

平成30年 5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04539

研究課題名(和文) 東北地方のノリ養殖に特化したスサビノリ低温耐性株の開発

研究課題名(英文) Establishment of cold stress-resistance nori strains specialized for the mariculture in Tohoku in Japan

研究代表者

三上 浩司(Mikami, Koji)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：40222319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：東北地方は、大規模なノリ養殖の北限であり、ノリ収穫期の春先に海水温が5℃以下に低下することでスサビノリの生長が抑制されるため、十分な収穫量が得られない問題を抱えている。そのため、寒冷地でのノリ生産量向上を可能にするスサビノリ新品種の作出を試みた。

まず低温耐性株「豊浜赤スサビノリ」を選抜し、これが低温を含めた広い温度範囲で高成長を示す優良品種であることを明らかとした。そのため、宮城県漁業組合が養殖に用いている気仙沼スサビノリとの交雑を行った。その結果、両親株とは異なる形質を持つ株を複数得ることができた。今後はこれらの生理学的特性を解析し、東北地方のノリ養殖に適したスサビノリ品種を開発したい。

研究成果の概要(英文)：Tohoku area is the northern limit of the large scale-nori mariculture and has had a severe problem such as reduction of nori productivity in the early spring because of lowering temperature of the sea water, which affects negatively on seaweed growth. The present study therefore focuses on the establishment of a new strain enabling the sustainable production of nori in Tohoku area.

To establish cold stress-resistance strains, a strain whose growth tolerates to cold stress was first selected with the help from the Aichi Fisheries Research Institute. Next, the crossing of this strain with Kesen-nuna Susabi, generally used as a cultivation strain in Tohoku area, was performed and then several lines exhibiting characteristics different from both parental strains were finally isolated. Thus, it is necessary to confirm growth under cold stress conditions of these new strains, which could enable to establish novel strains that are adapting to mariculture in Tohoku area in near future.

研究分野：海藻生物学

キーワード：スサビノリ ノリ養殖 低温耐性株 交雑育種 東北地方

1. 研究開始当初の背景

(1) 紅藻スサビノリを用いるノリ養殖は、その規模において国内水産業における重要な産業であり、東北地方は大規模ノリ養殖の北限である。その養殖・生産は先の東日本大震災により壊滅的な打撃を受けたが、その後の多くの努力により再開している。しかし、現場からはスサビノリ低温耐性株の作出を要望する声が、大きくなっている。それは、東北地方ではノリ収穫期である冬から春にかけての海水温が5以下まで低下するため、スサビノリの生長が止まってしまい、十分な収穫量が得られないからである。

(2) これまで、温暖化による被害が顕著な西日本の各県水産試験場では、独自に高温耐性株の候補を作出してきた。しかし、全国的なノリ養殖の傾向として東北地方を考慮した品種改良は想定されておらず、低温耐性株作出の試みは全く行われてこなかった。さらに、スサビノリの低温応答や低温耐性の制御機構に関する生物学的な知見は極めて少ない。そのため、スサビノリの環境応答や形態形成の制御機構を分子レベルで解明し、それらの知見を利用した選抜方法を確立する必要がある。ここで問題となるのが、海藻における遺伝子機能の解析方法が確立されていないことである。低温に依存する遺伝子の発現制御機構を解明するには、スサビノリにおいて遺伝子導入や遺伝子破壊を可能とする遺伝子組換え技術は必要不可欠である。

(3) スサビノリは明治時代に函館で発見・同定された北方系の海藻であるが、選抜を重ねることで西日本のような温暖な海域で生育できる品種が成立した。逆に、このことが本来の低温耐性を低下させたとも考えられる。そこで、北海道に生育しているスサビノリ原種と養殖品種の低温応答能を比較し、低温耐性の維持に必要な生理制御を明らかにすること、あるいは掛け合わせすることは、これまで行われてこなかったアプローチであり、早急に進めていくべき課題である。

