

海藻類でのゲノム編集による遺伝子導入に世界で初めて成功

～高バイオマスなどのスーパー海藻の開発に期待～

ポイント

- ・ゲノム編集技術 Crispr-Cas9 を利用した、ゲノムの標的箇所への遺伝子導入に成功。
- ・ドナーDNA と一本鎖 DNA により、任意の配列をゲノムの標的箇所へ挿入可能。
- ・任意の遺伝子に挿入変異が可能となり、マリンバイオテクノロジー分野の進展に期待。

概要

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター水圏ステーション室蘭臨海実験所の市原健介助教らの研究グループは、これまで安定した形質転換系の確立が困難であった海藻類を材料にし、ゲノム編集技術である Crispr-Cas9 を利用することで、標的遺伝子への挿入変異が可能な安定的な形質転換系の構築に世界で初めて成功しました。

海産緑藻であるアオノリは世界中の沿岸域に広く分布する緑藻で、複数の種についてゲノム情報が報告されています。しかし、逆遺伝学的な手法^{*1}の開発はまだ初期段階にあり、遺伝子の機能解析や有用な遺伝子変異の誘導は困難でした。本研究では、Cas9 タンパク質とガイド RNA から構成される Cas9 RNP 複合体^{*2}、ドナーdsDNA、Cas9 RNP 複合体による二本鎖切断部位とドナーdsDNA に相同な配列をもつ一本鎖 DNA を同時にアオノリの生殖細胞に導入することにより、任意の位置に遺伝子を挿入する手法を開発しました。本研究では高発現遺伝子として知られる *rbcS*^{*3} (ribulose 1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase) を標的とし、この遺伝子に緑色蛍光タンパク質である GFP を挿入することに成功しました。また、より長い DNA (*rbcS* プロモーターにより GFP を発現する) 断片の挿入にも成功しました。確立された GFP 挿入変異体は、数世代にわたって高い GFP の発現を維持しています。このゲノム編集による遺伝子挿入法は、制限はあるもののゲノム中の任意の場所に遺伝子などの挿入が可能で、海藻類における遺伝子工学と標的遺伝子の機能解析を大きく前進させることが期待されます。

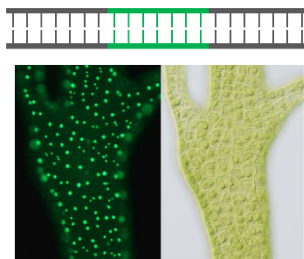
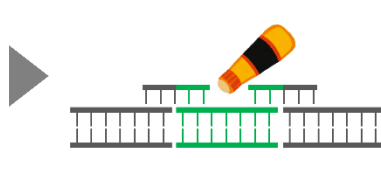
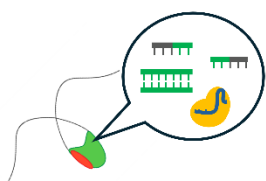
なお、本研究成果は、2024 年 6 月 30 日（日）公開の *Algal research* 誌に掲載されました。

1. PEG法で全ての材料を細胞に投入

2. ハサミ(Cas9 RNA 複合体)でDNAが切れる

3. のり(一本鎖DNA)が切断箇所に遺伝子を貼り付ける

4. 任意の箇所に遺伝子挿入！



アオノリでの Cas9 を用いた遺伝子挿入法の概要

【背景】

緑色海藻類であるアオサ属藻類は、世界中の沿岸域に生育する海藻類の仲間で、しばしば大量発生し、グリーンタイド（緑潮）の構成種としても知られるほど高い増殖能力を持っています。また、その高い増殖能力から、ブルーカーボンとしての役割や海藻バイオマス研究の材料としても着目されています。しかし、これまでのところ、逆遺伝学的な手法の開発が遅れており、遺伝子の機能解析や遺伝子工学を用いた高機能性の株を作出するための安定的な形質転換系の開発が待たれていました。

【研究手法】

研究グループでは、すでに確立していた Cas9 RNP 複合体を用いたゲノム編集技術を利用し、挿入したい DNA 配列（ドナーdsDNA）と Cas9 による二重鎖切断領域とドナーdsDNA と同一の塩基配列をもつ一本鎖 DNA（ssODN）の三つを、PEG 法^{*4}によって同時にスジアオノリ配偶子に導入することで（図 1）、Cas9 による二重鎖切断部位に、任意の DNA 配列を挿入することを試みました（図 2）。今回のゲノムの標的箇所には、「ピレノイド^{*5}」と呼ばれる藻類の葉緑体内にあり、光合成の場として知られる構造に局在する酵素のルビスコを構成する遺伝子 *rbcS*（ribulose 1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase）を選び、挿入遺伝子は緑色蛍光タンパク質 GFP としました。*rbcS* は高発現遺伝子として知られており、挿入遺伝子のタンパク質が大量に発現し、ピレノイドに GFP の蛍光が局在することで、目視による確認が容易であることが期待されました。また同一の手法で、より長い DNA ドナーの挿入にも挑戦しました。

【研究成果】

実験の結果、GFP がピレノイドに局在するアオノリを得ることができました（図 3）。これらのゲノム編集アオノリ株は、世代を超えて安定的な GFP の発現が確認できています。挿入配列の正確性については、18%~50%の割合で当初のデザイン通りの配列を有するゲノム編集個体を得ることができました。また、長い DNA ドナーの挿入を試みた実験では、GFP の発現が確認できた 23 株のうち、デザイン通りの配列を有するゲノム編集個体は確認できず、挿入配列の正確性については今後の課題となる結果となりました。

