

<令和元年度助成>

機能性多糖類フコイタンを豊富に含む新規モズク株作出に 必須となる新技術の開発

西辻 光希

(沖縄科学技術大学院大学 マリンゲノミクスユニット)

Introduction

日本に流通する褐藻モズクの90%以上は沖縄で養殖されるオキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) であり、年間50億円規模の産業である。モズクには多数の生理活性が報告されている硫酸多糖フコイタンが豊富に含まれており、その需要は増加し続けている。より豊富にフコイタンを含むモズク品種の作出が切望されているが、海藻類において交雑育種は成功していない。オキナワモズクの交雑を行うには、雌雄盤状体を単離する必要があるが、形態から判別することができないため実現していない (Figure 1A~D)。そのため、オキナワモズクの2Nおよび雌雄盤状体を正確に区別する手法の開発が喫緊の課題となっている。

褐藻類のゲノム解読は、その重要性にかかわらず、わずか9例に止まっている。動植物では1万種近くがゲノム解読されていることを鑑みても、その少なさが際立っている¹⁾。褐藻が持つ多糖が障害となり、ゲノム解読を困難にしているためである。そんな中、私はこれまでに褐藻のゲノム解読を5例報告し、既に単離されている特徴的なオキナワモズク4株 (S、K、O、C株) は同一種ではなく、亜種であることを報告してきた^{2,3,4)} (Figure 1E)。また近縁種シオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*) では雌雄特異的遺伝子が既に同定されている⁵⁾。

本研究では、シオミドロ雌雄特異的遺伝子の情報をもとに、オキナワモズクでの雌雄遺伝子の候補を特定する。それらに対する遺伝マーカーを設計し有用性を確認することにより、オキナワモズク盤状体の2Nおよび雌雄判別に利用できる遺伝マーカーを

特定し、海藻では世界初となる交雑育種に必須となる新技術を開発する。

Material and methods

ゲノム比較解析

オキナワモズクS株のゲノム情報 (遺伝子モデル ver2) およびシオミドロのゲノム情報は web サイトからダウンロードした (Table 1)。Blast ソフトウェア (ver. 2.7.1) を使用し、オキナワモズクの雌雄特異的遺伝子を探索した。

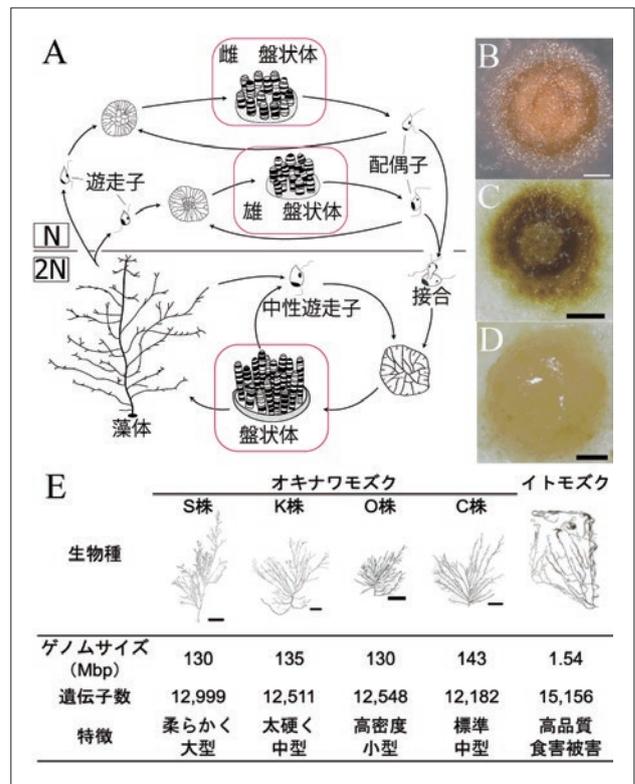


Figure 1 (A) オキナワモズクの生活環。(B) 2N、(C) 雄、(D) 雌の各盤状体。形態から見分けることは不可能である。スケールバー: 100 μm (E) これまで私がゲノム解読した褐藻5例。オキナワモズク4株は同一種ではなく亜種であることが明らかになっている。

