

「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24年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

石川 孝博

国立大学法人 島根大学生物資源科学部・教授

形質転換ユーグレナによるバイオ燃料生産基盤技術の開発

§1. 研究実施体制

(1) 石川グループ(島根大学)

- ① 研究代表者: 石川 孝博 (島根大学生物資源科学部、教授)
- ② 研究項目
 - ・RNA-Seq による遺伝子発現解析

(2) 田茂井グループ(近畿大学)

- ① 主たる共同研究者: 田茂井 政宏 (近畿大学農学部、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ユーグレナ形質転換法の改良
 - ・光合成能強化ユーグレナの作出

(3) 鈴木グループ((株)ユーグレナ)

- ① 主たる共同研究者: 鈴木 健吾 (株式会社ユーグレナ 研究開発部、部長)
- ② 研究項目
 - ・排気ガスを利用した高密度培養法検討
 - ・閉鎖系バイオリアクターによる最適培養条件の検討

§2. 研究実施内容

研究のねらいー 本研究で着目する微細藻類ユーグレナは、光合成により貯蔵多糖パラミロン

(β -1,3-グルカン)を合成し、嫌気条件下に移行することでパラミロンからバイオディーゼルの生産に適したワックスエステル生産能を持つ。本研究の目的は、ユーグレナワックスエステル生産性増大のための基盤技術の確立を目指し、生産コストに見合った有効なワックスエステル生産実用化への道筋を付けることである。そこで本研究では、好気条件や嫌気条件、高 CO_2 条件などさまざまな培養条件における、ユーグレナ細胞の発現遺伝子・タンパク質・代謝産物によるオミクス解析により、パラミロンとワックスエステルの生合成およびそれらの制御機構に関わる遺伝子、炭酸ガス耐性や光合成調節に関連した有用遺伝子の探索・同定・機能解析を進める。また、形質転換によりこれら有用遺伝子を導入することで、高ワックスエステル発酵能、光合成機能強化、および高ストレス耐性能を持った‘スーパーユーグレナ’の創生を目指し、パラミロンやワックスエステル生産のための効率的ユーグレナ培養方法の検討と併せて、ユーグレナによるバイオ燃料生産の実用化を図る。

研究の進捗状況および成果 — 今年度は、ユーグレナの発現遺伝子情報整備のため、RNA-Seq による遺伝子発現解析を実施した。多くの発現遺伝子情報を得るため、好気従属栄養条件の対数増殖期および定常期、ワックスエステル発酵を誘導するため嫌気 24 時間処理、および好気独立栄養条件定常期の各細胞から mRNA を精製後、illumina HiSeq2000 によりペアエンド法で解析を行った。得られた配列情報をアセンブルし、ユーグレナ固有の mRNA 5' 末端にみられる Splicing Leader 配列を基に調べたところ、完全長 cDNA は 32,116 遺伝子含まれていた。また RPKM 値でサンプル間の発現量をノーマライズした後、クラスタリング解析により、嫌気条件特異的に発現応答している遺伝子群を見出した。また、パラミロンおよびワックスエステル代謝に関連する遺伝子群の推定を行い、各候補遺伝子配列情報を得た。

本プロジェクトの目標となる“スーパーユーグレナ”の作出のためには、効率的な遺伝子導入技術の確立が必須となる。そこで効率的な形質転換ユーグレナの選抜条件の検討のために、種々の抗生物質に対する感受性試験を行った結果、パロモイシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシンが有効であることが示唆された。また、先行している CaMV35S プロモーターに加え、植物(トマト)由来ルビスコスモールサブユニットプロモーターを用いた導入プラスミドの構築を行った。

