

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：33401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19240

研究課題名（和文）多様な栄養戦略を採る「増やしにくい生物」の増殖能強化による実験生物化への挑戦

研究課題名（英文）Developing new model microorganisms with diverse nutritional strategies by enhancing growth efficiency through genetic manipulation

研究代表者

柏山 祐一郎（Kashiyama, Yuichiro）

福井工業大学・環境学部・教授

研究者番号：00611782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、培養効率が低い原生生物を対象に、最終的に細胞膜輸送体を導入して培地中から吸収した糖やアミノ酸などの溶存有機物を利用した効率的な培養を実現するため、まずこれら非モデル生物の形質転換系の確立と応用を目指した。本期間には、特に食作用混合栄養性（盗葉緑体性）の*Rapaza viridis*（ラパザ）を対象に、CRISPR/Cas9遺伝子ノックインを目指した実験系の整備を進め、高効率（～60%）のゲノム編集を実現し、ノックアウト実験やエピトープタグの導入実験に成功した。また、細胞膜に発現しているラパザの輸送体タンパクを特定し、これと融合させたタンパク質遺伝子の導入のための検証実験を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類が有する真核細胞の知識の大半は、自然界の広範な多様性の中のごく一部の「培養しやすい」モデル生物の研究に基づいている。よって多様な真核生物（細胞）の大半が実験室での培養が困難である事実を考えれば、我々の知識はむしろ非常に特殊な生物からの偏った情報に依存している可能性さえある。我々は、近年確立されたゲノム編集技術はこれら「人類の知らない細胞」の研究に革命をもたらすポテンシャルを有していると考えた。本研究は、ラパザという、これまで実験細胞として見向きもされず、その「盗葉緑体現象」という「常識」からすれば奇妙奇天烈な細胞生理を示す生物のゲノム編集実験系を確立し、新しい真核細胞研究をスタートさせた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish and apply a transformation system for non-model organisms, with the ultimate goal of achieving efficient cultivation by introducing cell membrane transporters to utilize dissolved organic matter such as sugars and amino acids absorbed from the culture medium. During this period, we developed an experimental system aimed at CRISPR/Cas9 gene knock-in, particularly for the phagotrophic mixotroph (thallophyte) *Rapaza viridis* (Rapaza), and achieved high-efficiency (up to 60%) genome editing, successfully conducting knockout experiments and experiments to introduce epitope tags. In addition, we identified the transporter protein of *R. viridis* that is expressed in the cell membrane, and proceeded with verification experiments for the introduction of protein genes fused to this.

研究分野：細胞生物学

キーワード：CRISPR/Cas9ゲノム編集 非モデル生物 難培養性 ラパザ 盗葉緑体現象

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物の遺伝的多様性の大半を占める単細胞性の真核生物(原生生物)は、従来、基本的に培養が容易ではない。従って、既存のモデル生物をベースとした従来の実験生物学的な研究アプローチ(分子生物学や生化学)をこれら難培養性非モデル生物に応用することは、これまで非常に困難であった。一方、自然界にはモデル生物細胞では認められないような多様な細胞生理を示す真核生物が存在していることが分かってきている。例えば、本研究の代表者らの研究室では、最近、鞭毛遊泳性の細胞 *Rapaza viridis* (ラパザ)の「盗葉緑体現象」を見だし、食作用による盗葉緑体の形成から劣化に至る細胞動態の微細構造を研究し、また、多くの水平転移起源の葉緑体関連遺伝子を盗葉緑体(緑藻から奪った葉緑体)の内部に対して発現させていることを明らかにしてきた。従ってこの細胞は、葉緑体進化のプロセスを理解する上で革新的な研究材料であると共に、自由生活性の細胞の食作用のメカニズムなどについても研究可能なものだと言える。一方、近年確立されたゲノム編集技術、特に、*in vitro*で調整されたりボヌクレオチドタンパク質複合体を直接細胞核に導入する CRISPR/Cas9 法は、原理上あらゆる細胞を対象に形質転換実験が可能であり、様々な「人類の知らない細胞」の研究に革命をもたらすポテンシャルがあると考えられた。

