

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14804

研究課題名(和文)珪藻感染性ウイルスに由来する超高発現型新奇プロモーターの分離

研究課題名(英文) Isolation of of marine diatom-infecting virus promoters in the marine diatoms

研究代表者

足立 真佐雄 (Adachi, Masao)

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・教授

研究者番号：70274363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：海産珪藻を用いた有用物質生産が期待されている。生産効率の向上には遺伝子組換え技術の利用が有効であり、有用遺伝子に連結して強力的に働くプロモーターの開発が重要である。本研究では、海産珪藻に感染するウイルスに注目し、ウイルスゲノムのプロモーター領域を推定し、海産珪藻においてその導入遺伝子の転写誘導活性を評価した。海産珪藻の形質転換において頻用されている内在性プロモーターよりも転写誘導活性が高く、恒常的に機能する世界初の珪藻感染ウイルス由来プロモーターが得られた。

研究成果の概要(英文)：Transformation of diatom may enable us to solve the limitations in the mass production of beneficial chemicals for use in human activities. Promoter activity is important in genetic engineering. Thus, in this study, potential promoter regions were isolated from several marine diatom-infecting viruses (DIVs). DIV promoter-driving gene expression capacities in the Pennales diatom *Phaeodactylum tricornutum* were evaluated and compared to those of the endogenous promoter. We then examined the effects of the growth stage, the nutrient concentrations in media, and the photoperiods on viral promoter activity were investigated. Compared to diatom endogenous promoters, novel DIV promoter mediate a significantly higher degree of reporter transcription. Stable expression levels were observed in transformants grown under both light and dark conditions. This is the first report describing a promoter of DIVs that may be of use in basic and applied diatom research.

研究分野：海洋微生物学

キーワード：珪藻 プロモーター 形質転換

### 1. 研究開始当初の背景

日本の海域・領海は世界で6番目の広さを有しており、国土や資源の限られた日本においては、海洋生物資源の利用は、重要なテーマとなっている。この広い海域には、微細藻類が生息しており、中でも海産珪藻は、推定2万種以上から構成され、海洋の炭素固定の約20%を担う一大生物群を形成している。海産珪藻を含めた微細藻類は、医薬品、化成品、バイオ燃料等の原料となる有用物質を生産することが知られている。海産珪藻は光合成を行うことから、培養によりCO<sub>2</sub>排出削減が見込めること、また広い海洋スペースを培養に利用できることから陸上の食料生産と競合しない有用物質の生産が可能となり生物資源として大きな期待が持たれている。

海産珪藻を用いた低コスト、かつ高品質な有用物質生産の実現には、遺伝子組換え技術により珪藻の有用物質の生産能を高めることが有効だと考えられ、数種の海産珪藻において、遺伝子組換え技術が確立されている。遺伝子組換えでは、珪藻から得られた内在性のプロモーター、フコキサンチン-クロロフィル a/c 結合タンパク質(以下、FCPと省略)の遺伝子のプロモーターや硝酸還元酵素の遺伝子のプロモーターが利用されている。しかし、導入遺伝子の発現誘導活性が低いといった問題が報告されている。

動物や植物の幅広い種の形質転換において、ウイルスプロモーターが利用されており、導入遺伝子の発現が高く、かつ恒常的に発現誘導が可能となっている。例として、植物においては、カリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーター(以下、CaMV pro.と省略)が、動物においては、サイトメガロウイルス由来の最初期遺伝子のプロモーター(以下、CMV pro.と省略)が用いられている。海産珪藻の形質転換において、これらの動植物に感染するウイルス由来のプロモーターが用いられた報告があるが、動植物に感染するウイルス由来のプロモーターは、遺伝子の発現誘導活性が低い、または発現誘導活性能力が無いと考えられる。

近年、海産珪藻に感染するDNAウイルスやRNAウイルスが報告されている。これら珪藻感染ウイルスは、種特異性の高い感染能に加えて、珪藻細胞内における増殖能、および溶藻活性を有しており、*in silico*による解析から、そのゲノム配列上に複数のオープンリーディングフレーム(Open Reading Frame, ORF)が見いだされ、複製関連タンパク質(VP3)の遺伝子、構造タンパク質(VP2)の遺伝子、および機能未知のタンパク質の遺伝子がコードされていると考えられている。

