

「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による  
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」  
平成22年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告
----------------

河野 重行

東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授

微細藻類の倍数化と重イオンビーム照射による  
バイオ燃料増産株作出に関する新技術開発

## §1. 研究実施体制

### (1)「河野」グループ

- ① 研究代表者:河野 重行 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・微細藻類の人為的倍数性の誘導と重イオンビーム照射

### (2)「大矢」グループ

- ① 主たる共同研究者:大矢 禎一 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・微細藻類の形態的特徴を把握する汎用 CalMorph の開発
  - ・汎用 CalMorph を用いたダイナミック・スクリーニング

### (3)「服部」グループ

- ① 主たる共同研究者:服部 正平 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・微細藻類の倍数化と欠失によるゲノム再編と有用遺伝子探索

### (4)「都筑」グループ

- ① 主たる共同研究者:都筑 幹夫 (東京薬科大学生命科学部、教授)
- ② 研究項目
  - ・変異株の大量培養適性評価による優良株の取得

## §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### (1) 微細藻類の人為的倍数性の誘導と重イオンビーム照射 (河野グループ)

重イオンビームによる先端的な分子育種法の開発を目指している。緑藻類のクロレラ (*Parachlorella kessleri*, *Chlorella sorokiniana*)<sup>4)</sup>とヘマトコッカス(*Haematococcus pluvialis*)を主に用いるが、他の緑藻としてナノクロリス(*Nannochloris bacillaris*)<sup>1, 3, 7)</sup>や増殖力に優れた珪藻(*Chaetoceros neogracile*)<sup>2)</sup>なども用いて、明暗条件はもとより栄養塩欠乏によるバイオマス量や物質生産量の増大を比較検討した。特にイオウ欠乏によって、クロレラのデンプン蓄積やオイル生産能が飛躍的に増大することを見いだした。重イオンビーム照射に関しては、理研・仁科センターにおいて、炭素、アルゴン、ネオン、鉄の4線種をクロレラとヘマトコッカスに計6回照射して<sup>8)</sup>、生存曲線などの基礎的なデータの収集に努めた。増殖速度と細胞サイズに関して、10<sup>4</sup>規模のスクリーニングを繰り返し高増殖株を単離している。増殖速度と細胞サイズの間には弱い負の相関が見られトレードオフの関係にあるが、その制約の中でも重イオンビームで様々な有用形質の突然変異体が単離できている。また、デンプンとオイルの間にもトレードオフの関係が見られるが、イオウや窒素が欠乏した培地でデンプン量が際限なく少なくなり、オイル量が6.4倍になるような株も単離され、微細藻類でも重イオンビーム照射の有効性が再確認されている。コルヒチンで人為的倍数性を誘導した株への重イオンビーム照射の効果は現在解析中であるが、バイオマス量が増大する株を単離できる可能性が出てきている。電顕の三次元立体構築(3D-TEM)法を確立し<sup>5)</sup>、微細藻類のデンプンやオイルといった物質生産は勿論、分裂増殖に関わる微細構造の動態解析ができるようになった<sup>6)</sup>。今後の変異体解析になくてはならないツールとなる。

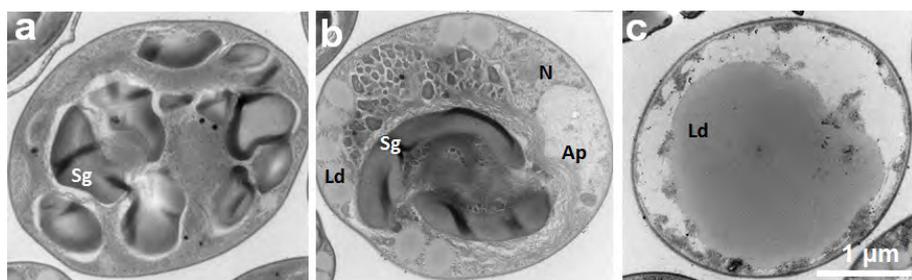


図1 クロレラ細胞の物質生産 培養条件を制御することで、デンプン蓄積細胞(a)から、中間体(b)を経て、オイル蓄積細胞(c)を誘導できる。Sg デンプン粒、Ld オイルドロップ、Ap オートファゴソーム、N 核

