

「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 実績報告

宮城島 進也

国立遺伝学研究所新分野創造センター・特任准教授

高バイオマス生産に向けた高温・酸性耐性藻類の創出

§1. 研究実施体制

(1) 育種技術グループ1

① 研究代表者: 宮城島 進也 (国立遺伝学研究所新分野創造センター、特任准教授)

② 研究項目

- ・シズンゲノムニュートラルサイトへの遺伝子導入法の開発
- ・シズンにおける熱ショックによる導入遺伝子誘導発現系の構築
- ・シズンへのアルカン合成経路導入の試み
- ・酸性耐性緑藻 *Chlamydomonas eustigma* のゲノム解析及び遺伝子発現解析

(2) 育種技術グループ2

① 主たる共同研究者: 黒岩 常祥 (立教大学理学部、特定課題研究員)

② 研究項目

- ・シズンの APX 遺伝子の強制発現系の開発
- ・紅藻類のキメラ遺伝子を含むシズンの選択マーカーURAPCG を持つプラスミドによる構成的発現系の構築
- ・核ゲノム、油滴・澱粉粒の細胞当たりの定量評価を迅速にするための基本染色技術の開発、N-培養条件下におけるシズン、クラミドモナスなどの顕微ゲノム定量法による油滴顆粒の定量
- ・油滴などのバイオマス生産に関わる物質の蛍光・電子顕微鏡法による局在及び形成過程の解析
- ・シズン類の凍結保存に必須な各種凍結保護剤及び最適な凍結保護溶媒の濃度・混合比の決定

(3)環境耐性・遺伝子資源グループ1

①主たる共同研究者:三角 修己 (山口大学大学院医学系研究科、准教授)

②研究項目

- ・新規に採種された *C. caldarium delta* 株のドラフトゲノム解析を「環境耐性・遺伝子資源グループ2」と協同で推進
- ・*C. caldarium delta* を含めた新規採種株の、環境耐性や物質生産等に着目した詳細なキヤラクタリゼーション
- ・シズンのトランスクリプトーム解析により選抜された、高温耐性、酸化ストレス耐性遺伝子の機能解析
- ・極限環境紅藻由来のストレス耐性遺伝子の緑藻クラミドモナス等への導入準備

(4)環境耐性・遺伝子資源グループ2

①主たる共同研究者:吉川 博文 (東京農業大学応用生物科学部、教授)

②研究項目

- ・新規極限環境藻類のドラフトゲノム解析
- ・比較ゲノム解析、トランスクリプトーム解析による極限環境耐性関連遺伝子の探索
- ・インフォマティクス解析面での各共同研究グループの支援

(5)代謝機能・制御グループ1

①主たる共同研究者:田中 寛 (東京工業大学資源化学研究所、教授)

②研究項目

- ・シズン葉緑体における窒素応答の機能解析
- ・CO₂ 飢餓応答に関わる核ゲノム転写制御因子の探索

(6)代謝機能・制御グループ2

①主たる共同研究者:今村 壮輔 (東京工業大学資源化学研究所、准教授)

②研究項目

- ・酵母 FKBP12 高発現株の解析
- ・シズン細胞からの脂質抽出法と GC-FID を用いた TAG 定量法の確立

§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. 研究目的

藻類のバイオマス利用に関する研究の多くは中性付近の環境を好む藻類を用いて行われているが、開放培養においては他の生物の増殖との競合が起るため優占増殖させることが難しい。一方で、我々は、高温強酸性の極限環境(30~60°Cの高温、pH0.5~ pH5.0の酸性条件)に棲息し、唯一光合成を行うことのできる、原始紅藻シアニジウム類の増殖機構の解析を行ってきた。特にその一種であるシズンについては、その全ゲノムの塩基配列を、真核藻類として初めて解読し、遺伝子導入や、藻類として初めて相同組換えによる遺伝子破壊系の構築等に成功した。極限環境紅藻類は、高温・酸性条件下で優占種として生息するため、開放系におけるバイオマス生産技術開発に適しているだけでなく、NO_x、SO_xの除去への応用の可能性を秘めている。

