

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05511

研究課題名(和文) 応用利用に向けたユーグレナにおけるパラミロン粒形態制御の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism regulating the paramylon granules formation in Euglena for applied utilization

研究代表者

野村 俊尚 (Nomura, Toshihisa)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：20722771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユーグレナを対象に、貯蔵多糖であるパラミロン合成・顆粒形成の制御機構の解明を目的として研究を行った。まず、パラミロン粒形成が、糖(グルコース)添加により誘導され、添加濃度に応じて含有量や粒サイズが増加することを確認した。次に、糖添加がパラミロン合成酵素タンパク量を増加させることを見出した。この結果から、糖添加によりパラミロン合成・顆粒形成の関連遺伝子の発現量が増加する可能性が示唆された。そこで、糖添加条件でのRNA-Seqを行い、発現量が上昇した遺伝子群を見出した。これらの中にパラミロン合成・顆粒形成に関与する因子が含まれる可能性を想定し、今後解析を進めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ユーグレナにおけるパラミロン合成や顆粒形成の制御機構の一端が明らかになった。また、新たなゲノム編集ツールを用いた標的遺伝子破壊や塩基書換え、タグ配列挿入法を開発し、本種における研究手法を拡充した。本研究で得た知見や技術を基盤に、今後の更なる学術的な研究推進が期待される。パラミロンは、免疫賦活作用やインスリン分泌促進作用などを有することが、近年明らかになると共に、バイオプラスチックなどのバイオ化成品原料としての利活用が進められている。本研究で明らかとなったパラミロン合成および顆粒形成に関する基礎的知見は、パラミロン生産や利活用といった応用に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanisms regulating the synthesis of the storage polysaccharide paramylon and granule formation in Euglena (*Euglena gracilis*). First, we confirmed that paramylon granule formation is induced by the glucose treatment, and that its content and granule size increase in accordance with the glucose concentration. Next, using the FLAG-tagged EgGSL2 (Paramylon synthase) expressing strain, we found that glucose treatment increased the amount of EgGSL2. We hypothesized that glucose treatment might increase the expression levels of a group of genes related to paramylon synthesis and granule formation, and performed RNA-Seq analysis under glucose-treated conditions. As a result, we found that more than 1,000 genes were upregulated by glucose treatment. We plan to analyze these candidate genes in future studies.

研究分野：応用細胞分子生物学

キーワード：ユーグレナ パラミロン 貯蔵多糖 ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Euglena gracilis (以下、ユーグレナと表記) は、運動性を有した光合成を行う微細藻類の一種である。本種は、顆粒状の β -1,3-グルカンの結晶であるパラミロンを貯蔵多糖として細胞内に蓄積する。パラミロンは免疫賦活作用や整腸作用、各種の生活習慣病症状の緩和を促すことが報告されており、食品機能性成分として注目を集めている。また、パラミロンは熱安定性バイオプラスチックや化学繊維などのバイオマス由来の化成品の原料としても利用される。嫌気条件下では、ユーグレナ独自の代謝経路によりパラミロンから油脂(ワックスエステル)が生産される。このワックスエステルは融点が低く、バイオジェット燃料に適している。

近年、*EgGSL2* 遺伝子がパラミロン粒形成に不可欠な β -1,3-グルカン合成酵素をコードすることが明らかになったが(Tanaka et al. 2017)、 β -1,3-グルカンからの顆粒状結晶の形成に関する因子や仕組みは未だ未解明である。

他方で、ユーグレナにおいては遺伝子ターゲティング法が開発されておらず、それが本種における生命現象を解明するための壁となっていた。そこで我々は最近、Cas9 RNP 複合体の直接導入法による高効率なユーグレナのゲノム編集法を確立した(Nomura et al. 2019, Nomura et al. 2020)。これにより、本種におけるパラミロン合成・粒形成の分子機構解明に逆遺伝学的にアプローチしやすい状況となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、独自に確立したユーグレナにおけるゲノム改変技術やパラミロン粒形成の誘導系を基盤として、パラミロン合成や粒形成の背景にある分子機構を明らかにすることを主な目的として研究を実施する。これにより、将来的にパラミロン合成や顆粒の形態形成を人為的に制御する技術の確立を目指す。また、本種における新たなゲノム改変技術の開発も並行して取り進めることで、上記の目標達成のための実験手法の拡充も図る。