### (2) 微細藻類の形態的特徴を把握する汎用 CalMorph の開発 (大矢グループ)

ヘマトコッカスのアスタキサンチンの蓄積は増殖や成長とは異なるステージで起こり、そのステージには10種以上ものタイプの細胞集団が含まれる。本年度は、様々な培養条件においてヘマトコッカスの生育状況および蓄積した色素量を簡便に把握するために、様々なタイプの細胞が示す細胞形態を正確に把握し、顕微鏡画像から数値データを取得できるソフトウェアを開発した(特許出願済み)。本ソフトウェアは、微細藻類のカラー顕微鏡画像から細胞形態情報を抽出・定量化するプログラム、混入微生物であるツボカビ類の感染を判定し、汚染率を計算するプログラム、アスタキサンチンおよびクロロフィル量を推定するプログラムからなる。定量化にあたり、細胞の大きさや位

置、色素量など14種類の基礎的な特徴量を設定し、これらを組み合わせた計50の特徴量について定量値を算出した。各種培養条件下でのヘマトコッカスの顕微鏡画像300枚を用いて性能評価を行ったところ、本ソフトウェアは、様々な形状および色素量のヘマトコッカスとツボカビ類を識別でき、培養中のヘマトコッカス集団の不均一性を捉えることができた。本ソフトウェアにより、ヘマトコッカスによるアスタキサンチンの高生産条件の検討や高生産株の選抜過程において、ヘマトコッカスの生育状況および色素量の簡便な把握が可能となった。

### (3) 微細藻類の倍数化と欠失によるゲノム再編と有用遺伝子探索 (服部グループ)

重イオンビーム育種の親株であるクロレラ (*Parachlorella kessleri* N-2152) 及びヘマトコッカス (*Haematococcus pluvialis* K-0084) の454を用いたシーケンシングに、昨年度作成したクロレラのBAC、ヘマトコッカスのFosmidクローンの両端シーケンシングを加えてさらに高精度のゲノムシーケンシングを進めた。クロレラに対しては、454シーケンサーによる約480万リード(約1.7 Gb)とSanger法による約1万のBACクローンの両端シーケンシング(約22.6 Mb)を行い、これら配列リードのアセンブリから、約62.6 Mb(400 scaffolds)のユニークなゲノム配列を得た。さらに、このゲノム配列からは遺伝子予測プログラムAugustusを用いて9,065個の遺伝子を同定した。また、このシーケンシングにおいて、クロレラの葉緑体ゲノム(44コンティグ, 約147 kb)の配列も決定した。ヘマトコッカスに対しては、454シーケンサーによる約750万リード(約3 Gb)とSanger法による約6.5万のFosmidクローンの両端シーケンシング(約141 Mb)を行い、これら配列リードのアセンブリから、約131Mb(1,565 scaffolds)のユニークなゲノム配列を得た。さらに、このゲノム配列からは遺伝子予測プログラムAugustusを用いて19,873個の遺伝子を同定した。

以上から、両微生物株について高精度のゲノム配列を完成させることに成功した。今後は、両微生物株のmRNAのcDNAシーケンシングを行い、遺伝子の同定をより高精度にする予定である。また、変異株における塩基及びゲノム変異をここに完成したゲノム配列をレファレンスとして調べる計画である。

### (4) 変異株の大量培養適性評価による優良株の取得 (都筑グループ)

本グループはクロレラを用い固相表面で連続培養する技術開発に成功し、池型培養の10倍以上の効率で連続的に細胞回収できること、20日程度は連続培養できることを明らかにした。本技術は、加温やCO<sub>2</sub>供給が比較的容易なことから、今後はスケールアップの課題と屋外での検証実験を行う予定である。また、河野グループで作製したデンプン蓄積能の高い変異株1A3が本培養技術に適用可能であることも明らかにした。さらに、この培養系を用いることにより、セシウム等の回収技術にも利用できることが分かった<sup>12)</sup>。

緑藻クラミドモナスでは、S欠損やN欠損条件でトリアシルグリセロール(TG)が蓄積するが、この現象に、新規のタンパク質合成が関与し、光合成が関係していること、diacylglycerol O-acyltransferaseのtype1(DGAT)遺伝子は常時発現しているのに対し、type2(DGTT)は、TG合成が盛んになる条件で特異的に遺伝子発現が誘導されることを明らかにした。クロレラでもS

