

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K05233
研究課題名（和文）ゲノム操作技術によりデザイン化した微細藻類スマートグリーンセルファクトリーの創製

研究課題名（英文）Generation of engineered designer microalgae by using a genome manipulation technology

研究代表者
河邊 佳典（Kawabe, Yoshinori）

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：30448401
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）：近年微細藻類は、カーボンニュートラル社会実現に向けたバイオエコノミーのための宿主細胞として大変注目が集まっている。目的に合わせて的確にデザインするゲノム・遺伝子改変操作技術を用いることができれば、目的有用物質の生産性向上が期待できる。本研究では、外来遺伝子を安定的に高発現可能な遺伝子改変微細藻類（クラミドモナス）細胞株を開発できた。また、クラミドモナスにおけるさらなる高発現システムの開発を目的に、人工遺伝子発現システムの構築を行った。微細藻類に適した人工転写因子を開発することができ、それに合わせた人工合成プロモーターを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
有用遺伝子の高安定・高発現かつ再組込み可能な細胞株の開発に成功した。同細胞はクラミドモナスリソースセンター（米国ミネソタ大学）に寄託済み（#CC-5888）であり、今後幅広い使用が期待される。ゲノム改変が容易なCre-loxPシステムを用いた遺伝子導入ならびに外来遺伝子の安定発現が示されたことで、より複雑な遺伝子発現系をゲノムDNA上で設計可能であることを示している。また、人工遺伝子発現システムが開発できた。これらことから、合成生物学的手法をベースとするゲノム工学に必要な操作ツール基盤を着実に整備できたため、これまで微細藻類では難しかったデザイナー細胞開発の足がかりになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, microalgae have attracted a great deal of attention as a host cell for the bioeconomy toward the realization of a carbon neutral society. Development of on-genome/gene manipulation techniques will facilitate the productivity of useful substance. In this study, we developed a genetically modified microalgae (*Chlamydomonas*) cell line that can stably express foreign genes at high levels throughout the culture period. In addition, we constructed an artificial gene expression system for the purpose of developing a higher expression system for *Chlamydomonas*. We developed an artificial transcription factor suitable for microalgae, and found an artificial synthetic promoter suitable for it.

研究分野：生物化学工学

キーワード：微細藻類 クラスミドモナス Cre/loxP 人工遺伝子発現システム 人工転写因子 人工遺伝子回路
ゲノム操作 CRISPR転写活性化システム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成微細藻類は、持続可能なグリーンセルファクトリーとして大変注目が集まっている。微細藻類で遺伝子組換え技術がより簡便かつ確実にできれば、バイオ燃料やバイオ医薬品生産、また食品や色素用途等の使用において微細藻類のさらなる高機能化が期待できる。現在までに、葉緑体ゲノムへの遺伝子組換え技術が先行して進められている。しかし、代謝関連タンパク質(酵素)や翻訳後修飾が必要な生理活性物質の細胞における機能・修飾場所は細胞質となるため、核ゲノムでの遺伝子組換え技術の開発が求められている。これまでに、多くの研究グループが微細藻類核ゲノムにおける外来遺伝子発現のための遺伝子発現ツールを開発したり、外来遺伝子発現に適した細胞株を構築してきている。しかしながら、長期間安定的な外来遺伝子発現の検討は不十分であり、確立されたものに至っていない。

外来遺伝子発現には、発現量の制御にかかわる遺伝子モジュールが必要になる。しかし、これまで個々の遺伝子モジュールは経験則的に使用しているにすぎない。また、遺伝子モジュールを組み合わせる評価する手段がない。そこで本研究では、「微細藻類ゲノム特有の問題において外来遺伝子を高効率に高発現・高安定させるテクノロジーは何か」を学術的「問い」とした。従来発現量制御に関わる遺伝子モジュールを人工的に設計・構築・デザインすることが、高発現・高安定可能な遺伝子発現システムを達成するのに最善と考え、核ゲノム上でデザイン可能な遺伝子改変微細藻類細胞株の作製と、微細藻類に適した人工遺伝子発現システムの開発および人工遺伝子ネットワークの構築に関して研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、外来遺伝子の安定的高発現が困難な微細藻類において、ゲノム操作技術を用いてゲノム上で遺伝子を自由自在にデザインし、藻類の生物機能を最大限利用できるスマートセルを迅速かつ確実に構築する技術の開発と、バイオ燃料や環境浄化に関する有用物質生産など藻類バイオテクノロジーへの応用を目指した、微細藻類セルファクトリーの創製を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞および培地

