

講演番号：2E074

発表日時：3月5日 14:15～15:15、発表場所：ポスター発表会場エリア E

ゲノム編集による油糧微生物の高度不飽和脂肪酸組成の自在改変

Protein-Based Genome Editing Enables Versatile Modulation of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Profiles in Thraustochytrids

○石橋 洋平¹、谷村 龍治²、安宅 祐輔²、本多 大輔³、沖野 望¹ (¹九大院農、²九大院生資環、³甲南大理工)

○Yohei ISHIBASHI¹, Ryuji TANIMURA², Yusuke ATAKA², Daisuke HONDA³, Nozomu OKINO¹ (¹Kyushu Univ. Faculty of Agriculture, ²Kyushu Univ. Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, ³Konan Univ.)

海洋油糧微生物ラビリンチュラ類の一属であるパリエティキトリウム属は、鎖長伸長と不飽和化を繰り返すことで高度不飽和脂肪酸（PUFA）であるドコサヘキサエン酸（DHA、C22:6）を合成・蓄積する。特定の鎖長伸長酵素（ELO）または不飽和化酵素（DES）の遺伝子を欠損させ PUFA 合成経路を遮断させることで、PUFA の組成を任意に改変可能であることから、ニーズに合わせた様々な有用脂肪酸の生産源として期待されている。本研究では核酸ベクター不使用・非遺伝子組替えとなるタンパク質ベースの CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術をパリエティキトリウムに適用し、脂肪酸組成を自在に改変する技術の開発を試みた。ドコサペンタエン酸（DPA、C22:5n-3）を DHA に変換する $\Delta 4$ DES、エイコサペンタエン酸（EPA、C20:5）を DPA に伸長する C20 ELO、ジホモ- γ -リノレン酸（DGLA、C20:3）をアラキドン酸（ARA、C20:4n-6）に変換するとともに、エイコサテトラエン酸（ETA、C20:4n-3）を EPA に変換する $\Delta 5$ DES を標的とした crRNA を作製し、Cas9・tracrRNA との複合体（RNP）を形成させ、エレクトロポレーション法により対象株に RNP を直接導入した。その結果、crRNA に対応した目的遺伝子の DNA 切断を確認するとともに、 $\Delta 4$ DES 欠損によって DHA が消失し、代わりに DPA が蓄積すること、C20 ELO 欠損により EPA が主要な PUFA となることを明らかにした。また、 $\Delta 5$ DES 欠損により ETA および DGLA が顕著に蓄積されることが確認され、核酸ベクター・外来遺伝子を利用せずに、有用脂肪酸を自在に作り分けることが可能であることが示された。

In this study, protein-based CRISPR-Cas9 genome editing technology was employed to modify the polyunsaturated fatty acid composition of *Parietichytrium*, which synthesizes DHA by using several elongases and desaturases. RNP containing crRNAs targeting $\Delta 4$ desaturase, C20 elongase and $\Delta 5$ desaturase with Cas9 and tracrRNAs were formed and introduced into *Parietichytrium* by electroporation. We confirmed that the designed crRNA has cleaved the target gene. A deficiency in $\Delta 4$ desaturase resulted in the loss of DHA and the accumulation of n-3DPA, whereas a deficiency in C20 elongase resulted in EPA becoming the predominant PUFA. Furthermore, a deficiency in $\Delta 5$ desaturase led to a notable accumulation of ETA and DGLA. In conclusion, this study demonstrates that genome editing by introducing RNP directly into cells can be applied to *Parietichytrium* to selectively produce various valuable fatty acids with precision. The resulting strains qualify as non-genetically modified organisms, thereby avoiding regulatory restrictions and enabling their potential application across diverse fields.

Genome editing, Polyunsaturated fatty acid, Thraustochytrid

発表責任者：石橋 洋平 (ishibashiyo@agr.kyushu-u.ac.jp)