

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2019～2021

課題番号：19KT0038

研究課題名（和文）地球温暖化に適応するための海藻類の新品種開発手法の確立

研究課題名（英文）Establish the methods to create new algae varieties to adjust the global warming

研究代表者

西辻 光希（Nishitsuji, Koki）

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号：60770823

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）：NBRPバイオリソース藻類から褐藻フトモズク、イシモズクを入手し、次世代シーケンサー（Illumina MiSeqとNovaSeq）でシーケンスを行った。さらに独自手法を開発し、Oxford Nanopore Technology minIONでのロングリードシーケンスデータの取得にも成功した。得られたシーケンスデータを解析することにより、ドラフトゲノム配列の取得に成功した。さらに共生バクテリア由来と思われるDNA配列の取得にも成功した。また各モズク類からバクテリアの単離に取り組んだところ、少なくとも77のコロニーが得られた。これらは今後のモズク類の品種開発に有用な可能性が高いと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム情報は今後にも有用になる。単離したバクテリアの解析を続けることにより、褐藻類の成長や高温耐性メカニズムを解明し、昨今世界中で盛んな海藻類養殖のための重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：Two brown algae *Tinocladia crassa* and *Sphaerotrichia firma* were provided from NBRP algae, and were sequenced Illumina MiSeq and NovaSeq. Furthermore, we developed new methods which enabled sequence using Oxford Nanopore Technology minion. Analyzing the obtained data, we succeeded in assembling the draft genome sequences and collecting the DNA information about likely symbiosis bacteria of those brown algae. Isolation of bacteria from each mozuku species resulted in at least 77 colonies. These are likely to be useful for the development of mozuku species in the future.

研究分野：ゲノミクス

キーワード：モズク 共生バクテリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海に囲まれている日本は、古くより豊かな海と共存し、繁栄してきた。特に海藻は日本人にとって、食用として馴染み深いものである。さらに近年では、紅藻のカラゲナン、褐藻のフコイダンなどの海藻に含まれる物質の生理活性に注目が集まっており、それらの抽出原料として利用されている。そのため、海藻の需要は年々増加している。その一方で、今日では海藻類の生産量は年々減少している。例えばモズク類の生産量は、直近10年で8,000トンから23,000トンを推移しており、安定していない(沖縄県林水産統計, 2021; 図1)。海藻類の生育不全の原因として地球温暖化による海水温上昇による影響が大きいと考えられている。さらに緑藻アオサではバクテリアが共生していないと正常に生育できないことが知られている(Matsuo et al., 2005, Science, doi: 10.1126/science.1105486)。このまま対策を取らずに気候変動が進み、日本周辺海域の水温上昇が続くと、海藻の養殖が不可能となる恐れがある。

このような状況の中、海藻類の利用を促進するには養殖可能な領域を広げると共に、各種条件に対する安定性の高い多様な品種の開発が必要となる。けれども、海藻類の品種改良は進んでいない。例えば食用として長い歴史を持つワカメやコンブでは、1970年代以降偶然出現した優良体の選抜による品種改良が行われ、産地ごとに異なる名前が付けられ販売されているが、正式に新品種として品種登録された例は現在まで1つもない(農林水産省品種登録データベース)。一方、陸上において主要な作物である米は、明治時代には病気や低温に弱かった。しかし、現在では品種改良により冷涼な北海道などで病気に強く味の良い米が大規模に生産されており、500品種が登録されている。これは品種改良の中でも交雑育種の成果であるが、陸上植物とは異なり花が咲かない海藻類では交雑育種が行うことができず、品種改良のスタートラインにすら達していないのが現状である。

日本で唯一の褐藻ゲノム研究に取り組んでいる代表者は、ナガマツモ科オキナワモズクのゲノム解読に成功し(褐藻では3例目)、モズク科イトモズクのゲノム解読も完了している(Nishitsuji et al., 2016, DNA Res., doi: 10.1093/dnares/dsw039; Nishitsuji et al., 2018, Sci. Rep., 2019)。その際、共生バクテリア29種のゲノム配列も得ることに成功している。さらに共生バクテリアの培養・解析技術は分担者により確立されている(Takagi et al., 2016, Mar. Biotechnol., doi: 10.1007/s10126-015-9667-3)。このように、ゲノム科学・遺伝学的研究基盤が整いつつあるモズク類においてさえ、品種改良株の開発は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では海藻類と共生バクテリアの関係性に着目して、共生バクテリアの組成を改変することにより、地球温暖化に適応する海藻の育種技術の開発を目的とした。

そのモデルとして2種のゲノムを解読し、すでに生産が安定していないモズク類を用いることとした。特にモズク類の中でも、褐藻シオミドロ目ナガマツモ科のオキナワモズク(沖縄に分布)、フトモズク(九州に分布)とイシモズク(東北に分布)と、シオミドロ目モズク科のイトモズク(沖縄に分布)の全4種のモズク類を材料に使用した(図2)。モズクの生育に必要なバクテリアを特定し、高温暴露で生存した株を選抜することにより、高温耐性モズクを作出する。それを用いて共生バクテリアとの協力関係を分子レベルで明らかにすることで、高温体制を付与するバクテリアを決定し、海藻類全てに適用可能となる高温耐性海藻の育種手法を確立することを目指し、研究に取り組んだ。

