

「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23年度採択研究代表者

|                |
|----------------|
| H24 年度<br>実績報告 |
|----------------|

太田 啓之

東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター・教授

植物栄養細胞をモデルとした藻類脂質生産系の戦略的構築

## §1. 研究実施体制

### (1)「太田」グループ(東京工業大学)

① 研究代表者: 太田 啓之 (東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター、教授)

#### ② 研究項目

- ・植物葉での栄養飢餓による脂質蓄積機構解明
- ・藻類での栄養飢餓による脂質蓄積機構解明
- ・モデル藻類共発現情報の取得
- ・マスター制御因子の同定
- ・有用藻類共発現情報の取得
- ・有用脂肪酸高生産系構築
- ・バイオディーゼル生産技術基盤構築

### (2)「西田」グループ(埼玉大学)

① 研究代表者: 西田生郎 (埼玉大学理工学研究科、教授)

#### ② 研究項目

- ・藻類小胞体膜脂質合成と貯蔵脂質合成の分配機構解明
- ・藻類における貯蔵脂質蓄積機構の解明と制御
- ・小胞体脂質合成の改変に基づく有用藻類貯蔵脂質の高生産化
- ・

### (3)「和田」グループ(東京大学)

① 主たる共同研究者: 和田 元 (東京大学・総合文化研究科、教授)

#### ② 研究項目

- ・モデル藻類脂肪酸合成機構の解明
- ・特殊脂肪酸合成藻類の脂肪酸合成機構解明

- ・有用脂肪酸高生産系構築
- ・バイオディーゼル生産技術基盤構築

(4)「黒川」グループ(東京工業大学)

① 研究代表者:黒川 顕 (東京工業大学・大学院生命理工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・モデル藻類共発現情報の取得
- ・有用藻類の網羅的ゲノム解読
- ・藻類比較ゲノムデータベース(Algaenome)の構築

(5)「大林」グループ(東北大学)

① 研究代表者:大林 武 (東北大学・情報科学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・モデル藻類共発現データ作成法の開発
- ・植物-モデル藻類比較共発現データベースの構築
- ・藻類比較共発現データベースの構築

(6)「佐藤」グループ(東京大学)

① 主たる共同研究者:佐藤 直樹 (東京大学・総合文化研究科、教授)

② 研究項目

- ・モデル藻類脂質代謝フローの解析
- ・モデル代謝情報データベース構築
- ・有用藻類脂質代謝フローの解析と代謝情報データベース構築

(7)「尾崎」グループ(花王株式会社)

① 主たる共同研究者:佐藤 直樹 (花王株式会社・生物科学研究所・室長)

② 研究項目

- ・有用脂肪酸高生産藻類の探索・選定
- ・各種脂肪酸合成遺伝子の同定
- ・有用脂肪酸高生産系構築

## §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. 「太田」グループ(東京工業大学)

#### (1)植物および藻類での栄養飢餓による貯蔵脂質蓄積機構の解明

平成24年度は、平成23年度に取得したデンプン合成変異体 *pgm1* とリン欠乏時の糖脂質合成変異体 *pah1pah2* の3重変異体についてより詳細な解析を行った。*pgm1* はデンプン合成の欠損によってTAGの蓄積量が著しく増大するが、それに比べて3重変異体のTAG蓄積が顕著に低下したことから、PAH1, PAH2が、葉でのTAG蓄積に必要なジアシルグリセロール(DAG)の提供に大きく寄与していることが明らかになった。しかし、*pah1pah2* の2重変異体では、リン欠乏時のTAG蓄積は野生型と同様に起こることから、PAHは、デンプン蓄積がシャットダウンされた際の過剰な炭素のフローに依存したTAG蓄積に特に重要な役割を果たしていると考えられる。また強光条件ではTAGの蓄積量が顕著に増大することも明らかになった。以上の内容は第20回国際植物脂質シンポジウム(ISPL2012), 2013年 ゴードン会議 Plant Lipids: Structure, Metabolism & Function、GCOE&CREST シンポジウム「Plant lipid metabolic network and switching」で発表した。