Table 1 ゲノム情報や解析に用いた web サイトの URL

オキナワモズクゲノム	https://marinegenomics.oist.jp/okinawa_mozuku_s_v2/viewer/download?project_id=67
シオミドロゲノム	https://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/overview/EctsiV2
NCBI Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

オキナワモズク盤状体

オキナワモズクの 2N、雄、雌の各盤状体は沖縄県水産海洋技術センターで単離されたものを使用した。

プライマー（遺伝マーカー）の設計

オキナワモズクにおいて雌雄特異的と考えられる遺伝子のうち、33 の遺伝子について特異的なプライマー（遺伝マーカー）を NCBI Primer-Blast (Table 1) を用いて設計した。

ゲノム PCR

1.5 ml チューブに 2N、N オス、N メスの盤状体 1 カケと滅菌水 70 μ l を加えた。それを 95 度で 5 分加熱処理した。処理液 1 μ l を用いて TaKaRa Gflex PCR mix のプロトコル通りに PCR した。PCR 産物を 1% アガロースゲルで DNA ラダー（プロメガ 1 kb DNA ラダー）と共に 30 分電気泳動し、ゲルを撮影した。

Results

雌雄特異的遺伝子の候補の特定と遺伝マーカーの設計

オキナワモズクとシオミドロのゲノム比較解析の結果、12,999 個のオキナワモズク遺伝子のうち、雌雄特異的と考えられる遺伝子 269 個が見つかった。269 個の候補遺伝子のうち、16 遺伝子に対し、33 の特異的なプライマー（遺伝マーカーの候補）を設計することができた。

遺伝マーカーの決定とオキナワモズクの雌雄判別

設計した 33 の遺伝マーカー候補を用いてゲノム PCR を行ったところ、雄遺伝子 5 つ、雌遺伝子 4 つについて特異的なバンド（PCR 産物）が検出された (Table 2, Figure 2)。また 2N 盤状体を用いたものでは、9 つの遺伝マーカー由来の PCR 産物が確認できた。

Table 2 作成した遺伝マーカーの配列

Gene ID	Fw primer	Rv primer	PCR 産物	雌雄
g11150	ACACCCCTTGTAATCGGGAT	GACCACTACATTTTCACCGC	453bp	オス
g11151	CGCAGGCCATTTCCGGTTTAG	GCTACACGCTCTTCTGGAGG	524bp	オス
g12375	GGTCGTGAAAGTACTTGAGG	TTCATGAGCAAAGGATCGT	975bp	オス
g12376	CTGGAGTTGGGAGACACGAG	CCGAACCCATGAACGGATGA	762bp	オス
g12381	AGGTGAACGCACGAAGGAAA	CGGAAGGACATGGTACACCG	911bp	オス
g13772	TGCACCGTTGAGAGAGTTGT	TTTCGGTCAAGGAGTCCACC	359bp	メス
g19792	GACGTGCTGATGACTCACGA	GTTACGGTTAGCACGAGGGT	476bp	メス
g19793	AAGCGGGGTTTCCAGAGATG	GTTTTTGTCTGGGGCCGTC	717bp	メス
g20120	GGTAATGCCAATGTGCGACC	AAGATGGGTATGCTCGGACC	769bp	メス