本研究ではシズンのオミクス解析を基盤に、藻類に高い環境耐性を付与する遺伝的要因(環境耐性・遺伝子資源グループ)、藻類におけるCO₂固定並びに糖質・脂質合成の調節機構(代謝機能・制御グループ)を明らかにする。その情報を基に、藻類に対して遺伝学的改変を施し、高温・酸性等のストレス環境でも高増殖能及び、高バイオマス(糖類、脂肪酸)生産性をもつ藻類の作出を行う(育種技術グループ)。本年度は目的達成に必要な研究材料の整備、遺伝子情報の整備、方法の開発、代謝制御機構の解析を行った。

2. 研究成果

(1) 育種技術グループの成果

シズンにおいて、従来の一過的発現ではなく、ニュートラルサイトへの外来遺伝子導入法を開発することにより恒常的な導入遺伝子発現系を開発した。さらに、シズンにおいて複製するプラスミドを開発した。導入遺伝子産物の発現量及び細胞内局在を効率よく検出するために、シズンで機能する高温耐性型 GFP を開発した。形質転換株を凍結保存するために、各種凍結保護剤(グリセロール、ジメチルスルホキシド、メタノール)を検討し、最適な混合比を決定した。新たに開発した顕微ゲノム定量法及び BODIPY による Lipid body 染色法を、シズン、シアニジウム類、クラミドモナス、その他のバイオマス生産株候補の藻類に適用し、核ゲノムサイズと油滴量の測定法を確立した³。蛍光・電子顕微鏡法による解析により、シズンとクラミドモナスにおける Lipid body の形成・蓄積が細胞内顆粒から起こることが分かった。これに関連し、油滴及び澱粉粒の形成に関わる細胞小器官の増殖機構の解析を進めた^{1, 4, 5, 6}。細胞内代謝系の人為的調節を可能とするための第一歩として、細胞内の酸化還元状態を人為的に変化させる手法を確立した²。シアノバクテリアのアルカン合成遺伝子をシズンで一過的に発現させたところ、オイルボディーの形成が見られた。緑藻にも応用可能な、高温耐性、酸性耐性を付与する遺伝子群の候補を得るために、環境耐性・遺伝子資源グループ²と協同して、極限環境緑藻

Chlamydomonas eustigma のゲノム解析を進めた。

(2) 環境耐性・遺伝子資源グループの成果

高温、硫酸酸性に生息するシズンやシアニジウムの脂質合成における、硫黄(S)の役割について解析を進め、窒素(N)と同様にSの欠乏が脂質合成を活性化させ、細胞内のTAG含有量を増加させることを明らかにした。また、昨年度選抜されたストレス応答遺伝子について引き続き機能解析を進め、転写誘導の条件や遺伝子産物の特性を検証し、他種に有用形質を付与する遺伝資源としての適性を確認した。本プロジェクトにより新規に単離された極限環境紅藻 *Cyanidium caldarium delta* 株について、引き続きゲノム解析をおこない、当初計画通り、推定ゲノムサイズの50倍以上のリード深度を確保した。アセンブルプログラム Velvet による *de novo* アセンブルを実施し、アセンブル塩基長が最長になるようパラメーターを振った。その結果、オルガネラについては、ミトコンドリアと葉緑体、各1個のスキップフォルド配列を得ることができた。核ゲノムについては、約450個の1 kb以上のスキップフォルド配列群を得た。この配列を用いた比較ゲノム解析により、シズンの極限環境耐性に関わる既知の29個の遺伝子について、*delta* 株におけるオーソログを発見し、育種技術グループに遺伝子配列情報を提供した。