2. 研究の目的

東北地方におけるノリ養殖を持続的に展開する上で、収穫期である春先の海水温低下に耐えうる低温耐性株の作出が重要である。その実現に向けて、本研究では、スサビノリの低温耐性の生理学および分子生物学的な解析とそれらを可能にする遺伝子機能解析技術の開発、さらには北海道産のスサビノリ原種の有効活用の検討などを行い、寒冷地でもノリ生産の向上を可能にする新品種を作出することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) スサビノリの低温応答および低温耐性の制御機構の解明

低温による色落ち現象を再現できる実験系

を構築し、それを用いて低温下でなぜ色落ちが起きるのか、その回復にはどのような手法が考えられるのかを生理学的に解析する。

(2) スサビノリにおける遺伝子組換え技術の開発

外来遺伝子のゲノムへの挿入と形質転換細胞の選抜の実現により遺伝子組換え技術を確立する。ここでは特に陸上植物で定法となっているアグロバクテリウム法に焦点を合わせて実験を遂行する。また、この技術を用いる低温誘導性遺伝子の機能解析により、低温耐性株の選抜に有効なマーカー(低温耐性付与遺伝子)を見出す。

(3) 寒冷地での養殖に適したスサビノリ低温耐性株の開発

上記で同定された選抜マーカーを用い、低温耐性の北海道産原種と高生長の養殖株の掛け合わせを行う。それがうまくいかない場合は、養殖株の中から低温でも生育が早い変異株を選抜し、得られた変異株と高生長の養殖株の交雑を行う。このような交雑によって得られる変異株の内、親株とは異なる形質を持ち、東北地方のノリ養殖に適した低温に強く高生長な株を選抜する。

4. 研究成果

(1) スサビノリの低温応答および低温耐性の制御機構の解明

海水温低下による色落ちを人為的に誘導できる実験系を、0のような低温でも安定して温度管理ができるインキュベーターの作出を通して完成させた。この実験系により、これまで全く解析されてこなかった低温誘導的な色落ちの発生機構を生理学的・分子生物学的に解析可能となった。解析の結果、0や5では窒素源を取り込むために必要な輸送体(アンモニウムトランスポーター、硝酸トランスポーター、尿素トランスポーターなど)の遺伝子の発現が抑制されることで輸送体が少なくなることで海水中に窒素源があってもそれを吸収できないことが確かめられた。低温誘導性色落ちにおける輸送体遺伝子の発現抑制があることは新規の知見である。なお、15ではそれが回復することで窒素源の吸収が可能となり、色落ちが解消されることも見出された。今後は、低温でも活性が低下しない輸送体の作出を、輸送体の活性に影響する細胞膜の物理状態の制御の解析と並行して行うことが望まれる。

(2) スサビノリにおける遺伝子組換え技術の開発

遺伝子の機能解析に必須な形質転換技術の

開発に向けて、ゲノムにランダムに外来遺伝子を挿入できるアグロバクテリア法に着目し、スサビノリ細胞内で発現可能な人為遺伝子のゲノム内挿入を試みた。しかし、ハイグロマイシン耐性遺伝子の発現をマーカーとした実験を何度も繰り返したが、多くの改良を加えたものの現時点で成功していない。形質転換技術は紅藻の生物学的研究の進展に必要不可欠であることから、異なるアプローチを想定しながら今後も継続して取り組む予定である。

(3) 寒冷地での養殖に適したスサビノリ低温耐性株の開発

東北地方のノリ養殖をより活性化するため、スサビノリの低温耐性に関する研究と東北地方に適した低温耐性株の開発を進めた。まず、愛知県水産試験場漁業生産研究所の協力を得て、スサビノリの低温耐性株の選抜を行うことができた。「豊浜赤スサビノリ」と名付けられた耐性株は、名前の通り赤みを帯びているが、5 以下の低温条件でも比較的良好な生育を示した。さらに、豊浜赤スサビノリの生長の最適温度が 20 であり、低温を含めた広い温度範囲で野生株よりも高成長を示すことから、比較強い高温耐性をもつ優良品種であることがわかった。加えて、豊浜赤スサビノリの生活環を詳しく解析したところ、野生株とは異なり、生殖細胞の受精を伴わない世代交代をしていることが確かめられた。また、傷害ストレスにより無性生殖が活発になり、種苗生産に有効な胞子が野生株に比べて大量に得られることも見出した。そのため、豊浜赤スサビノリは、アマノリ類では世界で初めてとなる世代交代変異株で、しかも種苗生産が効率よく行われるため、高生長養殖品種としての有効性が強く示された。