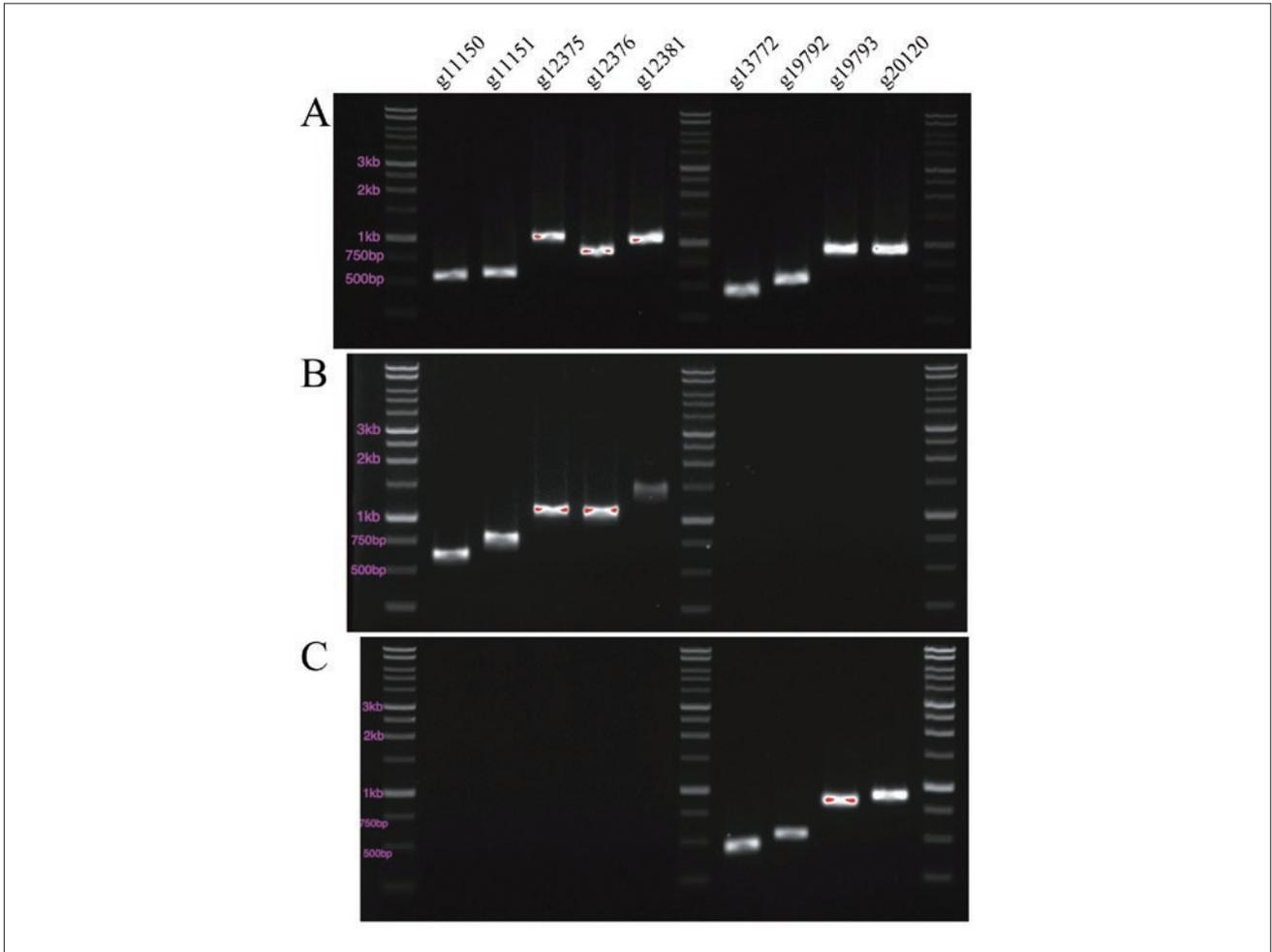


Figure 2 ゲノム PCR 産物の検出
 (A) 2N、(B) 雄、(C) 雌の各盤状体を用いた結果。それぞれ雌雄特異的なバンドが検出された。
 2N 盤状体は雄雌遺伝子の両方を持つことも改めて示された。

さらに簡便に盤状体の 2N、雄、雌を判別するために、一度に複数の遺伝マーカーを用いたゲノム PCR を行った。その結果、盤状体が 2N の時はバンドが 2 本、雄もしくは雌の時は、検出箇所が異なるバンドが 1 本それぞれ検出することができた (Figure 3)。これらの結果は、検査対象の盤状体が 2N か雄か雌かを、1 回のゲノム PCR で確認することができるようになったことを意味している。