### 2. 研究の目的

遺伝子組換え海産珪藻による有用物質の生産効率向上を目的に有用遺伝子に連結し

て強力に働くプロモーターを開発する。前述の珪藻に感染するウイルスに注目し、VP3、およびVP2の発現に関与すると考えられるウイルス由来のプロモーターを単離し、それらの活性評価を羽状類 *Phaeodactylum tricornutum* を用いて行い、高発現型新奇プロモーターの単離を試みた。

また、海産珪藻による有用物質の生産を行うにあたり、恒常的な遺伝子発現による連続した生産が行えることが望ましいと考えられる。そのためには、プロモーターによる導入遺伝子発現の発現誘導が恒常的に行われる必要があるため、ウイルス由来のプロモーターの遺伝子発現誘導に与える栄養塩類と増殖段階、および日周期の影響を調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウイルスのプロモーター領域の推定と単離

本研究で用いたウイルス由来のプロモーターを表1にまとめている。珪藻感染ウイルスのVP3とVP2、それぞれのORFの上流、約500塩基を珪藻感染ウイルス由来のプロモーター領域とし、PCRにより増幅し、単離した。また、比較対象として、*P. tricornutum*の形質転換において幅広く用いられている2種類の内在性プロモーター(*P. tricornutum*由来のFCPA遺伝子のプロモーター、以下PtfcpA pro.と省略、および*Cylindrotheca fusiformis*由来の硝酸還元酵素遺伝子のプロモーター、以下Cfnr pro.と省略)、動物や植物の形質転換において用いられているウイルス由来プロモーター(CaMV pro.とCMV pro.)および植物において幅広く用いられているノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター(以下、nos pro.と省略)を評価に用いた。

表1. 評価に用いたプロモーター

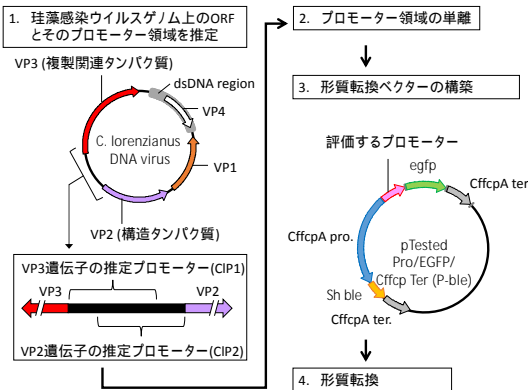
プロモーター	由来
CdP1	Chaetoceros debilis DNA virus複製関連遺伝子
CIP1	Chaetoceros lorenzianus DNA virus複製関連遺伝子
CIP2	Chaetoceros lorenzianus DNA virus構造タンパク質の遺伝子
TnP1	Thalassionema nitzschioides DNA virus複製関連遺伝子
TnP2	T. nitzschioides DNA virus構造タンパク質の遺伝子
CaMV pro.	リフラワーマザイクウイルス35S
CMV pro.	サイトメガロウイルス最初期遺伝子
nos pro.	Agrobacterium tumefaciensノパリン合成酵素の遺伝子
PtfcpA pro.	<i>P. tricornutum</i> フコキサンチン-クロロフィルa/c結合タンパク質の遺伝子
Cfnr pro.	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> 硝酸還元酵素の遺伝子

#### (2) プロモーター活性の評価

図1に示した概要に従ってプロモーター活性の評価を行った。本研究では、形質転換体の選別のための羽状類由来の内在性プロモーター(FCP遺伝子のプロモーター)と連結された抗生物質耐性遺伝子 *Sh ble* が組み込まれているベクターに対して、評価を行うプロモーターと連結したレポーター遺伝子