### 2. 研究の目的

ラパザを含む、培養効率が低い自由生活型単細胞性真核生物を対象に、ゲノム編集により細胞膜輸送体を導入して、培地中から吸収した糖やアミノ酸などの溶存有機物を利用した効率的な培養を可能にするという発想を得た。そこで、真核生物の一大系統であるユーグレノゾア生物の中から、異なる栄養摂取様式(食作用従属栄養性、盗葉緑体性、および光独立栄養性)を採りながら互いに近接する3つの姉妹系統、すなわち、ペラネマ、ラパザ、ユートレプチエラを研究材料として研究を開始し、本来これらの生物が有さない吸収栄養の能力を付与することにより、従来は困難であった効率的な細胞増殖を可能にし、本来の生理条件(無機培地+餌生物や光)に戻して様々な実験をおこなうことを目標にした。そこで本研究の期間には、まず遺伝子導入を可能にする実験系の確率を目指した。特に、研究上のインパクトが最も高いラパザのゲノム編集から着手することとした。

### 3. 研究の方法

ラパザの DNA-seq データベースを参照し、盗葉緑体の機能に関連すると考えられる遺伝子を選んで、以下の様々なゲノム編集を試みた。すなわち、盗葉緑体の炭酸固定に関連するルビスコ小サブユニット様およびルビスコアクチベース様の遺伝子 (*RvRbcS-like* と *RvRca-like*)、およびラパザの植物的な活動を可能にしている硝酸同化経路に関連すると考えられた硝酸同化酵素様遺伝子(*RvNar-like*)について、遺伝子ノックアウト実験および エピトープタグの挿入(融合発現)実験を試みた。また、フレームシフトを起こすことなく遺伝子の ORF 配列を削除する実験デザインを検証した。さらに、盗葉緑体への輸送シグナルと考えられた配列をクローニングしてルシフェラーゼ-抗生物質耐性融合タンパク質に融合させた DNA フラグメントを合成し、ラパザのゲノム DNA に挿入して発現させる実験を試みた。一方、細胞膜に任意の輸送体を挿入するために、ラパザの細胞膜輸送体を探索し、その構造的特徴(特に局在を指定する配列の位置)と融合タンパク質発現の可能性を探った。

### 4. 研究成果

#### 4.1 遺伝子ノックアウト実験

まず、*RvNar-like* について、N 末端側の配列に crRNA のターゲット配列を設計し、tracrRNA とアニーリングさせて gRNA とし、*in vitro*で Cas9 と RNP を形成させて、エレクトロポレーション法により細胞に導入したところ、増殖した細胞の 69% に非相同末端連結エラーに伴う変が認められ、56% では切断位置下流でフレームシフトが生じて遺伝子のノックアウトが生じた。ここからマイクロキャピラリー法により細胞を単離して培養することで、非常に効率的にノックアウト体クローンが得られることが分かった(Maruyama et al., 2023)。次に、*RvRbcS-like* と *RvRca-like* において N 末端側に数百塩基離れたターゲット配列をそれぞれ持つ 2 つの crRNA を設計し、2 種類の RNP を調整してエレクトロポレーション法により細胞に導入したところ、2 つの切断部位が非相同末端連結により結合した変異が PCR 産物の電気泳動により認められた。この短化した PCR 増幅産物の配列を解読したところ、いくつかの変異のバリエーションが認められたため、マイクロキャピラリー法により細胞を単離して培養したところ、塩基の欠如に続いてフレームシフトが認められる変異体クローンを得ることができた。さらに *RvRbcS-like* については、このような 2 種類の RNP に加えて、これらの切断箇所を正確に接続するための ssODN を同時に細胞に導入したところ、ssODN の設計通りに接続された変異体が優先的に得られることが

分かった（論文執筆中）。

#### 4.2 エピトープタグ「HiBiT」および「HA×3」の融合発現

*RvRbcS-like* の細胞内での局在を調べることを目的として、この翻訳産物で4回繰り返す RbcS ドメインの3番目と4番目を接続しているリンカー部分に2カ所の crRNA ターゲットを設計し、エピトープタグ「HiBiT」ないし「HA×3」の配列を含む ssODN と2つの RNP を同時にラバザ細胞に導入したところ、高い確率で設計通りの変異を持つクローンが得られた（前者では約6割）。これらの融合タンパク質が発現した変異体では、この遺伝子のノックアウト体で認められるような光合成活性の低下や細胞増殖率の低下などの有意なフェノタイプ変化は認められず、これら融合タンパク質が本来の機能を維持していることが示唆された。HiBiT 導入体では、細胞のライセートに対して HiBiT タグと相補してルシフェラーゼを構成する LgBiT タンパク質とルシフェラーゼの発光基質を添加するアッセイを行ったところ、高い発光が認められ、この融合タンパク質が有意に発現していることが示唆された。また、HA×3 導入体では、HA 抗体を用いた抗体顕微鏡観察実験により、この融合タンパク質は盗葉緑体の内部で RbcL とほぼ共局在する形で発現していることが示された（論文執筆中）。

