

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04784

研究課題名(和文) 微細藻類によるオメガ3脂肪酸の効率的生産に向けた人工染色体の構築

研究課題名(英文) Development of artificial chromosomes for efficient production of omega 3 fatty acids in microalgae

研究代表者

前田 義昌 (Maeda, Yoshiaki)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：30711155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、珪藻の染色体複製・分配に関わる自立複製配列とセントロメアを特定し、多数の遺伝子を一括導入可能な人工染色体ベクターを開発することで、 ω -3脂肪酸の生産効率の飛躍的向上を目指した。まず海洋珪藻の染色体レベルにアセンブルしたゲノムデータから、GC含量に関する特徴量を基にセントロメア領域を推定し、ベクターの接合伝達法と組み合わせ、その機能評価を行った。接合伝達法により ω -3脂肪酸合成酵素遺伝子を珪藻に導入し、 ω -3脂肪酸代謝経路の拡張にも成功した。さらに、ChIP-Seq法に基づいて自立複製配列を特定した。本研究は、微細藻類において自立複製配列を実験的に特定した初めての研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全世界の養殖魚の生産は天然魚捕獲量よりも生産量が高く、食糧供給の一翼を担う重要な産業である。しかし、現在その持続可能性が危ぶまれている。それは、養殖魚の成育に必須な飼料添加物である ω -3脂肪酸の供給源が魚油であり、「魚で魚を育てる(魚がいないと魚を育てられない)」事に起因している(フィッシュオイルジレンマ)。そのため、魚油以外の持続可能性の高い供給源が求められている。本研究では珪藻細胞で安定的に複製・分配される人工染色体開発に必要なDNA配列を特定すること、珪藻の ω -3脂肪酸代謝の改変にも成功し、将来的な ω -3脂肪酸の安定供給に向けた技術開発に必要な基礎的知見を獲得することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to improve the productivity of omega-3 fatty acids by development of artificial chromosomes on which the microalgal centromere and autonomous replication sequence are introduced. First, we estimated the centromeres from the chromosome-level assembly data of diatom genome using the parameter related to GC content. The function of the estimated centromeres was investigated with the aid of bacterial conjugation technique. We successfully demonstrated the expansion of the metabolic pathway for biosynthesis of omega-3 fatty acids. Furthermore, the autonomous replication sequences were identified with the chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq) technique. This is, to the best of our knowledge, the first study to identify the autonomous replication sequences by experimental investigation.

研究分野：生物工学

キーワード：微細藻類 オメガ3脂肪酸 人工染色体 セントロメア 自立複製配列 代謝改変

1. 研究開始当初の背景

世界人口の増加から、食料の持続可能な供給は世界共通の課題である。全世界の養殖魚の生産は天然魚捕獲量よりも生産量が高く、食糧供給の一翼を担う重要な産業である。しかし、現在その持続可能性が危ぶまれている。それは、養殖魚の育成に必須な飼料添加物である ω 3脂肪酸(主にエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA))の供給源が魚油であり、「魚で魚を育てる(魚がいないと魚を育てられない)」事に起因している(フィッシュオイルジレンマ)。そのため、魚油以外の持続可能性の高い供給源が求められている。

本研究で使用する珪藻は、太陽光エネルギーを利用して培養でき、 ω 3脂肪酸の生産量が高いことから、有望な魚油代替の ω 3脂肪酸供給源である。しかし魚油と同等程度の低コストな ω 3脂肪酸生産を実現するためには、遺伝子組み換えを施し、生産量を向上させることが必須である。 ω 3脂肪酸生産量の飛躍的向上のためには、 ω 3脂肪酸合成酵素を一括で過剰発現させるような大規模な代謝改変が必要となる。しかし、従来の珪藻の代謝改変技術では、1個から数個の遺伝子を導入することしかできないことが問題であった。

