

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00652

研究課題名(和文) 海洋性珪藻類を利用した資源循環型物質生産技術の開発

研究課題名(英文) Development of resource-recycling material production technology using marine microalgae

研究代表者

原田 尚志 (HARADA, Hisashi)

鳥取大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50640900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TALENやCRISPR/Cas9等のゲノム編集技術は、従来は遺伝子操作が困難だった生物種にも適用できる強力なゲノム改変技術である。本研究では、選抜マーカーリサイクルが可能なゲノム編集システム構築を試みることで、海洋性珪藻類における多重遺伝子改変技術の開発を目指した。本研究を通じて、珪藻用のエピソーム型ゲノム編集プラスミドを開発し、珪藻株への導入と保持とキュアリング、さらにプラスミド再導入を達成した。また、開発した技術は様々な遺伝子改変に適用可能であることも実証した。したがって、本研究により海洋性珪藻類の多重遺伝子改変システムの構築が完成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

珪藻類においては、専らボンバードメント法による染色体導入型のゲノム編集が用いられているが、発現カセットがゲノムにランダムに挿入されること、導入後の発現カセットの除去が困難であるため複数遺伝子をターゲットとしたゲノム改変が不可能であった。本研究はこれらの欠点を完全に補完するだけでなく、特別な装置がなくとも実施可能なゲノム編集システムである。したがって、今後は国内外の多くの研究機関を対象に広く技術を提供することで、珪藻類を対象とした数多くの基礎研究や応用研究分野での活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Genome editing, such as TALEN and CRISPR/Cas9, are powerful tools that can be applied to species that have traditionally been difficult to genetic modification. In this study, we attempted to construct a genome editing system that can recycle selection marker and aimed to develop a technology to modify multiple genes in marine diatoms. Through this study, we developed episome-type genome-editing plasmids for diatoms, which allowed for the introduction and retention into diatom cells, as well as plasmid curing and reintroduction. It was also demonstrated that the developed technology can be applied to the modification of various genes. Therefore, this study completes the construction of a multiple genome editing system in marine diatoms.

研究分野：代謝工学

キーワード：海洋性珪藻 ゲノム編集 イソプレノイド 代謝工学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イソプレノイドは自然界で最も多様な化合物集団であり、これまでに 2 万種超もの物質が単離されている。しかしながら、多くの有用イソプレノイドの安定供給には膨大な労力とコストが必要である。そのため、大腸菌や出芽酵母などの異種微生物を利用した、多量生産のための技術研究がこれまでに多数報告されている。一方、微生物利用による物質生産研究においては近年、カーボンニュートラルの観点からバイオマスを利用した循環型・環境調和型の生産技術が求められており、これらを両立する究極の物質生産システムとして、光合成微生物を利用した生産システムの実用化が期待されてきた。

海洋性珪藻は海洋における主要な藻類の一つであり、21 世紀に入り 2 種の珪藻種における全ゲノム配列が明らかになったことに伴い、これまで遅れていた遺伝子工学技術やそれを利用した応用研究も増えつつある。しかしながら、工業微生物として用いられている大腸菌や酵母などと比べて研究例は一部に留まっており、これは遺伝子工学技術が成熟していない事に起因する技術的制約が多いことが原因であった。珪藻類においても最近、ボンバードメント法による染色体導入型のゲノム編集が用いられるようになったが (Nymark et al. 2016)、発現カセットがゲノムにランダムに挿入されること、導入後の発現カセットの除去が困難であるため複数遺伝子をターゲットとしたゲノム改変が不可能であった。

2. 研究の目的

本研究では、近年報告されたエピソーム型の遺伝子導入法 (Karas et al. 2015) を改変して、選抜マーカーリサイクルが可能な形質転換系の構築、およびプラスミド発現を利用したゲノム編集を試みることにより、海洋性珪藻類における多重遺伝子改変技術の開発を目指した (図 1)。さらに、これらの技術の有効性を検証するため、イソプレノイド代謝、特にカロテノイド生合成に関連する遺伝子の改変による実証を試みた。

3. 研究の方法

(1) エピソーム型遺伝子導入によるマーカーリサイクル系の構築

エピソーム型遺伝子導入を用いたマーカーリサイクル系構築を目的とし、珪藻細胞内でプラスミド保持に必要な複製配列、および大腸菌の接合伝達に必要な配列を連結した新規発現プラスミドを構築した。これを大腸菌との接合伝達を介して珪藻細胞に導入し、導入株のスクリーニング、プラスミドキュアリング、ならびにキュアリング株への再導入を行った。

(2) (1)を用いたゲノム編集システムによる多重遺伝子改変

(1)で構築したシステムを用いて、珪藻類において多重遺伝子改変が可能なゲノム編集システム開発を目的に、珪藻用エピソーム型 TALEN および CRISPR/Cas9 ベクターの構築、珪藻細胞への導入によるゲノム編集効果の評価を行った。

(3) カロテノイド生合成遺伝子を対象としたゲノム編集システムの実証

カロテノイド生合成に関与する 2 種の遺伝子を対象に、CRISPR/Cas9 ベクターの構築ならびに遺伝子破壊を試みた。

4. 研究成果

(1) エピソーム型遺伝子導入によるマーカーリサイクル系の構築

本実験においては Karas らの系を改変し、接合伝達因子をゲノム上に持つ大腸菌株 (*Escherichia coli* S17-1) を利用した結果、目的とする珪藻用発現プラスミドを海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* に導入、保持させることに成功した (図 1)。