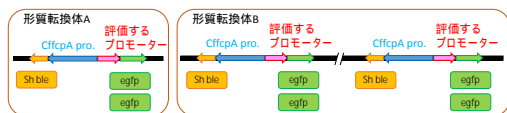
(enhanced green fluorescent protein の遺伝子, *egfp*) を組み込んだベクターを構築した。導入遺伝子は、挿入されたゲノム上のコピー数により、その発現が影響を受ける。また、挿入されたゲノム上の位置による発現への影響(位置効果)が知られている。導入遺伝子のゲノム上のコピー数の影響を抑えるため、*Sh ble* の発現量に対する *egfp* の相対発現量をプロモーター活性の指標に用いた。ゲノミック PCR により *Sh ble* と *egfp* の両遺伝子の組換えが確認されたクローンを用いて、qRT-PCR を行い、それぞれの発現量を求めた。また、位置効果によるプロモーター活性の変動を抑えるため、評価する各プロモーターを導入した形質転換体について、それぞれ 10 クローンを用い (Cfnr pro. については 6 クローン) 統計的な解析によって、より正確なプロモーター活性の評価を試みた。

#### 形質転換体の獲得



#### 形質転換体の解析

- ゲノミックPCRを用いたP. tricornutumゲノムへの導入遺伝子の挿入の確認
- qRT-PCRを用いた*egfp*と*Sh ble*の発現量の解析



複数の形質転換体クローンにおいて*egfp*の発現量を*Sh ble*の発現量で除することで、導入遺伝子の多コピーが*egfp*発現量に与える影響を最小限にする(例:形質転換体B)。

図1. プロモーター評価方法の概略

### (3) ウイルス由来プロモーターの遺伝子発現誘導に与える栄養塩類と増殖段階、および日周期の影響

ウイルス由来のプロモーターの活性に対する栄養塩類の影響について栄養塩類が通常の培地 (*f/2* 培地) の 5 分の 1 の *f/10* 培地で培養することで調べた。また、増殖期と定常期におけるプロモーター活性を調べ、定常期においては日周期の影響を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) プロモーター活性評価

図2は、各プロモーターのそれぞれの形質転換体クローンにおける *Sh ble* の発現量に対する *egfp* の相対発現量 (○) と平均値 (◆) を示したグラフである。図中のアスタリスク

は、内在性の *PtfcfpA pro.* とそれぞれのプロモーターとの間に有意差がみられたことを示す (*t* 検定,  $**P < 0.01$  と  $*P < 0.05$ )。 *PtfcfpA pro.* に対して、プロモーターを有しない *pro. less.*、内在性プロモーター *Cfnr pro.*、珪藻感染ウイルス由来プロモーター *TnP1* と *TnP2*、および他の外来のプロモーター (*CaMV pro.*、*CMV pro.*、および *nos pro.*) のプロモーター活性は、有意に低い活性を示した。 *CdP1* と *CIP2* の活性は、 *PtfcfpA pro.* の活性と有意差が見られなかった。 *CIP1* の活性は、 *PtfcfpA pro.* の活性に対して有意に高い値であり、約 5 倍を示したことから、高い遺伝子発現誘導活性を有するウイルス由来プロモーターが得られたと考えられる。

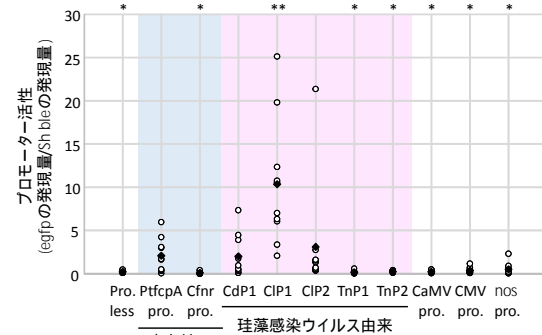


図2. プロモーター活性の比較

### (2) *CIP1* の遺伝子発現誘導に与える栄養塩類と増殖段階、および日周期の影響

*CIP1* を有する形質転換体 2 クローンを用いて調べた。図3は、内部標準遺伝子 (30S ribosomal protein subunit の遺伝子) に対する *egfp* の相対発現量を示す。増殖段階に注目すると、両クローン共に増殖期よりも定常期において、プロモーター活性の高いことが明らかとなった。そして、定常期において日周期の影響を受けない傾向がみられた。また、栄養塩の影響では、貧栄養塩類培地 (*f/10* 培地) においても通常の培地 (*f/2* 培地) と同程度の活性を示した。これらのことから、海産珪藻を用いた有用物質生産を行うにあたり、*CIP1* を活用した形質転換が有効であることが示唆された。

