

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05389

研究課題名（和文）ゲノム編集技術が拓く遠赤色光をも利用できる特異な非モデル藍藻研究の新展開

研究課題名（英文）New stage in the study of a unique non-model cyanobacterium that can use far-red light for photosynthesis by genome editing

研究代表者

土屋 徹 (TSUCHIYA, Tohru)

京都大学・人間・環境学研究科・准教授

研究者番号：20362569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Acaryochloris（アカリオクロリス）は、他の殆どの酸素発生型光合成生物が利用できない遠赤色光をも光合成反応に利用することができる。本研究では、この生物の遠赤色光への適応機構を逆遺伝学的手法により解明するために、ゲノム編集技術を開発することを目的とした。その結果、Acaryochlorisで初めてゲノム編集に成功した。さらに、遺伝子発現抑制技術であるCRISPR干渉により光捕集タンパク質のノックダウン株の作製にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物などの酸素発生型光合成生物が利用できる光は、いわゆる可視光である。しかし、本研究の対象であるAcaryochloris（アカリオクロリス）は、例外的に可視光に加えて遠赤色光をも利用することができる。本研究による成果は、この生物でのゲノム編集およびその関連技術の開発に初めて成功したことである。これは遠赤色光をも利用可能な光合成系の仕組みを解明するために必要な基盤技術が確立したことを意味する。Acaryochlorisでの研究成果をもとに、これまで有効に利用されてこなかった遠赤色光を利用可能な植物が作出できれば、バイオマスの増産が期待される。

研究成果の概要（英文）：Acaryochloris marina can utilize far-red light for photosynthesis, whereas most other oxygenic photosynthetic organisms cannot use the light. In this project, we aimed to develop the genome editing techniques for A. marina to elucidate the adaptation mechanism of the organism to far-red light by reverse genetic studies. In the result of this study, we succeeded in developing genome editing system for A. marina. In addition, we also succeeded in producing light-harvesting protein knockdown mutants by CRISPR interference, a technique for the repression of gene expression.

研究分野：生物学

キーワード：シアノバクテリア クロロフィルd 光合成 遠赤色光 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

(1) 生産者として地球上の生態系を支える光合成生物には、それぞれ利用可能な光の波長域がある。植物や藻類などの酸素発生源型光合成生物は、通常可視光しか利用できず 700 nm より波長の長い光のみでは光合成はできない。しかし、限られた種では 700 nm より長波長側の遠赤色光でも光合成が可能であることが知られている。シアノバクテリア (藍藻) の *Acaryochloris marina* は、クロロフィル *a* より約 30 nm 長波長側の光を吸収できるクロロフィル *d* という特殊なクロロフィルを主要なクロロフィルとしてもち (図 1)、遠赤色光のみでも生育が可能である。本生物についてはゲノム配列は解読されていたが、長らく形質転換系は開発されておらず、分子遺伝学的手法をもちいた解析を行うことができなかった。

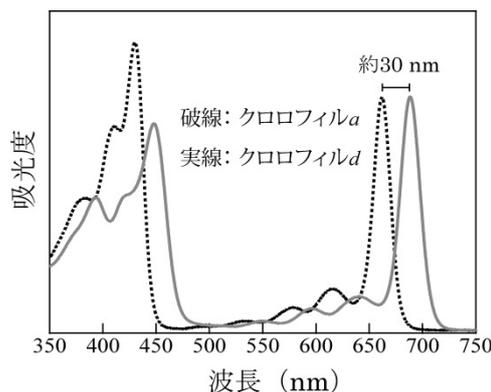


図1 クロロフィルの吸収スペクトル

(2) 遺伝情報はあがるが、それを有効に活用できない状況が続く中で、私たちは、*A. marina* の形質転換に世界で初めて成功し、プラスミドをもちいた外来遺伝子の導入やトランスポゾンタギングによる変異体作出を行ってきた。しかし、これらの実験系では、狙った遺伝子を破壊するなどの改変を施す遺伝子ターゲティングはできないため、さらなる実験系の開発が望まれた。近年、CRISPR/Cas システムによるゲノム編集が多くの生物で成功を収めるなかで、*A. marina* でのゲノム編集技術の確立こそが、本生物の遠赤色光をも利用可能な光合成系の解明に必要不可欠であろうと考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、特異な非モデルシアノバクテリアである *A. marina* を対象とした分子遺伝学的手法解析を行うために、*A. marina* でのゲノム編集およびその関連技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、いくつかあるゲノム編集システムのなかで、ひろく利用されている CRISPR/Cas システムを選択して条件検討を行った。これまでに私たちが作製した広宿主域プラスミド由来ベクターをもちいて、ガイド RNA 発現カセットとヌクレアーゼ遺伝子を含む all-in-one 型のベクターを多数構築した。このとき、変異導入によりヌクレアーゼ活性をなくした dCas9 の遺伝子をヌクレアーゼ遺伝子の代わりに利用することで、遺伝子発現抑制技術である CRISPR 干渉用のベクターを構築した。