次に、得られた形質転換株を非選抜培地にてプラスミドキュアリングを行ったところ、約 20% の効率でプラスミドを保持しない株を取得することができた。さらに、キュアリング株へのプラスミド再導入の結果、一回目の遺伝子導入時と同様の形質転換効率で目的プラスミドを保持する形質転換株を取得できた (図 2)。

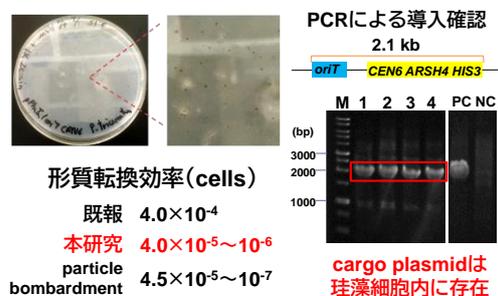


図 1 珪藻細胞へのエピソーム導入

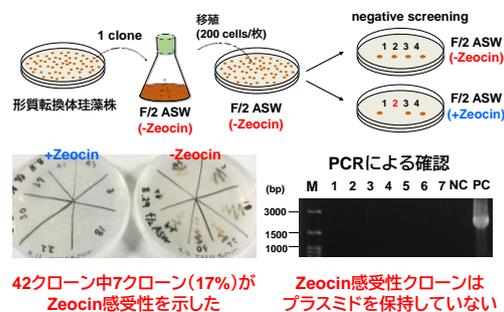


図 2 プラスミドキュアリング

(2) (1)を用いたゲノム編集システムによる多重遺伝子改変

ゲノム編集に対する有効性を検証するために、珪藻用 TALEN および CRISPR/Cas9 発現ベクタ

一の構築、ならびにウラシル合成酵素遺伝子 (*PtUmps*; TALEN を適用) ならびに細胞外アルカリフォスファターゼ遺伝子 (*PtAPase*; CRISPR/Cas9 を適用) を標的としたゲノム編集実験を行った。

TALEN 発現用プラスミドを導入した *E. coli* S17-1 を用いて接合伝達を介した珪藻細胞への遺伝子導入を行い、zeocin 耐性を示した 15 株の形質転換珪藻クローンを取得した。これらを 5-FOA を含む人工海水培地へ移植してスクリーニングを行った結果、9 クローン (60%) が 5-FOA 耐性を示した (図 3)。このうちの 4 クローンについて、ターゲットゲノム領域の延期配列解析を行った。その結果、目的とする遺伝子領域にて、数 bp から数十 bp の indel 変異が確認されたことから (図 4)、TALEN によるゲノム編集が目的通り行われていることが示された。



図 3 TALEN によるゲノム編集株の作出

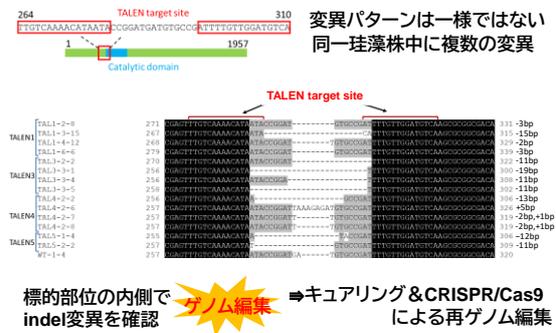


図 4 ゲノム編集領域の塩基配列解析

次に、*PtAPase* 遺伝子を標的とし、キュアリング後の *PtUmps* 遺伝子欠損株に対し CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行った。Zeocin 耐性を示した 23 株の形質転換珪藻クローンを取得し、これらについて X-Phosphate を基質とした簡易 APase アッセイを行った。その結果、17 クローン (74%) において APase 活性が失われており、目的遺伝子が破壊されている二重欠損株である可能性が示唆された (図 5)。現在、これらクローンについてターゲット領域の塩基配列を進めている。

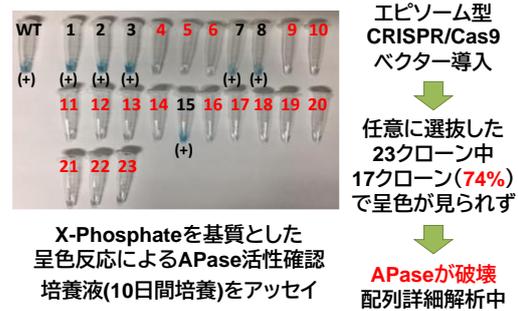


図 5 *PtAPase* 破壊株の選抜

(3) カロテノイド生合成遺伝子を対象としたゲノム編集システムの実証

上記で構築したエピソーム型 CRISPR/Cas9 プラスミドを用いたゲノム編集システムを用い、2つのカロテノイド生合成遺伝子 (*Pt16586* および *Pt26422*) のノックアウトプラスミドを作製し、珪藻株への導入と選抜を行った。その結果、何れの場合においてもノックアウト候補株を複数取得し、*Pt16586* においては 42 株、*Pt26422* では 25 株の候補株が得られた。形質転換効率は何れの場合もこれまでと同等 (60-70%) であり、本系が様々な遺伝子のゲノム改変に適用可能であることが示された。さらに現在、これら遺伝子の二重欠損株の作出を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北川諒治・上河ほのか・原田尚志
2. 発表標題 エピソーム型ゲノム編集による海洋性珪藻の多重遺伝子改変
3. 学会等名 第6回分子珪藻研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川諒治、原田尚志
2. 発表標題 海洋性珪藻におけるエピソーム導入型多重遺伝子改変システムの開発
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北川諒治・原田尚志
2. 発表標題 海洋性珪藻における多重遺伝子改変システム構築に向けた基盤技術開発
3. 学会等名 第4回分子珪藻研究会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----