細胞壁欠損株 *C. reinhardtii* CC-406 (cw15, mt-) および組換えクラスミドモナスは、一般的なトリプス/酢酸/リン酸培地 (TAP 培地) を用いて混合栄養条件で 25 °C で培養した。光照射は、100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度で 16 時間照射、8 時間暗所のサイクルで行った。

(2) プラスミド作製

すべてのプラスミドベクターは一般的な遺伝子工学的手法を用いて構築した。細胞への遺伝子導入のためのプラスミドはトランスフェクショングレードの抽出キットを用いて抽出した。PCR 産物はサンガー法を用いて遺伝子配列解析を行った。

(3) 遺伝子導入

細胞へのプラスミド導入は、エレクトロポレーション法 (Nepa21) を用いて行った。クローン細胞を取得する場合は、導入後対応する抗生物質含有 TAP 寒天プレートに塗布し、コロニーを形成させた。一過性発現によるルシフェラーゼアッセイでは、導入後適切な時間で培養上清を回収し、下記に述べるルシフェラーゼ測定キットを用いて発光値を測定した。

(4) ゲノム構造の解析

クラスミドモナスからの核ゲノム抽出は、市販のキット (MagExtractor) を用いて行った。Cre/loxP により組み込まれたときに増幅可能なプライマーペアを設計し、PCR 法を用いてジョイント領域に対して PCR を行った。ゲノムへの組み込みサイトはアダプター-PCR 法を用いて行い、増幅産物のシーケンスを解析することで、同定した。

(5) 導入遺伝子の解析

RNA 抽出は市販の RNA 抽出キット (RNAiso plus) を用いて行った。IFN 遺伝子転写産物を cDNA へコンバートし、特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。分泌型ルシフェラーゼ酵素活性は、市販のルシフェラーゼアッセイキット (Pierce Gaussia Luciferase Flash Assay Kit) を用いて測定した。培養上清回収時に、自動計数装置 (Countess) を用いて細胞数を計数し、酵素活性値とともに分泌型ルシフェラーゼ発現量 (RLU/(cell·day)) を算出した。IFN の発現は、市販の ELISA キット (RayBio Canine IFN-alpha ELISA Kit) を用いて定量化した。

4. 研究成果

(1) 高安定高発現可能なファンダー細胞株の開発と有用物質生産への応用

変異 loxP で挟まれたレポーター遺伝子 (分泌型ルシフェラーゼ, gLuc) およびスペクチノマイ

シン耐性遺伝子 (Spec) 発現ユニットを作製し、エレクトロポレーション法にて *Chlamydomonas* (CC-406) へ遺伝子導入した。導入後、抗生物質含有寒天 TAP プレートに塗布し、コロニーを形成させた。得られた 200 以上のコロニー (単クローン) を TAP 培地で培養し、gLuc の発光値を指標に評価したところ、gLuc を高く発現する細胞株を複数選抜することができた。なかでも発現上位 3 クローンに対して、60 日間にわたり培養して評価したところ、抗生物質の選択圧非存在下においても安定して高い発現を維持していた。特に、最も高かった細胞 (Chlamy/LS_#1) においては、既往の報告よりも 6 倍高い発現を示していた。これら細胞から核ゲノム DNA を抽出し、アダプター-PCR を行うことで、挿入位置の同定を試みた。Chlamy/LS_#3 に関して配列を正確に分析することができなかった。このことから、複数の遺伝子が挿入されていることが示唆された。一方で、Chlamy/LS_#1、Chlamy/LS_#2 では、それぞれ PNW74705 (GENE ID: CHLRE_12g486350v5) の第一エキソン、PNW77862 (GENE ID: CHLRE_10g454734v5) の第 8 イントロンに組み込まれていることがわかった。これらのことから、安定的な外来遺伝子発現を示すと考えられるゲノム部位を同定することができた。

