, H., Takechi, K., Sato, H., Takio, S., Takano, H., Treatment with antibiotics that interfere with peptidoglycan biosynthesis inhibits chloroplast division in the desmid *Closterium*, *PLoS ONE*, 査読有, Vol.7, e40734., (2012), DOI:10.1371/journal.pone.0040734 (2012).
- ④ Sakaguchi, E., Takechi, K., Sato, H., Yamada, T., Takio, S. and Takano, H., Three dinamin-related protein 5B genes are related to plastid division in *Physcomitrella patens*, *Plant Sci.*, 査読有, Vol.180, pp789-795, (2011), DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.02.003.
- ⑤ Wang, D, Lin, X., Hirayama, K., Li, Z., Ohno, T., Zhang, W., Namihira, T., Katsuki, S., Takano, H., Takio, S. and Akiyama, H., A new application of underwater pulsed streamer-like discharge to transcriptional activation of retrotransposon of *Porphyra yezoensis*. *IEEE Trans Plasma Sci.*, 査読有, Vol. 38, pp39-46 (2010), DOI: 10.1109/TPS.2009.2035126

[学会発表] (計 17 件)

- ① 橋田芳和, 武智克彰, 西来路史匡, 滝尾進, 塚谷裕一, 高野博嘉, ANGUSTIFOLIA は種子植物およびコケ植物において細胞の極性伸長に関わっている, 第54回日本植物生理学会年会, 2013年3月21-23日, 岡山大学(岡山市)
- ② 宇都宮 英恵, 武智克彰, 滝尾進, 高野博嘉, ヒメツリガネゴケにおいて Membrane-bound lytic transglycosylase B (MltB) 相同遺伝子は葉緑体の分裂・形態形成に関与する, 日本植物学会第76回大会, 2012年9月15日-17日, 兵庫県立大(姫路市)
- ③ 橋田芳和, 武智克彰, 滝尾進, 塚谷裕一, 高

野博嘉, ヒメツリガネゴケ茎葉体細胞の極性伸長における ANGUSTIFOLIA 相同遺伝子 PpANI-1、1-2 の働き, 日本植物学会第76回大会, 2012年9月15日-17日, 兵庫県立大(姫路市)

- ④ 山口瑞貴, 武智克彰, 明賀史純, 佐藤博, 滝尾進, 篠崎一雄, 高野博嘉, lesion mimic の形質を示す atlrgB ミュータントの解析, 日本植物学会第76回大会, 2012年9月15日-17日, 兵庫県立大(姫路市)
- ⑤ Midia LW Handayani, Hiroyuki Sasaki, Ryuya Matsuda, Katsuaki Takechi, Hiroyoshi Takano, Susumu Takio, Epiphytic bacteria of the red alga, *Porphyra yezoensis*, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi City Cultural Plaza (Kochi, Japan), 2012年7月13日-16日.
- ⑥ Ryuya Matsuda, Rengin Ozgur, Katsuaki Takechi, Hiroyoshi Takano, Susumu Takio, Sporophyte-specific expression of bromoperoxidase gene in a red alga, *Porphyra yezoensis*, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi City Cultural Plaza (Kochi, Japan), 2012年7月13日-16日.
- ⑦ Yuya Higashi, Katsuaki Takechi, Hiroyoshi Takano and Susumu Takio, Maintenance of normal stress tolerance in *Physcomitrella patens* lacking chloroplastic superoxide dismutases, Moss 2012, The **New York** Botanical Garden (New York, USA), 2012年6月16日-18日.
- ⑧ 谷所幸治, 武智克彰, 滝尾進, 高野博嘉, ヒメツリガネゴケにおいて葉緑体分裂に関与する D-アラニン:D-アラニンリガーゼ, 第53回日本植物生理学会年会, 2012年3月16-18日, 京都産業大学(京都市)
- ⑨ 山口瑞貴, 明賀史純, 佐藤博, 滝尾進, 武智克彰, 篠崎一雄, 高野博嘉, 緑化した葉の一部が白色化していくシロイヌナズナ apg17 タグラインの解析, 日本植物学会第75回大会, 2011年9月17日-19日, 東京大学(東京都)
- ⑩ 橋田芳和, 宮島兼佑, 武智克彰, 樋口智文, 沖田友美, 山本慈恵, 滝尾進, 塚谷裕一, 高野博嘉, シロイヌナズナの葉の細胞

の横幅を決める ANGUSTIFOLIA (AN) 遺伝子の相同遺伝子 PpAN1-1、1-2 はヒメツリガネゴケの茎葉体において茎の細胞の縦幅を制御する、日本植物学会第75回大会、2011年9月17日-19日、東京大学（東京都）

- ⑪ Higashi, Y., Takechi, K., Takano, H., Takio, S., Involvement of microRNA in copper-deficiency induced repression of chloroplastic CuZn-superoxide dismutase genes in *Physcomitrella patens*, International Congress of Moss 2011, Leistungszentrum Herzogenhorn (Freiburg, ドイツ), 2011年9月11日-14日
- ⑫ 松田竜也, Rengin Ozgur, 武智克彰, 高野博嘉, 瀧尾進, 紅藻ササビノリにおけるプロモペルオキシダーゼの活性発現機構の解析, 第14回日本マリンバイオテクノロジー学会大会, 静岡グランシップ (静岡市), 2011年5月28日-29日.
- ⑬ Takio, S., Transposable elements in a red alga, *Porphyra yezoensis*. BIT7s 1st Annual World Congress of Marine Biotechnology, Dalian **World Expo Center** (大連, 中国), 2011年5月25日-29日.
- ⑭ 橋田芳和, 宮島兼佑, 武智克彰, 樋口智文, 沖田友美, 山本慈恵, 瀧尾進, 塚谷裕一, 高野博嘉、ヒメツリガネゴケ ANGUSTIFOLIA1-1/1-2 二重遺伝子破壊ラインの表現型、第61回日本植物学会九州支部大会, 長崎大学 (長崎市), 2011年5月21-22日
- ⑮ 山口瑞貴, 井村信弥, 鍋島一真, 明賀史純, 篠崎一雄, 佐藤博, 瀧尾進, 武智克彰, 高野博嘉, 緑化した葉の一部が白色化するシロイヌナズナapgl7タグラインの解析, 第61回日本植物学会九州支部大会, 長崎大学 (長崎市), 2011年5月21-22日
- ⑯ 宮島兼佑, 橋田芳和, 武智克彰, 樋口智文, 沖田友美, 山本慈恵, 瀧尾進, 塚谷裕一、高野博嘉 他、ヒメツリガネゴケにおける PpAN 遺伝子の発現部位及び遺伝子破壊系を用いた機能解析. 第52回日本植物生理学会年会、東北大学、仙台市、2011年3月20日-22日
- ⑰ Uzilday, B., Takechi, K., Takano, H., Henmi, Y., Takio, S., ITS sequence

analysis of *Ulva* species in Kumamoto Prefecture. 第13回マリンバイオテクノロジー学会, 広島大学, 東広島市, 2010年5月29日-30日.

[図書] (計1件)

- ① Takio, S., Retrotransposons in *Porphyra yezoensis*. In Mikami, K. (ed.), *Porphyra yezoensis: Frontiers in Physiological and Molecular Biological Research*, pp61-80. Nova Science Publishers, New York (2012).

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/bio.ide/n/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