

「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

H25 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. 研究実施の概要

微細藻類を用いて倍数体化と重イオンビーム照射によるゲノム改変と DNA 欠失を利用した先端的な分子育種法の開発を目指している。目標となるのは増殖能の向上による藻類バイオマスの増産であるが、バイオ燃料に直結するオイルやデンプンに加え、長鎖脂肪酸、アスタキサンチンやカロテノイドなどの有用機能物質が増産されるのも望ましい。新たなスクリーニング法を考案することで、多くの変異株から大量培養が可能な優良株を確立するとともに、ゲノム解読やトランスクリプトーム解析で変異と代謝の分子機構を明らかにする。

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、鉄イオンの 4 核種をクロレラ(*Parachlorella kessleri*)とヘマトコッカス(*Haematococcus pluvialis*)に計 10 回照射して、生存率や変異率などの基礎的なデータ収集に加え、欠失部位のゲノム解析を試みている。クロレラには増殖速度と細胞サイズには負の相関があるが、そうした制約の中でも重イオンビーム照射によってデンプンやオイル増産株の作出に成功している。また、ヘマトコッカスでは、従来とは逆に重イオン照射してからコルヒチン処理し、倍数体化した株のなかからロバスト性に優れた優良増殖株を単離できるようになっている。

変異体のスクリーニングには様々な培養条件における生育状況や蓄積した色素量を簡便に把握できる必要がある。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を開発するとともに、ハイパースペクトラルカメラを用いてより詳細に有用物質の生産量を定量する新しいシステムを開発した。各種培養条件下でのヘマトコッカスの顕微鏡画像百枚を用いて新たに開発した HaematoCalMorph システムの性能評価を行ったところ、様々な形状および色素量のヘマトコッカスと死細胞を識別でき、培養中のヘマトコッカス集団のダイナミクスを追跡でき、ヘマトコッカスの生育状況と色素量の簡便な把握が可能となった。

クロレラ(*P. kessleri* N-2152)の染色体ゲノム(約 62.6 Mb、400 scaffolds)と葉緑体ゲノム(44 コンティグ、約 147 kb)の高精度配列が完成している。重イオンビーム照射で得た高オイル増産変異株(4 株)と硝酸還元欠損変異株(12 株)については、Ion Proton を用いて 1.3~3Gb/株の配列データを取得した。ゲノムあたり 20~50 倍の配列データとなる。これらをリファレンスとなる親株クロレラゲノムにマッピングし、重イオンビーム照射による欠失部位を探索した。オイル生産能が増大した 4 株については、各株に特異的な 2000~3400 カ所(平均 2600 カ所/株)の欠失部位を検出している。硝酸還元欠損変異株(12 株)については、硝酸還元遺伝子群を中心に塩基置換や小規模な欠損を含め変異率の詳細を解析中である。

微細藻類は、通常、培養液に懸濁する形で培養するのが一般的である。しかし、屋外の池型培養では、単位面積当たりの細胞増殖量は、乾燥重量にして、約 20gDW/m<sup>2</sup>/d が最大値に近く、膨大な土地を利用しなければ期待される量のバイオマス生産は不可能である。そのため、土地面積の利用効率が高い、新たな培養技術の開発が不可欠である。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、面積効率が高く、連続的に細胞を回収できることを示してきた。重イオン照射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を明らかにしている。また、固相膜の種類と本システムの特徴について更なる検討を行い乾燥ストレスでリアシルグリセロール(TAG)が蓄積することを明らかにした。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### 論文詳細情報(国際)

1. Yamazaki, T., Hirai, C., Ota, S., Kuwano, K., and Kawano, S.: Use of FM1-43, a membrane-specific fluorescent dye, to estimate plasma membrane integrity in the cryopreservation of green algae. *Cryo Letters*, in press (2014)
2. Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V., and Kawano, S.: Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under strong illumination and aeration culture conditions. *Bioresour. Technol.* 158, 127-134 (2014). DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.135
3. Shiratake, T., Sato, A., Minoda, A., Tsuzuki, M., and Sato, N.: Air-Drying of cells, the novel conditions for stimulated synthesis of triacylglycerol in a green alga, *Chlorella kessleri*, *PLoS ONE*, 8, 11, e79630 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0079630
4. Ohnuki, S., Nogami, S., Ota, S., Watanabe, K., Kawano, S., and Ohya, Y.: Image-based monitoring system for green algal *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) cells during culture. *Plant Cell Physiol.* 54, 1917-1929 (2013). DOI: 10.1093/pcp/pct126
5. Ota, S., Matsuda, T., Takeshita, T., Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T., and Kawano, S.: Phenotypic spectrum of *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta) mutants produced by heavy-ion irradiation. *Bioresour. Technol.* 149, 432-438 (2013). DOI 10.1016/j.biortech.2013.09.079
6. 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.* 46, 266 (2013).
7. Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A.A., Kawano, S., Bisova, K., Pribyl, P., Zachleder, V., and Vitova, M.: Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technology* 144, 268-274 (2013). DOI: org/10.1016/j.biortech.2013.06.096
8. Imoto, Y., Kuroiwa, H., Yoshida, Y., Ohnuma, M., Fujiwara, T., Yoshida, M., Nishida, K., Yagisawa, F., Hirooka, S., Miyagishima, SY., Misumi, O., Kawano, S., Kuroiwa, T. (2013). Single-membrane-bounded peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based

machinery. Proc Natl Acad Sci USA. 110, 9583–9588. DOI: 10.1073/pnas.1303483110

9. 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. 74, 605-614 (2013). DOI: 10.1111/tpj.12147

### (3-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)