

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：

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：

国立大学法人 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 CO<sub>2</sub> 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。本年度は、昨年度に達成した緑藻クラミドモナスの形質転換の高速・高効率化技術を活用して、光合成改変に結びつく CO<sub>2</sub> 濃縮機構 (CCM) に関わる遺伝子リソースの収集を進めた。

### 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

葉緑体ストロマに局在する CCM の必須因子 LCIB は、CCM が誘導されない高 CO<sub>2</sub> 条件あるいは暗所では葉緑体全体に拡散しているのに対して、CCM が誘導される低 CO<sub>2</sub> 条件かつ明所ではピレノイド (CO<sub>2</sub> 固定酵素 Rubisco が集積する葉緑体内の非膜オルガネラ) の回りにリング状に局在する (Yamano et al. *Plant Cell Phys* 2011)。このように LCIB は光と CO<sub>2</sub> に応答した特徴的な局在変化を示すとともに CCM に必須な因子であるため、LCIB の局在異常を指標にして CCM 変異株を単離できると考えた。昨年度に達成した緑藻クラミドモナスの形質転換の高速・高効率化技術を活用して、改変型 GFP である Clover を用いて LCIB-Clover を発現させた株に DNA タグをランダム導入した。得られた 2,500 株の形質転換株について 1 株ずつ人の目で観察し、低 CO<sub>2</sub> 条件かつ明所においても LCIB-Clover がピレノイドの周りに局在しない局在異常変異株を 6 株単離し、DNA タグ近傍の配列を決定した。また、当プログラムで開発されたセレンディピターを用いて LCIB-Clover の局在変化が捉えられるかの条件検討を行った。

#### 2-2 成果

当プログラムで開発した形質転換の高速・高効率化技術を用いて得られた LCIB の局在異常変異株の取得効率は  $6/2,500 = 0.24\%$  であり、これは約 13,000 株の形質転換株から 12 株 ( $12/13,000 = 0.092\%$ ) の局在異常変異株を単離した過去の報告 (Yamano et al. *Photosynth Res* 2014) に比べて約 2.6 倍高いものであり、効率よく変異株が取得できる系が確立できたと判断した。また Yamano et al. 2014 では原因遺伝子の同定には至らなかったが、今回得られた局在異常変異株では DNA タグ近傍の配列が決定されており、相補株の取得を通じて原因遺伝子の同定まで結びつけることができると考えられる。これらの結果をまとめた論文を準備中である。また、当プログラムで開発されたセレンディピターを用いて LCIB-Clover の局在変化を観察したところ、ピレノイド周囲に局在する培地条件と葉緑体全体に局在する培地条件との間で明確な区別ができることを確認した。さらにセレンディピターを用いて実際に局在異常変異株のソーティング実験を行い、LCIB 局在異常の表現型を示す変異株のソーティングに成功した。これは開発されたセレンディピターの実証評価の中核をなすデータとして評価された (論文投稿中)。

#### 2-3 新たな課題など

セレンディピターの開発が進み、誘導ラマン散乱 (Stimulated Raman Scattering; SRS) の検出が可能になった場合は、TAG 蓄積制御変異株のスクリーニング系を立ち上げる。具体的には、クロロフィルが分解されない stay green 表現型及び BODIPY を用いた脂質蓄積の表現型を指標に変異株のスクリーニングを進める。予備実験として、クラミドモナス野生株を 12h/12h の明暗周期で培養した後にグルタルアルデヒドで固定し SRS 顕微鏡で観察したところ、細胞内の主な構造 (デンプン、脂質顆粒、クロロフィル) に由来するラマンスペクトルを明確に分離できることが分かった。また、+N (窒素) 条件から-N 条件への誘導に伴って、クロロフィルが分解され、デンプン、脂質顆粒の量が増える様子をそれぞれ 100 枚の画像からのラマンスペクトルの抽出により定量的に示せることも確認した。今後はこれらの画像定量データを用いて実際に変異株をソーティングする。ソーティングされた株について共焦点顕微鏡などを用いて再現性を調べ、原因遺伝子の同定を行う。

### 3. アウトリーチ活動報告

なし