

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892003

研究課題名(和文)水産植物スサビノリの品種改良に資する新規育種基盤技術の研究開発

研究課題名(英文) Research and development of new breeding base technology to contribute to the breeding of marine plant *Pyropia yezoensis*

研究代表者

福田 覚 (Fukuda, Satoru)

弘前大学・食料科学研究所・准教授

研究者番号：20520951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、スサビノリの形質転換技術を活用し、海苔品種改良に資する分子生物学的手法を用いた新規育種基盤技術の研究開発を目的とする。

本研究では、形質転換体の作出を試みた後、形質転換体候補がレポーター遺伝子の発現が安定に見られるか形質転換体候補を観察したところ、スサビノリの交配による減数分裂時期の検証に用いることが可能なレポーター遺伝子を発現している形質転換体候補を確認することができなかった。

以上の結果により、スサビノリ形質転換体の交配による減数分裂時期を検証するためには、外来遺伝子が安定に発現する形質転換体候補をこれまで以上に獲得する必要があると示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study, using the transformation techniques of *Pyropia yezoensis*, was to research and develop new breeding base technology to contribute to the nori breeding. In this study, we tried to produce transformants with a reporter gene. However, transformant candidates to clearly express the reporter gene was not confirmed. As a result, transformant candidates available for demonstration of meiosis *P. yezoensis* was not obtained. In conclusion, to increase the transformation efficiency, it is suggested that the gene transfer technology of *P. yezoensis* be still improved.

研究分野：水産植物

キーワード：スサビノリ 紅藻 形質転換 海藻

1. 研究開始当初の背景

飢餓からの開放、食の安全、健康に暮らすことは、平和で豊かな世界を実現するための人類共通の願いである。将来の人口爆発による食料危機、および地球環境の悪化による命と健康の危機に備え、安全かつ高機能な水産食品の安定供給は地球規模で求められている。

海苔の養殖産業の中で最も代表的な品種はスサビノリであり、わが国の水産物の中でも重要な地位を占めている。しかし、近年は、有明海の養殖海苔の白化問題や陸上作物同様の菌類の寄生による病害などが多発し、生産高の約20%に相当する200億円もの損害が出ることもある。そのため、海苔の生産を安定させ、かつ高品質・高収量そして耐病性などの株の品種改良に向けて、海苔独自の育種技術が必要である。

海苔養殖は、干潟に立てたひび上に海苔がつくことを利用したひび建てによる採苗および養殖から始まり、海苔の糸状の胞子体世代が解明され¹⁾、海苔種苗が人為的に管理することが可能となり、さらに糸状の胞子体世代を利用した人工採苗の技術が開発され、収穫量が著しく増大した。その後、養殖海苔の最も代表的な対象種であるアサクサノリに加え、導入育種によって色が黒く、扱いやすいスサビノリが全国的に普及し、続いて選抜育種されたオオバアサクサノリおよびナラワスサビノリが多収穫性品種として全国的に普及した。近年では、上述のとおり養殖されている海苔の殆どは、スサビノリであり交雑育種等による品種改良が進められている。しかしながら、海苔は環境変化によって著しく形態および形質が変化するため、従来の育

種方法では、詳細な産業形質等を評価することが難しく、これまで以上の品種を獲得することが極めて困難であるのが現状である。

一方、スサビノリは以下に示すような実験生物としての利点があることから、水産植物における基礎および応用研究のモデル実験生物として近年注目されている。

- (1) 培養しやすく材料を大量に調整できる。
- (2) 生活環の完結に短期間で済む(2~3ヶ月)。
- (3) 染色体数は少なく、 $n=3$ である。
- (4) 遺伝子導入や形質転換体作出の技術が確立している

これらの実験生物としての開発の多くは研究代表者が所属した研究室を中心に国内の研究者によってなされたものである。特に研究代表者が携わった形質転換技術の確立は、スサビノリの実験生物としての価値を大きく向上させた。

以上より、高品質・高収量および耐病性などの品種改良に向けて、スサビノリの細胞・分子生物学的な知見の集積が益々重要課題となる一方で、スサビノリはモデル実験生物として基盤技術が整備されつつある。

2. 研究の目的

上記の背景とこれまでの研究成果をもとに、スサビノリの形質転換技術を利用したノリ品種改良に資する新規育種基盤技術の研究開発を目的とする。以下の3点に取り組み、スサビノリの形質転換体の交配実験系の確立を目指す。