#### 4.3 ORF 部分削除ゲノム編集による輸送シグナルの除去

4.1 の実験において成功した2種類の RNP による2カ所切断と ssODN を用いた正確な接続の手法を応用し、*RvRbcS-like* の N 末端側に存在が予測された輸送配列の除去を試みた。この機能ドメインより N 末端側上流に存在する構造が明確に予測されない配列部分については、まず、比較的近縁な生物であるユーグレナ藻の葉緑体遺伝子に存在する輸送配列との類似性から、ラバザがタンパク質を盗葉緑体に輸送するために用いられる輸送シグナルとして機能するものと予想し報告した（Karnkowska et al., 2023）。これを証明する1つのアプローチとして、この輸送シグナル様ペプチドの大半を欠如させるゲノム編集を試みた。すなわち、この配列をコードする部分の h 上流部分と下流部分のそれぞれに crRNA を設計し、2種類の RNP を調整した。さらに、この2カ所の切断部位を接続しつつ下流側にフレームシフトが起こらないような ssODN を設計し、2つの RNP と共にラバザ細胞に導入したところ、設計通りのゲノム編集がなされた変異体を得られた。*RvRbcS-like* の機能ドメイン部分に対するペプチド抗体を用いた Western blotting 実験からは、輸送シグナル様配列を削除した変異体ではタンパク質がほとんど蓄積しないことが示された。

#### 4.4 推定盗葉緑体輸送シグナルを持たせたルシフェラーゼ遺伝子の導入

上述の推定輸送シグナルが単独で盗葉緑体へのペプチドの輸送を実現していることをレポーターアッセイにより証明するため、まず、ルシフェラーゼ「NanoLuc」とセレクションマーカーとしての抗生物質耐性遺伝子 NeoR の融合タンパク質遺伝子のラバザへの導入を試みた。すなわち、ここでは *Euglena gracilis* の遺伝子のプロモーター配列と NanoLuc-NeoR 配列およびシロイヌナズナで知られるターミネーター配列からなるコンストラクトをもつプラスミドを作製し、該当箇所を PCR 増幅させた dsDNA 断片をエレクトロポレーション法によりラバザ細胞内に導入させ、ゲノム DNA へのランダム挿入を試みた。薬剤選抜実験を経てマイクロキャピラリー単離されたクローンでは、非常に高いルシフェラーゼ発光シグナルを確認できた（Nakazawa et al., 2023）。このルシフェラーゼ導入細胞を発光顕微鏡で観察したところ、細胞質に発光が局在し、盗葉緑体からは発光が全く認められなかった。次に、上述のコンストラクトの融合タンパク質配列の上流に *RvRca-like* の推定盗葉緑体輸送シグナルを融合させたコンストラクトを作製し、同様に dsDNA を用いたゲノム DNA へのランダム挿入実験を試みたところ、同様に高いルシフェラーゼ発光シグナルを示すクローンを得ることができた。この細胞を発光顕微鏡で観察したところ、発光が盗葉緑体に局在することが示され、この N 末端側配列が盗葉緑体輸送シグナルとして単独で機能することが証明された。