3. 研究の方法

(1) パラミロン粒形成誘導実験系の条件検討

パラミロン粒がほぼ見られない状態の独立栄養培養ユーグレナ細胞を用いて、グルコースを含む従属栄養培地(KH 培地)への植え替え、または培地へのグルコース添加により、パラミロン粒形成を誘導する実験系を確立する。さらに、確立したパラミロン粒形成誘導条件において、パラミロン粒形成のタイミングなどを調べ、RNA-Seq 解析のためのサンプリング条件を探る。

(2) パラミロン粒形成誘導時のパラミロン合成酵素(*EgGSL2*)量への影響

パラミロン合成酵素(*EgGSL2*)をイムノブロットング法で検出するためのペプチド抗体を作製する。作製抗体での検出が困難な場合は、ゲノム編集法を利用したゲノム上の*GSL2* 遺伝子配列の末端へのFLAG タグ配列を挿入により *EgGSL2*-FLAG タンパク質発現株を作出し、FLAG タグ抗体を用いた検出を試みる。上記のいずれかの方法において *EgGSL2* の検出が可能となった場合は、(1)で検討したパラミロン粒形成誘導条件における *EgGSL2* 量への影響を調べる。

(3) パラミロン合成・粒形成に関与する因子の探索

対照区およびパラミロン粒形成誘導条件区のサンプルから、それぞれ Total RNA 抽出を行い、RNA-Seq 解析を行う。特に(2)において、*EgGSL2* 量の増加が見られた場合は、他のパラミロン合成・粒形成に関与する因子の発現量も増加する可能性が期待されるため、同条件でのサンプルを

解析に用いる。

(4) ユーグレナにおけるゲノム編集技術の拡充

ユーグレナにおいて確立済みの Cas9 RNP ベースのゲノム編集では、AT リッチな標的サイトなどゲノム編集が難しい対象があり、一部において技術的な制限が残っていた。この問題を解決するため、Cas12a (Cpf1) RNP を用いたゲノム編集法を導入する。また、タンパク質のアミノ酸置換などの機能解析の実施を想定し、ゲノム編集技術をベースとした塩基書換え法などの開発も目指す。

3. 研究成果

(1) 糖添加によるパラミロン粒の形成誘導

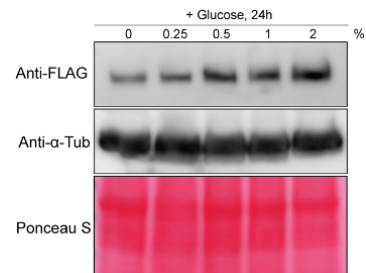
CM 培地を用いて独立栄養培養したユーグレナ細胞に対し、グルコース添加 (0.5-2%) することでパラミロン粒形成が誘導されることを確認した。このとき、添加するグルコースの濃度依存的に 24h 後のパラミロン量が上昇した。グルコースを 1.2% 含む KH 培地への植え継ぎによってもパラミロン粒形成の誘導がみられたが、当培地は各種アミノ酸や有機酸も豊富に含み、細胞に多様な変化を誘起することが想定されるため、グルコース添加によるパラミロン粒形成の誘導系を以降の解析に用いることとした。

