

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 29 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合せることにより、オイル生産藻の油脂蓄積にいたる代謝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、油脂生産を制御する代謝メカニズムの解明において、明暗周期で培養した藻体のメタボロームを経時的に調べることにより、油脂生合成のボトルネックとなる代謝反応候補を明らかにした。高効率油脂生産株の単離を目指す中で、油脂蓄積量を向上させた変異株の単離に成功し、変異点解析に着手した。さらに、重イオンビーム照射法および常温常圧プラズマ法により変異を導入した藻株の中から、FACS による選抜を経て、油脂を超高蓄積する変異株を取得することに成功した。また、油脂生産性を向上させる培養システムの検討にも取り組んでいる。

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

オイル生産藻の油脂蓄積制御メカニズムの解明、および高効率に油脂を高生産する変異株の選抜と評価を進めている。油脂蓄積制御メカニズムの解明では、安定同位体標識した CO_2 ($^{13}\text{CO}_2$) を用いて明暗周期条件での動的代謝プロファイリングを実施した。油脂を高生産する変異株の選抜では、獲得したオイル高生産藻のメタボローム解析と変異解析に着手している。また、このオイル高生産藻に対してさらに変異導入を行い、油脂を超高蓄積する変異株の取得に成功した。

2-2 成果

興味深いことに積算光量ベースのバイオマス生産量は継続光条件よりも明暗周期条件で高いことが分かった。動的代謝プロファイリング技術を用いることで、カルビン回路・油脂合成経路・デンプン合成経路の光照射下における代謝フラックス量が継続光と比較して明暗周期条件で多いことを明らかにした（図 1）。また、メタボローム解析により、カルビン回路の代謝物である Ru5P が暗期に蓄積することを発見した。暗期における Ru5P の蓄積が明期における活発な光合成に寄与する可能性を見出した（論文投稿準備中）。

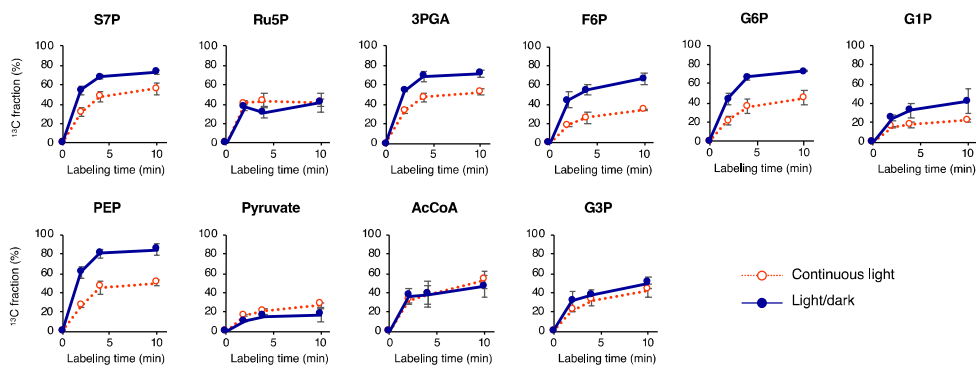


図 1 光照射条件を変えて培養したオイル生産藻の動的代謝プロファイリング

獲得したオイル高生産藻 *Chlamydomonas* sp. KDR（以下、KDR 株とする）のメタボローム解析を実施したところ、KDR 株ではカルビン回路・油脂合成経路・デンプン合成経路における代謝物の多くが増加していた（図2）。特に油脂合成の中間代謝物である PEP・ピルビン酸・G3P の増加が見られ、オイル含有率の向上に寄与した可能性が示唆される。また、KDR 株のゲノム配列のデータを取得しており、今後はオイルの増産に有効な変異点の特定を行う予定である。

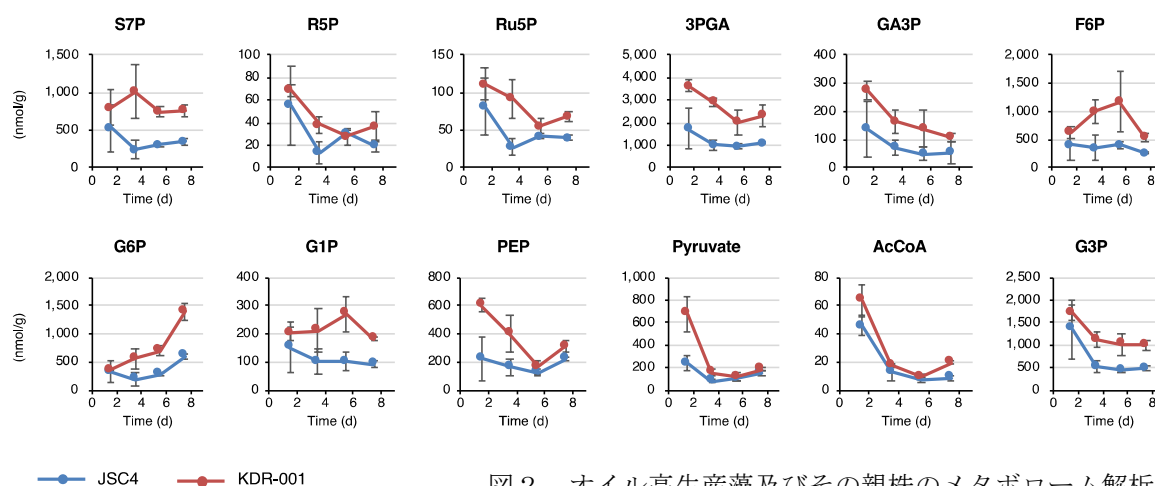


図2 オイル高生産藻及びその親株のメタボローム解析

KDR 株に対して変異を導入し、オイル含有率のさらなる向上を図った。窒素源存在下で培養した変異細胞集団を FACS に供し、BODIPY 蛍光を指標とした一次スクリーニングを実施した。昨年度開発した多検体同時培養システムを用いて二次スクリーニングを行い、オイル含有率が KDR 株の 2 倍以上と

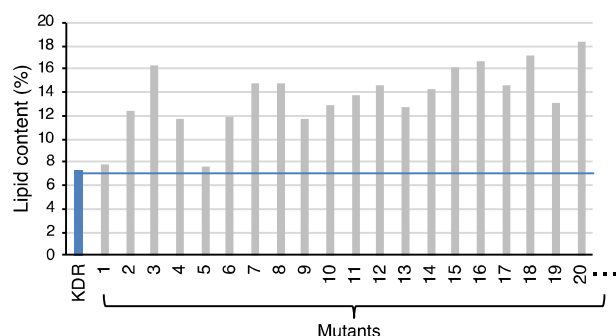


図3 変異株のオイル含有率

なった変異株を多数獲得することに成功した（図3）。今後は、これらの変異株のオイル生産性について、培養条件を変えるなどして詳細に評価する予定である。また、変異株のゲノム配列解析とメタボローム解析等を行い、オイル生産制御因子の特定、オイル増産メカニズムの解明を目指す。

2-3 新たな課題など

明暗周期条件下で、オイルを高生産する変異株の獲得に成功した。これらはランダムな変異導入により作出された変異株であり、オイル増産に至るメカニズムが不明である。他種藻類にも応用可能な普遍的知見を得るには、原因となった変異遺伝子の解明が必要である。

3. アウトリーチ活動報告

特になし。