

「褐虫藻におけるゲノム編集および酸素還元酵素の機能解明」

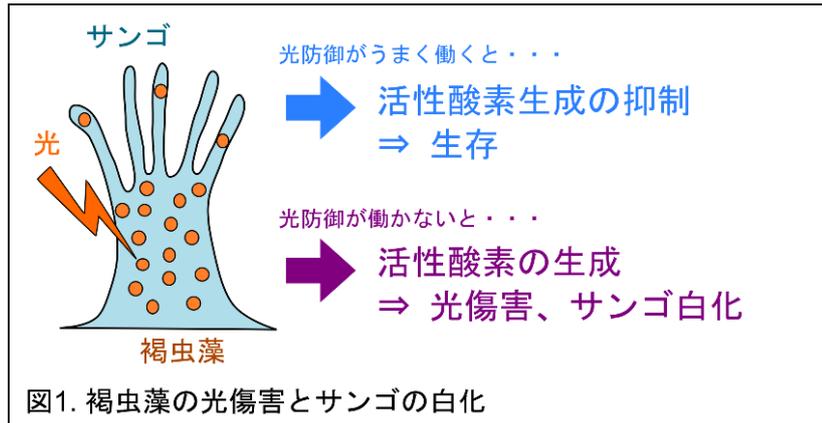
関西学院大学 生命環境学部

嶋川 銀河

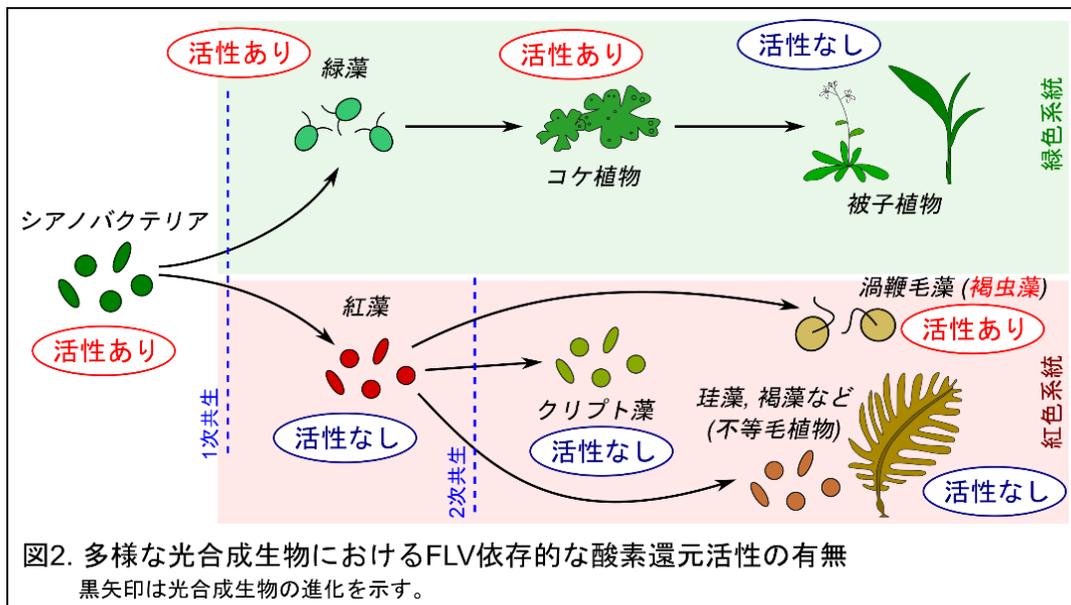
1 研究の背景と目的

サンゴ礁は、生物多様性の観点において最も重要な生態系の一つである。海洋においてサンゴ礁が占める面積は1%にも満たないが、その中には全海洋生物の約4分の1に相当する9万種の生物が生息する。これら多種多様な生物を支えるサンゴ礁は、漁業や観光業の観点においても私たちの生活に重要な役割をもつ。

造礁サンゴの細胞内には渦鞭毛藻の一群である褐虫藻 (Symbiodiniaceae) が共生し、光合成によってサンゴへ有機物を供給しているが、高水温などの環境ストレスによって褐虫藻が活性酸素を蓄積すると、その光合成系が光



