

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05561

研究課題名（和文）トランスクリプトームビッグデータ解析を活用した高油脂生産Coccomyxaの創生

研究課題名（英文）Creation of lipid-hyper-producing Coccomyxa strains by utilizing transcriptome big data

研究代表者

笠井 由紀（KASAI, YUKI）

中央大学・研究開発機構・専任研究員

研究者番号：20416572

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）：CoccomyxaのDYRK1変異株は野生株の2倍の速度で油脂を生産する。トランスクリプトーム解析の結果、DYRK1変異株では油脂合成に関する複数の遺伝子の転写活性が野生株よりも速いタイミングで変動していることが明らかとなった。DYRK1変異株を分子育種の親株にするために、CRISPR/Cas9でDYRK1のみを破壊した株を作製した。また、硝酸塩要求性を導入し生物学的封じ込めが可能な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

本研究成果はCoccomyxa属以外の微細藻類にも適用可能であり、微細藻が生産するバイオディーゼルの産業利用を促進することで化石燃料の使用量を減らしCO2排出削減に貢献することができる。また、本研究成果は油脂以外の機能性物質生産にも適用可能で、微細藻類を利用した有用物質生産の産業利用を促進することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Coccomyxa mutants deficient in a DYRK1 accumulate lipids twice as fast as wild type strain. The transcriptome analysis showed that a lot of genes involved in lipid production were induced earlier in the DYRK1 mutants than in wild-type strain. For the breeding of Coccomyxa, DYRK1 gene was disrupted by CRISPR/Cas9-based genome editing method. CNX1G disrupted mutants that is unable to assimilate nitrate as a nitrogen source also created to prevent the leakage to outer environments.

研究分野：分子生物学

キーワード：バイオディーゼル 単細胞性緑藻 トランスクリプトーム ゲノム編集 セルフクローニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の大量使用に伴う CO₂ 排出量の増加は地球温暖化を促進し、異常気象の遠因となっている。近年、光合成により微細藻が合成する油脂が、CO₂ 削減に有効なバイオディーゼルの原料として注目を集めているが、製造コストが高く未だ商業化には至っていない。この問題を解決するためには、油脂蓄積に要する時間を短縮し、且つ油脂蓄積量を増加させた微細藻を創出する必要がある。

我々はこれまで、産業微細緑藻 *Coccomyxa* の油脂生産に関与する遺伝子群の同定とその制御の一端を解明すると共に、*Coccomyxa* の分子生物学的手法を開発してきた。それらの知見を基に分子育種に取り組み、油脂生産性が7割増加した組換え体作製に成功した。しかしながら、油脂生産速度はほぼ変わらず、油脂蓄積に要する時間は短縮できなかった。この原因として、導入遺伝子発現に使用したプロモーターの転写活性が栄養ストレス下で低下し、酵素発現量が十分ではなかったこと、油脂生産の律速となる酵素が複数存在し、一部の酵素の発現を促進しても油脂生産性を改善するには不十分である、ことなどが考えられた。しかし、栄養ストレス下で高活性を示す *Coccomyxa* の遺伝子プロモーターや、油脂合成の律速になる酵素群およびその転写制御についてはまだ完全に同定されておらず、これを解明する必要がある。

2. 研究の目的

Coccomyxa における油脂生産の律速となる酵素群を同定するとともに、栄養ストレス条件下での油脂生産速度が向上し、生物学的封じ込めが可能なセルフクローニング株を作製する。

3. 研究の方法

(1) 栄養ストレス下で高転写活性を示すプロモーターの取得

窒素十分条件(+N)と窒素欠乏(-N)あるいはリン欠乏(-P)条件下でのトランスクリプトーム解析を実施し、それらのデータを比較した。栄養ストレス下で高い転写活性を示す遺伝子を探索し、その5'および3' UTR領域をクローン化した。ゼオシン耐性遺伝子(ble)と *Coccomyxa* 用にコドンを最適化した -glucuronidase 遺伝子(GUS)とを自己切断アミノ酸配列(2A)を介して結合したレポーター遺伝子カセットを挿入した発現コンストラクトを作製し(図1)、プロモーター活性を定量的に測定した。