つぎに、Cre/loxP システムを用いて同細胞へ目的遺伝子を部位特異的にノックインし、タンパク質発現を確認するために、Chlamy/LS_#1 において不要となったレポーター遺伝子部分を Cre/loxP システムで削除した、安定的外来遺伝子発現可能なファウンダー細胞株 (Chlamy/S) を樹立した。この細胞は起点となる loxP 配列を核ゲノム中に引き続き有しているため、外来遺伝子と同じゲノム場所に Cre-loxP システムで導入可能である。そこで、IFN 遺伝子発現力セットを有するドナープラスミドと Cre 発現ベクターを共導入した後、対応する抗生物質でスクリーニングすることで、IFN 遺伝子組込み細胞を取得した。得られた細胞から核ゲノム DNA を抽出し、PCR 法を用いて、組込み部分を解析した。その結果、Cre/loxP で組み込まれたときにのみ増幅可能なプライマーペアを用いた場合のみ、予想される分子量サイズでバンドを検出することができた。また、増幅産物のシーケンス解析したところ、期待される loxP 配列への組み換えられていることがわかった。また、IFN の転写産物を解析したところ、導入遺伝子の発現が認められた。培養上清中に生産させた IFN をウエスタンブロットで解析したところ、目的分子量サイズで検出できた。30 日間長期培養したところ、選択圧がない状態でも初期培養時の発現量を維持できた。このことから、開発した細胞株では、外来遺伝子の安定発現細胞株の迅速な構築が可能であり、組換えタンパク質や高機能有用物質の生産ホストとしての利用が期待できる。ゲノム改変が容易な Cre-loxP システムを用いた遺伝子導入ならびに外来遺伝子の安定発現が示されたことで、より複雑な遺伝子発現系をゲノム DNA 上で設計可能であることを示しており、これまで微細藻類では難しかったデザイナー細胞開発の足がかりになりえる。

(2) 人工転写活性化ドメインの開発と人工遺伝子発現システムの構築

微細藻類クラミドモナスにおけるさらなる高発現システムの開発を目的に、人工遺伝子発現システムの構築を行った。一般的に、外来遺伝子発現では、細胞由来のプロモーターがよく用いられている。クラミドモナスで高発現可能な人工プロモーターシステムを開発できれば、細胞の状態や内在性遺伝子制御とは独立してコントロールでき、導入遺伝子の高発現や発現制御が可能となると考えられる。そこで、クラミドモナスに適した人工転写因子による外来遺伝子発現システムの開発を行った。はじめに、人工遺伝子発現システムのための、迅速評価モデルを構築した。微細藻類で一般的によく用いられる遺伝子導入後寒天プレートに塗布し、コロニーを形成させ、各コロニーを評価する方法では、遺伝子導入を行ってから検定に非常に時間がかかる。また、取得したクローン間での差により転写活性化ドメイン (TAD) 間の機能比較が難しいと懸念された。そこで本実験では、動物細胞でよく用いられる一過性発現による評価に着目した。エレクトロポレーション法にて遺伝子導入した後に、そのまま培養を開始して、培地中に分泌されたルシフェラーゼ酵素量を測定することで、迅速かつ簡単な評価系が構築可能か検討した。一過性発現システム評価用のプラスミドとして、単純なプラスミドである pHR/gLuc を用いた。ここでの HR プロモーターは、HSP70A と RbcS2 の発現調節領域から構成されており、クラミドモナスで最も強く発現するプロモーターであることが知られている。本プラスミドを Chlamy/S 細胞へ遺伝子導入後、各時間における培養上清を回収し、市販のルシフェラーゼ測定キットを用いたアッセイを行った。その結果、遺伝子導入後数時間でルシフェラーゼ遺伝子の発現が検出され、6 時間前後で最大化することがわかった。このことから、導入数時間で、一過的発現評価が可能な評価システムを構築できた。

つぎに DNA 結合ドメインと TAD との融合タンパク質からなる人工転写因子を遺伝子工学的に設計し、構築した評価モデルを用いて検討した。クラミドモナスで最も高発現を誘導する既往の遺伝子発現制御領域を使用した場合と比較して、3 倍以上高い発現を誘導可能な人工遺伝子発現系が開発できた。この際用いた人工転写活性化タンパク質の DNA 結合領域の特性を生かして、添加薬剤による発現を評価したところ、濃度依存的な遺伝子発現制御が達成できた。これらのことは融合パートナーを変えることで、さらに複雑な遺伝子発現調節ができることを示唆しており、藻類でのゲノム工学技術の応用展開が見込まれるものとなった。