#### (2) モデル藻類における共発現データの取得

平成23年度にモデル藻類(*Chlamydomonas*)においてTAG蓄積の見られるリン欠乏条件などで取得した発現情報に加え、平成24年度は細胞壁欠損変異体、デンプン蓄積変異体などで培養の中期と後期での遺伝子発現データを取得した。得られたデータを基に大林Gと共同でさらにその解析を進めた。まず、これら8条件の遺伝子発現データに加え、パブリックに取得できた88のRNAseqによる*Chlamydomonas*遺伝子発現データを合わせ、データの質を検討した。読み取りの深さ(総TAG数)では我々のデータは88の公共のRNAseqデータの約10倍の感度を持つ(総TAG数が10倍)ことが分かった。そこで我々の取得したデータを基に、リン欠乏時に発現の誘導される転写因子の候補を1つ同定した。また公共のRNAseqデータと合わせて、脂質代謝系の遺伝子群に関してネットワーク解析を行ったところ、脂肪酸合成、TAG合成、TAG分解などの異なる代謝経路が、それぞれ独立したネットワークを形成することを見出した。このことはRNAseqデータによる代謝系の解析が極めて良好に行われていることを示している。

#### (3) 有用藻類におけるゲノム解析と共発現データの取得

太田 G では、モデル藻類 *Chlamydomonas* での研究と同時に、TAG 高生産藻類として *Nannochloropsis* を取り上げ、その TAG 生産条件等の検討を進めている。平成 24 年度は *Nannochloropsis oculata* の基盤情報整備の一環として、黒川 G と共同でゲノム解析を進めた。*Nannochloropsis* ゲノムについてかずさ DNA 研究所のロッシュ 454 シークエンサーとシングルおよびメイトペアでそれぞれ1ランのシークエンシングを行った。さらに得られたデータを

平成 23 年度に本 CREST で導入した新型シーケンサーIllumina GAIIxにより得られたデータと統合して解析し、スキャホールド 212、スキャホールド N50 が 463,654 の高精度なアライメントデータを得た。*Nannochloropsis* についてはすでに *Nannochloropsis gaditana*, および *Nannochloropsis oceanica* でゲノム解析が報告されているが (Radakovits et al Nature comm. 2012, Vieler et al Plos G 2012)、これらのデータと比べてもスキャホールドで一桁以上高精度のデータが得られた。平成 25 年度はさらにこの解析を進めると共に、このゲノムデータを基に発現情報の取得を行う予定である。

## 2.「西田」グループ(埼玉大学)

西田グループでは、TAG 合成の場である小胞体に注目し、モデル藻類として *Chlamydomonas* における脂肪酸の小胞体膜脂質への取り込み機構、膜脂質 (PE および DGTS) → TAG への変換機構を明らかにすると共に、異種生物遺伝子を利用した PC → TAG 合成経路の新規構築を行い、TAG 合成機能の強化をはかる。また、モデル藻類で得られた知見を *Hibberdia magna* などの有用藻類にも応用し、TAG 合成の強化を目指す。

### (1) 小胞体膜脂質合成と貯蔵脂質合成の分配機構解明

- ① *Chlamydomonas* ゲノムよりシロイナズナの ER 型 GPAT のホモログ、出芽酵母の ER 型 LPAT のホモログを取得し、変異株相補による機能検定に着手した。
- ② *Arabidopsis thaliana* の PC 合成調節遺伝子である *CCT1* と *CCT2*、および、根粒菌由来の新規 PC 合成遺伝子、*PCS* をそれぞれ *Chlamydomonas* のコドンユーセージに変換し、過剰発現プラスミドを構築した。*PCS*、*CCT* を導入した *Chlamydomonas* では、各遺伝子の発現が確認されたが、PC は検出されなかった。H25 年度は他の PC 合成関連遺伝子導入株の解析や DGTS 合成酵素の破壊株の構築を引き続き行なう。

### (2) 小胞体脂質合成の改変に基づく有用藻類貯蔵脂質の高生産化

有用脂質であるドコサヘキサエン酸(DHA)を蓄積する *Hibberdia magna* のドラフトゲノム決定のためのクロモソームの抽出を完了し、太田グループによるシーケンシング、黒川グループによるアノテーションを開始した。また RNAseq による発現解析を行なう条件を決める目的で *H. magna* で TAG の蓄積条件を検討した。*H. magna* は通常培養条件でも細胞内に Lipid droplet (LD) と思われる構造体が見られ、さらに定常期において LD の数が上昇することを観察した。H25 年度は *H. magna* のストレス条件における TAG 蓄積の検討と各条件における RNA の調製を行なう。

## 3.「和田」グループ(東京大学)

### (1) 藻類脂肪酸合成機構の解明

葉緑体での脂肪酸合成は脂質合成の最初のプロセスであり、この脂肪酸の合成調節および貯蔵脂質 (TAG) 合成への脂肪酸の振り分け機構を明らかにすることは、藻類を用いた有用脂質の合成システムを確立する上で必要不可欠である。本年度は、脂肪酸の合成や振り分けに