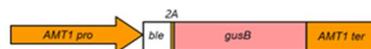


図1 ゼオシン耐性発現コンストラクト

(2) ゲノム編集技術による DYRK1 破壊株の作製と解析

Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1 (*DYRK1*) のリン酸化ドメインを標的にした Guide RNA を合成し、Cas9 タンパク質との複合体をエレクトロポレーション法で導入し、*DYRK1* が破壊された株を選抜する。*DYRK1* 破壊株の油脂生産性を解析して油脂合成速度の上昇を確認する。

(3) 油脂生産の律速となる酵素群の同定

DYRK1 が欠損した *Coccomyxa* 変異株のトランスクリプトームデータを野生株のデータと比較し、野生株と大きく異なる転写活性を示す油脂合成関連遺伝子および転写制御関連遺伝子を探索する。このうち転写活性が増加したものについては cDNA をクローン化して過剰発現させ、転写活性が低下したものについては遺伝子ノックアウトあるいは遺伝子ノックダウンを行い、油脂生産への影響を解析する。

(4) 生物学的封じ込めが可能なセルフクローニング宿主株の作製

分子育種した株を屋外で培養するためには、生物学的封じ込めが可能な株に変換することが好ましい。モリブデンコファクター生合成遺伝子(*CNX1G*)変異株は硝酸塩を窒素源として利用できず、環境中での拡散が抑制できる。*CNX1G* を標的にした Guide RNA を合成し、Cas9 タンパク質との複合体をエレクトロポレーション法で導入し、硝酸培地での生育が劣る株を選抜する。セルフクローニングの選抜マーカーとして *CNX1G* 発現コンストラクトを作製し、*CNX1G* 破壊株に導入して硝酸塩要求性が回復することを確認する。

4. 研究成果

(1) 窒素欠乏時に高発現するプロモーターの解析

+N 条件と -N 条件下でのトランスクリプトーム解析データを比較したところ、多くの遺伝子の発現は -N 条件下で減少するが、硝酸トランスポーター遺伝子(*NAR2*)とアンモニアトランスポーター遺伝子(*AMT1*)は -N 条件下で高発現することが示された。更に *AMT1* 転写活性は +N 条件下での発現量がこれまで transgene 発現に利用していたポリペプチド鎖伸長因子遺伝子(*EF1a*)転写活

性と同程度であることから、+N 条件下での transgene 発現に十分な転写活性を示し、かつ -N 条件下では転写活性が更に増加することが期待された(図2)。しかしながら、AMT1 のプロモーター/ターミネーターを使用したコンストラクトでは TAG 合成遺伝子の高発現はできなかった。そこで、レポーター遺伝子発現コンストラクトでその転写活性を解析した。発現コンストラクトが導入された *Coccomyxa* 株で作られる Ble-2A-GUS ペプチドは、細胞質で Ble-2A と GUS とに切断され、Ble-2A は核に移行しゼオシン耐性を示す。このことから、ゼオシン耐性と GUS 活性には相関があると予想されるが、高濃度のゼオシンに耐性を示す株でも GUS 活性は低かった。Real-time PCR で GUS mRNA の定量を行ったところ、GUS mRNA は 3' 側から分解され易く著しく不安定であることが示された(図3)。植物の窒素代謝関連遺伝子は 3' 側の配列により転写後調節を受けることが報告されている^{1,2)}。そこで、AMT1 ターミネーターを RBCS のターミネーターと入れ替えたコンストラクトを構築し、GUS 活性を測定したところ、AMT1 ターミネーターに比べ、GUS 活性が 10~60 倍に上昇した。以上の結果から、AMT1 プロモーターを使用して transgene を発現させる際には別遺伝子のターミネーターを使用して mRNA の安定化を図る必要があることが明らかになった。

