

令和 5 年 4 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19149

研究課題名（和文）珪藻を活用した組換え遺伝子高発現システムの創成～珪藻による有用物質生産を目指して

研究課題名（英文）Selection of terminator that drives high-level expression of introduced genes in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：形質転換を用いた海産珪藻における有用物質の高生産には、導入遺伝子を高発現させる高活性なプロモーター、およびターミネーターの選択が重要となる。これまでに導入遺伝子を極めて高発現可能なプロモーターCsetP4を分離した。しかし、本高発現型プロモーターと同時に導入遺伝子を高発現させるターミネーターについて、未検討である。そこで本研究では、計3種のターミネーターを用いて、CsetP4と共に導入遺伝子を高発現させるターミネーターの選抜を試みた。その結果、PtfcP4ターミネーターとの組み合わせが導入遺伝子を最も高発現させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ターミネーターが導入遺伝子の発現に及ぼす影響の解明の一助となったと考えられる。また、構築した導入遺伝子の高発現システムを用いることにより、バイオ燃料やワクチンや抗体などの有用物質の大量生産が期待される。さらに、高発現システムを国内外で知的財産化することにより、バイオ産業の振興や国際競争力の向上が期待される。また、珪藻によるこれらの有用物質生産の際には、光合成による炭酸ガス固定を伴うことから、地球温暖化防止効果が期待され、国連が掲げるSDGsのうち、「7.エネルギーをクリーンに」と「13.気候変動に具体的な対策を講じること」の2つのチャレンジに貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Promoters and terminators are key elements for the regulation of gene expression. Recently, we investigated the activity of promoters derived from marine diatom-infecting viruses (DIVs) in marine diatoms. Then, we obtained DIV promoter, CsetP4 having high activity. However, the terminators that can express the transgene at high levels for use in combination with CsetP4 have not been investigated. In this study, we investigated the activities of three terminators, two endogenous terminators from diatoms (PtfcP4 terminator derived from *Phaeodactylum tricornutum* and CffcpA terminator derived from *Cylindrotheca fusiformis*) and a viral terminator, CsetT4 derived from DIV used together with CsetP4. The change in the expression level of the transgene by the terminator used was observed. Among three combinations, the combination of CsetP4 and PtfcP4 terminator leads to an increase in the expression level of the transgene.

研究分野：海洋微生物学

キーワード：珪藻 ターミネーター 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 CO₂ 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なることにより、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おり、複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 *alc* 結合タンパク質 (以降、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。

珪藻に感染し、珪藻細胞内で短時間に大量に増殖可能なウイルス (以降、珪藻ウイルス) に注目して、世界に先駆けてプロモーターの分離に取り組み、珪藻内在性プロモーターの活性と比較して 5 倍程度と高い活性を有する、珪藻ウイルスに由来する新奇プロモーターの開発に成功した (Kadono et al. 2015)。

一方、植物 (de Felippes et al., 2020, Wang et al., 2020) や緑藻クラミドモナス (Geisler et al., 2021) において、ターミネーターが導入遺伝子の発現に影響を与えることが知られている。ターミネーター領域には、転写の終結、mRNA の安定性や翻訳の効率を決めるシス配列が含まれることから、用いるターミネーターによって、遺伝子発現量において、プロモーター能力が十分反映されないことが考えられる。

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、珪藻ウイルス由来のプロモーターの能力を反映するターミネーターを単離する。得られたターミネーターを、上述した珪藻ウイルス由来のプロモーターと共に、レポーター遺伝子 (改良型緑色蛍光タンパク質の遺伝子、*egfp*) に連結する。これを珪藻に導入した後、各ターミネーターの活性をレポーター遺伝子の発現レベルを元に評価し、最も導入遺伝子の高発現をもたらすターミネーターを選抜することで、珪藻を活用した組換え遺伝子高発現システムを構築する。