(2) ゲノム編集および CRISPR 干渉の標的遺伝子には、光合成に関する遺伝子を選択した。これまでに確立した接合法をもちいて、ベクターを *A. marina* に導入し形質転換株を作製した。得られた形質転換株の色素組成は、HPLC によって解析した。

4. 研究成果

(1) *A. marina* で CRISPR 干渉が可能であるかを検討した。これまでに、モデルシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 を対象として、当研究室で作製した all-in-one 型ベクターが機能することを確認していた。そこで、そのベクターをもちいて *A. marina* で CRISPR 干渉を試みた。このとき、標的遺伝子として光捕集に関わるアンテナタンパク質であるフィコシアニンの遺伝子を選択した。その結果、安定して予想される表現型を示す形質転換株は得られなかった。そこで、ベクターの改変を進め、プロモーター活性の異なるいくつかのベクターを構築した。そのなかで適したベクターを利用することで、青色のフィコシアニン含量が下がり黄色みがかかった色を呈する株を得ることができた (図 2)。この成果は、*A. marina* で CRISPR 干渉による遺伝子発現抑制が初めて可能となったことを意味する。



図2 CRISPR干渉によるフィコシアニン遺伝子の発現抑制

(2) フィコシアニン遺伝子の発現抑制に成功したことで、さらにフィコシアニン以外の光合成関連遺伝子についても、CRISPR 干渉による遺伝子発現抑制を試みた。光合成色素の代謝に関わるいくつかの酵素の遺伝子を標的にしたところ、機能的に破壊できないと考えられた遺伝子では発現抑制をかなり抑えても形質転換株が得られなかった。また、強く発現を抑制するベクターを使用しても、期待される表現型が得られない遺伝子や、わずかに機能低下が判別できる遺伝子もあった。なかには期待通りの表現型を示す形質転換株が得られたものもあったが、かなりの条件検討を必要とした。これらの結果より、機能既知の遺伝子の解析ですら CRISPR 干渉との相性の良し悪しがあることが判明したが、CRISPR 干渉が *A. marina* の逆遺伝学的解析に有効な手法の一つであることには変わりはない。

(3) ゲノム編集については、光化学系 II 複合体のサブユニットの一つにヒスチジンタグを導入した株の作製を試みることで実験系の確立を目指した。光化学系 II 複合体は、光化学系 I 複合体と比較して含量が少なく、サブユニット数が多いため精製が非常に困難である。そこで、他のモデル光合成生物ではサブユニットの一つにヒスチジンタグを導入することで、アフィニティー精製による簡便な精製ができるようになっている。それらの株ではヒスチジンタグの導入により致死にはならず光合成により生育できるため、*A. marina* でもゲノム編集による株の作製が可能であろうと考えた。ガイド RNA 発現カセットとヌクレアーゼ遺伝子および相同組換えでのリペアテンプレートを含むベクターを *A. marina* に導入し、得られた株のゲノムが目的の箇所では改変されているのかを調べた。その結果、標的サブユニットの C 末端側にヒスチジンタグを融合しているであろう株を得ることができた。その株のチラコイド膜タンパク質をウエスタンブロッティングで解析したところ、目的の分子量の移動度で特異的にヒスチジンタグを含むタンパク質が検出された (図 3)。本成果は、*A. marina* で初めてゲノム編集に成功したことを示す。

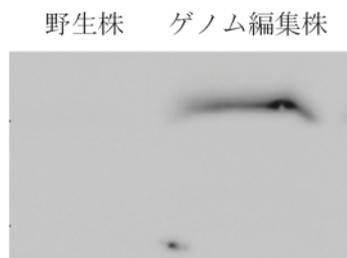


図 3 ウエスタンブロッティングによるヒスチジンタグの検出

これらの成果により、世界で初めて *A. marina* で CRISPR 干渉による遺伝子発現抑制とゲノム編集が可能になった。これらの技術を駆使して分子遺伝学的解析を進めることで、遠赤色光をも利用可能な *A. marina* の光合成系の理解が飛躍的に進むと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田伏 廣輝、松本 直大、古屋 隆盛、渡部 和幸、土屋 徹
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Acaryochloris marina</i> でのゲノム編集技術の開発
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020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
---------	---------