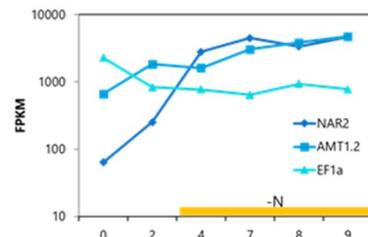


図2 油脂含量測定時と同じ窒素欠乏条件下で培養した時の転写活性

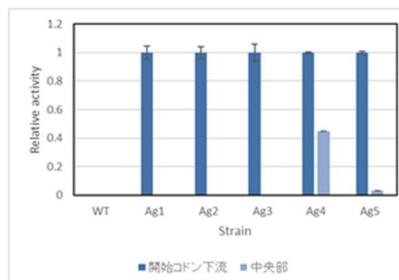


図3 GUS転写活性

(2) ゲノム編集技術による *DYRK1* 破壊株の作製と油脂生産性の解析
変異原処理により取得した *DYRK1* 変異株は、野生株よりも2倍速い速度で油脂生産を行うが、*DYRK1* 以外の遺伝子にも100を越す変異を持つ。そこで、CRISPR/Cas9で *DYRK1* のみを破壊した株を作製し、油脂生産性を解析した。その結果、*DYRK1* 破壊株は *DYRK1* 変異株と同様な結果を示し、油脂生産速度向上が *DYRK1* 変異に由来することが明らかとなった(図4)。*DYRK1* 破壊株は分子育種の親株としても有用であると考えられる。

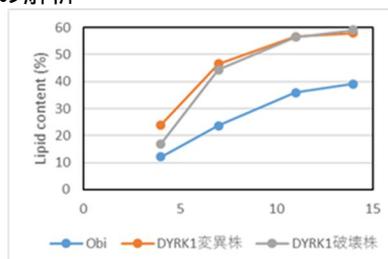


図4 *DYRK1*破壊株の油脂含量の時間変化

(3) 油脂生産の律速となる酵素群の同定

複数の *DYRK1* 変異株と野生株を栄養十分条件と -N 条件で培養、トランスクリプトーム解析を行い *DYRK1* 変異株に共通した転写活性の変動を同定した。その結果、*DYRK1* 変異株では脂肪酸合成系遺伝子とトリグリセリド合成系遺伝子の転写活性が上昇し、クロロフィル合成系遺伝子やクロロフィル結合タンパク質遺伝子の転写活性が低下していた。*DYRK1* 変異株の TAG 含有量は培養開始4~7日目に急激に上昇していることから、この時期に野生株の転写活性と大きな差がある遺伝子を同定した。脂肪酸鎖伸長を行う3-ケトアシル-ACPシンターゼの3遺伝子について継続的に real-time PCR で解析したところ、培養4日目、7日目の転写活性は野生株より高く、11日目には野生株とほぼ同じ程度であった(図5)。次に、*DYRK1* の制御の元これらの遺伝子の転写活性を直接制御している因子を同定することにした。これまでに微細藻の油脂合成は Myb タイプの転写因子により調節を受けていること知られている³⁾。また、アブシジン酸添加によりクロレラの TAG 含量が増加する報告がある⁴⁾。アブシジン酸は Protein phosphatase 2C (PP2C) を不活化することで SnRK2 を活性化し、その結果遺伝子転写活性が促進される⁵⁾。*DYRK1* 変異株では転写活性が変動した Myb 転写因子や PP2C 遺伝子が複数同定されている。これらの遺伝子が律速因子である可能性が考えられたため、*DYRK1* 変異株で転写活性が低下した Myb 転写因子については CRISPR/Cas9 で破壊株を作製したが、油脂生産性は変わらなかった。PP2C については致死遺伝子である可能性があるため、RNAi でノックダウン株を作製した。野生株と比較すると多少は油脂生産性が向上した株もあるが、現在のところ *DYRK1* 変異株程の油脂生産性を示す株は得られていない。まだ解析が進んでいない遺伝子が複数残っているので引き続き解析を行う。

