

プログラム名： セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名： 合田 圭介

プロジェクト名： 超効率バイオ燃料開発の実証評価

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 28 年度

研究開発課題名：

動的代謝解析による海洋性緑藻の油脂生合成発動メカニズムの解明と油脂

高生産技術開発への応用

研究開発機関名：

国立大学法人神戸大学

研究開発責任者

蓮沼 誠久

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

緑藻 *Chlamydomonas* sp. JSC4 (以下、JSC4 株とする) は高い増殖性と高い油脂含有率を両立し、海水塩濃度の増加とともに細胞内貯蔵物質をデンプンから油脂へと切替える。本研究では、動的代謝プロファイリング技術と一細胞解析技術を組み合わせることにより、オイル生産藻の油脂蓄積にいたる代謝の制御メカニズムを解明し、高効率に油脂を高生産する変異株の選抜と、培養システムの最適化を目指す。本年度は、油脂合成メカニズムの解明としては、油脂生産を制御する転写因子候補の取得、明暗周期下におけるメタボロームおよび動的代謝プロファイリングデータの取得を目指す、高効率油脂生産株の単離としては、変異導入に用いる常温常圧プラズマ (ARTP) 法の操作条件を確定し、1 万株以上のスクリーニングを行う。培養システムの最適化としては、屋外を模倣した環境下で油脂生産性を最大化する光強度、CO₂ 濃度、温度の条件を明らかにすることを目標とした。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

油脂生産を制御する転写因子候補の取得を進めている。明暗周期条件下におけるメタボローム解析、ならびに動的代謝プロファイリングを実施した。また、ARTP 法の操作条件を確定するとともに、1 万株以上のスクリーニングを実施した。また、屋外を模倣した明暗周期条件下にて培養条件の検討を行い、環境要因が細胞増殖や油脂含有率に及ぼす影響を調べた。

2-2 成果

油脂合成メカニズムの解明においては、JSC4 株の経時的なメタボローム解析を行った。連続光下、および 12 時間の明暗周期下で緑藻を培養し、12 時間ごとに油脂含有率・代謝物量などを調べた。明暗周期下において代謝物量に顕著な変化が見られたのはカルビン回路・解糖系・TCA 回路であった。CO₂ 固定に関わるカルビン回路は暗期において停滞し、中間代謝物であるリブローズ-5-リン酸が多く蓄積した。逆に、カルビン回路下流の解糖系における 3-ホスホグリセリン酸やホスホエノールピルビン酸は暗期において減少し、明期において増加した。TCA 回路の代謝物も暗期において減少する傾向を示した。一方で、油脂合成経路やデンプン合成経路における代謝物は明暗周期の有無によって顕著な変化を示さなかった。また、安定同位体標識した CO₂ (¹³CO₂) を用いて動的代謝プロファイリングを実施した。

高効率油脂生産株の単離においては、ARTP 法におけるプラズマ照射時間の検討を行い、プラズマ照射後の細胞生存率を 10%以下に保つことで油脂生産性が変化した株を取得できる可能性が高まることが分かってきた。一方で、マルチウェルプレートによる LED 培養系を整備して、明暗周期条件下で安定的な多検体同時培養を可能にした (図 1)。そこで、FACS を用いて、クロロフィルあたりの BODIPY 蛍光を指標に 1 次スクリーニングを行った後、多検体同時培養

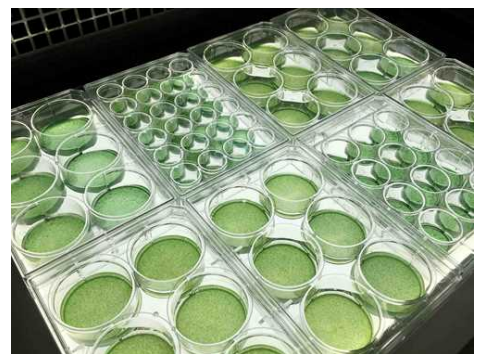


図 1 多検体同時培養システム

による2次スクリーニングを行った。その結果、油脂含有率が有意に高い株を少なくとも3株取得することに成功した。これらの株はスクリーニング時の培養条件において野生株の約2倍の油脂含有率を示した(図2)。また、連続光、明暗周期のいずれの光条件においても野生株より高い油脂含有率を示すことが分かった(図3)。今後は、変異株のゲノム配列の解析を行い、油脂含有率に影響を与えた遺伝子の探索を行う予定である。また、メタボローム解析を含む詳細な解析を実施する予定である。

また、重イオンビーム照射による変異導入とストレス条件下での進化育種を行うことにより、高塩濃度(7%海水塩)ストレスに耐性の高い株を創出することに成功した。得られた耐性株はデンプン・油脂変換系遺伝子の発現量低下、高塩濃度条件下での凝集抑制・細胞肥大化抑制を示すことを明らかにした(論文投稿中)。

また、屋外を模倣した明暗周期条件下にて、JSC4株の培養を行ったところ、250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度、2%のCO₂濃度では、海水塩濃度2%、温度30°Cにおいて油脂生産性が最大になることを確かめた。

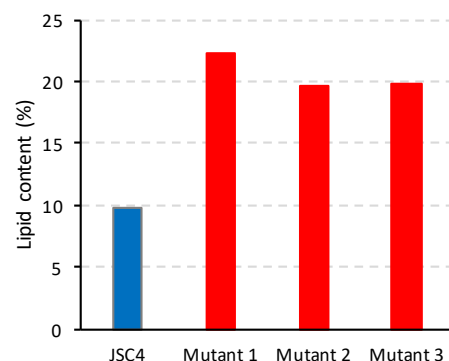


図2 獲得変異株の油脂含有率

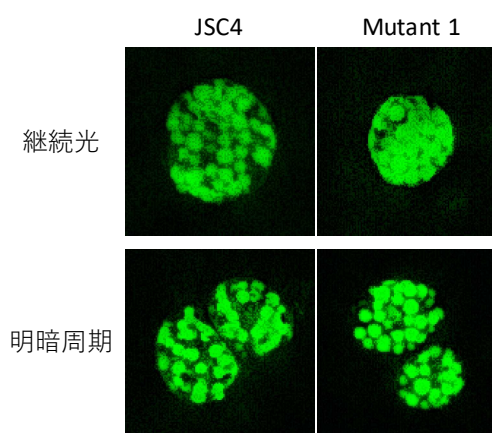


図3 BODIPY 染色後の共焦点画

2-3 新たな課題など

いままでのところ、油脂生産性を支配する転写因子の取得には至っていない。これまでにプロモーター配列と緑藻 cDNA ライブラリを導入した酵母細胞およそ 356 万クローンをスクリーニングし、うち 27 クローンを候補として取得した。しかし、単離した緑藻遺伝子はいずれも偽陽性であり、プロモーター配列への結合が確認できなかった。原因としては、cDNA を調製した緑藻細胞での標的遺伝子の発現量が低かった、緑藻中の多糖類によって RNA から cDNA への変換反応が阻害され cDNA ライブラリのボリュームが十分でなかった、などが考えられる。

また、ピルビン酸センサー遺伝子導入株で蛍光を検出することができなかった。導入した遺伝子を機能発現するために、遺伝子構築の見直しが必要である。

3. アウトリーチ活動報告

特になし。