

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：

モデル緑藻クラミドモナスを用いた脂質蓄積制御に関わる

遺伝子リソースの収集

研究開発機関名：

京都大学

研究開発責任者：

山野 隆志

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

藻類を用いたバイオ燃料の産業的な実用化が期待されているが、自然界からの有用藻類のスクリーニングや脂質代謝研究に留まることが多く、脂質蓄積制御に関する分子遺伝学的な理解が圧倒的に不足している。そこで本研究は、高速・高効率形質転換技術、ハイスループットな変異株スクリーニング技術、遺伝子発現・抑制のエンジニアリング技術を組み合わせ、燃焼効率の高いバイオディーゼルの原料となるトリアシルグリセロール (TAG) の蓄積制御に関わる遺伝子と光合成改変に結びつく CO₂濃縮機構に関わる遺伝子リソースを収集することを目的とする。特に本年度はその技術的な土台となる緑藻クラミドモナスの形質転換の高速・高効率化を目指した。

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

形質転換時の細胞数の検討、細胞と DNA を懸濁するバッファーの検討、他の薬剤耐性遺伝子の検討を行い、クラミドモナスの形質転換の高速化・高効率化を行った。またクラミドモナスでは DNA タグがエクソンに挿入される確率が低く、遺伝子の変異に結びつかない問題があった (Jinkerson and Jonikas 2015)。これを解消するための新しい DNA タグを開発した。例えば、薬剤耐性遺伝子のプロモーターとスタートコドン省いた DNA タグ (ATG-less タグ) を形質転換し、ATG-less タグが、転写される遺伝子のエクソン部分に in-frame に入った時のみ薬剤耐性株が得られるような系を構築した。これは ATG-less タグがイントロン、UTR、遺伝子間領域に挿入された場合は薬剤耐性が獲得されないため、形質転換株が得られる効率は減少すると考えられるが、エクソン領域に挿入される確率は格段に上昇するため、結果としては遺伝子破壊株の得られる確率は上がるとの仮説に基づく。

2-2 成果

形質転換時のバッファーの検討により、既存のバッファーを用いた時よりも 100 倍以上高い形質転換効率を得る条件を見出した。また、細胞質のタンパク質合成を阻害するハイグロマイシンとパロモマイシンに対して耐性を付与する遺伝子 *aphVII* と *aphVIII*、葉緑体のタンパク質合成を阻害するスペクチノマイシンに対して耐性を付与する *aadA* の 3 種類について ATG-less タグを開発し、実際に薬剤耐性株が得られることを見出した。ATG-less タグを形質転換した場合は、DNA タグは転写される遺伝子のエクソン部分に順方向に挿入される効率が高いことを見出した。

2-3 新たな課題など

今年度開発した高効率形質転換系と ATG-less タグを用いて、野生株のゲノムに DNA タグをランダムに挿入した挿入変異株ライブラリを作成する。これをプログラム内で開発されている Image Activated Cell Sorter (いわゆるゆせれんディピター) で 1 細胞ソーティングを行い、光合成や脂質合成に異常のある変異株を網羅的に探索する。

3. アウトリーチ活動報告

なし