傷害を受けてしまい、その結果サンゴ側は十分なエネルギーを確保できず、最悪の場合では死に至ってしまう (図1; 樋口ら 2014 日本サンゴ礁学会誌 16, 47-64)。一方で、褐虫藻は様々な光防御システムを有しており、軽微な環境ストレス下では、うまく光傷害を予防して生存するはずである。これまでの多種多様な光合成生物における光防御因子の研究から、褐虫藻が紅色進化系統において例外的に酸素還元酵素である FLV を有することがわかっている (図2; Shimakawa et al. 2019 *Photosynth. Res.* 139, 401-411, Shimakawa et al. 2022 *Photosynth. Res.* 151, 113-124)。FLV は、活性酸素生成の原因となる過剰な電子を安全に使い、酸素を水へと還元することで、光傷害の予防に役立つと推定されるが、褐虫藻におけるその詳細な生理機能は未だ不明である。これら褐虫藻の光傷害・光防御を分子レベルで理解するために有効な手段は、遺伝子組換えによる



変異体の作製およびその解析であるが、他のモデル生物と異なり褐虫藻における遺伝子組換え技術は未だ確立されていない。

本課題では、FLV 欠損株の作製を目指して、褐虫藻におけるゲノム編集による遺伝子組換え技術の開発に取り組んだ。

2 研究方法・研究内容

A. 褐虫藻における遺伝子組換え技術の開発

ゲノム編集を利用して褐虫藻クレード C 株 (*Cladocopium* sp.) の遺伝子組換え技術を開発する。RNP 法では Cas9 タンパク質と gRNA の複合体 (Cas9-gRNA 複合体) を直接細胞内に導入することにより、形質転換を伴わない遺伝子組換えが可能である。本法はゲノム編集を応用した最新技術であるが、すでに海洋性珪藻 (Serif et al. 2018 *Nat. Commun.* 9, 3924) や褐藻 (Badis et al. 2021 *New Phytol.* 231, 2077–2091) において成功例が報告されている。当該手法のターゲット因子については、まず褐虫藻の Adenine phosphoribosyltransferase (APT) を標的とする。APT を欠損した変異体は、野生株において毒となる 2-fluoroadenin (2-FA) 存在下での生育が可能となるため、ゲノム編集がかかったコロニーの簡便な単離が可能である。RNP 法においては異なる複数の Cas9-gRNA 複合体を同時に導入することができるため、APT および FLV の両方をターゲットとした複合体を共導入することにより、APT/FLV 二重欠損株の選抜が可能となる。得られたコロニーは数回にわたる播種を通してモノクローン化し、最終的にシーケンス解析によって遺伝子型を同定する。形質転換、すなわち Cas9-gRNA 複合体の導入法としては、エレクトロポレーションおよびパーティクルボンバートメントを想定する。

B. FLV 欠損株の生理解析

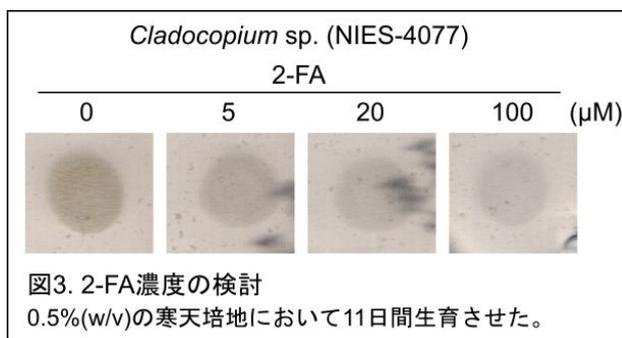
非破壊的な酸素濃度測定とパルス変調クロロフィル蛍光・吸収測定を駆使することで褐虫藻における FLV の機能および光防御への役割を定量的に評価する。具体的には、酸素発生および光化学系 II のクロロフィル蛍光を同時測定することで酸素依存的な電子伝達活性を評価し、野生株と FLV 欠損株の比較によって FLV の生理活性を定量的に評価する。また、近赤外吸光の非破壊測定によって光化学系 I の酸化還元レベルを測定し、FLV が光化学系 I の酸化還元に与える影響を明らかにすることができる。また、光合成解析に加えて高温や強光など環境ストレス下における FLV 欠損株の生育も評価する。

