

養殖スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) 突然変異株 における変異遺伝子の解析

水上 譲*¹・川崎武仁*¹・村瀬 昇*¹・國本正彦*²

Analysis of mutant genes in the cultured mutant strain of *Porphyra yezoensis*

Yuzuru Mizukami*¹, Takehito Kawasaki*¹, Noboru Murase*¹, and
Masahiko Kunimoto*²

Nucleotide sequences in four loci of the *Porphyra yezoensis* genome were compared between wild and green-type pigmentation mutant strains. Approximately 3 to 10 % of nucleotides varied in two loci by substitutions, additions and deletions of nucleotides. However, in the other two loci, nucleotide sequences were identical between the two strain types although previous data of RAPD analysis suggested variations in the nucleotide sequences. Southern-blot analysis showed that all of the nucleotide sequences found in the 4 loci were repeated over the genome and the frequency of repetition differed between the two strain types. Nucleotide sequences in two loci showed 100 % nucleotide similarities with those of retrotransposons in higher plants. These results suggested that the spontaneous mutation of *Porphyra yezoensis* was brought about by retrotransposons as well as nucleotide conversions.

Key words : *Porphyra yezoensis*, Pigmentation mutation, gene conversion, retrotransposon

1 緒 言

スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) 養殖におけるノリ (海苔) の生産性は海況等の影響により年毎に著しく変動する^{1,2)}。安定生産のためには海況等に見合った多様な品種による栽培が望まれるが、生長性に関する品種以外に実用的な品種は開発されていない。最近では新品種作出のための選抜、交配および突然変異育種等に関する新技術の開発が行政レベルでも望まれるようになった^{3~5)}。

突然変異育種は古くから農業用植物の改良や花卉育種に利用されている主要な育種法の1つであるが⁶⁾、大型紅藻類育種への応用例は極めて少なく、また、突然変異育種の基礎となる変異遺伝子の解析についても紅藻類では殆ど行われていない。

著者らは先に記載した論文⁷⁾の中で、スサビノリ突然変異株ゲノムにおいて遺伝子変異が生じている領域をいく

つか明らかにし、相同性検索の結果、これらの領域の1部は高等植物レトロトランスポゾンに高い類似性を持つことを報告した。本研究では、変異領域の塩基配列およびそれらのゲノム上での反復頻度を野生型株および自然発生緑色突然変異型株間で比較して遺伝子構造の変異を明らかにするとともに、変異領域の1部を被子植物レトロトランスポゾンと比較し、両者の相同性を塩基配列レベルで検証した。

2 材料および方法

2.1 藻 体

本研究では野生型 (正常型) 養殖種 (養殖名: 佐賀5号) を野生型株とし、緑色突然変異型養殖種 (養殖名: ナラワスサビミドリメ^{8~10)}) を自然発生突然変異型株として用いた。これらの藻体は有明海にて養殖されたものを佐賀県有明水産センターから譲り受けたもので、自家受精によって

2006年1月16日受付。Received January 16, 2006.

* 1 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

* 2 水産総合研究センター中央水産研究所 (National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency)

フリー糸状体とした後、継代培養した。また、一部のフリー糸状体を -20°C に保存してDNA抽出に用いた。

2.2 DNAの抽出および変異領域塩基配列の解析

DNA抽出キット (DNAeasy Plant Maxi Kit, Qiagen社) を用いて糸状体からDNAを抽出した。方法の詳細については前報告⁷⁾に記載した。また、前報告⁷⁾では緑色突然変異型株ゲノムにおける変異領域複数を推察した。本研究では、これらの変異領域のうちから任意に4領域を選び、塩基配列を野生型株および緑色突然変異型株間で比較した。変異が推察されたDNA領域の塩基配列⁷⁾をもとに4組のプライマーセット (Table 1) を作成し、これらのプライマーセットと野生型株および突然変異型株DNAを用いたPCR¹⁰⁾を行なって、それぞれのDNA断片を得た。これらのDNA断片をクローン化した後、塩基配列を解析し、遺伝子解析ソフト (DNAsis-Mac Ver 3.4, Hitachi Softwareengineering社) によって野生型株および突然変異型株間で塩基配列を比較した。また、これらDNA断片のゲノム上の反復頻度を野生株および突然変異株間で比較するため、これらのDNA断片をプローブとして全DNAのサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識およびハイブリダイゼーションシグナルの検出には標識・検出キット (ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System, Amersham Biosci. 社) を用いた。

