

比較トランスクリプトーム解析に基づく ヒカリモの浮遊メカニズムの解明

前田 義昌
筑波大学 生命環境系

研究の目的

微細藻類は高い光合成活性により CO_2 を固定し、様々な有用物質へ変換できる。特に来るべき脱炭素社会において、オメガ 3 脂肪酸生産による魚介類養殖業やバイオ燃料生産の観点から、発酵産業をはじめとする応用微生物学分野から高い期待を寄せられている。一方で、微細藻類による有用物質生産バイオプロセスにおいて、コストや CO_2 収支、エネルギー収支の面において最も問題となっているのは、微細藻類の細胞を培養液から回収するプロセスであることはあまり知られていない。一般的に微細藻類の培養液は細菌や酵母の培養液と比較して、細胞濃度が低い。そのため、培養液から遠心分離で細胞を回収する際に多大なコストとエネルギー消費を要する。この細胞回収プロセスの困難さが、微細藻類バイオ産業の普及を妨げている一因といっても過言ではない。本研究では、水面に浮遊するという特殊な性質を持つヒカリモという微細藻類（黄金色藻）（図 1）に着目し、その浮遊メカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。細胞が水面で自発的に濃縮されれば、回収が容易になることから、微細藻類バイオ産業普及のボトルネックである細胞回収コストを劇的に低減できると期待される。



図 1 水面に浮遊し、黄金色に輝くヒカリモ（茨城県日立市で撮影）

方法

ヒカリモのゲノム解読

ヒカリモの単離株 3 株（SH01 株、SH02 株、SH03 株）を淡水微細藻類培養に広く用いられる AF-6 培地で培養した。得られた各株の細胞から、Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 法により DNA を抽出した。抽出した DNA を、PacBio Revio によるロングリードシーケンシングに供し、得られたリード配列をアセンブリングした。下記の方法で得られた SH02 株のトランスクリプトーム情報を基に、Funannotate により遺伝子予測を行った。さらに、SH02 株の予測遺伝子情報を基に、BRAKER により SH01 株、SH03 株の遺伝子予測を行った。

ヒカリモのトランスクリプトーム解読

SH02 株の培養細胞（遊泳細胞）に Trizol を加え、攪拌した。その後、クロロホルムを添加し、遠心分離して得られた上清を NucleoSpin® RNA キットを用いて精製した。また、SH01 株を単離した茨城県日立市東滑川ヒカリモ公園から、ヒカリモの浮遊細胞を回収し、セルストレーナーを用いて大きなゴミなどを除去した後に、RNA later™ Stabilization Solution に浸漬して筑波大学まで移動した。その後、上記と同様の方法で RNA を抽出した。なお、ヒカリモの採集は、日立市役所の許可を得て行った。

結果

ヒカリモの高精度なゲノム情報の取得

ヒカリモ 3 株のゲノム情報を取得し、遺伝子予測を行った。その結果、3 株のゲノム情報は、ゲノムサイズ、遺伝子数、配列類似性の全ての観点からよく似ていた。これは、過去に行われた系統分類学研究の結果とよく一致した。遺伝子予測の完全性を評価する BUSCO 解析を実施したところ、他の黄金色藻のゲノム解析を行った先行研究¹⁾と比較しても十分に高い値を示した。また、ヒカリモがもつ予測遺伝子から、代謝経路を再構築したところ、ヒカリモから検出される光合成色素や脂肪酸の組成と矛盾しない代謝経路をもつことが示された。以上のことから、ヒカリモゲノムに含まれる遺伝子をおおよそ特定できたと結論づけた。下記のトランスクリプトーム解析を実施する際に、ここで予測した遺伝子配列を利用した。

ヒカリモの遊泳細胞と浮遊細胞の比較トランスクリプトーム

培養液の化学組成や物理的条件を変更することでヒカリモの培養条件を最適化し、細胞濃度を飛躍的に高めることに成功した。しかし、培養液中のほとんどの細胞は遊泳細胞であり、浮遊細胞はごく一部にとどまった。ヒカリモの水面浮遊メカニズム解明ためには、浮遊細胞から十分な量の RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析に供する必要があった。

そこで、天然環境で浮遊するヒカリモの細胞を採取し、RNA 抽出を試みた。茨城県日立市東滑川ヒカリモ公園では、年間を通して水面に浮遊するヒカリモを観察することができる（図 1）。その浮遊細胞をスライドガラスで回収し、RNA 抽出に供した。その結果、14.7 µg の RNA を獲得できた。また、培養した遊泳細胞からも RNA を抽出し、13.0 µg の RNA を獲得した。いずれのサンプルからもトランスクリプトーム解析に十分な RNA サンプル（表 1）を獲得できたため、次世代シーケンサーを用いて配列データを取得し、ゲノム情報にマッピングした。

表 1 浮遊細胞と遊泳細胞からの RNA 抽出

	濃度 (ng/μl)	収量 (μg)	A260/280	A260/230
浮遊細胞	488.5	14.4	2.22	2.28
遊泳細胞	434.4	13.0	2.28	2.53

天然環境で浮遊する細胞と、培養環境での遊泳細胞で得られたトランスクリプトームデータを比較したところ、浮遊細胞細胞において、細胞分裂や細胞分化に関連する機能ドメインをもつタンパク質をコードする遺伝子群が高発現していることが確認された。先行研究において、ヒカリモが水面に浮遊する際に細胞の形態を変化させ、『柄』と呼ばれる構造体を形成することが報告されている^{2,3)}が、細胞形態の劇的な変化に関与する遺伝子の特定は行われていなかった。本研究で、浮遊細胞において高発現していることが見出された遺伝子群が、その細胞形態変化に関与している可能性が示唆された。

今後、ヒカリモの遺伝子組換え技術を確認し、本研究で水面浮遊性への関与が示唆された遺伝子をノックダウン、もしくはノックアウトし、細胞の表現型がどのように変化するかを確認することにより、ヒカリモの水面浮遊性メカニズムをより詳細に特定できるものと期待される。

結論

本研究では、水面浮遊性微細藻類（黄金色藻）ヒカリモのゲノム情報を取得し、トランスクリプトーム解析に必要な遺伝子予測を行った。その後、培養した遊泳細胞と、天然環境から採取した浮遊細胞から RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、細胞分裂や細胞分化に関与する機能ドメインをもつタンパク質をコードする遺伝子群が高発現していることを見出した。これらの遺伝子群が、遊泳細胞から浮遊細胞へと移行する際の細胞形態変化に関与する可能性が示唆された。今後、ヒカリモの遺伝子組換え技術の確立により、より詳細な水面浮遊メカニズム解明を推進する予定である。

文献

- 1) Majda, S., Beisser, D., Boenigk, J., (2021) Nutrient-driven genome evolution revealed by comparative genomics of chrysomonad flagellates. *Commun. Biol.* **4**: 328
- 2) Karin Petry, W., (1968) Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an *Chromophyton rosanoffii* und einigen Chlorophyceen *Osterr. Bot. Z.* **115**: 447-481
- 3) 野水美奈, (2007), 水表面性黄金色藻 *Chromophyton rosanoffii* (ヒカリモ) に見られる光反射の研究. 筑波大学修士論文