3. 研究の方法

(1) ターミネーターの単離、および形質転換ベクターの構築

珪藻ウイルスに由来する新奇プロモーターの開発 (Kadono et al. 2015) では、海産珪藻 *Cylindrotheca fusiformis* 由来の FCPA 遺伝子 (*fcpA*) のターミネーター (CfcpA ターミネーター) が用いられており (図 1) これを海産珪藻の形質転換において頻用されている *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646 株由来の *fcpA* ターミネーター (PtfcfA ターミネーター) と置換した。また、珪藻ウイルス CsetDNAV 由来である発現誘導活性が高いプロモーター CsetP4 と対となるターミネーター CsetT4 と置換した。PtfcfA ターミネーターは、*P. tricornutum* UTEX646 株のゲノム DNA を、CsetT4 は CsetDNAV のゲノム DNA を鋳型とし、PCR 増幅し、精製した (図 1)。*egfp* が含まれる Backbone 断片を PCR 増幅し、精製した (図 1)。そして、ターミネーター断片と Backbone 断片との 2 断片を NEBuilder HiFi DNA Assembly (New England Biolabs) を用いてアッセンブリーし、形質転換ベクターを構築した (図 1)。制限酵素処理により線状化したベクターを用いて、これをエレクトロポレーション

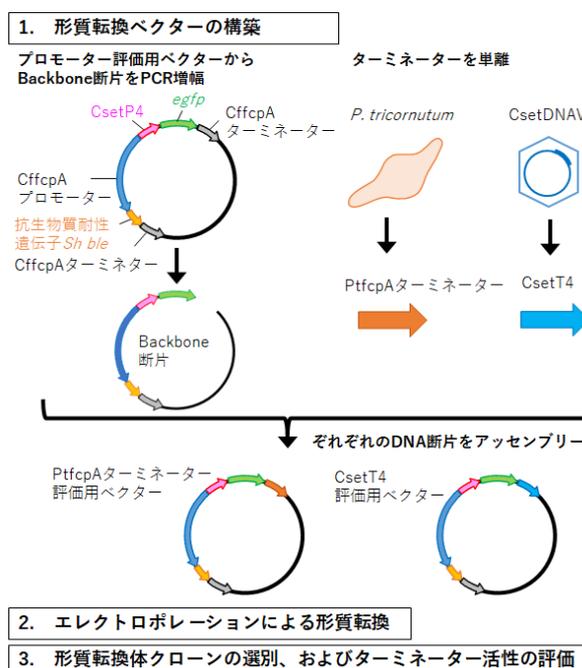


図1. ターミネーター評価の概要

(NEPA21 Electroporator Gene Transfection System, NEPA GENE) により *P. tricornutum* NR1A-0065 株へ導入した。その後、抗生物質 Zeocin™ (InvioGen) を含む寒天培地上で培養した。

(2) プロモーター活性の評価

抗生物質 Zeocin™ を含む寒天培地上で得られたクローンを用いて、細胞を鋳型としてゲノミック PCR を行い、*egfp* カセット、および抗生物質耐性遺伝子 (*Sh ble*) カセットのゲノムへの挿入を確認した。両カセットの挿入が確認された各ターミネーター、それぞれの形質転換体 6 クローンを用いて、*egfp* の発現解析を行った。

(3) ターミネーター活性の評価

ターミネーターの活性評価には、qRT-PCR による *egfp* 発現解析、およびフローサイトメーターを用いた eGFP 蛍光の測定により評価を行った。qRT-PCR による解析には、ゲノム上の導入遺伝子のコピー数の影響を抑えるために、形質転換ベクターに含まれる *Sh ble* に対する *egfp* の発現の相対比 ($\Delta\Delta Ct$ 値) を用いて行った。フローサイトメーターを用いた eGFP 蛍光の測定では、フローサイトメーター (BD LSRFortessa™ X-20 flow cytometer system, BD Biosciences) を用いて、1 クローン当たり 10,000 細胞分を測定し、eGFP 蛍光強度からその平均値を求め、細胞サイズにより補正を行い、さらに野生株に対する相対値を求めた。

4. 研究成果

qRT-PCR による解析の結果 *PtfcfA* ターミネーターは、*CffcpA* ターミネーター、または、*CsetT4* に対して、有意に高い活性 (Steel-Dwass 検定, $P < 0.05$) を示した (図 2A)。相対 eGFP 蛍光強度の解析から、*PtfcfA* ターミネーターの活性は、*CffcpA* ターミネーターの活性、および *CsetT4* の活性より高い傾向がみられた (図 2B)。珪藻ウイルス由来の高発現型プロモーター *CsetP4* と同時に用いるターミネーターの種類を変えることにより、導入遺伝子の発現量は変わり得ること、中でも *PtfcfA* ターミネーターとの組み合わせが導入遺伝子を最も高発現させることが明らかとなった。