2.3 レトロトランスポソンの解析

上記のプライマーセットを用いて増幅したDNA断片のうち、A-11-0.4-mおよびA-16-0.7-mと名づけた2領域の塩基配列と類似な配列を遺伝子データバンクDDBJ (DNA Data Bank of Japan) によって検索し、類似度が最も高い被子植物レトロトランスポソンと塩基配列を比較した。

3 結果

3.1 変異領域塩基配列の比較

Fig. 1はA-12-1.2-wおよびC-20-0.8-mと名づけた領域について塩基配列を両株間で比較したものである。これらの領域では塩基の欠失、挿入、置換など多くの塩基に変異が見られ、特にA-12-1.2-w領域における変異は解析した150塩基の10%に達していた。Fig. 2にA-11-0.4-mおよびA-16-0.7-m領域の塩基配列を示した。これらの領域はRAPD解析で変異が推察された領域であるが、解析した約330および450塩基中では1塩基の変異も見られなかった。

3.2 特異塩基配列の反復頻度

上記の4領域で見たDNA塩基配列のゲノム上での複雑度および量的変異をサザンハイブリダイゼーション法で調べた。Fig. 3は、4領域のDNA断片をプローブとした野生型株および緑色突然変異型株全DNAのハイブリダイゼーションパターンを示したものである。4領域のプロー

Table 1. Primers used for amplifying and sequencing of the DNA regions named A-11-0.4-m, A-12-1.2-w, A-16-0.7-m and C-20-0.8-m in the genome of *P. yezoensis*.

Primer	5' 3' sequence
A-11-0.4-m	
Forward	GTGGAGATGATTCAGGATGG
Reverse	ACCAAGTCAGGTCCAACCTCG
A-12-1.2-w	
Forward	CCTTGGGACGTTCCCGTTGA
Reverse	CCGAGATCGCAAGGCCTGCT
A-16-0.7-m	
Forward	AATGTATTGGGGCACAAGCG
Reverse	CGCGAATTCAGTACTCCGGC
C-20-0.8-m	
Forward	CCGCTGGGAGGTCTACGATA
Reverse	ACATGGATCCAGACGAGGGC

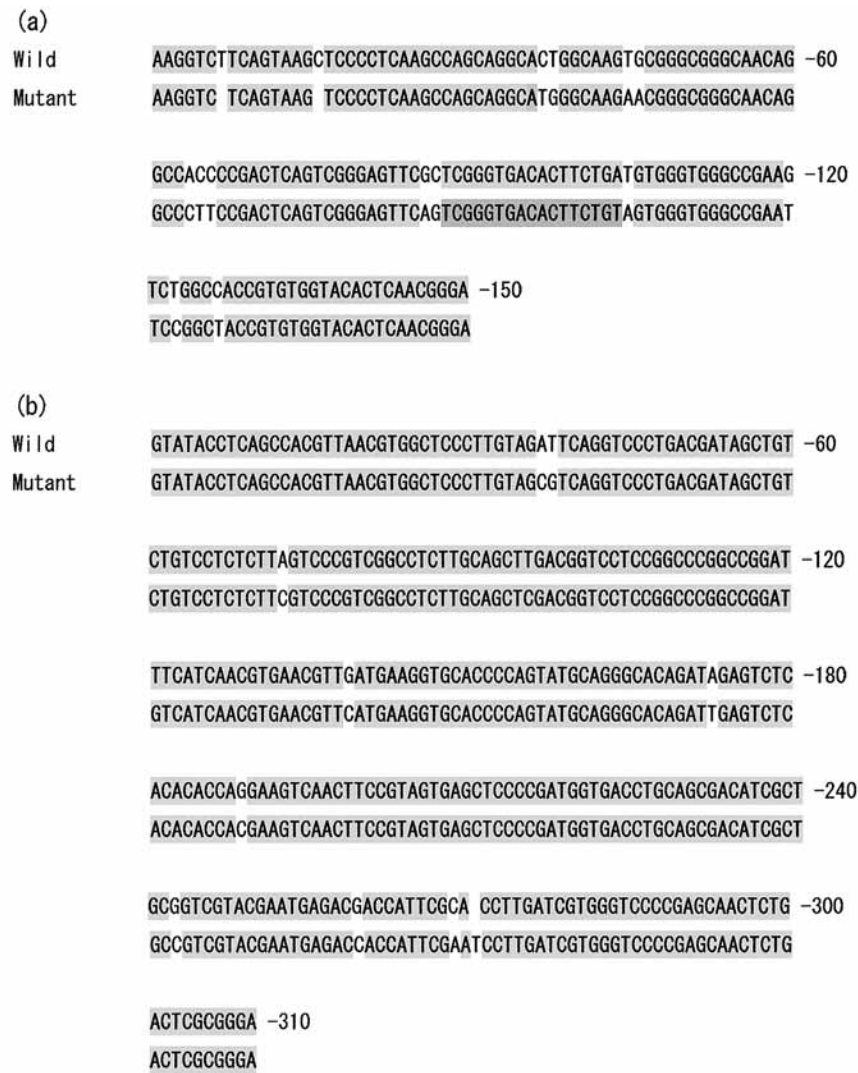


Fig. 1. Nucleotide sequences of the A-12-1.2-w and C-20-0.8-m regions in the genomes of wild and mutant strains.
 (a): A-12-1.2-w region, (b): C-20-0.8-m region. Shaded areas indicate homologous nucleotides in the alignments. Numbers indicate nucleotide positions.