関わる遺伝子を、ゲノム配列がすでに決定されているモデル藻類である *Chlamydomonas reinhardtii* において同定し、それらの遺伝子を過剰発現するためのプラスミドコンストラクトを作製した。また、遺伝子産物の細胞内局在性を調べるために、GFP との融合タンパク質を発現させるプラスミドコンストラクトの作製も行った。今後は、作製したプラスミドコンストラクトを野生株に導入して形質転換体を作製し、さらに解析を進める。これらのプラスミドコンストラクトの作製と平行して、*C. reinhardtii* の細胞において栄養欠乏下でおこる TAG の蓄積について、光合成活性や新規の脂肪酸合成との関係について解析した。その結果、窒素欠乏下では細胞の増殖が抑制され、光合成活性も低下するものの、TAG の蓄積が起り、光合成または新規脂肪酸合成を阻害剤によって完全に阻害すると、TAG の蓄積が著しく阻害されることが明らかとなった。また、リン欠乏下でも窒素欠乏下と同程度の TAG の蓄積がおこるが、窒素欠乏下に比べて蓄積に時間がかかり、光合成活性は窒素欠乏下に比べて高く維持されることがわかった。これらの結果は、栄養欠乏条件下でおこる TAG の蓄積には、光合成や新規の脂肪酸合成が必要であり、光合成活性は窒素欠乏下とリン欠乏下では異なる制御を受けていることを示している。

#### 4.「黒川」グループ(東京工業大学)

##### (1) 有用藻類の網羅的ゲノム解析

目的: 黒川がこれまでに構築してきた次世代シーケンサーデータの高効率解析パイプラインを活用し、*Nannochloropsis*、ペラゴ藻 (*Sarcinochrysis* 属)、黄金色藻綱(*Hibberdia* 属)等有用藻類を網羅的にゲノム解析する。藻類ゲノム解読に関しては太田、黒川、佐藤らによるグローバル COE プログラムで、代表的な一次共生藻の完全ゲノム解読を完了したが、本 CREST では完全ゲノム解読は行わず、ドラフトゲノム情報を可能な限り複数種の有用藻類で取得し、発現遺伝子のマッピングに資するゲノム情報の提供を行う。

進捗状況: 有用藻類のドラフトゲノム配列を得るために平成 23 年度に太田グループで導入した新型シーケンサー Illumina GAIIX を活用し、*Nannochloropsis* のゲノム解読を太田グループと共同で実施し、ドラフトゲノム配列を取得した。また、昨年度に引き続き、高度なアノテーションを実現するため、藻類に特化したゲノム解析パイプラインを構築した。具体的には、真核生物の遺伝子予測ツールとして実績のある Augustus をパイプラインに組み込み、より正確な遺伝子予測を可能とした。グローバル COE プログラムにて一次共生藻のゲノム配列の解読が完了し、そこから得られた遺伝子情報からモデルを構築し、開発元ですでに準備されている *Chlamydomonas* の遺伝子モデルと併せて利用する事で、高精度な遺伝子予測を実現している。

##### (2) 藻類比較ゲノムデータベース(Algaenome)の構築

目的: 研究項目1で取得したドラフトゲノム情報に加え、各藻類で TAG 蓄積条件等、様々な環境条件で取得した遺伝子発現情報によりゲノム配列情報を補完し、遺伝子発現情報の網羅性を重視した藻類比較ゲノムデータベース(Algaenome)の構築を行う。本データベースシステム

では、表現型と遺伝型との関連性を見出すための、多変量解析を中心とした各種統計的解析ツールを実装し、各グループに有用な情報を提供する。

進捗状況:本研究でモデル藻類として取り扱っている *Klebsormidium* では、完全ゲノム配列および遺伝子発現情報が得られている。これらをモデルデータとして、藻類データベース *Algaenome* の基盤データとして、他のゲノム配列と比較解析を実施した。具体的には、すでに公開されている他の藻類 (*Green Algae*: 11 種, *Rhodopyta*: 2 種, *Cercozoa*: 1 種, *Stramenpiles*: 8 種), *Hacrobia*: 2 種) や陸上植物 (*Land Plant*: 5 種) とゲノムレベルで相互に比較し、オーソログ遺伝子解析から得られた結果を核として、全データを統合化したデータベースを構築した。