2. 研究の目的

本研究では、多種類の遺伝子発現カセットを搭載し、珪藻細胞内で安定的に複製・分配できる遺伝子組み換えツールである人工染色体ベクターを開発することを目的とした。具体的には、珪藻の染色体複製・分配に関わる自立複製配列とセントロメアを特定することを目指した。これらの配列の内、モデル珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* においてセントロメアが実験的に特定されている¹が、それ以外の珪藻においてはほとんど研究がなされていない。さらに、自立複製配列やセントロメアを導入したベクターに ω 3脂肪酸合成酵素を搭載し、接合伝達で珪藻細胞に導入することで、珪藻の ω 3脂肪酸代謝経路を拡張できるか検証した。

3. 研究の方法

(1) 珪藻ゲノムからのセントロメア推定

海洋珪藻 *Fistulifera solaris* のゲノム情報は、研究代表者がナノポアシーケンシングで取得した染色体レベルのアセンブルデータを用いた²。先行研究¹に倣い、GC含量の分布を測定し、その割合が顕著に低い領域をセントロメアとして推定する方法を採用した。すなわち、パイオインフォマティクスツールである seqkit³ を用いて、各染色体で5'末端側から100 bpの領域GC含量を50 bpずつずらしながら測定し、3 kbpごとに32%よりも低いGC含量を示す領域数をプロットし、ピークを示す染色体上の箇所を特定した。さらに、ピークを示す箇所の内で、遺伝子間領域に該当する領域を抽出し、推定セントロメア配列とした。

(2) *F. solaris* 推定セントロメア導入ベクターの構築

推定セントロメア配列及び薬剤耐性遺伝子を含むプラスミド(計15種類)と酵母由来セントロメア/自立複製配列をそれぞれ導入したプラスミドを作製した。その後、大腸菌 S17-1 株を用いた接合伝達法により *F. solaris* へ導入した。各プラスミドの接合伝達で得られた薬剤耐性株の数をカウントすると共に、ダイレクトPCR及び電気泳動を行い、プラスミドの導入が確認された株の割合を算出した。

(3) *F. solaris* の多価不飽和脂肪酸合成遺伝子の特定

F. solaris の推定遺伝子群に対して相同性検索を行い、先行研究で特定されていなかった5エロンガーゼ遺伝子を推定した。同遺伝子を接合伝達プラスミドにクローニングし、上記と同様に大腸菌 S17-1 から *F. solaris* に導入した。5エロンガーゼ遺伝子の発現を逆転写PCRで確認した。また、野生株と遺伝子組み換え体の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィ-質量分析計(GC-MS)で確認した。

(4) 海洋珪藻 *P. tricornutum* の自立複製配列の推定

本研究では免疫沈降シーケンシング法(ChIP-Seq法)により自立複製配列を特定することとした。なお本実験から、用いる珪藻種を *F. solaris* から *P. tricornutum* に変更した。その理由として、*P. tricornutum* が珪藻の分子生物学研究でモデル生物として用いられていること、さらに *F. solaris* と比較して遺伝子組換えが容易であり、ChIP-Seq実験への適用性が格段に高いことが挙げられる。*P. tricornutum* で方法論を確立した上で、他の珪藻への適用を検討した方が効率的であると判断し、実験生物の変更を行った。

自立複製配列に特異的に結合するタンパク質複合体である自立複製配列認識複合体(Origin Recognition Complex: ORC)のサブユニットにFLAGタグ(エピトープタグ)を融合した組換えタンパク質を発現するプラスミドを構築し、エレクトロポレーション法で海洋珪藻 *P. tricornutum* に導入した。なお、本研究では、複数種類のORCサブユニットを組換え発現した。その後、薬剤選択により形質転換体を獲得した。形質転換体を固定化処理・超音波による断片化処理を施した後、抗FLAGタグ抗体を固定化した磁性粒子を加え、組換えタンパク質とDNAのプルダウンを行った。脱固定化処理後、遊離したDNAを次世代シーケンサーで解読し、リード情報を得た。パイオインフォマティクスツールである

