

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19183

研究課題名(和文) 脂質生産に特化したスラウストキトリッドの創成

研究課題名(英文) Generation of super thraustochytrids specialized for lipid production

研究代表者

沖野 望 (OKINO, NOZOMU)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90363324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脂質生産に特化したスラウストキトリッドの創成とスラウストキトリッドに対するゲノム編集技術の開発を試みた。細胞が脂質を蓄積すると比重が軽くなることに着目した育種により、飽和脂肪酸の生産力が向上した株を単離することに成功すると共に、本株では脂肪酸合成酵素の遺伝子発現が上昇していることを明らかにした。次に、薬剤耐性遺伝子をゲノムに挿入した変異株ライブラリーのスクリーニングにより、ミトコンドリアの酸化に関与する遺伝子が脂質代謝に重要であることを明らかにした。また、ゲノム編集に関してはCRISPR/Cas9システムを用いて、実用的なスラウストキトリッドのゲノム編集技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スラウストキトリッドは高度不飽和脂肪酸を始めとして様々な有用脂質が生産可能な海洋微生物であり、スラウストキトリッドを用いた有用脂質の産業レベルでの生産が期待されている。本研究により、スラウストキトリッドにおいて脂肪酸合成酵素の発現強化が飽和脂肪酸生産の重要なファクターになることが示された。また、スラウストキトリッドにおいてCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集が可能になったことから、ゲノム編集技術を利用したスラウストキトリッドの脂質代謝経路の改変による有用脂質の生産が現実的になった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to isolate a thraustochytrid with enhanced lipid production and develop a genome editing workflow for its synthesis. Through breeding by focusing on the fact that the specific gravity of cells decreases with lipid accumulation, we succeeded in isolating a strain with improved saturated fatty acid production. Gene expression analysis of this strain revealed an enhanced expression of the fatty acid synthase gene. Next, we screened a mutant library where a drug resistance gene was inserted into the genome. This revealed that mitochondrial  $\beta$ -oxidation is vital for lipid metabolism in thraustochytrids. We also established an optimized protocol for thraustochytrid genome editing using the CRISPR/Cas9 technology.

研究分野：海洋資源化学

キーワード：ラビリンチュラ類 高度不飽和脂肪酸 ゲノム編集

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5n-3) やドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6n-3) 等の n-3 系高度不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) は、心血管疾患リスク低減、血中中性脂肪低下作用、関節リュウマチ症状の緩和などの機能が広く認知された脂質である。EPA や DHA などの n-3 PUFA は主に海産魚由来の魚油から供給されているが、近年、n-3 PUFA は機能性食品、医薬品、養殖飼料などの素材として幅広く産業利用されており、世界的な需要の増加や魚資源の減少・保護の観点から魚油に代わる新しい n-3 PUFA の供給源の開発が求められている。

スラウストキトリッドは、ストラメノパイルの一群に分類される海洋性の単細胞真核生物で、細胞内の油滴に DHA をはじめとする多量の n-3 PUFA を蓄積する。また、パルミチン酸、スクアレン、アスタキサンチン等の産業的価値の高い脂質の生産力にも優れている。この海洋微生物は、ヒトへの病原性がなく、光に依存することなく高密度集積培養が可能のため、産業微生物としても注目を集めている。

### 2. 研究の目的

スラウストキトリッドは油糧微生物の中でも卓越した脂質生産能力を持っているが、魚油由来の n-3 PUFA と比較するとコストが高いことから、産業利用にあたりさらに脂質生産力の高い株が必要である。本研究では我々がこれまでに培ってきたスラウストキトリッドの分子育種技術を基盤として、機能性食品、医薬品、バイオ燃料の生産に適用することを前提とした脂質生産に特化したスーパースラウストキトリッドを創成し、最終的には産業利用が可能な株を取得することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために以下の研究を実施した。

#### 1. スラウストキトリッドの選抜育種による脂質生産強化株の取得

細胞が脂質を蓄積すると比重が軽くなる性質に着目して、培養液を遠心した後の上清の植え継ぎを繰り返すことで、脂質量が増加する株の取得を試みた。まず、スラウストキトリッドの一種である *A. limacinum* MYA-1381 を GY 培地で培養し、3日目から4日目の培養液の一部を取り出し、2,000×g、5,000×g、10,000×g でそれぞれ2分間遠心した。その上清の一部を新しい GY 培地に加えて3日間から4日間培養した。このサイクルを100回繰り返したものをそれぞれ、2S100株、5S100株、10S100株とした。また、比較対象として、培養3日目から4日目の野生株の培養液の一部を新しい GY 培地に加え、3日間から4日間の培養サイクルを繰り返した株を A100株とした。2S100株、5S100株、10S100株を総称して遠心継代株と呼称した。それぞれの株の脂質は高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) によって、リン脂質とトリアシルグリセロールを解析し、ガスクロマトグラフィーによって脂肪酸組成と量を解析した。また、それぞれの株から抽出した RNA を用いて、RNA-Seq 解析を実施した。