上記を受けて、豊浜赤スサビノリの形質を生かした東北独自の養殖株の開発を進めた。まず、計画通りに函館原産のスサビノリとの交雑を試みようとしたが、その前に函館産原種がその成長過程で非常に多量の無性胞子を放出し、藻体が大きくなることが判明した。このことから、函館産原種を親株に用いることは断念した。そのため、宮城県漁業組合が通常用いている養殖株である気仙沼スサビノリを取り上げ、それと豊浜赤スサビノリの交雑を試みた。その結果、交雑に成功し、これまでに気仙沼スサビノリでも豊浜赤スサビノリでもない形質を持つ株がいくつか得られている。今後はこれらの交雑株の生理学的特性や養殖への適用性を解明していく予定で、近いうちに東北地方のノリ養殖に適したスサビノリ品種が開発できると考えている。

また、より多彩な東北地方特化型養殖株の開発に向けて、極めて強い低温ストレス耐性を持つ天然アマノリ類の探索を行った。その

結果、北海道松山管内の江差町において、真冬の 2 月と春先の 3 月に採取されたものの中に目的のものを発見した。最大の特徴として 0 でも生存・生長することがあげられ、既知の野生および養殖アマノリ類とは次元の異なる超低温耐性アマノリと言える。今後は、このような強力な低温耐性を司る制御機構の解明や超低温耐性アマノリの新規の低温耐性養殖品種作成への活用法について検討を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

Sasuga, K., Yamanashi, T., Nakayama, S., Ono, S. and Mikami, K.: Discolored red seaweed *Pyropia yezoensis* with low commercial value is a novel resource for production of agar polysaccharides. *Mar. Biotechnol.* doi:10.1007/s10126-018-9823-7, (2018) 査読有

Mikami, K., Ito, M., Taya, K., Kishimoto, I., Kobayashi, T., Itabashi, Y. and Tanaka, R.: Parthenosporophytes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* exhibit sex-dependent differences in thermotolerance as well as fatty acid and sterol composition. *Mar. Environ. Res.* doi: 10.1016/j.marenvres.2018.02.003 (2018) 査読有

Yokoyama, T., Tokuda, M., Amano, M. and Mikami, K.: The presence of free D-aspartate in marine macroalgae is restricted to the Sargassaceae family. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 82, 268-273 (2018) 査読有.

Adams, E., Mikami, K. and Shin, R.: Selection and functional analysis of a *Pyropia yezoensis* ammonium transporter PyAMT1 in potassium deficiency. *J. Appl. Phycol.*, 29, 2617-2626 (2017). 査読有

Yokoyama, T., Tokuda, M., Amano, M. and Mikami, K.: A method for the simultaneous determination of primary and secondary D-amino acids by reverse-phase high-performance lipid chromatography using pre-column derivatization with two-step labelling. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81, 1681-1686 (2017). 査読有

Sasuga, K., Yamanashi, T., Nakayama, S., Ono S. and Mikami, K.: Optimization of yield and quality of agar polysaccharide isolated from the marine red macroalga *Pyropia yezoensis*. *Algal Res.*, 26, 123-130 (2017). 査読有

Mori, I.C., Ikeda, Y., Matsuura, T., Hirayama, T. and Mikami, K.: Phytohormones in red seaweeds: a technical

review of methods for analysis and consideration of genomic data. *Bot. Mar.*, 60, 153-170 (2017). 査読有

Shahabuddin, A.M., Khan, M., Mikami, K., Araki, T. and Yoshimatsu, T.: Dietary supplementation of red alga *Pyropia* spheroplasts on growth, feed utilization and body composition of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenia). *Aquac. Res.* 48, 5363-5372 (2017). 査読有