#### 4.5 ラバザの細胞膜輸送体の研究

ラバザが硝酸同化経路を有していると考えられることに着目し、細胞外からサイトゾルへ硝酸イオンを取り入れるための硝酸輸送体を探索したところ、ユーグレナ藻の硝酸輸送体などと相同性を示すタンパク質遺伝子 *RvNRT-like* が確認された。この遺伝子がラバザの硝酸同化経路に必須な因子であることを証明するため、上述のゲノム編集法によるノックアウト実験を行ったところ、*RvNRT-like* のノックアウト体では硝酸イオンを全く利用できないフェノタイプが認められ、これが実際に硝酸イオン輸送体として細胞膜に発現している可能性が示された。次に、このタンパク質に任意の輸送体を融合発現させることができれば、ラバザ細胞膜に糖輸送体などを発現させられるのではないかと考え、このペプチドの N 末端側と C 末端側に存在する機能未知の配列それぞれについて、上述のゲノム編集削除実験を試み、細胞膜局在に必須なシグナルの探索を試みた。すると、N 末端側と C 末端側のいずれかが削除された変異体では、どちらも *RvNRT-like* が機能しないフェノタイプが得られることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Karnkowska Anna, Yubuki Naoji, Maruyama Moe, Yamaguchi Aika, Kashiyama Yuichiro, Suzaki Toshinobu, Keeling Patrick J., Hapl Vladim?r, Leander Brian S.	4. 巻 120
2. 論文標題 Euglenozoan kleptoplasty illuminates the early evolution of photoendosymbiosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2220100120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2220100120	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 該当する
1. 著者名 Nakazawa Masami, Andoh Hiroko, Tsujii Hiromi, Amada Katsumi, Okuno Hitomi, Gejima Yusuke, Iizuka Kumi, Haruguchi Daiki, Maruyama Moe, Kashiyama Yuichiro, Ueda Mitsuhiro, Miyatake Kazutaka, Sakamoto Tatsuji	4. 巻 75
2. 論文標題 Stable nuclear transformation methods for <i>Euglena gracilis</i> and its application to a related Euglenida	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 103292 ~ 103292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.algal.2023.103292	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 Maruyama Moe, Kagamoto Tsuyoshi, Matsumoto Yuga, Onuma Ryo, Miyagishima Shin-ya, Tanifuji Goro, Nakazawa Masami, Kashiyama Yuichiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Horizontally Acquired Nitrate Reductase Realized Kleptoplastic Photoautotrophy of <i>Rapaza viridis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1082 ~ 1090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcad044	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 丸山 萌・柏山 祐一郎	4. 巻 55
2. 論文標題 ユーグレノイド鞭毛虫 <i>Rapaza viridis</i> による盗葉緑体現象	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 15-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 柏山 祐一郎	4. 巻 72
2. 論文標題 盗葉緑体生物ラバザはどのように進化してきたか	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 藻類	6. 最初と最後の頁 27-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 丸山萌
2. 発表標題 盗葉緑体生物のNitrate Reductase様遺伝子の機能発現
3. 学会等名 第12 回本光合成学会年会およびシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山萌, 加賀本剛, 中澤昌美, 蘆田弘樹, 粟井光一郎, 柏山 祐一郎
2. 発表標題 ラバザの盗葉緑体を制御するHGT起源タンパク質群
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏山 祐一郎, 丸山萌
2. 発表標題 ユーグレノイド鞭毛虫 <i>Rapaza viridis</i> による盗葉緑体現象
3. 学会等名 ユーグレナ研究会第37回研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山萌, 柏山 祐一郎
2. 発表標題 盗葉緑体性ユーグレノイドのもつNitrate reductase 様遺伝子の機能検証
3. 学会等名 ユーグレナ研究会第37回研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏山 祐一郎
2. 発表標題 どうすれば植物になれるのか? 盗葉緑体生物ラバザの動的キメラ状態
3. 学会等名 第3回東京理科大学総合研究院合成生物物学研究部門シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山萌
2. 発表標題 ユーグレノイド類ラバザにおける盗葉緑体現象
3. 学会等名 第47回原生生物・寄生虫・進化(PPE)セミナー(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山萌, 加賀本剛, 谷藤吾朗, 中澤昌美, 柏山祐一郎
2. 発表標題 盗葉緑体生物のNitrate reductase様遺伝子の機能検証
3. 学会等名 第12 回日本光合成学会年会およびシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏山祐一郎, 丸山萌
2. 発表標題 ラバザの盗葉緑体を制御するHGT起源タンパク質群
3. 学会等名 NIBB共同利用研究「研究会」盗機能生物研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Kashiyama, M. Maruyama, T. Kagamoto, M. Nakazawa, N. Inada, H. Ashida, R. Onuma, S. Miyagishima
2. 発表標題 Genetic transformation of <i>Rapaza viridis</i> and biochemical demonstration of its kleptoplast-targeted proteins
3. 学会等名 3rd Annual International Congress on Euglenoids 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柏山祐一郎
2. 発表標題 ラバザの核ゲノムコード「盗」葉緑体タンパク質
3. 学会等名 日本共生生物学会第7回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大橋悠歩, 加賀本剛, 丸山萌, 柏山祐一郎
2. 発表標題 盗葉緑体生物 <i>Rapaza viridis</i> の硝酸イオン輸送体様タンパク質の機能検証
3. 学会等名 日本共生生物学会第7回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大橋悠歩, 加賀本剛, 丸山萌, 中澤昌美, 柏山祐一郎
2. 発表標題 盗葉緑体生物Rapaza viridisの硝酸同化経路の検証
3. 学会等名 日本藻類学会第48回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 柏山祐一郎, 中澤昌美
2. 発表標題 盗葉緑体性ユウグレノイドRapaza viridisのゲノム編集
3. 学会等名 第38回ユウグレナ研究会
4. 発表年 2023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
研究分担者	藤原 崇之 (Fujiwata Takayuki)  (10595151)	国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教  (63801)	
研究分担者	中澤 昌美 (Nakazawa Masami)  (90343417)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師  (24403)	

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