

「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

H27 年度  
実績報告書

宮城島 進也

国立遺伝学研究所 細胞遺伝研究系  
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 (国立遺伝学研究所細胞遺伝研究系、教授)
- ② 研究項目
  - ・シゾンの代謝改変による TAG 合成および蓄積強化
  - ・極限環境緑藻 *Chlamydomonas eustigma* の比較ゲノム解析による酸耐性遺伝子の同定
  - ・酸性・高温耐性遺伝子候補群の機能解析と有用緑藻等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
  - ・酸性温泉・鉱山廃水を利用した藻類培養法の構築
  - ・貯蔵脂質生産メカニズムのタービドスタット法による連続培養システムによる解析

### (2)「育種技術」グループ2

- ① 主たる共同研究者:黒岩 常祥 (日本女子大学理学部物質生物科学科、客員研究員)
- ② 研究項目
  - ・遺伝子工学を用いた有用な環境耐性紅藻類の作出
  - ・紅藻と緑藻類の油滴(脂質)及び澱粉粒(糖質)の産生に関わる細胞小器官の解析
  - ・油滴・澱粉粒を高生産する紅藻類の大量・開放培養に向けた安価な培地の開発
  - ・上記2項目の推進が可能な新規緑藻の開発

### (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

- ・LED 光源を用いた光波長条件調節による脂質合成誘導系の構築
- ・光波長条件による脂質合成誘導時のトランスクリプトーム解析
- ・石炭火力発電所より排出される燃焼ガスを用いた原始紅藻類の培養検討実験

(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バイオサイエンス学科、教授)

② 研究項目

- ・新規高温・酸性耐性藻類の単離と純化
- ・新規高温・酸性耐性藻類のゲノム解析
- ・比較ゲノム解析・トランスクリプトーム解析による高温・酸性耐性遺伝子資源の探索
- ・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

- ・脂質蓄積条件で活性化される転写因子群の機能解析
- ・シブン解析ツールの開発・改良
- ・アセチル化による脂質合成活性化の標的検索

(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

- ・TAG 生合成における TOR の制御作用点の解析
- ・1次元 TLC と2次元 TLC による脂質の分離・精製
- ・TLC により分離・精製した脂質の GC-FID を用いた解析
- ・シブン有用形質遺伝子の評価

## § 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<sub>x</sub>、SO<sub>x</sub>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CO<sub>2</sub>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遺伝子導入法、導入遺伝子発現調節法の開発、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、酸性耐性藻類を培養するための安価な培地の開発を進めた。主な結果は以下の通りである。

(1)クロラムフェニコール耐性遺伝子を新たなマーカーとした、シズンの遺伝子導入法を開発した。これまでのウラシル合成酵素をマーカーとした形質転換法も改良した。これらの結果、染色体の複数箇所を改変することが可能となった。さらに培地の窒素源を変化させることで導入遺伝子の発現を誘導・抑制できる系を開発した(Fujiwara et al., 2015)。

(2)シズン、その他真核藻類において、細胞内油滴形成に関わる各細胞内小器官の役割を明らかにした。さらに、シズンを用いたオミクス解析の情報も取り入れることで、貯蔵脂質合成能を向上させる培養法、遺伝子改変法等を開発した(Imamura et al., 2015; Sumiya et al., 2015)。

(3)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、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。

(4)日本各地の硫酸温泉、鉱山廃水に窒素源のみを加えることで、シズン他、酸性耐性藻類を安価に、合成培地と同程度に増殖させる培地を開発した。

【主要論文】

- Takayuki Fujiwara, Yu Kanesaki, Shunsuke Hirooka, Atsuko Era, Nobuko Sumiya, Hirofumi Yoshikawa, Kan Tanaka and Shin-Ya Miyagishima. "A nitrogen source-dependent inducible and repressible gene expression system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*". *Front Plant Sci.* vol. 6, No. 657. 2015
- Nobuko Sumiya, Yasuko Kawase, Jumpei Hayakawa, Mami Matsuda, Mami Nakamura, Atsuko Era, Kan Tanaka, Akihiko Kondo, Tomohisa Hasunuma, Sousuke Imamura, Shin-ya Miyagishima, "Expression of Cyanobacterial Acyl-ACP Reductase Elevates the Triacylglycerol Level in the Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*", *Plant and Cell Physiology*, vol. 56, No.10, pp.1962-1980, 2015
- Sousuke Imamura, Yasuko Kawase, Ikki Kobayashi, Toshiyuki Sone, Atsuko Era, Shin-ya Miyagishima, Mie Shimojima, Hiroyuki Ohta and Kan Tanaka, "Target of rapamycin (TOR) plays a critical role in triacylglycerol accumulation in microalgae" *Plant Mol. Biol.*, No. 89, pp. 309-318, 2015