

関西学院大学 研究成果報告

2024年 3月 11日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科

職名：博士研究員

氏名：豊島 正和

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	☐ 特別研究期間 ☐ 自由研究期間 ☐ 大学共同研究 ☐ 個人特別研究費 ☒ 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	海洋性珪藻のピレノイドの構造と機能、及び有用物質生産に関する研究
研究実施場所	生命環境学部生物科学科 松田研究室
研究期間	2023年 4月 1日 ～ 2024年 3月 31日 (12ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* のバイオマス生産性向上を目的として、ゲノム編集技術を用いて *P. tricornutum* の遺伝子破壊を行なった。バイオマス生産性向上に向けたゲノム編集による破壊遺伝子として、光合成利用の高効率化を目的としたターゲットとして、i) フコキサンチン・クロロフィル *a/c* 結合タンパク質 (LHC) をコードする 5 遺伝子、ii) メチルエリストールリン酸経路の入口酵素である DXP レダクトイソメラーゼ (DXS) をコードする遺伝子、iii) カロテノイド・フコキサンチン合成経路酵素である リコペンシクラゼ (LYCB) をコードする遺伝子をターゲットとした。また、b) 増殖能に通じる代謝バランスの最適化を目的として i) β -グルカン合成経路のホスホグルコムターゼ (PGM) と UDP-グルコースピロホスホリラーゼ (UGP) をコードする 3 遺伝子、ii) トリアシルグリセロール (TAG) やコレステロール合成酵素 (PDAT, DGAT, ACAT, KCT) をコードする 12 遺伝子、ii-2) TAG リパーゼなど 4 遺伝子、ii-3) TAG 合成制御に関わる因子をコードする 4 遺伝子、iii) 解糖系の酵素の発現制御に関わる PFK2/F2BP をコードする 2 遺伝子、iv) 細胞の代謝をグローバルに制御する転写制御因子をコードする 7 遺伝子をターゲットとした。さらに、細胞内のホメオスタシスの最適化を目的として、炭酸脱水酵素 (CA) をコードする 3 遺伝子をターゲットとした。ゲノム編集による遺伝子破壊のターゲットに設定した 43 遺伝子に対して 55 個のゲノム編集のためのプラスミド DNA を作製した。作製したそれぞれのプラスミド DNA をバクテリア接合法を用いて *P. tricornutum* 細胞内へ導入した。プラスミド DNA の導入した細胞のコロニーはゼオチン耐性の

獲得により選択した。55種類のプラスミドそれぞれを導入した細胞全てでゼオチン耐性を獲得したコロニーが得られた。ゼオチン耐性を獲得したコロニーからゲノムDNAを抽出し、そのゲノムDNAを鋳型として目的のゲノム編集領域を挟むように設計したプライマーを用いたPCRによりゲノム編集が起こっているかを確認した。得られたゲノム編集が起こっている可能性のある細胞をモノクローン化するため、新しいゼオチン入りプレート培地に再び播種した。再度、形成された*P. tricornutum*の細胞コロニーからゲノムDNAを抽出して再びPCRによりゲノム編集の確認を行なった。その結果得られたゲノム編集された細胞のゲノムDNAの塩基配列をシーケンス解析により解読した。その結果、UGP/PGMでは11株（うちOut of frame変異4株）、PDATでは3株（うちOut of frame変異3株）、PFK2/F2BPでは3株（うちOut of frame変異1株）、LCYBでは5株（うちOut of frame変異1株）、LHCでは18株（うちOut of frame変異12株）、CAでは20株（うちOut of frame変異12株）、転写制御因子では30株（うちOut of frame変異17株）のゲノム編集株が得られた。得られたゲノム編集株について、弱光（光強度 $20 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）、強光（光強度 $200 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）、高 CO_2 （ CO_2 濃度1%）、高 CO_2 +強光のそれぞれの培養条件について生育測定し、野生株との比較を行った。弱光条件下では、転写制御因子を破壊した株で細胞の生育速度と到達濁度で野生株より高くなった。また、LHCを破壊した株で生育速度の向上が見られた。UGPをコードするJ23639遺伝子の一部を欠損させた株でも生育速度の向上が見られた。次に、強光条件下ではほとんどの株で野生株より生育速度や到達濁度の減少が見られた。特にPGMの破壊株では著しく生育が阻害された。高 CO_2 条件下では、野生株より到達濁度が上昇したゲノム編集株は見られなかったが、転写因子などのいくつかの破壊株で生育速度の増加が見られた。高 CO_2 +強光条件下では、転写因子のゲノム編集破壊株とUGPの破壊株で、生育速度や到達細胞濁度の増加が見られた。高 CO_2 +強光条件下で生育の向上したゲノム編集株についてさらに詳細に生育特性を調べた。その結果、1個の転写因子のゲノム編集破壊株において野生株より生育速度と到達細胞濁度が有意に増加していることが明らかになった。

得られたゲノム編集株について、細胞内の油脂の生産性に変化がないか調べた。弱光条件下において生育した細胞から、Bligh & Dyer法を用いて、全脂質を抽出した。抽出した脂質を薄層クロマトグラフィーによって、中性脂質であるトリアシルグリセロールと遊離脂肪酸、膜構成脂質に分画した。分画したそれぞれの脂質クラスからメタノリシス反応により脂肪酸メチルエステルを生成した。生成した脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーにより分離・定量し、それぞれの脂質の細胞内量とした。その結果、UGPやCA、転写因子のゲノム編集破壊株のいくつかで細胞あたりのトータル脂質の増加が見られた。また、*P. tricornutum*が生産する高付加価値物質である脂肪酸のエイコサペンタエン酸(EPA)についてはUGPゲノム編集破壊株では野生株に比べて変わらないか、減少したのに対して、CAや転写因子のゲノム編集破壊株で増加した。これまでの結果から転写因子のゲノム編集破壊が*P. tricornutum*のバイオマス生産性向上において有効であることが示唆された。今後は、さらにターゲットとした遺伝子のゲノム編集破壊株の作製を行い、*P. tricornutum*のバイオマス生産性向上において有効な株の探索を行うとともに、これまでに得られたバイオマス生産性向上に有効な転写因子のゲノム編集破壊株について光合成活性や CO_2 固定能などの詳細な解析を行う。

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。