#### 2. 外来遺伝子の導入による脂質生産力に変化がある株の選抜とその原因遺伝子の探索

変異株ライブラリーの作成にはネオマイシン耐性遺伝子 (NeoR) を使用することとし、PCR で増幅させた NeoR 発現コンストラクトを *A. limacinum* MYA-1381 にエレクトロポレーション法により導入した。その後、液体 GY 培地で回復培養させ、抗生物質として 0.5 mg/mL の G418 を含有するポテトデキストロース寒天平板培地で培養し、変異株を取得した。次に、得られた変異株を釣菌し、0.5 mg/mL の G418 を含有する液体 GY 培地を加えた 96 穴ディープウェルプレートで3日間振盪培養した。これらの細胞濁度 (OD595) を計測するとともに、親油性の蛍光試薬 (Nile Red) を用いて脂質量を測定した。この操作を3回繰り返した後、OD595 を細胞数、Nile Red を添加したときの蛍光量を脂質量として、細胞数あたりの脂質量を算出し、この割合が著しく高い株と低い株を選抜した。これら選抜株から脂質を抽出して、LC-MS を用いて、脂質組成の分析を行い、脂質組成に大きな変化が生じていた株をさらに選抜した。最終的には、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸量と組成の解析を行い、脂質生産に有効な因子に変化が生じたと考えられる株を選抜した。本スクリーニングにより、幾つかの脂質生産に変化がある株を取得したが、本研究ではその中で、ミトコンドリアの酸化に参与するタンパク質 (electron-transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase, ETFQO) の機能不全により、ミリスチン酸が消失する M17 株 (ETFQO 変異株) の解析を詳細に行った。

#### 3. 産業利用を目指したゲノム編集による遺伝子操作法の確立

ゲノム編集で最も良く使用されている CRISPR/Cas9 技術をスラウストキトリッドに適用するにあたって、Cas9 と gRNA の複合体である Ribonucleoprotein (RNP) を電気穿孔法によって直接細胞内に導入した。また、より効率の良い導入方法を確立する為に、スラウストキトリッド *Aurantiochytrium limacinum* と *Thraustochytrium aureum* の -グルクロニダーゼ (GUS) 発現株を取得した (以下 Aurli-GUS、Tau-GUS)。これらの株においては、GUS の基質である X-gluc 含有平板培地で培養すると、基質が加水分解されることでコロニーが青く呈色する。この株の GUS

遺伝子を破壊するとコロニーの色が白色に戻ることから、ゲノム編集効率を視覚的に判断できる。次に、*A. limacinum* の内在性遺伝子 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24) を標的として、RNP の導入を行った。DHCR24 はステロール C24 位の二重結合を還元する還元酵素であり、DHCR24 欠損株はコレステロール合成不全となる。ゲノム編集がされたと考えられる株のステロール組成は LC-MS により解析した。また、ゲノム編集の成否はシーケンス解析により判断した。

#### 4. 研究成果

##### 1. スラウストキトリッドの選抜育種による脂質生産強化株の取得

スラウストキトリッドの選抜育種による脂質生産強化株の取得に関しては、培養液を遠心した後の上清の継代を繰り返すことで、遠心しても沈みにくくなる株（遠心継代株）を樹立した。野生株（A100 株）と遠心継代株（2S100 株、5S100 株、10S100 株）の脂質を分析したところ、野生株と比較して 2S100 株ではあまり大きな差は見られなかったが、5S100 株と 10S100 株では飽和脂肪酸量が増加していることが分かった。これらのことは、本方法により、飽和脂肪酸含量が増加したスラウストキトリッド株の樹立に成功したことを示している。また、RNA-Seq 解析を実施したところ、特に 10S100 株では野生株に比べて、脂肪酸合成酵素の遺伝子発現が増加していることが明らかになった。