Takahashi, M. and Mikami, K.: Oxidative stress promotes asexual reproduction and apogamy in the red seaweed *Pyropia yezoensis*. *Front. Plant Sci.* 8, 62. doi: 10.3389/fpls.2017.00062 (2017). 査読有

Takahashi, M. and Mikami, K.: Phototropism in the marine red macroalga *Pyropia yezoensis*. *Am. J. Plant Sci.*, 7, 2412-2428 (2016) 査読有

Mikami, K., Mori, I.C., Matsuura, T., Ikeda, Y., Kojima, M., Sakakibara, H. and Hirayama, T.: Comprehensive quantification and genome survey reveal the presence of novel phytohormone action modes in red seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 28, 2539-2548 (2016). 査読有

Kakinuma, M., Suzuki, K., Iwata, S., Coury, D.A., Iwade, S. and Mikami, K.: Isolation and characterization of a new DUR3-like gene, PyDUR3.3, from the marine macroalga *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). *Fisheries Sci.* 82, 171-184 (2016). 査読有

Inoue, A., Mashino, C., Uji, T., Saga, N., Mikami, K. and Ojima, T.: Characterization of an eukaryotic PL-7 alginate lyase in the marine red alga *Pyropia yezoensis*. *Curr. Biotechnol.* 4, 240-248 (2015). 査読有

Choi, Y.H., Kim, E.-Y., Mikami, K. and Nam, T.J.: Chemoprotective effects of a recombinant protein from *Pyropia yezoensis* and synthetic peptide against acetaminophen-induced Chang liver cell death. *Int. J. Mol. Med.* 36, 369-376 (2015). 査読有

[学会発表] (計 20 件)

三上浩司、李成澤、濱洋一郎 (2018): 原始紅藻スサビノリにおける胞子体から配偶体への移行は減数分裂に依存していない。第 59 回日本植物生理学会年会。2018.3.28-30、札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)

岸本育也、三上浩司 (2017): 原始紅藻ウシケノリにおけるストレス記憶に基づく高温耐性能獲得。2017 年度北海道植物学会大会。2017.12.20、北海道大学理学部 (北海道、札幌市)

田谷賢祐、三上浩司 (2017): オーキシンによる紅藻スサビノリ糸状体の先端

生長制御。2017 年度北海道植物学会大会。2017.12.20、北海道大学理学部 (北海道、札幌市)

Mikami, K. and Kishimoto, I. (2017) Heat stress memory is responsible for acquisition of thermotolerance in the red seaweed *Bangia fuscopurpurea*. 11th International Phycological Congress, August 13-19, Szczecin (Poland).

Adams, E., Shin, R. and Mikami, K. (2017) Nitrogen-related transporters at work on potassium deficiency and salt tolerance in *Pyropis yezoensis*. 11th International Phycological Congress, August 13-19, Szczecin (Poland).

三上浩司: 原始紅藻類は熱ストレスを記憶することで高温耐性を獲得する、「海藻のしなやかな生き方を支える環境応答戦略 ~ 研究の現状と展望 ~」第 19 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2017.6.3-4、東北大学大学院農学研究科 (青葉山新キャンパス、青葉山 commons) (宮城県、仙台市)

流石啓司、山梨智也、中山滋、小野秀悦、三上浩司 (2017): 産業廃棄物の有効利用に向けた色落ちノリからの寒天抽出法の確立。第 19 回マリンバイオテクノロジー学会、2017.6.3-4、東北大学大学院農学研究科 (青葉山新キャンパス、青葉山 commons) (宮城県、仙台市)

田谷賢祐、林謙一郎、三上浩司 (2017): 海産紅藻スサビノリにおけるオーキシンによる先端生長の制御。2017 年度日本植物生理学会、2017.3.16-18、鹿児島大学 (郡元キャンパス) (鹿児島県・鹿児島市)

Adams, E., Mikami, K., Shin, R. (2017) Contribution of ammonium transporter to Na⁺/K⁺ homeostasis in marine red alga *Pyropia yezoensis*. 2017 年度日本植物生理学会、2017.3.16-18、鹿児島大学 (郡元キャンパス) (鹿児島県・鹿児島市)

Mikami, K. (2016) Is "stress memory" responsible for acquired heat tolerance present in red seaweeds? 7th Bilateral Seminar Italy-Japan, Physiological and chemical impacts on marine organisms: emerging hazards and strategies for saving the ocean, November 29-December 2, Minamiboso Tomiura Royal Hotel, Minamiboso, Chiba (Japan).