一方、ワックスエステル高生産のためには、ワックスエステル発

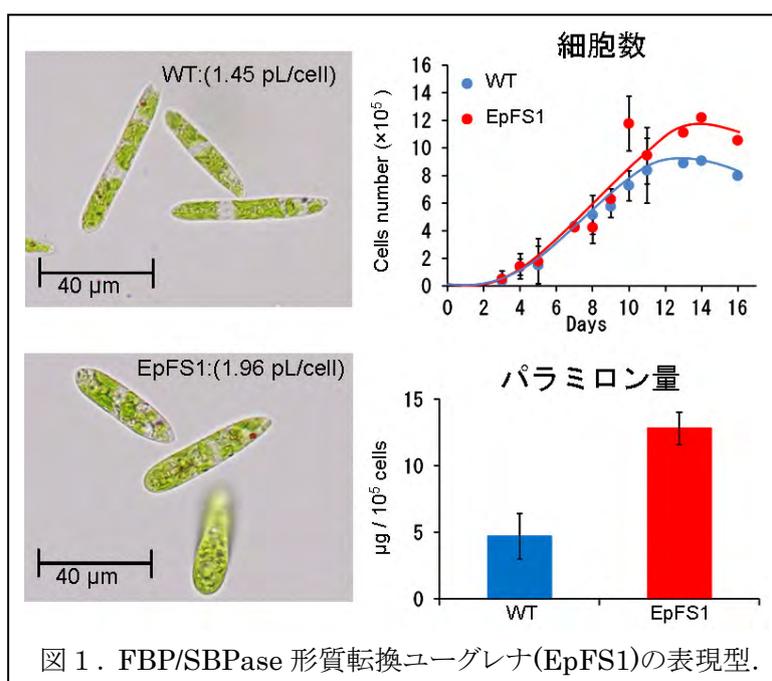


図 1. FBP/SBPase 形質転換ユーグレナ(EpFS1)の表現型。

酵の前段階となるパラミロンの蓄積量を光合成能力の強化により増大させることが重要である。そこで、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター制御下でラン藻由来 FBP/SBPase 遺伝子を導入するプラスミドを構築し、パーティクルガンによりユーグレナ核ゲノムへの導入を行った。得られた形質転換株(1株)を用いて、生育、パラミロン量の比較などを行い、形質転換体では野生株と比較して生育促進、パラミロン量の増大が見られることを明らかにした(図1)。

また、他系統を得るための選抜を行い、複数の FBP/SBPase 導入候補株を得ている。排気ガスを利用した高密度培養法検討のため、排気ガスの通気流量(0.1~1vvm)を変化させてユーグレナを培養し最適な排ガス通気量の検討を進めたが、いずれの条件でもユーグレナの生育に大きな差は認められなかった。また、(株)ユーグレナで所有するユーグレナ株について 15% CO₂条件下で生育の良いユーグレナの選別を試験管レベルで行い、保有しているユーグレナの 8 種の増殖速度の確認を行った。さらに、閉鎖型培養試験を行う実験系のインフラとして、中規模培養試験を行うことのできる 20L 規模弱のチューブ型フォトバイオリアクタのプロトタイプを構築した。

今後の見通し— ユーグレナ発現遺伝子情報の整備が完了したため、次年度からは好気/嫌気条件、高 CO₂ 条件などさまざま培養条件における遺伝子発現解析を進めると同時に、プロテオミクス解析も併用することで、ワックスエステル発酵および高 CO₂ 耐性に関わる鍵遺伝子の探索・同定を進める。また、推測したパラミロンとワックスエステル代謝関連遺伝子についてサイレンシングや組換え体酵素作製により機能解析を進めて行く。形質転換に関しては、ユーグレナの選抜に有効な抗生物質の耐性遺伝子カートリッジを用いた導入用ベクターの構築およびユーグレナへの導入を試みることに加え、既知の動植物由来のプロモーターでユーグレナの形質転換に利用可能なプロモーターの探索を行う。RNA-Seq 情報を基にしたユーグレナ由来プロモーターの活用も試みる。また FBP/SBPase 導入株については、複数の系統を用いて種々の培養条件(光強度、光質、高 CO₂、高/低窒素など)におけるバイオマス生産量、パラミロンおよびワックスエステル量の評価を行い、ユーグレナへの FBP/SBPase 導入効果の再現性の確認を行う。新たに構築したチューブ型フォトバイオリアクタにより、排気ガスを利用したユーグレナの高密度培養条件の最適化を図る。

§3. 成果発表等

(3-1) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 3 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)