(2) FLAG タグ付加パラミロン合成酵素遺伝子 (EgGSL2) 発現株の作出

当初の計画として、パラミロン合成酵素遺伝子 (EgGSL2) を対象に抗原部位予測結果が良好であったペプチド配列 2 種を抗原として、抗体作成を行なったが、イムノブロッティング法で目的サイズのバンドが検出可能な抗体の作製には至らなかった。そこで、一本鎖 DNA を用いたゲノム編集ベースの DNA ノックイン法により、ゲノム上の *EgGSL2* 遺伝子の C 末端に FLAG タグ配列を挿入した株を作出した。FLAG タグ付加 EgGSL2 の発現を確認するため、FLAG タグ抗体を用いたイムノブロッティングを行い、目的サイズの位置にバンドが検出されることを確認した。また、EgGSL2-FLAG 発現株に対し、EgGSL2 を標的としたゲノム編集でノックアウト株を作出したところ、バンドが検出されなくなることを確認した。本株を用いることによって、ユーグレナにおける EgGSL2 タンパク質を、容易にモニタリングすることができるようになった。

(3) 糖添加によるパラミロン粒形成誘導時の EgGSL2 量の変動

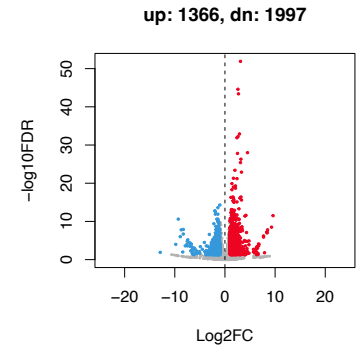
上記 (2) で作出した EgGSL2-FLAG 発現ユーグレナ株を用いて、(1) のグルコース添加によるパラミロン粒形成誘導 24h 後の EgGSL2 量への影響を、FLAG タグ抗体を用いたイムノブロッティング法により調べた。その結果、添加したグルコース濃度依存的に EgGSL2 量が増加することが明らかになった。本結果は、ユーグレナにおけるパラミロン合成は、供給される基質量のみでは無く、生合成酵素の量的制御によっても調節を受けていることを示唆する。この結果を踏まえ、パラミロン粒の結晶構造形成などに関与する未同定の因子も量的な制御を受けている可能性が考えられた。



各濃度のグルコース添加 24h 後における EgGSL2-FLAG 量の変化。

(4)糖添加により発現変動する遺伝子群の探索

グルコース添加によりパラミロン粒形成に関連する遺伝子群の発現量が増加する可能性を想定し、対照区（グルコース非添加）および、1%グルコース添加後24hにおけるRNA-Seq解析を行った。その結果、 $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$, $\text{FDR} < 0.05$ の条件において、3,363個の発現変動遺伝子が見出された。特に、発現量が有意に増加した1,366個の遺伝子群の中に、パラミロン合成および顆粒形成に関与する因子が含まれていることを期待し、今後、ゲノム編集法などを用いた遺伝子機能解析を順次進めていく予定である。



ユーグレナにおいてグルコース添加条件で発現変動した遺伝子を示した Volcano plot.

(5) Cas12a RNP を用いたユーグレナのゲノム編集法の確立

ユーグレナにおいて、Cas12a RNP を用いた高効率な標的配列への変異導入手法を確立した。本手法ではアンプリコンシーケンス解析の結果において、77.2~94.5%という高い効率でランダムな挿入または欠失変異（InDel 変異）導入が検出された。また、Cas12a RNP 複合体を用いたゲノム編集技術では、Cas9 ベースの手法と比較して、長めの欠損変異が入ることが示された。派生手法として、ゲノム上の離れた 2 カ所の切断による長鎖欠損変異の導入や一本鎖 DNA と Cas12a RNP 複合体を用いた短鎖 DNA 配列のノックインやゲノム上の特定の塩基配列の正確な書き換え技術も確立した。例として、EgGSL2 遺伝子の特定の塩基配列を書き換え、アミノ酸配列置換を生じさせることにより酵素の機能阻害を誘導した。これにより、従来困難であった AT-リッチ配列を標的としたゲノム編集も可能となり、ユーグレナにおけるゲノム改変技術を拡張した。

引用文献

Tanaka Y, Ogawa T, Maruta T, Yoshida Y, Arakawa K, Ishikawa T. Glucan synthase-like 2 is indispensable for paramylon synthesis in *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.* 2017 May;591(10):1360-1370. doi: 10.1002/1873-3468.12659.