- (1) レポーター遺伝子と選択マーカーを持つスサビノリ形質転換体の作出

(2) 分子遺伝学的解析に利用可能なスサビノリ形質転換体の選抜

(3) スサビノリ形質転換体の交配による減数分裂時期の検証

3. 研究の方法

(1) レポーター遺伝子と選択マーカを持つスサビノリ形質転換体の作出

申請者は、モデル実験生物に必須である形質転換技術の開発に携わり、スサビノリ固有の転写調節領域（プロモーター領域）とスサビノリ特有のアミノ酸配列（コドン使用頻度に従った配列）に改変したレポーター遺伝子や選択マーカを用いた外来遺伝子導入方法を開発し、スサビノリの一過的遺伝子発現や形質転換体の作出に成功した²⁾。

上記の形質転換技術を利用し、組織化学的検出が可能なベータグルクロニダーゼ（GUS）遺伝子や蛍光タンパク質（CFP）遺伝子を持つ、複数のスサビノリ形質転換体の作出を行った。

(2) 分子遺伝学的解析に利用可能なスサビノリ形質転換体の選抜

レポーター遺伝子と選択マーカを組み合わせで作出したスサビノリ形質転換体候補から、減数分裂時期の検証に利用可能な株の選抜を行った。具体的には、選択マーカがハイグロマイシン耐性遺伝子であるため、ハイグロマイシンを添加した人工海水培地で形質転換体を培養し、死滅しなかった藻体を選抜した。次に、通常的人工海水培地で培養し、レポーター遺伝子の発現が安定に見ら

れるか形質転換体を観察した。

(3) スサビノリ形質転換体の交配による減数分裂時期の検証

本検証については、(1)および(2)のとりくみが当初想定していた見込みよりも進捗が遅れたことによって十分に検証するところまで至らなかった。

4. 研究成果

スサビノリ固有の転写調節領域とスサビノリ特有のアミノ酸配列に改変したレポーター遺伝子や選択マーカを用いて外来遺伝子導入方法により、スサビノリの一過的遺伝子発現を確認するとともに、形質転換体の作出を試みた。その結果、組織化学的検出が可能な遺伝子や蛍光タンパク質遺伝子を持つ、複数のスサビノリ形質転換体候補を得ることが出来た。形質転換体候補は、ハイグロマイシンを添加した人工海水培地で培養し、さらに候補を絞り、その後、通常的人工海水培地で培養して十分に成長させた形質転換体候補が、レポーター遺伝子の発現が安定に見られるか形質転換体候補を観察した。具体的には、CFP 遺伝子を持つ形質転換体候補を観察したところ、スサビノリの交配による減数分裂時期の検証に用いることが可能な CFP を発現している形質転換体候補を確認することができなかった。

以上の結果により、スサビノリ形質転換体の交配による減数分裂時期を検証するためには、外来遺伝子が安定に発現する形質転換体候補をこれまで以上に獲得する必要があると示唆された。

本研究結果により、スサビノリでは、遺伝

子解析の基盤的技術である形質転換技術が未だ不安定であることが課題として見出された。これまでに、プロモーターやレポーター遺伝子配列は最適化されつつあり、導入法においても物理的導入法の一つであるパーティクルガン法が現段階において最良であると考えられる。現行の形質転換手法では、外来遺伝子導入時の材料に栄養生長している葉状体を用いるのが一般的であるが、その材料の最適化については検討されていない。このことが、効率的な形質転換体候補の獲得、すなわち形質転換効率の不安定さの要因になっていると考えられる。また、研究代表者は、予備的実験により生殖器官に分化した細胞を有するスサビノリの葉状の配偶体を研究材料に用いると外来遺伝子導入効率が良いという情報を得ている。したがって、本取り組みでは、プロモーターやレポーター遺伝子配列および外来遺伝子導入法は先行研究と同様とし、外来遺伝子導入時の材料の状態に着目する。具体的には、外来遺伝子導入に最適な研究材料を特定することを目的として、種々の環境制御により誘導した様々な状態の葉状の配偶体を用いて外来遺伝子導入効率を向上させ、形質転換効率の底上げを目指す。

<引用文献>

1) Drew, K. M., Conchocelis-Phase in the Life-History of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. Nature, 164, 748-749 (1949).

2) Hirata, R., Uji, T., Fukuda, S., Mizuta, H., Fujiyama, A., Tabata, S. and Saga, N. :Stable nuclear transformation of *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta) with the codon-optimized selection marker and

reporter genes. J. Applied Phycol., DOI10.1007/s10811-013-0234-x (2014).

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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.ifs.hirosaki-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 覚 (FUKUDA, Satoru)

弘前大学・食料科学研究所・准教授

研究者番号：20520951