Discussions

269 個の雌雄特異的遺伝子の候補

オキナワモズク 12,999 遺伝子のうち、雌雄特異的と考えられる遺伝子が 269 個と多数見つかった。これは近縁種シオミドロの 34 個と比較しても

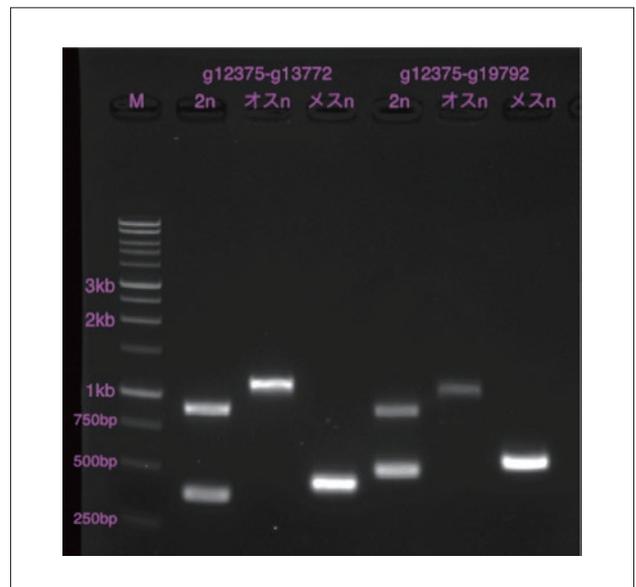


Figure 3 複数の遺伝マーカーを用いたゲノム PCR 産物の検出
 2N 盤状体を用いた時は 2 本、雌雄盤状体の時は異なる長さのバンドが 1 本それぞれ検出された。

とても多い。これは本来雌雄特異的ではない遺伝子が多数含まれているためだと考えられる。雄／雌盤状体の RNA-seq を行い、遺伝子発現解析をすることにより正確に雌雄特異的遺伝子が絞り込めるはずである。しかしながら今回遺伝マーカーを作成した雄 5 つ、雌 4 つの遺伝子を利用すればオキナワモズクの雌雄判別は問題なく可能である (Figure 2, 3)。そのため、候補遺伝子が他にも多数あるが、本研究結果の優位性に変わりはない。

複数の遺伝マーカーを組み合わせ簡便な雌雄判別方法の確立

本研究では雄 5 つ、雌 4 つの遺伝子に対する遺伝マーカーの作成に成功した。遺伝マーカーを組み合わせ、より少ない回数での雌雄判別を実現できた。これは研究者以外でもより簡単に判別が行えることを意味する。例えばモズク養殖に注力している沖縄県水産海洋技術センターをはじめとする各都道府県が管轄する水産課や水産庁の職員でも利用可能である。また遺伝マーカーを用いた判別は安価な装置 3 つ (合計 30 万円程度) があれば実施可能である。そのため、どのような企業でもこの遺伝マーカーを用いた雌雄判別が可能であり、誰でもオキナワモズクの新品種作出に取り組むことが可能になったということも意味する。つまり本研究に得られた成果は、世界初の海藻類交雑育種による品種改良を現実的に可能にするものである。

モズク類以外の海藻類への波及効果

本研究での遺伝マーカーの設計には近縁種シオミドロの情報を利用した。これはモズクの遺伝マーカーがシオミドロにも利用できる可能性が高いことを意味する。シオミドロは微細な非食用褐藻であるため産業利用されることはない。しかしながら他の褐藻類、例えばコンブ、ワカメ、ヒジキなどには、モズク遺伝マーカーが利用可能であると考えられる。コンブでは品種登録されてはいないものの、複数の品種があるとされている。そのため、本研究で得られた遺伝マーカーを用いて異なる品種同士をか

け合わせ、より高品質なコンブが得られることも期待できる。

次に開発すべき技術と今後の課題

本研究の成果により、雌雄判別が可能になった。しかしながらモズクを含む褐藻類で交雑育種を行うためにはもう 1 つ別の技術、株判別する遺伝マーカーが必要になる。株判別を行わずに同じ株を掛け合わせてしまうと、遺伝的に新しいものは得られない。新たな品種を生み出すためには、異なる株を交雑させる必要がある。株判別マーカーを開発するには、株ごとのゲノム情報が必須となる。オキナワモズクの場合、先行研究により特徴が異なる 4 株のゲノム解読が完了している。さらに高温耐性株なども既に単離・株化されており、ゲノム解読中である。これらの情報を用いることにより、株判別マーカーの開発は十分実現可能であり、早期に実現すべきの課題でもある。