##### 2. 外来遺伝子の導入による脂質生産力に変化がある株の選抜とその原因遺伝子の探索

*A. limacinum* MYA-1381 にエレクトロポレーション法によりネオマイシン耐性遺伝子カセットを導入することで作成した変異株ライブラリーの中から、野生株と比較して中性脂質量が著しく減少した変異株として、M17 株を取得した。M17 株を振とう液体培養後、細胞内脂質を LC-MS とガスクロマトグラフィーにより解析した結果、中性脂質中のミリスチン酸（C14:0）量が顕著に減少していた。ゲノムシーケンス解析により本変異株の原因遺伝子を突き止めた結果、ミトコンドリアにおける脂肪酸の酸化に関わる遺伝子（電子伝達フラビンタンパク質 コビキノン酸化還元酵素：ETFQ0）が破壊されていることが明らかになった。次に、細胞増殖について調べたところ、M17 株は培地にグルコースが十分に存在する条件では、グルコースを優先的に利用して生育するが、グルコースが枯渇すると代替の栄養源となる長鎖脂肪酸が利用できないために、細胞が生育できなくなることが分かった。また、M17 株では酸化が停止するために細胞内にアシル CoA が蓄積していることも明らかになった。一方、ETFQ0 変異株では、ミトコンドリアにおけるバリンやイソロイシンのような分岐アミノ酸の分解も途中で止まり、中間産物の短鎖脂肪酸が培地中に放出されることで、培地中の pH が低下することも分かった。M17 株の解析から、*A. limacinum* の ETFQ0 はグルコースなどの糖が枯渇した条件で、長鎖脂肪酸や分岐鎖アミノ酸を利用する際に重要な働きをしていることが明らかになった。

##### 3. 産業利用を目指したゲノム編集による遺伝子操作法の確立

GUS の発現株である Aurli-GUS に RNP を導入し、得られた白いコロニー由来の GUS 配列を PCR で増幅し、シーケンス解析した結果、設計した gRNA が標的とする配列を起点として変異が導入されていることを確認した。また、Tau-GUS から RNP 導入により、白いコロニーの出現が確認できたことから、様々な属に対してもゲノム編集が可能であることが示された。次いで、カラーセレクションや選択マーカーを用いずに、内在性の遺伝子を編集することが可能かどうか検証するため、*A. limacinum* のコレステロール DHCR24 を標的とした RNP を電気穿孔法によって導入した。コロニー PCR により DHCR24 の断片を増幅させた結果、断片の大きさが一部異なる株を取得した。そこで、該当する領域のシーケンスを解析したところ、2 つの gRNA に囲まれた DHCR24 の配列に逆位が起こり、その周辺配列にランダムな配列の挿入が起こっていることが分かった。また、脂質を抽出し、LC-MS を用いてステロール組成を解析したところ、DHCR24 の産物であるコレステロールを全く合成していないことが分かった。本研究により、スラウストキトリッドにゲノム編集が適応できることが示されたことから、本技術はスラウストキトリッドの分子育種に大きく貢献する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丹生谷颯人、石橋洋平、伊東 信、沖野 望
2. 発表標題 ラビリンチュラ類の増殖制御因子の探索
3. 学会等名 令和2年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安宅祐輔、石橋洋平、伊東 信、沖野 望
2. 発表標題 ラビリンチュラ類に適用できる実用的ゲノム編集技術の開発
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋洋平、安宅祐輔、伊東 信、沖野 望
2. 発表標題 CRISPR-Cas9を用いたラビリンチュラ類のゲノム編集
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹生谷 颯人、石橋 洋平、沖野 望、伊東 信
2. 発表標題 ラビリンチュラ類の新規脂質代謝関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第43回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nozomu Okino, Hiroyoshi Wakisaka, Yohei Ishibashi, Makoto Ito
2. 発表標題 Visualization of endoplasmic reticulum and mitochondria in Aurantiochytrium limacinum ATCC MYA-1381
3. 学会等名 First International Conference on Labyrinthean Protists (ICoLP) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹生谷 颯人、石橋 洋平、伊東 信、沖野 望
2. 発表標題 ラビリンチュラ類のミトコンドリアにおける脂肪酸 酸化系の破壊は代謝性アシドーシスを引き起こす
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖野 望、花田理沙、重常公彦、堤 圭一郎、石橋洋平、有田 誠、伊東 信
2. 発表標題 ラビリンチュラ類を用いた外来遺伝子の導入によるn-3系高度不飽和脂肪酸代謝物の生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石橋 洋平  (ISHIBASHI Yohei)  (90572868)	九州大学・農学研究院・助教    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------