Bowtie2⁴によりリード情報をゲノム配列にマッピングし、MACS2⁵によりピークコールを行った(図1)。

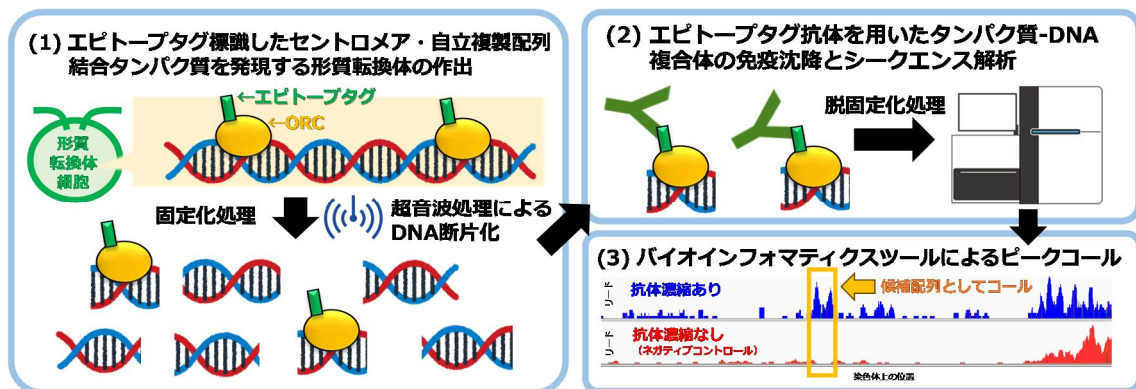


図1 ChIP-Seq法による自立複製配列解析の概要図

4. 研究成果

(1) *F. solaris* 推定セントロメア配列導入プラスミドの接合伝達

異質倍数体である珪藻 *F. solaris* には 44 本の染色体が推定されている。その内、16 本の染色体において明確なピークが確認され、GC 含量かつ遺伝子間領域である配列をセントロメアとして計 16 配列を推定した。全ての染色体でピークが確認されなかった一因として、GC 含量の特徴量を規定する閾値を、珪藻 *P. tricornutum* を用いた先行研究と同一の値に設定したことが挙げられる。セントロメア推定のための閾値は、珪藻種ごとに最適化する必要がある可能性がある。

推定したセントロメア 16 配列の内、15 配列を含むプラスミドをそれぞれ構築することができた。推定した珪藻セントロメア配列、もしくは酵母由来セントロメア/自律複製配列を含む接合伝達プラスミドを、*F. solaris* に導入した結果、特定の推定セントロメア配列で、酵母由来配列と比べて形質転換効率がわずかであるが向上した。また、導入ベクターに特異的な配列を標的とするプライマーを用いた PCR により、珪藻の推定セントロメアを含むプラスミドの方が、酵母由来セントロメア/自律複製配列を含むプラスミドよりも、珪藻細胞での安定性が高い傾向にあることを確認した。以上の事から、本研究で特定した推定セントロメアが、珪藻細胞内で安定的に継承されるベクターの構築に貢献できる可能性が示された⁶。一方で、形質転換効率の向上がわずかであったことから、実用的なベクター構築に向けては、珪藻のセントロメアだけは無く、珪藻の自立複製配列の特定も必要不可欠であることが示唆された。

(2) *F. solaris* のオメガ 3 脂肪酸合成代謝の拡張

F. solaris はオメガ 3 脂肪酸の中でもエイコサペンタエン酸(EPA)を高度に蓄積する⁷。一方で、食品・医療・養殖分野で需要の高いドコサヘキサエン酸(DHA)やドコサペンタエン酸(DPA)はほとんど生産しない。これは、C20 脂肪酸である EPA の脂肪酸鎖を伸長させる 5 エロンガーゼをほとんど発現しないためであると考えられた。そこで、相同性検索により内在性 5 エロンガーゼ遺伝子(図2)を探索し、上記のように確立した接合伝達法で *F. solaris* に導入した。その結果、内在性 5 エロンガーゼ遺伝子導入株において、GC-MS 解析により野生株では見られなかった DPA が検出された⁸。このことから、構築したベクターの接合伝達により、*F. solaris* のオメガ 3 脂肪酸合成代謝の拡張が可能であることが示された。一方で、DPA の脂肪酸鎖を不飽和化することで合成される DHA は検出されなかった。これは、不飽和化反応を担う 4 デサチュラーゼ遺伝子が発現していないためであると考えられた。今後、5 エロンガーゼ遺伝子と 4 デサチュラーゼ遺伝子、必要に応じてその他のオメガ 3 脂肪酸合成代謝関連遺伝子を同時発現させることにより、オメガ 3 脂肪酸の質・量の改変を行えると期待される。

