

# 関西学院大学 研究成果報告

2023年 3月 14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	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 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	2022年 4月 1日 ~ 2023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。まず、バイオマス生産性向上に向けてゲノム編集のターゲットとなる遺伝子の探索を行なった。a) 光合成利用の高効率化、b) 増殖能に通じる代謝バランスの最適化、c) ホメオスタシスの最適化に資する遺伝子をターゲットとして定めた。その結果、a) 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 リコペンシクラーゼ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)  $\beta$ -グルカン合成経路のホスホグルコムターゼと UDP-グルコースピロホスホリラーゼをコードする 3 遺伝子、ii) トリアシルグリセロール合成酵素をコードする遺伝子、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、c) ホメオスタシスの最適化を目的として炭酸脱水酵素をコードする 4 遺伝子をターゲットとした。ターゲットとした合計 23 遺伝子のそれぞれに対して、ゲノム編集のためのガイド RNA を設計した。ガイド RNA の設計には ATUM の CRISPR gRNA Design tool (<https://www.atum.bio>) と CRISPR RGEN Tools の Cas-designer ([www.rgenome.net/cas-designer](http://www.rgenome.net/cas-designer)) を用いた。ターゲットとした 23 遺伝子に対して

31セットのガイドRNAを設計した。設計したガイドRNAに相補する配列でゲノム編集が起こるようなプラスミドDNAを31種類作製した。作製したプラスミドDNAを大腸菌S17-1株に導入した。S17-1株は*P. tricornutum*細胞と接合し、線毛を介して自身のプラスミドDNAを*P. tricornutum*細胞へ導入する能力を有している。このS17-1株を用いたバクテリア接合によりゲノム編集のためのプラスミドDNAを*P. tricornutum*細胞へ導入した。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。31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。プラスミドを導入した31種類の株のうち、30種類でゲノム編集が起こっている可能性のある細胞が得られた。この時点ではゲノム編集が起こっている細胞と野生型の細胞が混在していると考えられ、ゲノム編集された細胞のみを得るため（モノクローン化）、ゲノム編集が起こっている可能性のあるコロニーを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みで構成されていると考えられるコロニーのゲノムDNAの塩基配列をシークエンス解析により解読した。その結果、ゲノム編集により目的の遺伝子の一部が欠損した5遺伝子（ $\beta$ -グルカン合成経路のホスホグルコムターゼとUDP-グルコースピロホスホリラーゼをコードする2遺伝子とトリアシルグリセロール合成酵素をコードする遺伝子、PFK2/F2BPをコードする遺伝子、転写制御因子をコードする遺伝子）18株を獲得した。ゲノム編集された遺伝子から翻訳されるタンパク質を確認したところ、ホスホグルコムターゼでは全1047アミノ酸の588から602番目のアミノ酸の15アミノ酸の欠損が確認された。UDP-グルコースピロホスホリラーゼをターゲットとしたゲノム編集では全712アミノ酸の72から80番目の9アミノ酸の欠損したタンパク質と途中で終止コドンが入ったことによって126アミノ酸のみになるタンパク質をコードする遺伝子がヘテロになっている細胞が得られた。また、トリアシルグリセロール合成酵素をコードする遺伝子をターゲットとしたゲノム編集では、全722アミノ酸のうち577アミノ酸と553アミノ酸までしか翻訳されない遺伝子を持つ細胞がそれぞれ得られた。PFK2/F2BPをコードする遺伝子、転写制御因子をコードする遺伝子についても、翻訳が途中で止まるようにゲノム編集された遺伝子を持つ株が得られた。現在、これらの株についての生育特性を測定している。また、その他のターゲット遺伝子についてもゲノム編集株の作製を続けている。

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。