Nomura T, Inoue K, Uehara-Yamaguchi Y, Yamada K, Iwata O, Suzuki K, Mochida K. Highly efficient transgene-free targeted mutagenesis and single-stranded oligodeoxynucleotide-mediated precise knock-in in the industrial microalga *Euglena gracilis* using Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Biotechnol J.* 2019 Nov;17(11):2032-2034. doi: 10.1111/pbi.13174.

Nomura T, Yoshikawa M, Suzuki K, Mochida K. Highly Efficient CRISPR-Associated Protein 9 Ribonucleoprotein-Based Genome Editing in *Euglena gracilis*. *STAR Protoc.* 2020 Jun 3;1(1):100023. doi: 10.1016/j.xpro.2020.100023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishikawa Marumi, Nomura Toshihisa, Tamaki Shun, Ozasa Kazunari, Suzuki Tomoko, Toyooka Kiminori, Hirota Kikue, Yamada Koji, Suzuki Kengo, Mochida Keiichi	4. 巻 20
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 mediated generation of non motile mutants to improve the harvesting efficiency of mass cultivated <i>Euglena gracilis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 2042 ~ 2044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pbi.13904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tamaki Shun, Ozasa Kazunari, Nomura Toshihisa, Ishikawa Marumi, Yamada Koji, Suzuki Kengo, Mochida Keiichi	4. 巻 191
2. 論文標題 Zeaxanthin is required for eyespot formation and phototaxis in <i>Euglena gracilis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2414 ~ 2426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiad001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 石川 まるみ、野村 俊尚、玉木 峻、持田 恵一	4. 巻 Vol. 81, No.2
2. 論文標題 ゲノム編集を用いた藻体回収に有利な遊泳不全ミドリムシの作出	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 B&I バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 123 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Nomura Toshihisa, Kim June Silk, Ishikawa Marumi, Suzuki Kengo, Mochida Keiichi	4. 巻 17
2. 論文標題 High efficiency genome editing by Cas12a ribonucleoprotein complex in <i>Euglena gracilis</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbial Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1751-7915.14393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshihisa Nomura, Komaki Inoue, Yukiko Uehara, Koji Yamada, Osamu Iwata, Kengo Suzuki, Keiichi Mochida
2. 発表標題 Highly efficient genome editing in industrial microalga <i>Euglena gracilis</i> using Cas9 ribonucleoproteins
3. 学会等名 7th International Society for Applied Phycology Congress (ISAP2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 野村俊尚（分担執筆）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 315
3. 書名 ゲノム編集技術～実験上のポイント / 産業利用に向けた研究開発動向と安全性周知	

1. 著者名 野村俊尚（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 324
3. 書名 藻類培養技術～屋内外大量生産・各種処理評価 / トラブル対応・商業化に向けた取り組み、第3章 大量培養生産・効率化・安定化・低コスト化の実務、第9節 微細藻類におけるゲノム編集技術・評価手法	

1. 著者名 野村俊尚（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 290
3. 書名 バイオエネルギー再燃、第3章藻類バイオ燃料の開発動向、2. ミドリムシにおける高効率ゲノム編集	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゲノム編集で遊泳不全ミドリムシの作出に成功 - 産業利用における回収効率の向上に期待 -
https://www.riken.jp/press/2022/20220909_1/

ユーグレナの眼点をつかさどる色素を同定 - 微細藻類の光認識機構と色素合成に関する新たな知見 -
https://www.riken.jp/press/2023/20230130_2/

微細藻類ユーグレナのゲノム編集技術を拡張 - より柔軟かつ緻密なゲノム改変が可能に -
https://www.riken.jp/press/2024/20240214_1/index.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	松島 良 (Matsushima Ryo) (80403476)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	

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