欠損で TG 蓄積が蓄積されることが明らかとなっている<sup>4)</sup>。

クラミドモナスではヒ素の細胞内取り込みが光合成と共役していることを見いだした<sup>9)</sup>。さらに、シアノバクテリアで、初めて細胞内に取り込まれたヒ素がアルセノ糖に代謝されることも明らかになった<sup>11)</sup>。また、シアノバクテリアは原核細胞のため、光合成と呼吸とが同じ細胞内部位、すなわち細胞質で行われる。そこで、フルクトース 1, 6-二リン酸アルドラーゼをコードする遺伝子 *fbaA* の発現誘導を調べたところ、光合成とグルコース添加(少量の光要求)条件とで、2 つの独立した発現誘導系が存在することを見いだした<sup>10)</sup>。光合成機能増進のための細胞改変に重要な知見につながる可能性を含んでいる。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Sumiya, N., Owari, S., Watanabe, K., and Kawano, S.: The role of multiple FtsZ rings in chloroplast division under oligotrophic and eutrophic conditions in the unicellular green alga, *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J. Phycol.* 48, 1187-1196, 2012. (DOI:10.1111/j.1529-8817.2012.01204.x)
2. Nishikawa, T., Moriyama, Y., Sato, M., Sano, T., Hasezawa, S., Ota, S., and Kawano, S.: Isolation of mitochondrial and plastid *ftsZ* genes and analysis 1 of the organelle targeting sequence in the diatom *Chaetoceros neogracile* (Diatoms, Bacillariophyceae). *Phycol. Res.* 60, 123-136, 2012. (DOI: 10.1111/j.1440-1835.2012.00644.x)
3. Sumiya, N., Watanabe, K., Owari, S., Yamamoto, M., and Kawano, S.: Chloroplast division and differentially regulated expression of FtsZ1 and FtsZ2 in *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Cytologia* 77, 59-66, 2012. (DOI: 10.1508/cytologia.77.59)
4. Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., and Kawano, S.: Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresour. Technol.* 129, 150-155, 2013. (DOI: org/10.1016/j.biortech.2012.11.030)
5. Wayama, M., Ota, O., Matsuura, M., Nango, N., Hirata, A., and Kawano, S.: Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, 8: e53618, 2013. (DOI:10.1371/journal.pone.0053618)
6. Li, X., Pribyl, Binová K., Kawano, S., Cepak, V., Zachleder, V., Cizkova, M.,

- Branyikova, I., and Vítová, M.: The Microalga *Parachlorella kessleri*-A Novel Highly Efficient Lipid Producer. *Biotechnology and Bioengineering, Biotechnol. Bioeng.* 110, 97–107, 2013. (DOI:10.1002/bit.24595)
7. Yamazaki, T., Owari, S., Ota, S., Sumiya, N., Yamamoto, M., Watanabe, K., Nagumo, T., Miyamura, S. and Kawano, S.: Localization and evolution of septins in algae. *Plant J.* 2013, (in press). (DOI:10.1111/tbj.12147)
  8. Ota, S, Matsuda, T., Takeshita, T., Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T. and Kawano, S.: Effect of heavy-ion beam irradiation on the survival and growth rates in *Parachlorella kessleri*, *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 2013. (in press).
  9. Murota, C., Matsumoto, H., Fujiwara, S., Hiruta, Y., Miyashita, S., Shimoya, M., Kobayashi, I., Hudock, M.O., Togasaki, R.K., Sato, N., and Tsuzuki, M.: Arsenic tolerance in a *Chlamydomonas* photosynthetic mutant is due to reduced arsenic uptake even in light conditions. *Planta* 236, 1395-1403, 2012. (DOI:10.1007/s00425-012-1689-8)
  10. Tabei, Y., Okada, K., Horii, E., Mitsui, M., Nagashima, Y., Sakai, T., Yoshida, T., Kamiya, A., Fujiwara, S., and Tsuzuki, M.: Two regulatory networks mediated by light and glucose involved in glycolytic gene expression in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 53, 1720-1727, 2012. (DOI:10.1093/pcp/pcs115)
  11. Miyashita, S., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., and Kaise, T.: *Cyanobacteria* produce arsenosugars. *Environmental Chemistry* 9, 474-484, 2012. (DOI: 10.1071/EN12061)
  12. 松井雄一郎、青木元秀、藤原棋多夫、都筑幹夫:微細藻類を利用したストロンチウム及びセシウムの回収、東京薬科大学研究紀要 16, 1–8, 2013.

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)