

気候変動に適応する強靱な新養殖事業－I

藻類養殖

岡 謙佑・八巻 勇翔¹⁾・五十嵐 洋治¹⁾・柿沼 誠¹⁾

1) 三重大学大学院生物資源学研究科

目的

養殖ヒトエグサの種苗の多くは現在、天然採苗によって確保されている。しかし、天然採苗は気象や海況に大きく影響される。また種場の遊走子の量を確認する方法も、現在は種場に張り込まれた種網の顕微鏡観察という手法に頼っている。顕微鏡観察では、種網を2週間培養することで結果を確定させているため、結果が出るまでに時間がかかることが問題となっている。また、必ずしも安定的に採苗が行えないことから藻体の生産量が安定せず、養殖業者の収入も変動が大きい。したがって現在、安定的に採苗を行う技術の開発が望まれている。そこで本事業では、ヒトエグサの安定的な採苗技術の開発を目的として、これまで遺伝学的知見の少ないヒトエグサの全ゲノム DNA 塩基配列を解読し、技術開発のための基礎的知見を得るとともに、環境水中のヒトエグサ遊走子を DNA レベルで検出する手法を検討してきた。

本年度は、昨年度取得したヒトエグサの塩基配列情報を基にオルガネラ（ミトコンドリアおよび葉緑体）ゲノムの全長塩基配列の決定を行うとともに、ヒトエグサ、スジアオノリおよびウスバアオノリの3種を対象に、ヒトエグサ種特異的プライマーを開発することを目的とする。

方法

1 オルガネラゲノムの全長塩基配列決定

昨年度取得した塩基配列データから、まず `fastp v0.23.2` を用いてアダプター配列や低品質の配列データについてフィルタリングを行った。続いて、`seqkit v2.4.0` を用いて過剰分の配列データをフィルタリングし、1,000万リードを抽出した。この配列データに基づき `NOVOPlasty v4.3.1` を用いてミトコンドリアおよび葉緑体ゲノム全長塩基配列を構築した。最後に、`Geseq` を用いて遺伝子のアノテーションと遺伝子地図を作成した。なお、アノテーションの参照配列には緑藻ミトコンドリアゲノム 77 種および緑藻葉緑体ゲノム 166 種を使用した。

2 ヒトエグサ種特異的プライマーの開発

構築したヒトエグサミトコンドリアゲノムについて、NCBI 塩基配列データベースに登録されているスジアオノリ (accession no. : NC_028538.1) およびウスバアオノリ (accession no. : NC_029701.1) のミトコンドリアゲノムと比較し、共通して保存されている遺伝子を特定した。

次に、特定した共通遺伝子の中から藻類の種判別によく用いられるシトクロム *c* オキシダーゼサブユニット 1 (*cox1*) 遺伝子領域を対象に、Primer-BLAST を用いてエキソン領域から 15 セット、イントロン領域から 10 セットのプライマーを設計した。また、ポジティブコントロールとして 3 種とともに増幅する共通プライマーを 2 セット設計した (プライマーセット 64, 65)。

PCR に用いた鋳型 DNA には、昨年度 DNA 抽出を行った松阪産ヒトエグサ由来のもの、スジアオノリおよびウスバアオノリについては、乾燥葉状体試料から DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen) を用いて抽出されたものを用いた。また、PCR の反応特異性を向上させるため、DNA 合成酵素はブルーフリーディング活性の無い KAPA2GRobust PCR Kit (Kapa Biosystems) を用いた。PCR 増幅反応は、ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて行い、反応液を 95°C で 3 分保温した後、95°C で 15 秒、62°C で 15 秒、72°C で 15 秒の反応を 35 サイクル行い、72°C で 1 分保温して反応を終了した。最後に、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、増幅断片の有無を確認した。

結果及び考察

1 オルガネラゲノムの全長塩基配列決定

オルガネラゲノムの全長塩基配列の構築を行った結果、その配列はミトコンドリアおよび葉緑体ゲノムでそれぞれ、78,062 bp (図 1) および 205,676 bp (図 2) であった。また、Geseq によるアノテーションの結果、ミトコンドリアでは 51 個および葉緑体では 110 個の遺伝子が予測された。これを既報の中国産ヒトエグサのオルガネラゲノム (accession no. : NC_072926.1, NC_072924.1) を参照配列として比較したところ、参照配列はミトコンドリアおよび葉緑体ゲノムでそれぞれ、

95,867 bp および 237,223 bp であり、本研究で得られた塩基配列長と大きく異なることが示された。さらに、本研究で得られたミトコンドリアゲノムからは参照配列より *cox2*, *cox3*, および *atp4* 遺伝子が欠損していることが明らかとなった。