候補遺伝子がコードするタンパク質の予測立体構造

ヒト超長鎖脂肪酸エロンガーゼの立体構造(PDB: 6Y7F)との重ね合わせ

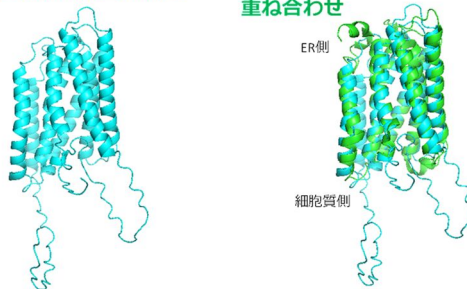


図2 珪藻由来 5 エロンガーゼ(予測構造:水色)とヒト由来脂肪酸エロンガーゼ(緑色)の立体構造比較

(3) ChIP-Seq による *P. tricornutum* の自立複製配列のマッピング

相同性検索により *P. tricornutum* の ORC サブユニット発現遺伝子を推定した。その内、ORC2 サブユニット、ORC4 サブユニットに FLAG タグを融合させて組換え発現させた。なお、これらのサブユニットをコードする対立遺伝子をそれぞれクローニングしたため、合計 4 種類の組換えタンパク質 (ORC2A、ORC2B、ORC4A、ORC4B) を発現する組み換え株を作出した。4 種類の組み換え株それぞれに対して、抗 FLAG タグ抗体を固定化した磁性粒子を作用させ、組換えタンパク質が結合する DNA 断片を濃縮した。対照実験として、抗体を固定化していない磁性粒子を作用させた際にプルダウンされる DNA 断片も取得した。それぞれを次世代シーケンサーで解析し、抗体固定化粒子を作用させた際に有意に得られる配列を MACS2 で特定した。その結果、4 種類の組換え株全体で 355 箇所のピークを得た。その内、69 箇所のピークが全ての組み換え株でピークとして検出された。これらの配列を推定自立複製配列とした。全ての推定自立複製配列において共通するモチーフ配列は見いだせなかったものの、複数の推定自立複製配列でモチーフ配列を共有していることが確認され、いくつかのグループに分けられることを見出した。推定自立複製配列の中には、先行研究¹で意図せずに自立複製ベクターに組み込まれていた配列も含まれていた。このことは、本研究で見出した配列が、ベクターに自立複製能を付与する可能性を示唆している。本研究は、微細藻類において自立複製配列を実験的に推定した初めての研究である。

以上のように、本研究では珪藻細胞で安定的に複製・分配される人工染色体開発に必要な DNA 配列を特定することに成功した。また、珪藻のオメガ 3 脂肪酸代謝の改変にも成功し、将来的なオメガ 3 脂肪酸の安定供給に向けた技術開発に必要な基礎的知見を獲得することができた。