(a)

wild	ACCAAGTCAGGTCCAACCTCGGGTGACGCTACCAATCAAGGGCGAATTCAGCACAAGTGGC -60
Mutant	ACCAAGTCAGGTCCAACCTCGGGTGACGCTACCAATCAAGGGCGAATTCAGCACAAGTGGC
	GGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT -120
	GGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
	TTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA -180
	TTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA
	AGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC -240
	AGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC
	TGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCG -300
	TGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCG
	CGGGGAGAGGCGGTTTGCATTGGGCGCTC -331
	CGGGGAGAGGCGGTTTGCATTGGGCGCTC

(b)

wild	GATTGGTAGCGTCACCCGAGTTGGACCTGACTTGGTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCA -60
Mutant	GATTGGTAGCGTCACCCGAGTTGGACCTGACTTGGTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCA
	TCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG -120
	TCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG
	TATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACC -180
	TATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACC
	CAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC -240
	CAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC
	CGCACCAGTCCGCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTA -300
	CGCACCAGTCCGCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTA
	GCGGCGCATT AAGCGCGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG CGTGACCCT ACACTTGCCA -360
	GCGGCGCATT AAGCGCGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG CGTGACCCT ACACTTGCCA
	GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGCTTCT TCCCTCCTT TCTCGCTACG TTCGCCGGCT -420
	GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGCTTCT TCCCTCCTT TCTCGCTACG TTCGCCGGCT
	TTCCCGTCA AGCTCTAAAT CGGGGGCTTC -450
	TTCCCGTCA AGCTCTAAAT CGGGGGCTTC

Fig. 2. Nucleotide sequences of the A-11-0.4-m and A-16-0.7-m regions in the genomes of wild and mutant strains.

(a): A-11-0.4-m region, (b): A-16-0.7-m region. Shaded areas indicate homologous nucleotides in the alignments. Numbers indicate nucleotide positions.