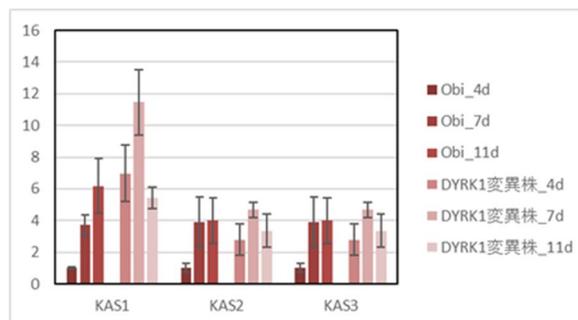


図5 *Coccomyxa* Obi株、*DYRK1*変異株の3-ケトアシル-ACPシンターゼ転写活性の時間変化

(4) 生物学的封じ込めが可能なセルフクロニング宿主の作製

モリブデンコファクター合成遺伝子 *CNX1G* を CRISPR/Cas9 で破壊した株を 2 株取得した。1 株 (5-3-4) はターゲット領域に 1 塩基の挿入が、もう 1 株 (7-4-2) は 3 塩基の欠失と 1 塩基の挿入があり、どちらも硝酸培地での生育は野生株より劣る (図 6)。7-4-2 株の方が復帰変異の確率が低いと考えられるので、この株を生物学的封じ込めが可能なセルフクロニング宿主とする。

CNX1G の cDNA をクローン化し、*RBCS* のプロモーター/ターミネーターと接続して、選択マーカ発現コンストラクトを構築した。7-4-2 株にエレクトロポレーション法で導入・硝酸要求性を回復したコロニーを選抜し、選択マーカ発現コンストラクトの挿入を確認した。我々はこれまでに piggyBac transposase を使ってマーカ遺伝子を繰り返し利用する方法を開発している。今回構築した硝酸要求性セルフクロニング宿主にこの方法を適用し、繰り返し cDNA 導入を可能にすることで、複数の cDNA が高発現し、且生物学的封じ込めが可能な高油脂生産性セルフクロニング株を作製する。

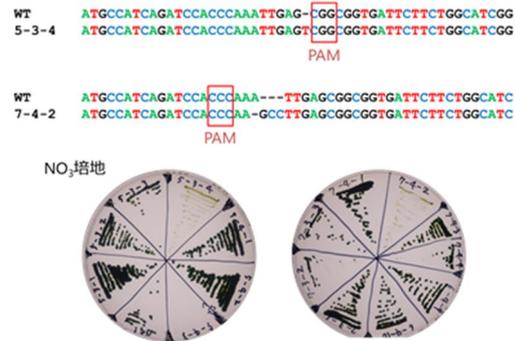


図6 *CNX1G*破壊株の変異導入部の塩基配列と硝酸プレート上での生育

< 引用文献 >

- Ortega, J. L., Moguel Esponda, S., Potenza, C., Conklin, C. F., Quintana, A., & Sengupta-Gopalan, C. (2006). The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. *The Plant Journal*, 45(5), 832-846.
- Yuan, L., Loqué, D., Ye, F., Frommer, W. B., & von Wirén, N. (2007). Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1; 1. *Plant Physiology*, 143(2), 732-744.
- Shi, M., Yu, L., Shi, J., & Liu J. (2022). A conserved MYB transcription factor is involved in regulating lipid metabolic pathways for oil biosynthesis in green algae. *New Phytologist*, doi: 10.1111/nph.18119
- Contreras-Pool, P. Y., Peraza-Echeverria, S., Ku-Gonzalez, A. F., Herrera-Valencia, V. A. (2016). The phytohormone abscisic acid increases triacylglycerol content in the green microalga *Chlorella saccharophila* (Chlorophyta). *Algae*, 31(5), 267-276.
- Komatsu, K., Takezawa, D., Sakata, Y. (2020). Decoding ABA and osmostress signaling in plants from an evolutionary point of view. *Plant Cell & Environment*, doi: 10.1111/pce.13869

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 大迫香穂、笠井由紀、阿部淳、高木さつき、井出曜子、原山重明
2. 発表標題 GUSリポーター遺伝子を用いた単細胞性緑藻Coccomyxaのプロモーター活性評価
3. 学会等名 生物工学会
4. 発表年 2019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
---------	---------