また、これまでにクラミドモナスでは、CRISPR 技術による遺伝子発現調節に関してほとんど検討がされていない。そこでさらなる導入遺伝子の発現増強のために、CRISPR 転写活性化シ

システムを用いたクラミドモナスにおける遺伝子高発現増強システムの開発を行った。クラミドモナスに適した dCas9 や転写活性化ドメインを調査した。その後、TRE プロモーターをターゲットとして gRNA を設計し、CRISPR 転写活性化システムを評価したところ、gRNA 依存的な遺伝子発現誘導が認められた。さらに HR プロモーターに対して gRNA を複数デザインしたところ、転写増強が認められ、gRNA をうまく選ぶことで最大約 7 倍高い目的遺伝子の発現を検出することができた。また、SAM システムを使うと、さらに 1.8 倍発現向上が認められた。これらのことから、クラミドモナスに適した人工転写因子を明確にでき、高い発現誘導可能な人工遺伝子発現系が構築できたことから、クラミドモナスにおけるゲノム工学に必要な操作ツール基盤を着実に整備することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Guan Huang, Yoshinori Kawabe, Kazuki Shirakawa, Tatsuki Akiyama, Masamichi Kamihira	4. 巻 132
2. 論文標題 Novel transgenic Chlamydomonas reinhardtii strain with retargetable genomic transgene integration using Cre-loxP system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 469-478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.07.006	査読の有無 有
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 Kazuki Shirakawa, Yoshinori Kawabe, Guan Huang, Akira Ito, Masamichi Kamihira	4. 巻 333
2. 論文標題 Targeted Gene Integration into Nuclear Genome of Microalgae Using Cre/loxP Recombination System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MATEC Web of Conferences	6. 最初と最後の頁 7003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1051/mateconf/202133307003	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10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮副こころ、河邊佳典、上平正道
2. 発表標題 CRISPR転写活性化システムによる微細藻類クラミドモナスでの遺伝子発現増強
3. 学会等名 第75回日本生物工学会（2023）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河邊佳典、秋山立幹、宮副こころ、上平正道
2. 発表標題 微細藻類クラミドモナスでの人工転写活性化因子による外来遺伝子発現システム
3. 学会等名 化学工学会第88年会（東京）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋山立幹、河邊佳典、宮副こころ、上平正道
2. 発表標題 Tet転写活性化システムを用いた微細藻類クラミドモナスにおける人工遺伝子発現制御技術の開発
3. 学会等名 創立100周年記念第74回日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮副 こころ、河邊 佳典、上平 正道
2. 発表標題 微細藻類クラミドモナスにおける人工遺伝子発現システムの開発
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山立幹、河邊佳典、黄冠、白川和輝、上平正道
2. 発表標題 微細藻類Chlamydomonasにおける安定的外来遺伝子発現株の開発
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河邊佳典
2. 発表標題 ゲノム操作技術を用いた有用物質生産のためのセルエンジニアリング
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山立幹
2. 発表標題 微細藻類による有用物質の大量生産のためのゲノム工学技術の開発
3. 学会等名 化学工学会九州支部学生賞審査会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山立幹、河邊佳典、上平正道
2. 発表標題 微細藻類における遺伝子発現制御システムの開発
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Huang Guan, Kawabe Yoshinori, Shirakawa Kazuki, Akiyama Tatsuki, Kamihira Masamichi
2. 発表標題 Targeted integration of transgene into a pre-defined genomic locus of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 化学工学会第86年会(2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白川 和輝、河邊 佳典、黄 冠、上平 正道
2. 発表標題 安定的外来遺伝子発現のための <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 宿主細胞株の樹立
3. 学会等名 化学工学会 第51回秋季大会 (2020)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 河邊佳典、上平正道	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した 製品開発とその実用化 ～ 研究開発動向・課題解決策・技術予測と市場展望 ～	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学研究者情報 https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003157/index.html researchmap https://researchmap.jp/kawabe_yoshinori https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003157/index.html https://researchmap.jp/kawabe_yoshinori
--

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