また研究期間の後半には、高温耐性を持つ可能性のあるモズクを2株入手することに成功したため、これらを用いた交雑育種による品種改良にも着手した。そこで交雑育種を行うために必要となる新規株の全ゲノム解読に取り組み、遺伝学的情報基盤の整備を行った。

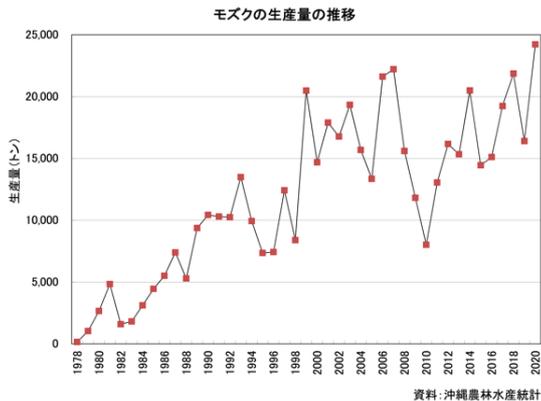


図1 沖縄でのモズク生産量の推移

直近10年の生産量は8,000-23,000トンであり、安定していない。原因として地球温暖化などの影響による冬場の高水温が影響していると考えられている。そのため、高水温に対応できるモズク品種が求められている。

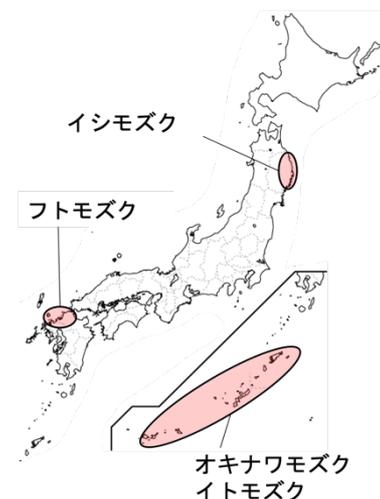


図2 各モズク類の主な生息地
オキナワモズクとイトモズクは主に沖縄地方で養殖されている一方、フトモズクは福岡、イシモズクは岩手で採取されることが多い。

3. 研究の方法

NBRP バイオリソース藻類からフトモズク、イシモズクを入手し、クールインキュベータ (CN-25C) を用いて拡大培養を行った (図 3)。この時の海水は、実際に海から採取したものを 0.2 μ m のフィルターで滅菌濾過したものを使用した。それらからゲノム DNA を抽出し、各種ライブラリーを作成したのち次世代シーケンサー (Illumina MiSeq と NovaSeq) でシーケンスを行い、塩基配列情報を取得することに成功した。さらに独自手法を開発し、Oxford Nanopore Technologies minION でのロングリードシーケンスデータの取得にも成功した。得られたデータを各種ゲノムアセンブラでアセンブルし、ゲノム情報の構築を行った。モズク類と共生しているバクテリアを単離するために、モズク懸濁液を連続的に希釈し Marine agar Plate に撒いた。これを 25 度で培養し、単一コロニーをピックアップし、新たな Marine aga Plate に植え継ぎ、4 度で保管した。

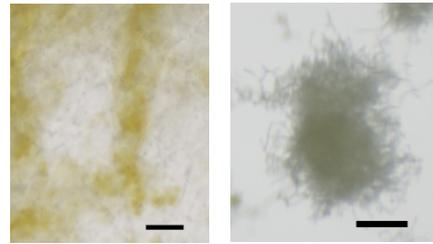


図 3 フトモズクとイシモズクの盤状体

フトモズク (左) とイシモズク (右) の“種”に相当する盤状体の集合体。小さな粒、一つ一つが盤状体であり、ここから食用となる藻体が発生する。スケールバー: 100 μ m

4. 研究成果

得られた抽出した DNA 及び RNA から各種ライブラリーを作成し、シーケンスした結果、高温耐性株 1, 2 及びフトモズク、イシモズクのデータ取得に成功した (表 1)。このうち Oxford Nanopore Technologies プラットフォームによるシーケンスデータが比較的多く取得できた高温耐性株 1 及びイシモズクのドラフトゲノム配列の構築を試みた。その結果を表 2 に示した。高温耐性株 1、イシモズクそれぞれ 121Mb、162Mb の assembled sequences が得られ、それぞれの conig 数も 700 以下であった。一方で、真核生物のデータセットを用いた時の Busco completeness がそれぞれ 11%、42%であった。褐藻類ゲノムを Busco で評価する際、Complete genome であっても completeness が 75%前後であることを鑑みても、これらの数値は明らかに低い。そのため、得られた assembled sequence を詳細に調べたところ、どちらからも多数のリボソーム 16S 配列を含む contig が得られた。これは得られたシーケンスの多くは共生バクテリア由来であり、モズク本来のゲノム情報は十分に得られていないことを示唆している。そのため、RNA-seq データを用いた遺伝子モデル予測などを行う前に、モズクの培養条件の再考が必要であると考えられた。しかしながら、assemble sequence から検出されたリボソーム 16S 配列は 1 つの contig に 1 つしかなく、contig の長さも 2-4Mb であることが多かった。そのため該当の contig はモズク共生バクテリアのゲノム配列である可能性が高い。つまり今回行った培養方法や核酸抽出、シーケンス手法はモズク類と共生するバクテリアのゲノム情報を取得するには有用であることも示唆された。また今回の培養では滅菌海水を使用しているため、NA 情報が得られたバクテリアは外部から混入したものではなく、モズク類の細胞内外に存在している可能性が高いと考えられる。