Koizumi, J., Kobayashi, N., Mikami, K., Maoka, T., Miyashita, K. and Hosokawa, M. (2016) Carotenoid content and biosynthesis pathway in a red alga, *Pyropia yezoensis*. ISNFF2016 (The International Society for Nutraceuticals & Functional Foods 2016), October 8-13, Rosen Shingle Creek Hotel, Orlando, FL (USA)

横山雄彦、高田洸輔、戸田航洋、難波信由、徳田雅治、三上浩司 (2016): ホンダワラ属海藻の D-アスパラギン酸 .平成 28 年度日本水産学会秋季大会、2016.9.8-11、近畿大学農学部(奈良キャンパス)(奈良県、奈良市)

岸本育也、須田昌宏、三上浩司 (2016): 海産原始紅藻ウシケノリにおける高温ストレス記憶の研究 .平成 28 年度日本水産学会秋季大会、2016.9.8-11、近畿大学農学部(奈良キャンパス)(奈良県、奈良市)

小泉次郎、小林乗時、三上浩司、眞岡孝至、宮下和夫、細川雅史 (2016): 紅藻スサビノリに含まれるカロテノイドの定量と生合成経路に関する研究 . 日本油化学会第 55 回大会、2016.9.7-9 奈良女子大学(奈良県、奈良市)

細川雅史、小林乗時、小泉次郎、三上浩司、宮下和夫、山野由美子、和田昭盛 (2016): 紅藻スサビノリのカロテノイド生合成経路の解析 .第 30 回カロテノイド研究談話会、2016.6.24-26、ホテルムーンビーチ 4F 酒座参番(沖縄県・沖縄市)

三上浩司: アマノリ類の生理制御機構を理解するための 2 つの視点、「アマノリ研究における基礎生物学的視点の涵養」第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2016.5.28-29、北海道大学函館キャンパス(北海道、函館市)

三上浩司: 海藻生物学の方向性、日本応用藻類学会設立 15 周年記念シンポジウム「日本応用藻類学会の歩みと応用藻類学の未来」、日本応用藻類学会第 15 回大会、2016.5.14、東京海洋大学(東京都、品川区)

岸本育也、須田昌宏、三上浩司 (2016): 海産紅藻ウシケノリ *Bangia*

fuscopurpurea におけるストレス記憶による高温耐性能の獲得 . 日本応用藻類学会第 15 回大会、2016.5.14、東京海洋大学(東京都、品川区)

三上浩司、池田陽子、松浦恭和、森泉、平山隆志 (2015): 褐藻シオミドロの雄性配偶体に偏ったサイトカイニンの蓄積 . 平成 27 年度日本水産学会秋季大会、2015.9.22-25 東北大学(宮城県、仙台市)

三上浩司、森泉、松浦恭和、池田陽子、平山隆志 (2015): 海藻は未知の植物ホルモン情報伝達機構を持つ . 日本応用藻類学会第 14 回大会、2015.5.16 東京海洋大学(東京都、品川区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 浩司 (MIKAMI, Koji)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号: 40222319

(2) 研究分担者

加藤 敦之 (KATO, Atsushi)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号: 90177428

(3) 研究分担者

細川 雅史 (HOSOKAWA, Masashi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号: 10241374

(4) 研究分担者

柿沼 誠 (KAKINUMA, Makoto)
三重大学・生物資源学研究科・教授
研究者番号: 60303757

(5) 研究分担者

横山 雄彦 (YOKOYAMA, Takehiko)
北里大学・海洋生命科学部・講師
研究者番号: 60296431