

Graduate School of Advanced Science and Engineering
Waseda University

博士論文審査報告書

論文題目

Comprehensive Analysis of Homoeolog
Expression Bias in Allopolyploid Diatom
Fistulifera solaris JPCC DA0580

異質倍数性珪藻

Fistulifera solaris JPCC DA0580 株の
ホメオロガス遺伝子発現の網羅的解析

申請者

Tatsuhiko	NOMAGUCHI
野間口	達洋

Department of Advanced Science and Engineering,
Research on Life Science and Medical Bioscience

October, 2018

1. 論文内容の要旨

異質倍数性(Allopolyploidy)は、異種交配によって発生する「異なる生物由来のゲノムを個体内に複数共存させたゲノム構造」である。異質倍数性ゲノムを持つ生物(異質倍数体)はその祖先種と比べ、サイズが大きい、成長が早い、環境適応能力が高いなどの報告がされており、工業・農業利用される生物において有益となる可能性が過去の研究で示唆されている。しかし、異質倍数体の研究はほとんどが高等植物のものであり、近年、工業利用が期待されている微細藻類での研究例は存在しない。これまで、田中らのグループは、バイオディーゼル燃料の生産ホストとして期待できる高脂質蓄積藻類 *Fistulifera solaris* JPC DA0580 を見出し、この株が脂質を多量に蓄積する他、他種では見られない「対数増殖期に脂質を並行して蓄積する」形質を持つことを報告した。また、ゲノムシーケンスにより、この株がこれまでに報告のない異質倍数性の藻類であることを示した。しかし、これまでは祖先から引き継がれた2つの祖先ゲノムが分離できておらず、*F. solaris* の異質倍数性と形質の関連性に関する研究は進展がなかった。本研究では、*F. solaris* の異質倍数性と脂質蓄積性の形質との関連性を解読することを目的として、ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析に取り組んだ。

まず、*F. solaris* のゲノムを2つの祖先由来ゲノム(サブゲノム)に分離するため、配列解析を実施した。生物種間ではGC含量やコドン使用傾向に違いがあることに着目し、*F. solaris* のゲノムに9,007個存在するホメオロガス遺伝子(交雑親種から引き継いだ位置・機能の類似した遺伝子)の配列を比較した結果、2つのサブゲノム(Fso_hとFso_lと呼称)に分離することに成功した。これにより、各祖先由来の遺伝子発現が比較できるようになったことに加え、祖先のゲノム情報を用いずに異質倍数性ゲノムをサブゲノムへ分離する解析手法を提案した。

次に、各サブゲノム由来のホメオロガス遺伝子の発現をトランスクリプトーム解析により比較した。過去の研究で、異質倍数体では一方のホメオロガス遺伝子がより多く発現する Homoeolog expression bias が起き、特定の祖先由来の遺伝子が偏って多く発現することが示唆されている。*F. solaris* においても、Homoeolog expression bias が発現レベルの高い遺伝子群で起きており、Fso_h由来の遺伝子がより多く発現する傾向にあること、またプロモーター配列がその偏りに関与している可能性が示唆された。さらに、脂質代謝系においては生産系はFso_l由来の遺伝子が、分解系ではFso_h由来の遺伝子がより寄与しているという、これまでに報告例のない「特定代謝経路で2つのサブゲノムが逆方向にそれぞれ寄与」していることを見出した。さらに脂質分解系に関しては、脂質の主成分であるトリアシルグリセロール(TAG)を分解するTAG lipaseを新たに同定し、その発現の偏りを脂質分解を促進した条件下でのトランスクリプトーム解析の結果、前述と同様にFso_hに偏って発現していることを確認した。これらの結果から、異質倍数性である*F. solaris*は、他の藻類では抑制される「脂質蓄積中の脂質分解系」が2つのサブゲノムが共存していることで活性化し、結果として増殖に必要なエネルギーを供給することで、増殖中に並行して脂質蓄積が可能という形質を獲得した可能性を示唆した。これらの結果は、地球上で最も多様に進化した微細藻類という生物の進化に関して新たな知見を提供すると同時に、工業利用に期待されている微細藻類において、異質倍数性が物質生産性の向上に有効である可能性を示唆した。

2. 主な質疑応答内容

2018年8月6日に行われた公聴会では、論文内容の説明と質疑応答が行われた。以下にその概要を報告する。

- (1) 研究の展望で異質倍数性を用いた物質生産性向上を挙げたが、実際に生産性向上を実現するために必要な研究は何か、本研究で得た知見から即座に実現が可能なのかという質問に対し、本研究はあくまで基礎研究であり、実際に工業応用するまでにはいくつかの研究・実証が必要であるという説明があった。具体的には、*F. solaris* のゲノム情報をロングリードが獲得できる次世代シー