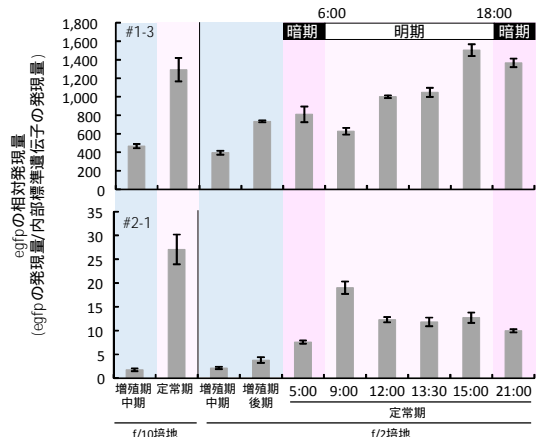


図3. プロモーター活性における栄養塩、増殖段階、および日周期の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

T. Kadono, A. Miyagawa-Yamaguchi, N. Kira, Y. Tomaru, T. Okami, T. Yoshimatsu, L. Hou, T. Ohama, K. Fukunaga, M. Okauchi, H. Yamaguchi, K. Ohnishi, A. Falciatore, and M. Adachi 'Characterization of marine diatom-infecting virus promoters in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*', Scientific Reports, 5, 18708 (2015).

N. Kira, K. Ohnishi, A. Miyagawa-Yamaguchi, T. Kadono, and M. Adachi 'Nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* using PCR-amplified DNA fragments by microparticle bombardment', Marine Genomics, 25, 49-56 (2016).

〔学会発表〕(計5件)

T. Kadono, N. Kira, K. Suzuki, O. Iwata, T. Ohama, S. Okada, T. Nishimura, M. Akakabe, M. Tsuda and M. Adachi. "Effect of an introduced phytoene synthase gene expression on carotenoid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*", 第2回分子珪藻研究会, 関西学院大学梅田キャンパス, 11月28~29日 (2015).

T. Kadono, K. Suzuki, T. Ohama, S. Okada, M. Akakabe, M. Tsuda and M. Adachi, "Effect of an introduced phytoene synthase gene expression on carotenoid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*", Molecular Life of Diatoms 2015, Seattle, USA, University of Washington, July 7-10 (2015).

角野貴志・大西裕美・福永一成・吉松孝倫・岡田茂・山口晴生・足立真佐雄. *Rhizosolenia* 属におけるメバロン酸経路関連遺伝子の発現解析. 第3回分子珪藻研究会, ねぎや陵楓閣(12月18日~19日・平成28年).

吉良望・大西浩平・山口(宮川)亜里沙・角野貴志・足立真佐雄. パーティクルガンを用いた珪藻の形質転換における直鎖状ベクターの有用性. 第3回分子珪藻研究会, ねぎや陵楓閣(12月18日~19日・平成28年).

渡邊夢実・角野貴志・吉良望・鈴木健吾・岩田修・山口晴生・足立真佐雄. 海産珪藻 *Phaeodactylum tricorutum* に由来する高発現型プロモーターの探索. 第3回分子珪藻

研究会, ねぎや陵楓閣(12月18日~19日・平成28年).

〔図書〕(計1件)

足立真佐雄・角野貴志 (2016) 遺伝子改変海産珪藻を用いた有用物質生産に向けて. 化学工学 80, 272-274.

6. 研究組織

(1)研究代表者

足立 真佐雄 (ADACHI, Masao)  
高知大学教育研究部自然科学系農学部門  
・教授  
研究者番号: 70274363

(2)連携研究者

外丸 裕司 (TOMARU, Yuji)  
水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所  
・主任研究員  
研究者番号: 10416042