

「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」

H26 年度
実績報告書

平成23年度採択研究代表者

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

高バイオマス生産に向けた高温・酸性耐性藻類の創出

(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

- ・ シズンにおける導入遺伝子過剰発現に適したプロモーターの選定
- ・ シズンにおけるシアノバクテリア *Acyl-ACP reductase* 発現による TAG 合成誘導のメカニズムの解明
- ・ シズン *Acyl-ACP reductase* 強制発現株およびその他代謝改変株の有機酸分析システムによる代謝フラックス変化の評価
- ・ 極限環境緑藻 *Chlamydomonas eustigma* の比較ゲノム解析による酸性耐性遺伝子の同定
- ・ 酸性・高温耐性遺伝子候補群の過剰発現および異種生物への導入とその効果の評価
- ・ 有用油合成能の高い酸性耐性緑藻の単離と同定

(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

- ・ シズンへの自他有用遺伝子の導入・強制発現技術の開発
- ・ 貯蔵脂質及び糖質の合成における細胞小器官の役割の一般性と遺伝子発現
- ・ 細胞を増殖させながら貯蔵脂質・糖質の合成能を高める培地の開発
- ・ 新規に単離された有用緑藻類の脂質合成能の評価
- ・ 有用藻類の凍結保存

(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

- ・ 新規採種株の純化と物質生産に着目したキャラクタリゼーション
- ・ 光波長条件による脂質合成誘導に関する解析
- ・ 高温耐性、各種環境ストレス耐性遺伝子の同定と機能解析

(4)環境耐性・遺伝子資源グループ2

① 研究代表者: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単離と純化
- ・ 新規極限環境藻類のゲノム解析
- ・ 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 研究代表者:田中 寛 (東京工業大学資源化学研究所、教授)

② 研究項目

- ・ 窒素飢餓応答と脂質合成をつなぐ核転写制御因子の機能解析
- ・ 炭素飢餓応答と脂質合成をつなぐ核転写制御因子の機能解析

(6)代謝機能・制御グループ2

① 研究代表者: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

- ・ 油脂蓄積における TOR の機能解析
- ・ GC-FID、GC-MS を用いた脂質の定量解析

§ 2. 研究実施の概要

藻類を利用して有用資源であるバイオマス生産(主に貯蔵脂質)を行う研究の多くは、中性付近の環境を好む藻類を用いて行われている。しかし、大量生産を目指した開放培養においては細菌等他の生物の混入による競合が起こるため、これら藻類を優占増殖させることは難しい。我々は、これまで高温酸性の極限環境(30~60°Cの高温、pH 0.5~5.0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(*Cyanidioschyzon merolae*)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、遺伝子導入法や藻類として初めての相同組換えによる遺伝子破壊系の構築に成功してきた。シアニジウム類は、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。さらに各種金属に対する高い耐性能の利用、NO_x、SO_xの除去への応用などの可能性をも秘めている。

本研究の第一の目的は、紅藻シズンの遺伝子改変や培養法の改良を行うことで、高温・酸性等ストレス環境下でも高増殖能及び高バイオマス生産能をもつ藻類を作出することである。このためシズンのオミクス解析を基盤に、細胞内におけるCO₂固定並びに貯蔵脂質(油滴、Lipid Body)合成・代謝の基本機構を明らかにして、それらに関わる遺伝子群の探索および遺伝子改変株の作成を行う。さらに従来の貯蔵脂質生産・蓄積の誘導法である窒素飢餓は細胞の増殖停止も引き起こすことから、細胞増殖を停止させることなく貯蔵脂質の合成能を強化する培養法の開発を行う。第二の目的は、既存の有用藻類に適用可能な、酸性・高温耐性を付与する遺伝子資源を確保することである。このためシズンのオミクス解析に加え、シズン以外の酸性及び高温耐性の紅藻、緑藻の探索と解析を行う。

本年度は目的達成に必要な研究材料の確保、培養方法の開発、貯蔵脂質の定性定量法の確立、遺伝子情報の整備、代謝制御機構のオミクス解析を行うとともに、その情報を基に増殖能を減少させることなく貯蔵脂質量を高める手法の開発を行った。主な結果は以下の通りである。

- (1) 日本各地の硫酸温泉、鉱山廃水から、貯蔵脂質生産能の高い耐酸性緑藻類を複数株単離した(Hirooka et al., 2014)。
- (2) 耐高温・酸性藻類の細胞増殖を停止させずに貯蔵脂質の合成能を高める培地を開発するとともに、培養の光条件を見いだした。
- (3) 窒素有無を感知して窒素欠乏応答系や貯蔵脂質合成系にシグナルを伝達するリン酸化酵素等を同定し、窒素欠乏条件におけるシグナル伝達経路の解明に向けた基本情報を取得した。
- (4) シズン遺伝子導入法の改良を進め、形質転換処理後一ヶ月で解析可能な培養を得ることができるようになった。さらに導入遺伝子の発現誘導および発現抑制系を確立した(Sumiya et al., 2014)。
- (5) シズンを用いたオミクス解析の情報を基に、遺伝子工学を使い細胞増殖を停止せずに貯蔵脂質合成能が向上した遺伝子改変株を作出することに成功した。
- (6) 有用藻類の耐酸性能を高めることができる汎用性のある遺伝子資源確保のために、シズン(Kobayashi et al., 2014)、シアニジウム類及び酸性耐性緑藻の比較ゲノム解析、トランスクリプト

ーム解析を行い、高温・酸性耐性に関与することが予想される遺伝子群を多数同定した。

【主要論文】

- Shunsuke Hirooka, Sumio Higuchi, Akihiro Uzuka, Hisayoshi Nozaki, Shin-ya Miyagishima. “Acidophilic green alga *Pseudochlorella* sp. YKT1 accumulates high amount of lipid droplets under a nitrogen-depleted condition at a Low-pH.” PLOS ONE, vol. 171, e107702, 2014 (DOI: 10.1371/journal.pone.0107702).
- Nobuko Sumiya, Takayuki Fujiwara, Yusuke Kobayashi, Osami Misumi, and Shin-ya Miyagishima “Development of a heat-shock inducible gene expression system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*.” PLOS ONE, vol.9, e111261, 2014
- Yusuke Kobayashi, Naomi Harada, Yoshiki Nishimura, Takafumi Saito, Mami Nakamura, Takayuki Fujiwara, Tsuneyoshi Kuroiwa, Osami Misumi “Algae sense exact temperatures: small heat shock proteins are expressed at the survival threshold temperature in *Cyanidioschyzon merolae* and *Chlamydomonas reinhardtii*.” Genome Biology and Evolution, vol. 6, pp. 2731-2740, 2014