

研究課題（テーマ）		微細藻類における部位特異的遺伝子ノックイン技術の開発	
研究者	所属学科等	職	氏 名
代表者	生物工学科	講師	加藤 悠一
分担者			
研究結果の概要			
微細藻類は、光合成によって CO₂ を固定してバイオマスを生産でき、持続可能な社会の構築に向けたバイオものづくりの宿主として期待されている。微細藻類が生産する有用物質の生産性向上や天然の微細藻類にはない有用物質生産の実現においては、任意のゲノム部位に外来 DNA 配列を導入する「部位特異的ノックイン」技術が重要であると考えられる。しかし現状、モデル微細藻類である <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> を含む多くの緑藻において、相同組換え修復（HDR）を介した核ゲノムへの部位特異的ノックインは困難であり、多くの場合において外来 DNA は核ゲノムのランダムな部位に導入されてしまうことが知られている。そこで本研究は、微細藻類における部位特異的ノックイン技術の開発に向けて、部位特異的ノックインの発生を評価する系を新たに構築した。さらにこの評価系を利用して、HDR と競合する非相同組換え修復（NHEJ）を阻害することで微細藻類における部位特異的ノックインの効率が向上するかを検証した。 部位特異的ノックインの評価系構築に向けて、本研究ではトリプトファン合成酵素遺伝子 <i>MAA7</i> の欠損によって 5-フルオロインドール耐性が獲得されることに注目した。<i>C. reinhardtii</i> をモデルとして、<i>MAA7</i> 遺伝子部位を標的とするのに必要な相同配列を有し、その部位にパロモマイシン耐性遺伝子 <i>aphVIII</i> を導入するためのノックインベクターを新たに作製した。このベクターによって部位特異的ノックインが行われた場合、細胞は <i>aphVIII</i> 遺伝子の導入によってパロモマイシン耐性を獲得し、さらに <i>MAA7</i> 遺伝子の欠損によってトリプトファン要求性かつ 5-フルオロインドール耐性となるため、コロニー形成法によって部位特異的ノックインの有無を簡便に調べることができる。 次に、NHEJ の阻害が部位特異的ノックインの効率向上に寄与するか検証するため、作製したノックインベクターを <i>C. reinhardtii</i> の細胞壁欠損株 CC-400 に対してエレクトロポレーション法で導入した。ノックインベクターの導入から 24 時間、細胞を種々の濃度の SCR7（NHEJ 阻害剤）が存在する条件でインキュベートした。その後、トリプトファン、パロモマイシン、5-フルオロインドールを種々の組合せで含む寒天培地に播種し、コロニー形成の度合いを比較することで <i>aphVIII</i> カセットの導入、および <i>MAA7</i> 遺伝子の欠損を個別に評価した。結果、5-フルオロインドールを含む寒天培地ではコロニー形成が見られなかった。これは本実験において <i>MAA7</i> 遺伝子が欠損されておらず、部位特異的なノックインが行われなかったことを示唆している。			
今後の展開			
微細藻類における部位特異的ノックインの実現には、微細藻類に対して有効な NHEJ 阻害方法の開発などがさらに必要であると考えられ、その検討には本研究で新たに構築された評価系が有用である。今後、微細藻類における部位特異的ノックインの技術が確立されれば、微細藻類を用いた様々な研究分野への幅広い貢献が期待できる。			