	種類	insert length	高温耐性株1	高温耐性株2	イシモズク	フトモズク
DNA	Paired-end	600bp	9.9	19.1	8.7	13.5
		2kb			1.7	1.47
	Mate pair	3kb			1.4	1.38
		4kb			1.4	1.66
		5kb			1.35	1.36
		6kb			1.37	1.44
		7kb				1.34
		9kb				1.38
		11kb			1.36	1.4
		13kb			1.18	1.14
ONT	15kb			0.98	0.96	
	16kb			0.58	0.45	
	18kb			0.1	0.16	
			10.5	8	18	7
RNA	illumina		51	78	40	32

表 2 得られたシーケンスデータ量 (注) データ量の単位は全て Gb

種類	高温耐性株1	イシモズク
assembled length (\geq 1,000bp)	121,197,722	162,410,887
Contigs	677	541
N50 (bp)	3,009,168	402,250
GC%	53	50
Busco completeness(%)	11	42

表 1 高温耐性株 1 とイシモズクのゲノムアセンブル結果

また各モズク類に共生しているバクテリアの単離に取り組んだところ、モズク懸濁液を連続的に希釈しプレートに展開し培養したところ、少なくとも1,000以上のコロニーを得ることができた。その中からシングルコロニーをピックアップし、植え継いだところ、合計77のバクテリアコロニーが得られた(図4)。今後、これら単離されたバクテリアのゲノム解読や機能解析を行なうことにより、海藻生育などに有用なものが発見される可能性がある。

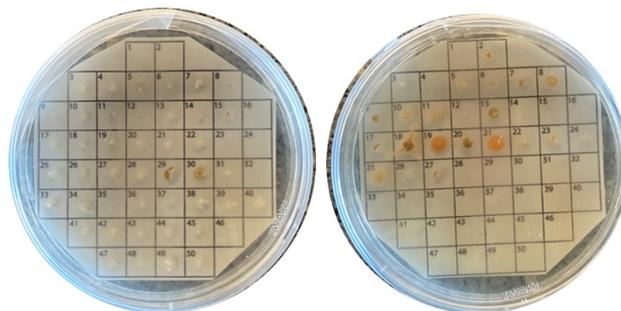


図4 モズク類から単離されたバクテリア群
合計77のシングルコロニーを得ることに成功した。

本研究課題の大半の期間が世界的に拡大した新型コロナウイルスの影響を受け、モズク類やバクテリア群の維持管理ができず、当初の計画通りに研究を進めることが非常に困難であった。しかしながら得られた成果を元に今後もモズク類をモデルとして、地球温暖化に適応可能な海藻類の作出に取り組んでいきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西辻光希・有本飛鳥・與那城由尚・近藤忍・久田香奈子・藤江学・川満真由美・將口栄一・佐藤矩行
2. 発表標題 形態的に異なるオキナワモズク <i>Cladosiphon okamuranus</i> 4株の比較ゲノム解析
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koki Nishitsuji
2. 発表標題 <i>Cladosiphon okamuranus</i> and <i>Nemacystus decipiens</i> genomes
3. 学会等名 Frontiers in Algal Research 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西辻光希
2. 発表標題 ゲノム科学で定義する新種モズク類の発見
3. 学会等名 第50回「生体機能の解明とその応用に関する研究会」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西辻光希
2. 発表標題 オワコンだなんて言わせない!重要性を増すゲノム研究 モズクゲノムが大変だった話
3. 学会等名 第28回 原生生物・寄生虫・進化セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木俊幸、佐々三依子、青山華子、井上広滋
2. 発表標題 細菌叢操作法の確立に向けたサンゴ共生藻の無菌化方法の検討
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西辻光希, 西辻淑恵, 與那城由尚, 佐藤矩行
2. 発表標題 オキナワモズクCladosiphon okamuranusの交雑育種に向けた雌雄判別DNAマーカーの開発
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西辻光希
2. 発表標題 ゲノムが教える新種オキナワモズク
3. 学会等名 第一回フコキサンチンミーティング (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔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	高木 俊幸 (Takagi Toshiyuki) (00814526)	東京大学・大気海洋研究所・助教 (12601)	

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
---------	---------