【今後への期待】

今回の結果は、Cas9 RNP 複合体を利用したゲノム編集法が海藻類に非常に有効であることを示しており、遺伝子の破壊や挿入が比較的容易に実現できることを示したものです。近年、海藻類は CO₂ 回収源としても着目されていますが、育種技術や遺伝子工学分野での発展の遅れが全体の律速となっている面がありました。本研究は、これら海藻研究の諸問題を解決する可能性があるもので、高 CO₂ 吸収能をもつ海藻の開発など応用的な研究にも貢献できると考えられます。

【謝辞】

本研究は、JSPS 科研費 JP18K14690、JP21K06242 の助成を受けたものです。

論文情報

論文名 Cas9 ribonucleoproteins and single-strand oligodeoxynucleotides enable targeted insertional mutagenesis in *Ulva* (Cas9 リボヌクレオチドタンパク質と一本オリゴヌクレオチドがアオサ属での標的遺伝子への挿入突然変異を可能にする)

著者名 市原健介¹、山崎誠和²、河野重行² (¹北海道大学北方生物圏フィールド科学センター水圏ステーション室蘭臨海実験所、²東京大学大学院新領域創成科学研究科)

雑誌名 *Algal research* (藻類学の専門誌)

D O I 10.1016/j.algal.2024.103598

公表日 2024 年 6 月 30 日 (日) (オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター水圏ステーション室蘭臨海実験所

助教 市原健介 (いち は ら けん す け)

T E L 0143-22-2846 F A X 0143-22-4135 メール Ichihara@fsc.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.fsc.hokudai.ac.jp/muroran/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

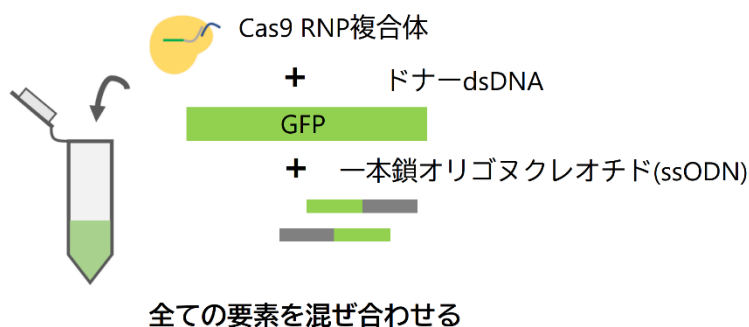


図 1. スジアオノリ生殖細胞、ポリエチレングリコール (PEG) 溶液、Cas9 RNP 複合体、ドナーdsDNA (今回の場合は GFP 配列)、2 本の一本鎖 DNA (ssODN) を混合する。

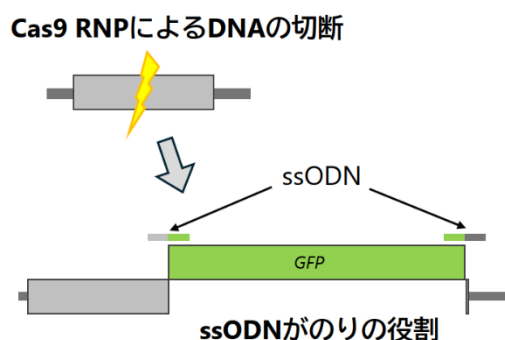


図 2. Cas9 RNP 複合体が標的配列を切断し、一本鎖 DNA (ssODN) が“のり”のように働き、ドナーdsDNA をゲノムに挿入する。

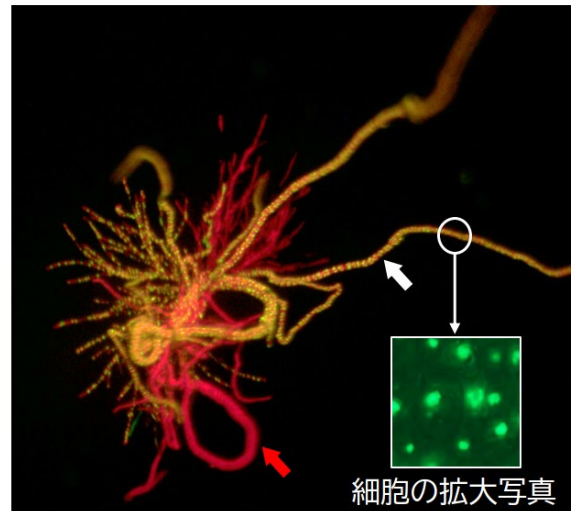


図 3. ゲノム編集株（白矢印）と野生型株（赤矢印）を蛍光顕微鏡で観察した様子。ゲノム編集株は GFP の緑色蛍光が観察できる。赤色に見えるのは葉緑体の自家蛍光。拡大図ではピレノイドに GFP が局在している様子を示した。

【用語解説】

- *1 逆遺伝学的な手法 … 特定の遺伝子を欠損・破壊し、個体への影響を見ることで遺伝子の機能を調べる手法。
- *2 Cas9 RNP 複合体 … ゲノム中の標的箇所を認識するガイド RNA と DNA2 本鎖を切断するはさみの役割を果たす Cas9 タンパク質で構成された複合体のこと。
- *3 *rbcS* … ルビスコを構成する S サブユニット（小サブユニット）の遺伝子のこと。植物では高発現遺伝子として知られている。
- *4 PEG 法 … 細胞壁のない細胞にポリエチレングリコール（polyethyleneglycol：PEG）を作用させて、DNA を細胞内部に取り込ませる形質転換法のこと。
- *5 ピレノイド … 多くの藻類の葉緑体にみられる構造で、二酸化炭素固定に働く酵素であるルビスコが集積している。