ケンサーなどを用いてより正確にすること、またトランスクリプトーム情報を増やして発現ネットワーク解析などを実施し、ホメオロガス遺伝子が相互的にどのように関わっているかを示していくことを必要な研究として挙げた。また、ゲノム情報の精度を上げることで、未発見遺伝子の探索や、今は確度が比較的低い短い染色体のサブゲノム分離がより確実になると説明があった。

- (2) 異質倍数性の微細藻類がこれまでほとんど研究されてこなかったことに関して、何か技術的な障壁があったのかという質問に対して、そもそも微細藻類ではゲノムを読まれている種が 6 種と非常に少なく、異質倍数性の生物が見つかっていなかったこと、その中で偶然にも *F. solaris* が異質倍数性を有していたとの説明があった。また人工的に異質倍数性を作る異種交配も、微細藻類においては報告が一報しかなく、実用化には今後多方面からの研究が必要であるとの説明があった。
- (3) Homoeolog expression bias の評価に「一方の遺伝子が対の遺伝子の 2 倍以上のレベルで発現している」という基準を用いていたが、これが今回の報告にある形質を説明する上で妥当であるか、という質問に対して、この基準は過去の研究でも用いられた基準を参考に設定し、その上で 1.5 倍や 3 倍などの基準で同様の解析も実施したが、結論に変わりはないという説明があった。また、この「2 倍」という基準は、あくまで発現の偏りの有無を示すための指標であり、発現量の差と形質の定量的な関連性は未解明であり、今後、解析が必要だという説明があった。
- (4) *F. solaris* の増殖と脂質蓄積に関して論じる際に、藻体のおかれている環境（培地の状態）に関して見ていないのか、またその環境変化に対する感受性は他種と比べてどうかという質問に対し、*F. solaris* の場合は脂質蓄積が急激に始まる培養開始後 48 時間で窒素が培地内で枯渇すること、また、この窒素枯渇が直接的に Homoeolog expression bias に関与しているかは今回のプロモーター配列では該当するモチーフが発見されておらず、今後、解析の必要があるとの説明があった。また、環境因子への感受性に関しては多種との比較は現在の研究では情報が不足し、検証には段階的に濃度を変えた組成の培地での実験などが今後必要になってくるとの説明があった。
- (5) 今回のトランスクリプトーム解析で使用した脂質蓄積中の 3 点のタイムポイントは何を基準に選択したのかという質問に対し、今回の解析では脂質蓄積が急速に始まるタイミング(48h)、蓄積が進行しているタイミング(96h)、蓄積が収まったタイミング(144h)の 3 点を調査することで、蓄積中の発現系を広く解析したとの説明があった。
- (6) 自然環境下で *F. solaris* は脂質を蓄積していると思うか、また進化的にこのような形質を何故会得したのかという点を知るためには、もっと多くの条件下でトランスクリプトーム解析を実施し、かつ可能であれば祖先種の解析をしたほうが良いというコメントがあった。その点に関して、祖先を獲得する以外には、ゲノム工学で一方のサブゲノムを特異的に機能抑制することでも知見は得られるが、現状の藻類のゲノム工学技術では非常に困難であるとの考察を述べた。
- (7) 今回の解析では統計的な数字の違いがあるとはいえ、多少考察が恣意的に脂質関連に偏っていないか、もっと光合成や糖代謝に関する考察はしないのかという質問に対し、糖代謝に関しても解析を実施したが、代謝反応の中で脂質代謝ほど明確な発現の差や、発現の差が明確な反応系・細胞内局在が見当たらなかったことの説明があった。

以上の研究内容の説明と質疑応答を通して、申請者が研究の意義と目的を理解し、本学問領域において十分な学識と考察力を備えていると判断する。

本研究は微細藻類における異質倍数性とその形質の関連性について報告した初めての研究であり、異質倍数性の形質への影響に関する知見を提供すると同時に、未知の祖先によって発生した異質倍数体の研究に必要な解析手法を提案したという点で学術的意義の高い研究成果であると云える。また、物質生産性向上に関連する形質への影響という研究観点から工業的な意義も高いことから、主査および副査は博士（理学）の学位論文として相応しいと認める。

2018年9月

審査員

(主査) 早稲田大学教授

博士(理学)

早稲田大学

朝日 透

署名

早稲田大学教授

博士(工学)

東京農工大学

竹山 春子

署名

東京農工大学教授

博士(工学)

東京農工大学

田中 剛

署名

太平洋セメント株式会社
中央研究所第3研究部長

博士(工学)

東京農工大学

高野 博幸

署名