<参考文献>

1. Diner, RE. et al., “Diatom centromeres suggest a mechanism for nuclear DNA acquisition” *PNAS* (2017) E6015–E6024
2. Maeda, Y. et al., “Chromosome-scale genome assembly of the marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris*” *Mar Biotechnol* (2022) 24(4):788-800
3. Shen, W. et al., “SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation” *PLoS One* (2016) 11(10) e0163962
4. Langmead, B. and Salzberg, S., “Fast gapped-read alignment with Bowtie 2” *Nat Methods* (2012) 9(4):357-9
5. Zhang, Y. et al., “Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS)” *Genome Biol* (2008), 9, R137
6. Maeda, Y. et al, “Functional analysis of the putative centromere sequences of marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris*” *Algal Res* (2023) 74, 13225
7. Tanaka, T. et al., “Production of eicosapentaenoic acid by high cell density cultivation of the marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris*” *Bioresour Technol* (2017) 245(A) 567-572
8. Suhaimi, N. et al, “Expansion of omega-3 polyunsaturated fatty acid metabolism of the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* by genetic engineering ” *J Biosci Bioeng* (in press)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiaki Maeda, Ryosuke Kobayashi, Kahori Watanabe, Tomoko Yoshino, Chris Bowler, Mitsufumi Matsumoto, Tsuyoshi Tanaka	4. 巻 24
2. 論文標題 Chromosome-scale genome assembly of the marine oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 788-800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10126-022-10147-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Noraiza Suhaimi, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka	4. 巻 133
2. 論文標題 Effects of fatty acid synthase-inhibitors on polyunsaturated fatty acid production in marine diatom <i>Fistulifera solaris</i> JPCC DA0580	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 340 ~ 346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.12.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Yoshiaki, Nakamura Mai, Watanabe Kahori, Okamoto Emi, Tanaka Tsuyoshi	4. 巻 74
2. 論文標題 Functional analysis of the putative centromere sequences of marine oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 103225 ~ 103225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.algal.2023.103225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suhaimi Noraiza, Kumakubo Ryota, Yoshino Tomoko, Maeda Yoshiaki, Murata Satoshi, Tanaka Tsuyoshi	4. 巻 In press
2. 論文標題 Expansion of omega-3 polyunsaturated fatty acid metabolism of the oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i> by genetic engineering	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2024.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中村真維, 渡邊かほり, 前田義昌, 吉野知子, 田中剛
2. 発表標題 エピソードマーカーの開発に向けたオイル高生産珪藻 <i>Fisturifela solaris</i> におけるセントロメア配列の自律複製機能の解析
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田義昌, Noraiza Binti Suhaimi, 中村真維, 田中 剛
2. 発表標題 微細藻類による魚油代替オイルの効率的生産に向けた基盤技術開発
3. 学会等名 ユーグレナ研究会 第37回研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田義昌
2. 発表標題 微細藻類の代謝改変によるオメガ3脂肪酸の効率的生産技術の開発
3. 学会等名 日本生物工学会東日本支部新年交換会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiaki Maeda
2. 発表標題 Chromosome-scale assembly of microalgal genome towards next-generation metabolic engineering
3. 学会等名 International Conference on Environmental Science and Green Technology 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田義昌
2. 発表標題 海洋珪藻Fistulifera solarisの染色体規模のゲノムアセンブリ
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会大会（論文賞受賞講演）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hyun-Sik Yun, Kohei Yoneda, Iwane Suzuki, Yoshiaki Maeda
2. 発表標題 Screening of autonomously replicating sequences in the marine diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> toward artificial chromosome development
3. 学会等名 13th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尹炫植, 米田広平, 菅澤威仁, 鈴木石根, 前田義昌
2. 発表標題 Distribution of autonomously replicating sequences on the genome screened by the origin recognition complex in the marine diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
3. 学会等名 第12回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尹炫植, 米田広平, 菅澤威仁, 鈴木石根, 前田義昌
2. 発表標題 Mapping the distribution of ORC2 and ORC4 in marine diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> for screening the autonomously replicating sequences
3. 学会等名 分子珪藻研究会2024 (MLDJ2024)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

第7回生物工学会東日本支部長賞受賞
https://www.sbj.or.jp/branch/branch_higashinohon_award.html
https://www.life.tsukuba.ac.jp/information/20220826_02/

令和4年度マリンバイオテクノロジー学会論文賞受賞
Chromosome Scale Genome Assembly of the Marine Oleaginous Diatom *Fistulifera solaris*, *Marine Biotechnology* 24(4), 788-800 (2022)
<http://www.marinebiotechnology.jp/info002.html>

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	田中 剛 (Tanaka Tsuyoshi) (20345333)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	

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
---------	---------