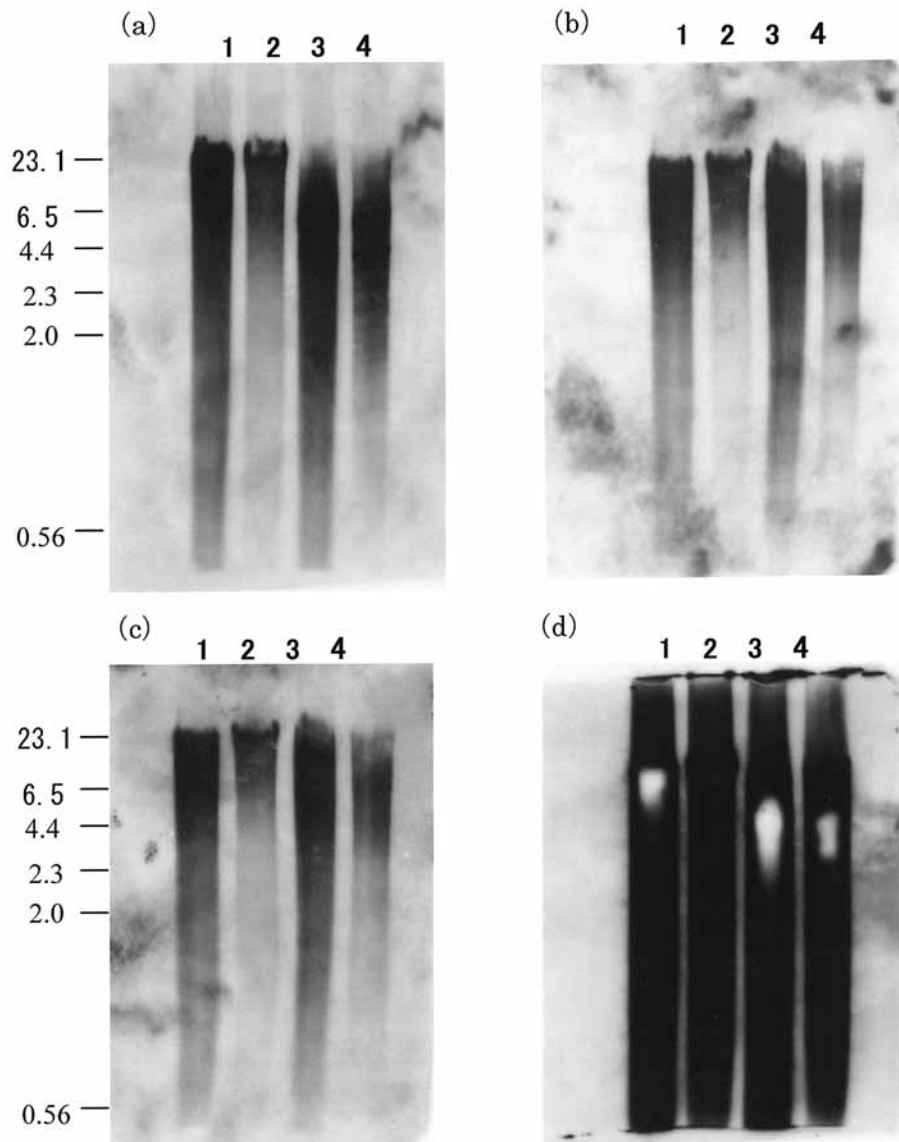


Fig. 3. Southern-blot analysis of genomic DNA with four DNA fragments specific for the wild or the mutant strains as probes.

The numbers above lanes indicate DNA from wild (lane 1 and 3) and mutant (lane 2 and 4) strains. The genomic DNA was digested by *Eco*R I (lane 1 and 2) or *Bam*H I (lane 3 and 4) and coelectrophoresed. Southern hybridization was carried out with A-11-0.4-m (a), A-12-1.2-w (b), A-16-0.7-m (c) and C-20-0.8-m (d) fragments as probes by reprobings of the same DNA filter. The size of the DNA standard is indicated in Kb on the left sides.

ブすべてにおいてハイブリダイゼーションシグナルがDNA全域に散在して見られ、特に、C-20-0.8-m領域DNAプローブとのハイブリダイゼーションでは極めて強いシグナルの散在が観察された。また、Fig. 3に示した実験では、野生型株および緑色突然変異株間で等量の全DNAを用いたが、C-20-0.8-m領域プローブの場合を除き、ハイブリダイゼーションシグナルは変異株に比べ野生株の方に幾分強く観察された。

3.3 変異領域塩基配列とレトロトランスポゾンの類似性

先の論文⁷⁾で、変異領域A-11-0.4-mおよびA-16-0.7-mと類似な遺伝子として被子植物レトロトランスポゾンが検索されたことを報告した。Fig. 4にはA-11-0.4-m領域と *Cicer arietium* (ヒヨコマメの1種) (AJ535749) レトロトランスポゾンRTドメインの塩基配列、また、Fig. 5にはA-16-0.7-m領域と *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ

A-11-0.4-m AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT -60
Cicer arietinum AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT

CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC -120
 CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC

TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC -180
 TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC

CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAG -216
 CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAG

Fig. 4. Comparison of nucleotide sequences between the A-11-0.4-m region of *P.yezoensis* genome and the *Cicer arietinum* retrotransposon. Shaded areas indicate homologous nucleotides in the alignments. Numbers indicate nucleotide positions

A-16-0.7-m AATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC -60
Arabidopsis AATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC

TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGAC -103
 TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGAC

Fig. 5. Comparison of nucleotide sequences between the A-16-0.7-m region of *P.yezoensis* genome and the *Arabidopsis thaliana* transposon. Shaded areas indicate homologous nucleotides in the alignments. Numbers indicate nucleotide positions.

の1種) (AC007018) レトロトランスポゾンRTドメインの塩基配列を比較した。これらの領域ではそれぞれ約220塩基および100塩基について比較したが、いずれもそれぞれのレトロトランスポゾンに100%の塩基類似性を示した。

4 考 察

A-12-1.2-wおよびC-20-0.8-m領域では約150~310塩基の中で10~15個の塩基が変異していた。これらの変異は突然変異として特異な形質等の変異に関与している変異か、あるいは、スサビノリ野生型株間に見られる塩基レベルの変異、即ち、DNA多型^{11,12)}の範囲に入る変異なのかは不明である。今後は、多くの野生株でA-12-1.2-wおよびC-20-0.8-m領域の塩基配列を解析して、この領域におけるDNA多型を明らかにし、本研究で解析した変異と比較することが必要である。