## 5.「大林」グループ(東北大学)

前年度構築したモデル藻類 *Chlamydomonas* の遺伝子共発現データの改良法の検討ならびに共発現信頼性の定量化法の開発を行った。マイクロアレイを用いた *Chlamydomonas* の遺伝子共発現データでは、プラットフォームの違いの統合が難しく、また低発現量遺伝子の検出も困難であった。そこで太田グループで取得した 8 サンプルの超高品質 RNAseq データに、NCBI GEO に収録されている *Chlamydomonas* の RNAseq データ、88 サンプルを加えて、遺伝子共発現関係の導出を行ったところ、マイクロアレイを基としたものよりも良好な結果が得られた。次に、個々の遺伝子ペアの共発現信頼性評価のために、比較共発現法を基とした定量化法を開発した。1 対 1 のオーソログ関係があることが望ましいため、そのようなオーソログ関係が最も顕著である動物において、定量化した信頼性の有効性を検証した。(原著論文 1)

## 6.「佐藤」グループ(東京大学)

### (1) 脂質代謝フローの解析

① 安定同位体を用いた脂質合成代謝フローの解析について、比較的単純な系であるシアノバクテリアを用いて、実験方法、解析方法、ソフトウェアの開発を行った。シアノバクテリアの場合、細胞内区画を1つと考えてよいと、比較的単純な数学的取扱により、取り込まれた  $^{13}\text{C}$  が、飽和 GlcDG から, MGDG, DGDG のさまざまな分子種へと流れていく速度を求めることができた。これについて、国内・国際学会で発表した。今後は、この方法論を緑藻に当てはめて、モデルを作る。② クラミドモナスにおいて、質量分析により、すべての主要アシル脂質の構造とすべての脂肪酸の二重結合位置を厳密に決め直し、新たに多数の微量成分を同定し、その結果を学会で発表した。これにより、代謝フローを正確に研究する基盤ができた。③ 光合成によって脂質を作るということの理論的な考察を行い、学会で議論し、著書にもまとめた。

### (2) 代謝情報データベースの構築

太田グループを中心として新規に配列決定がなされたモデル藻類 *Klebsormidium* のゲノム情報を、これまでの *Gclust* データベースに加えて、改めてクラスタリングを行い、陸上植物から藻類、シアノバクテリアに至る光合成生物と、その他の生物も含む比較ゲノムデータベースを構

築した。これに基づいて、実際に実験に用いる生物の脂質代謝系を構成する酵素遺伝子の比較情報を整備している。比較ゲノムを応用した論文を発表した(原著論文 2)。

## 7.「尾崎」グループ(花王株式会社)

### (1) 有用脂肪酸高生産藻類の選定

目的: 花王の保有する 600 株以上の藻類株ライブラリーから、超多価不飽和脂肪酸、極長鎖脂肪酸、ヒドロキシ脂肪酸、アセチレン脂肪酸など、生理活性素材や化学原材料として期待される各種脂肪酸類を探索し、その高生産株を選抜する。この目的のために各種脂肪酸の GC/MS や LC/MS による効率的な解析方法を確立する。

進捗状況: 平成 23 年度に引き続き、分譲機関からの購入の約 700 株および海洋・土壌から分離の約 200 株の藻類株について、昨年度に確立した方法により含有脂肪酸の GC/MS 解析を行った。この結果、購入藻類 19 株、海洋分離藻類の 7 株、さらに土壌分離藻類 6 株からエポキシ化や共役不飽和結合などの修飾脂肪酸と推定される GC/MS ピークが検出された。土壌分離株については混合株であったため単離操作を進めており、これまでに得られた単離株 2 株でも上記脂肪酸と推定される GC/MS ピークを確認すると共に、18S rDNA の部分配列解析から両株がトレボウクシア綱および緑藻綱に属することが示唆された。現在、各株から検出された各脂肪酸の同定および藻体内での存在形態等の解析、更に各分離株については単離と分類同定を進めている。またより効率的な脂質解析法の構築・活用を目指して LC/MS による網羅的脂質解析の検討を行っており、中性及び極性脂質の一斉解析の可能性を見出して最適化検討を進めている。

## §3. 成果発表等

### (3-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Takeshi Obayashi, Yasunobu Okamura, Satoshi Ito, Shu Tadaka, Ikuko N. Motoike, Kengo Kinoshita, “COXPRESdb: a database of comparative gene coexpression networks of eleven species for mammals”, *Nucleic Acids Res*, vol. 41, pp.1014-1020, 2013 (DOI: 10.1093/nar/gks1014)
2. Naoki Sato, Takashi Moriyama, Masakazu Toyoshima, Mika Mizusawa and Naoyuki Tajima “The all0458/lti46.2 gene encodes a low temperature-induced Dps protein homolog in the cyanobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 and *Anabaena variabilis* M3”, *Microbiology* vol. 158, pp. 2527-2536, 2012 (DOI: 10.1099/mic.0.060657-0)