3 研究成果

I. 寒天濃度および 2-FA 濃度の検討

形質転換後の選抜に向けて、2-FA 存在下での寒天培地生育の条件検討が不可欠である。異なる寒天濃度および 2-FA 濃度において C 株の生育を確認したところ、1% (w/v) 寒天培地で

明確な生育阻害がみられたことから、安定な生育を実現するためには 0.5% (w/v) 程度の寒天濃度が最適であると判断した。また 2-FA 濃度については、5 μM から生育阻害が現れ始め、10 μM 存在下では C 株の生育が確認できなかった (図 3)。このことから、10 μM 程度の 2-FA 濃度が最適であると判断した。



II. sgRNA のデザインおよび *in vitro* での切断確認

ゲノムデータベースより C 株の APT を BLAST 検索した結果、1 つの遺伝子が検出された。本課題で用いる Cas9 タンパク質でゲノム編集を起こすため、PAM 配列の前にある 20 塩基の配列をターゲットとし、APT 遺伝子のエクソン部分について 2 つのゲノム編集ターゲットをデザインした。

決定したターゲットが Cas9 によって切断されるか否か、*in vitro* における切断確認が可能で

ある。PCR により別途増幅した APT の全長配列を用いて切断確認を行ったところ、両ターゲットについて切断が確認されたが (図 3)、切断バンドがより明瞭であったターゲット 2 において以降の形質転換実験を行うこととした。

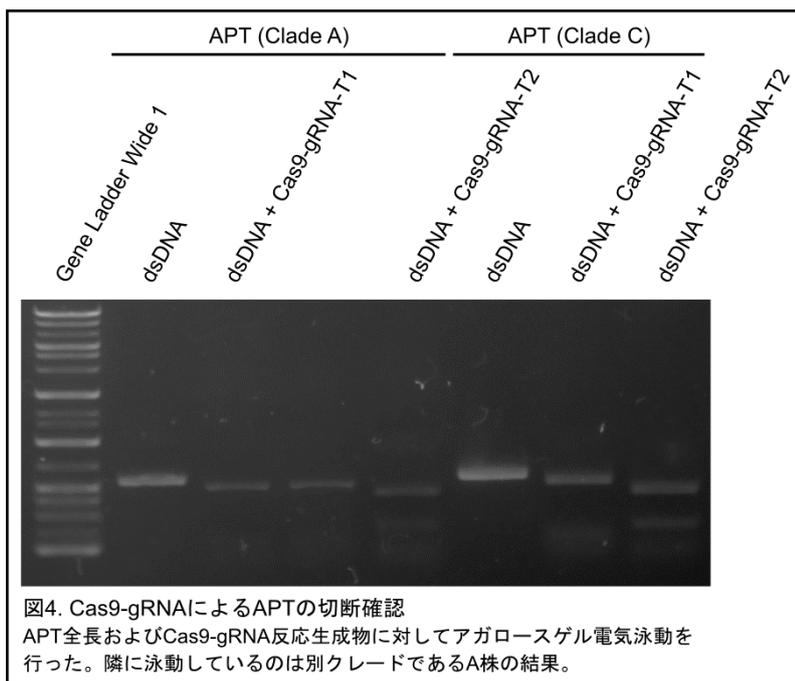


図4. Cas9-gRNAによるAPTの切断確認
APT全長およびCas9-gRNA反応生成物に対してアガロースゲル電気泳動を行った。隣に泳動しているのは別クレードであるA株の結果。

III. ゲノム編集ノックイン系のデザイン

APT 遺伝子の破壊による 2-FA 存在下での選抜のみでは、形質転換後の変異株単離が煩雑であるため、本課題では homology arm の導入によるノックイン系をデザインした。具体的には APT の gRNA ターゲット 2 前後 500 bp 長の相同配列を用いて緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の翻訳領域の両側を挟んだプラスミドを構築し、これを RNA と共に導入する。本法はすでに褐虫藻と同じ二次共生藻である珪藻 *Thalassiosira pseudonana* において成功例が報告されており (Nam et al. 2022 *BioRxiv*)、国際会議 MLD において関連する詳細情報の収集を行っている。本課題における実際の実験では、プラスミド中の必要な配列のみを制限酵素による切断およびゲル精製で取り出し、また Strandase によって sDNA 化処理したものを用いた。