Conclusions

本研究の成果により、オキナワモズク盤状体の雌雄を判別することができるようになった。さらなる技術開発が必要になるものの、海藻類初となる交雑育種が現実味を帯びてきている。モズク類で新たな交雑品種が作成できれば、その影響はコンブ、ワカメ、ヒジキなどの他の褐藻にもおよぶことが予想される。

近年の地球温暖化の影響により、日本の海藻類は瀕死の状況にある。長崎県五島列島や和歌山県串本では魚の住処となる海藻類が激減し、その代わりに造礁サンゴが増殖しているとの報道が多数なされている。本研究の成果を用いて地球温暖化に対応できる海藻品種を作出することができれば、そのような問題にも対応できる。ひいては本研究の成果は、国連が提唱する SDGs (持続可能な開発目標) の「13. 気候変動に具体的な対策を」「14. 海の豊かさを守ろう」に貢献できる可能性を多分に秘めている。

Acknowledgement

本研究で用いたオキナワモズクは共同研究先でもある沖縄県水産海洋技術センターより提供されました。この場を借りてお礼申し上げます。

ならびに本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

Reference

- 1) 西辻光希, 未開拓な大型海藻ゲノムの現状とこれから, *藻類*, 67巻, 2号, 81-87ページ, 2019年
- 2) Nishitsuji *et al.*, A draft genome of the brown alga, *Cladosiphon okamuranus*, S-strain: a platform for future studies of 'mozuku' biology., *DNA research*, Vol. 23, Issue 6, pp. 561-570, 2016年
- 3) Nishitsuji *et al.*, Draft genome of the brown alga, *Nemacystus decipiens*, Onna-1 strain: Fusion of genes involved in the sulfated fucan biosynthesis pathway., *Scientific Reports*, Vol. 9, Article number: 4607, 2019年
- 4) Nishitsuji *et al.*, Comparative genomics of four strains of the edible brown alga, *Cladosiphon okamuranus*, *BMC Genomics*, Vol. 21, Article number: 422, 2020年
- 5) Alexandre Cormier *et al.*, Re-annotation, improved large-scale assembly and establishment of a catalogue of noncoding loci for the genome of the model brown alga *Ectocarpus*, *New Phytologist*, Apr;214 (1) :219-232 2017年

Development of new essential tools for breeding new Okinawa mozuku strains that contain more of the functional polysaccharide fucoidan

Koki NISHITSUJI

Marine genomics unit, Okinawa Institute of Science and Technology

Cladosiphon okamuranus, Okinawa mozuku in Japanese, is one of the edible brown seaweeds, with an annual yield of 22k tons, worth 5 billion JPY per year in Japan. More than 90% of Japanese mozuku production is from Okinawa, 95% of which is cultivated. *C. okamuranus* contains more fucoidan, which is a bioactive polysaccharide, than other brown algae. The life cycle of *C. okamuranus* is complicated, and it has self-cloning life cycles in both the haploid (N, male and female) and diploid (2N). The diploid seeds (germlings) can give rise to edible sporophytes. Establishing a new mozuku strain that contains more fucoidan is required. However, important tools for distinguishing diploid, haploid-male, and haploid-female germlings are missing for the cross breeding of *C. okamuranus*. In this study, we developed a new technology to address that issue. A comparative analysis between *C. okamuranus* and the related species, *Ectocarpus siliculosus* revealed that more than 200 putative male/female genes were found in the *C. okamuranus* genome, and specific primers could be designed for five male and four female genes. PCR results using these primers showed that we could distinguish diploid, male, or female germlings. These results suggest that the crossbreeding of *C. okamuranus* will be realized, and that a fucoidan-rich mozuku strain will be bred in the near future.