A-11-0.4-mおよびA-16-0.7-m領域には塩基の変異が全く検出されなかった。これらの領域は、RAPD解析において野生型株および突然変異型株間でバンドパターンの違いが観察された領域である⁷⁾。Fig. 2に示した結果から、これらのパターンの違いは塩基の置換など塩基変異によって生じたものでなく、これらの領域のゲノム上での反復頻度の違いによるものと推察された。

変異領域にある塩基配列 (DNA断片) のゲノム上での量的変異を調べたところ、4領域にある塩基配列 (または類似の配列) はすべてゲノム上に散在していることが示唆された。特に、C-20-0.8-m領域に見られたDNA配列は極めて高度にゲノム上に散在していることが示唆された。また、Fig. 3に示した結果から、C-20-0.8-m領域DNAについてははっきりしなかったが、他の領域のDNA (あるいは、それらに類似したDNA) 配列については、いずれも野生型株および緑色突然変異型株間でゲノム上での反復頻度に

差異があることが示唆された。しかし、Fig. 3 に示したサザンハイブリダイゼーション実験では、野生型株および緑色突然変異型株間で等量のDNA量を用いたものの、標準となる遺伝子を用いたDNAの定量実験を行っていない。そのため、反復頻度の量的差異については今後さらに精査が必要に思われた。

2つの変異領域で解析されたDNA配列は高等植物レトロトランスポゾンと全く同じ塩基配列を含んでいた。このことから、これら領域のDNAはレトロトランスポゾン（の1部）と考えられた。体制、細胞内構造、生活環等が高等緑色植物とは著しく異なり、また、進化学上最も下等で未分化な紅藻類にあっても、突然変異にレトロトランスポゾンが大きく関わり、高等緑色植物と同様の塩基配列と機能を持っていることは大変興味深いことであった。また、A-12-1.2-wおよびC-20-0.8-m領域のDNA配列は、Fig. 3 に示したサザンハイブリダイゼーション実験において多コピーの存在が示唆されたにもかかわらず、これらと相同な高等植物レトロトランスポゾンが検索されなかった。このことから、A-12-1.2-wおよびC-20-0.8-m領域DNA配列は紅藻類あるいはスサビノリに特異なトランスポゾン（あるいは、それらの1部）の可能性もあり、これらDNA領域の広範で詳細な構造解析に興味をもたれた。

謝 辞

養殖アマノリ（品種佐賀5号）および緑色変異型株（ナラワスサビミドリメ）の葉状体および糸状体をご提供いただいた佐賀県有明水産センターの川村嘉応博士ならびに横尾一成、三根崇幸の各氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 川村嘉応：平成12年度佐賀県有明海のノリ不作と珪藻の大増殖。海苔と海藻, 62, 1-12 (2001).
- 2) 藤井弘治：有明海減産の影響, 海苔と海藻, 62, 13-16 (2001).
- 3) 地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業（水産業関係）, 成果概要. 水産庁研究部研究課 (1996).
- 4) 先端技術等地域実用化研究促進事業, 成果概要. 農林水産省技術会議事務局, (2002).
- 5) 平成17年度先端技術を活用した有明ノリ養殖業強化対策研究委託事業, 技術開発推進委員会資料. 水産総合研究センター中央水産研究所 (2005).
- 6) 鶴飼保雄：植物育種学, 東京大学出版会 (2003).
- 7) 水上 譲, 川崎武仁, 村瀬 昇, 國本正彦：養殖スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) の緑色突然変異株における変異遺伝子の検索. 水産大学校研究報告, 54, 181-188 (2006).
- 8) 三浦昭雄：ノリの色彩の変異体と色彩の遺伝. 遺伝, 32, 11-16 (1978).
- 9) 三浦昭雄, 国藤恭正：スサビノリの色彩変異型の遺伝子分析. 遺伝, 34, 14-20 (1980).
- 10) Miura: Present trends and perspective in *Porphyra* (Nori) breeding. Genetics of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* development origin of variegated gametophytic thalli. *Suisan Ikushu*, 15, 19-30 (1990).
- 11) Y. Mizukami, Y. Kaminisi, M. Kunimoto, M. Kobayashi, N. Murase, and H. Kito: Comparison of partial nucleotide sequence in the exonic region of a small subunit ribosomal RNA gene for discrimination of laver (*Porphyra*) species and cultivars. *Fisheries Sci.*, 64, 886-891 (1998).
- 12) Y. Mizukami, K. Kito, Y. Kaminisi, N. Murase, and M. Kunimoto: Nucleotide sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacer regions of cultivated (cultivars) and field-collected thalli of *Porphyra yezoensis*. *Fisheries Sci.*, 65, 788-789 (1999).