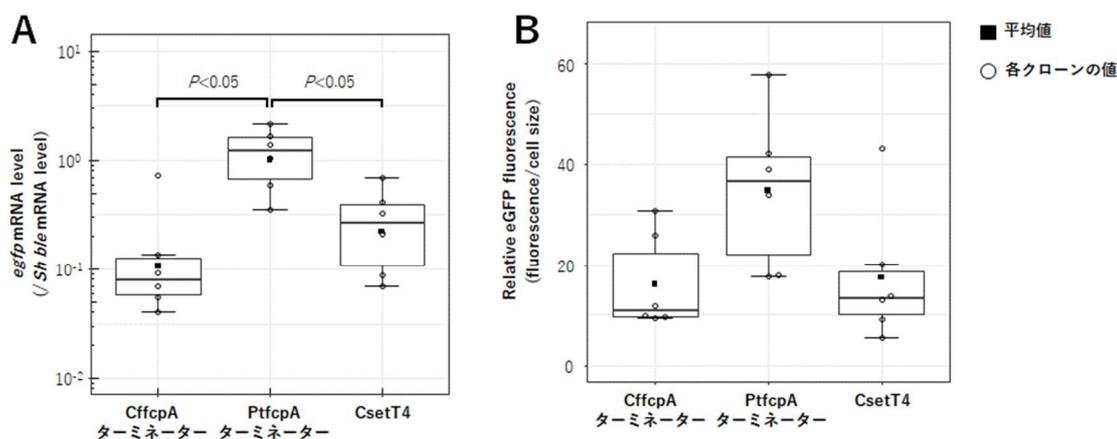


図2. ターミネーターの活性を示した箱ひげ図

< 引用文献 >

- Takashi Kadono, Arisa Miyagawa-Yamaguchi, Nozomu Kira, Yuji Tomaru, Takuma Okami, Takamichi Yoshimatsu, Liyuan Hou, Takeshi Ohama, Kazunari Fukunaga, Masanori Okauchi, Haruo Yamaguchi, Kohei Ohnishi, Angela Falciatore, Masao Adachi, Characterization of marine diatom-infecting virus promoters in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*, Scientific Reports, 2015, 5, 18708
- Felipe F de Felippes, Marcus McHale, Rachel L Doran, Sally Roden, Andrew L Eamens, E Jean Finnegan, Peter M Waterhouse, The key role of terminators on the expression and post-transcriptional gene silencing of transgenes, The Plant Journal, 104(1), 2020, 96-112
- Wang Po-Hao, Kumar Sandeep, Zeng Jia, McEwan Robert, Wright Terry R., Gupta Manju, Transcription terminator-mediated enhancement in transgene expression in maize: preponderance of the AUGAAU motif overlapping with poly(A) signals, Frontiers in Plant Science, 2020, 11, 570778
- Katrin Geisler, Mark A Scaife, Paweł M Mordaka, Andre Holzer, Eleanor V Tomsett, Payam Mehrshahi, Gonzalo I Mendoza Ochoa, Alison G Smith, Exploring the impact of terminators on transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* with a synthetic

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕 計2件

1. 発表者名

角野 貴志, 外丸 裕司, 佐藤 尚, 鈴木 健吾, 山田 康嗣, 足立 真佐雄

2. 発表標題

海産珪藻における高発現型新奇ウイルスプロモーターの探索

3. 学会等名

第21回マリンバイオテクノロジー学会（国内学会）

4. 発表年

2021年

1. 発表者名

吉良 明日海, 角野 貴志, 山口 晴生, 鈴木 健吾, 山田 康嗣, 足立 真佐雄

2. 発表標題

珪藻において導入遺伝子を高発現可能なターミネーターの探索

3. 学会等名

第22回マリンバイオテクノロジー学会（国内学会）

4. 発表年

2022年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角野貴志, 外丸裕司, 佐藤尚, 鈴木健吾, 山田康嗣, 足立真佐雄
2. 発表標題 海産珪藻における高発現型新奇ウイルスプロモーターの探索
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉良明日海, 角野貴志, 山口晴生, 鈴木健吾, 山田康嗣, 足立真佐雄
2. 発表標題 珪藻において導入遺伝子を高発現可能なターミネーターの探索
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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