これらのことから、三重県松阪市で養殖されているヒトエグサと中国産のヒトエグサは別種である可能性が極めて高いことが示唆された。

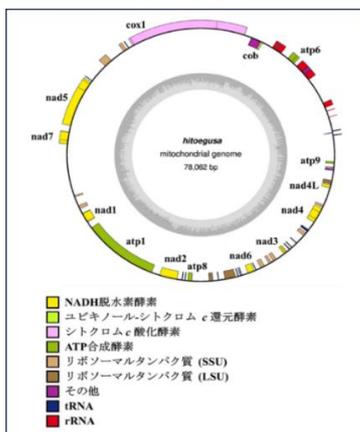


図 1. ヒトエグサミトコンドリアゲノムの遺伝子地図

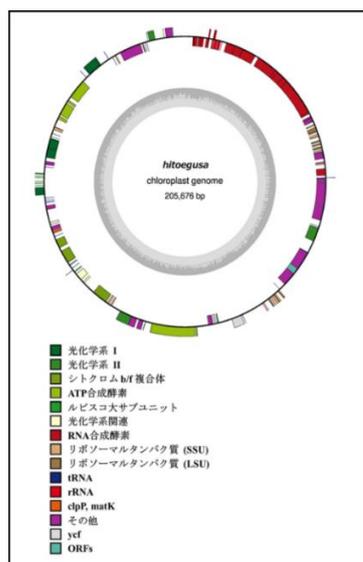


図 2. ヒトエグサ葉緑体ゲノムの遺伝子地図

2 ヒトエグサ種特異的プライマーの開発

ヒトエグサ、スジアオノリおよびウスバアオノリのミトコンドリアゲノムを比較した結果、3種で共通して保存されている遺伝子は 26 個存在していた。

次に、*cox1* 遺伝子のエキソン領域に設計したプライマー15 セットについて、アガロースゲル電気泳動により PCR 増幅産物の確認を行ったところ、ヒトエグサでは全てのプライマーセットにおいて増幅が認められた(図 3)。スジアオノリにおいても全てのプライマーセットで増幅が認められ、ウスバアオノリでは No. 47 を

除くプライマーセットで増幅が認められた。また、イントロン領域に設計したプライマー10 セットも同様に確認をしたところ、ヒトエグサでは全てのプライマーセットでの増幅が認められた(図 4)。一方、スジアオノリおよびウスバアオノリでは対象領域において No. 76 を除き増幅は認められなかったが、プライマーダイマーと考えられる非特異的増幅由来のバンドが多く検出された。

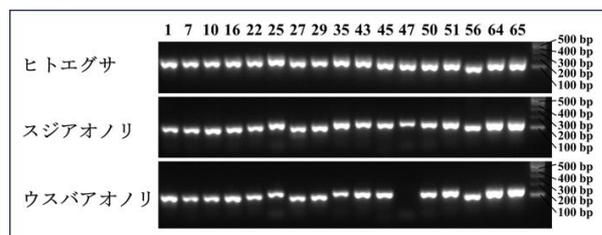


図 3. エキソン領域を対象とした PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動結果。番号はプライマーセット名を示す。No. 64, 65 は種間共通プライマーセットの PCR 増幅産物。

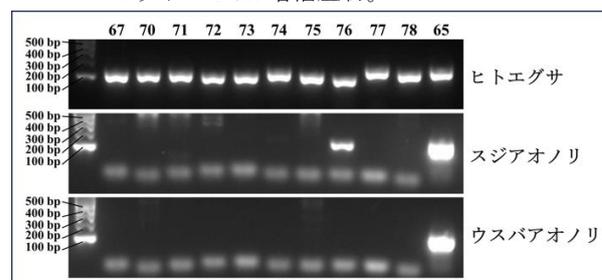


図 4. イントロン領域を対象とした PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動結果。番号はプライマーセット名を示す。No. 65 は種間共通プライマーセットの PCR 増幅産物。

ミトコンドリアゲノムのエキソン領域で設計した全てのプライマーセットは種特異性が低く、スジアオノリおよびウスバアオノリでも増幅産物が認められた。エキソン領域はタンパク質をコードする領域であるため保存性が高く、異なる種においても塩基配列に共通する箇所が多く、ヒトエグサに特異的なプライマーセットを設計することが困難であった。一方、イントロン領域に設計したプライマーセットでは、ヒトエグサで特異的な増幅が確認されたものの、その他の種で非特異的増幅が認められ、今後行う遊走子の定量 PCR や下流の解析に不都合を生じる可能性が示唆された。

今後、増幅断片がエキソン領域とイントロン領域にまたがるように種特異的プライマーセットを設計するなどして現在の課題を克服するとともに、環境水由来の DNA を鋳型とした PCR についても検討を行っていききたい。