IV. 形質転換法の検討

RNP 導入法の候補にはエレクトロポレーション法およびパーティクルボンバートメント法を想定していたが、まずは、安価かつ簡便であるエレクトロポレーション法の検討を行った。実験には巨大分子である Cas9-gRNA 複合体を想定して FITC-Dextran (150 kDa)を用い、パルス設定等は珪藻 *Chaetoceros gracilis* において報告されている条件にしたがった (Miyahara et al. 2013 *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 874-876)。エレクトロポレーション後の細胞について蛍光観察を行ったところ、細胞膜沿いに FITC の緑色蛍光が確認されたことから、Cas9-gRNA が細胞内に導入されていないことが示唆された (図 5)。この結果は、異なるパルス頻度や強度においてもほとんど変わらなかった。このことから、RNP の導入には分子を物理的に細胞へ導入することができるパーティクルボンバートメント法がより適していると判断した。

パーティクルボンバートメント法では、それぞれ homology arm/EGFP 融合コンストラクトおよび Cas9-gRNA を金粒子に吸着させ、十分に乾燥させた際に細胞内へ導入し

た。その他の実験条件は珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における既報にしたがった (Serif et al. 2018 *Nat. Commun.* 9, 3924)。これら形質転換後、2-FA 存在下において寒天培地へ現れたコロニーについて変異体候補として取得した。現在ゲノムシーケンスにより遺伝子型の同定を順次行っている。

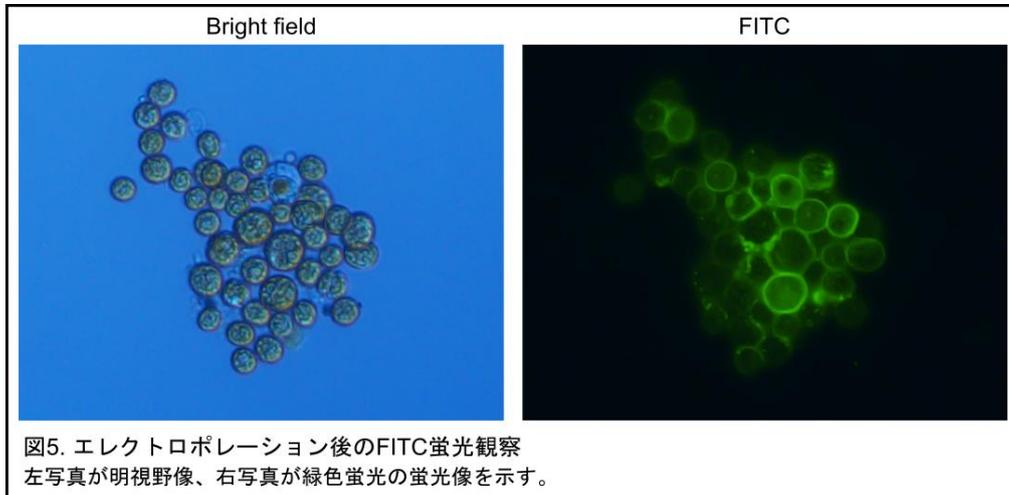


図5. エレクトロポレーション後のFITC蛍光観察
左写真が明視野像、右写真が緑色蛍光の蛍光像を示す。

4 生活や産業への貢献および波及効果

褐虫藻およびサンゴのゲノム情報は、ここ数年の間に急激に明らかになってきており、これら生物における遺伝子組換え技術の需要は今後世界的に急増すると推定される。本課題で新規に開発を目指す褐虫藻のゲノム編集技術および成果から得られた分子生物学的知見は、この先多くの分子生物学および生理学研究へ展開され、これらを通してわが国が世界的なサンゴ分子研究の拠点となることを期待する。

褐虫藻におけるゲノム編集技術の開発は国内外において他の研究グループにも注目され、取り組まれているが、未だ成功に至った事例は報告されていない。本課題では、RNP法を用いることで煩雑なプラスミド作製のステップを解消し、解決すべき課題を細胞導入および組換えといった2つのステップに絞った。少なくとも本成果からRNPの導入にはエレクトロポレーション法よりもパーティクルボンバートメント法が適していることが示唆された。また、選抜時の寒天や2-FA濃度の検討を行ったことで、今後のゲノム編集技術開発に有用な知見を得ることができた。