(3) 代謝機能・制御グループの成果

葉緑体における転写調節因子と考えられる Ycf28 の、コムギ胚芽発現系による調節を検討するとともに、葉緑体グルタミンレセプターと予想される GLND タンパク質について解析を行なった。その結果、GLND が窒素飢餓条件で発現誘導されて葉緑体周辺部に局在化すること、GLND の過剰発現により、核における窒素転写因子である MYB1 の窒素飢餓による発現誘導が強められることが明らかとなった。これは GLND が窒素シグナル伝達に関わる因子であることを示している。また、炭素同化に関わる遺伝子発現の制御因子を同定するために、CO₂ ダウンシフト時のアレイデータを基盤に CO₂ 飢餓に関わる核転写因子の検索を進めたが、これまでのところタンパク質レベルで有意に発現量が増える転写因子は同定されていない。CO₂ ダウンシフトで誘導されるプロモーター配列からの制御配列の絞り込みや、候補発現調節因子の絞り込みを継続中である。窒素代謝上流で機能していると考えられる TOR の解析では、昨年度作出した酵母 FKBP12 高発現株へのラパマイシン添加により、細胞の増殖停止、翻訳の低下、葉緑体サイズの縮小などが観察された。これらの結果は、当初の目的通りに TOR の活性がラパマイシン添加により低下していることを示している。細胞内に蓄積した脂質(トリグリセリド(TAG)や炭化水素)の定量に関しては、初年度に構築した定性的解析法を基礎にして解析を行った。しかし、窒素欠乏条件から経時的に回収した細胞内における TAG や炭化水素量を定量的に測定することができなかった。その原因として、細胞からの脂質の抽出効率に原因があることが判明したので、脂質抽出方法について使用する細胞量、溶媒の組成、抽出回数などについて最適化を行った。その結果、定量的に TAG を測定する実験系の確立に成功した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Shin-ya Miyagishima, Kenji Suzuki, Kumiko Okazaki, and Yukihiro Kabeya, “Expression of the nucleus-encoded chloroplast division genes and proteins regulated by the algal cell cycle.” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 29, pp. 2957-2970, 2012 (DOI: 10.1093/molbev/mss102)
2. Yukihiro Kabeya and Shin-ya Miyagishima, “Chloroplast DNA replication is regulated by the redox state independently of chloroplast division in *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Plant Physiol.*, vol. 161, pp. 2102-2112, 2013 (DOI: 10.1104/pp.113.216291)
3. Tsuneyoshi Kuroiwa, Mio Ohnuma, Yuuta Imoto,, Osami Misumi, Takayuki Fujiwara, Shin-ya Miyagishima, Nobuko Sumiya, Haruko Kuroiwa “Lipid droplets of bacteria, algae and fungi and a relationship between their contents and genome sizes as revealed by BODIPY and DAPI staining”. *Cytologia*, vol. 77, pp. 289-299 (DOI: 10.1508/cytologia.77.289)
4. Fumi Yagisawa, Takayuki Fujiwara, Mio Ohnuma, Haruko Kuroiwa, Keiji Nishida, Yuuta Imoto, Yamato Yoshida, Tsuneyoshi Kuroiwa, “Golgi inheritance in the primitive red alga, *Cyanidioschyzon merolae*”. *Protoplasma* (in press, DOI: 10.1007/s00709-012-0467-6)
5. Yuuta Imoto, Haruko Kuroiwa, Mio Ohnuma, Shigeyuki Kawano, Tsuneyoshi Kuroiwa “Identification of peroxisome-dividing ring in *Cyanidioschyzon merolae* based on organelle partner hypothesis.” *Cytologia* (in press)
6. Yamato Yoshida, Takayuki Fujiwara, Yuuta Imoto, Masaki Yoshida, Mio Ohnuma, Shunsuke Hirooka, Osami Misumi, Haruko Kuroiwa, Shinichi Kato, Sachihiko Matsunaga, Tsuneyoshi Kuroiwa “The kinesin-like protein TOP promotes Aurora localization and induces mitochondrial, chloroplast and nuclear division”. *J Cell Sci* (in press, DOI: 10.1242/jcs.116798)