

「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22年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

河野 重行

東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授

微細藻類の倍数化と重イオンビーム照射による
バイオ燃料増産株作出に関する新技術開発

§1. 研究実施体制

(1)「河野」グループ

- ① 研究代表者:河野 重行 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・微細藻類の人為的倍数性の誘導と重イオンビーム照射

(2)「大矢」グループ

- ① 主たる共同研究者:大矢 禎一 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・微細藻類の形態的特徴を把握する汎用 CalMorph の開発
 - ・汎用 CalMorph を用いたダイナミック・スクリーニング

(3)「服部」グループ

- ③ 主たる共同研究者:服部 正平 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授)
- ④ 研究項目
 - ・微細藻類の倍数化と欠失によるゲノム再編と有用遺伝子探索

(4)「都筑」グループ

- ⑤ 主たる共同研究者:都筑 幹夫 (東京薬科大学・生命科学部、教授)
- ⑥ 研究項目
 - ・ 変異株の大量培養適性評価による優良株の取得

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(1) 微細藻類の人為的倍数性の誘導と重イオンビーム照射 (河野グループ)

本研究は、微細藻類を用いて、重イオンビーム照射による DNA 欠失とゲノム改変を利用した先端的な分子育種法を開発することを目的としている。材料として緑藻類のクロレラ(*Parachlorella kessleri*)とヘマトコッカス(*Haematococcus pluvialis*)を主に用いるが、他の緑藻としてクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)やナノクロリス(*Nannochloris bacillaris*)^{1,3}、増殖力に優れた珪藻(*Chaetoceros neogracile*)²なども用いて、培養条件やバイオマス量を比較検討した。本年度の重イオンビーム照射は、理研・仁科センターにおいて、アルゴンと炭素で計3回行った。クロレラに関しては約 900 の重イオンビーム照射株を確立し、現在までに増殖速度と細胞サイズによるスクリーニングが終了し、その約 5 パーセントで野生株の 3 倍以上の収量が見込めることが分かった。また、炭素イオンビーム照射株にヨウ素デンプン反応を施し目視のスクリーニングで優良株を単離し、アンスロン硫酸法によるデンプン定量を行ったところデンプン蓄積量が野生株より 3 ~5 倍あることが分かった。ヘマトコッカス に関しては致死性が高いアルゴンイオンビーム照射で 110 株を樹立した。増殖速度に対して細胞乾燥重量とアスタキサンチン蓄積量は負の関係があるようだが、アスタキサンチンやそれを含有したオイルドロップの形成過程を詳細に顕微鏡観察するなどして、それらの大量蓄積株の単離方法を検討している。

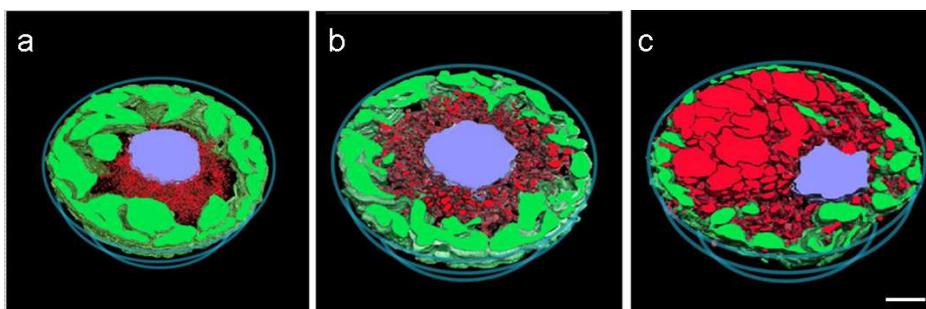


図1 ヘマトコッカスのオイルの蓄積過程を示す顕微鏡3次元立体構築 オイルにはアスタキサンチンが高濃度に含まれている。栄養細胞(a)、アスタキサンチンの誘導初期(b)、後期(c)、バーは 5 μm

(2) 微細藻類の形態的特徴を把握する汎用 CalMorph の開発 (大矢グループ)

ヘマトコッカスのアスタキサンチンの蓄積は増殖や成長とは異なるステージで起こり、そのステージには 10 種以上ものタイプの細胞集団が含まれる。本年度は様々なタイプの細胞がどのような細胞形態を示すかを正確に把握し、顕微鏡画像から数値データを取得できる汎用 CalMorph の開発に着手した。まずヘマトコッカスの休止期細胞を新鮮な培地に接種し、経時的に出現する内生孢子細胞、遊走細胞、パルメラ細胞など様々なタイプの細胞を SYBR green で核染色した後に、同一視野にて明視野像、クロロフィル蛍光像、核の蛍光染色像の顕微鏡画像を取得した。この画像から形態情報の取得するために、合計 1,111 の数値パラメーターを抽出できる出芽酵母専用のソフトウェア CalMorph をベースにした。ヘマトコッカスは、母細胞内で細胞分裂を行う内生孢子や、鞭毛を持ち寒天質に包まれる遊走細胞など、出芽酵母にはない多様な形態の細胞タイプがある。このような細胞タイプに特異的な特徴を抽出するプログラムの開発に取り組み、他の微細

藻類にも適用が期待できる細胞の最外形および寒天質部分を除く細胞外形について、それぞれ個別に抽出するアルゴリズムを開発した。

(3) 微細藻類の倍数化と欠失によるゲノム再編と有用遺伝子探索 (服部グループ)

近縁微細藻類のゲノムサイズから、クロレラは約 50Mb、ヘマトコッカスは 120Mb と推定される。クロレラに対して約 480 万リード(約 1.7 Gb)、ヘマトコッカスに対して約 600 万リード(約 2 Gb)シーケンスした。これらのリード数には、アセンブリの精度の検証のため、paired-end シーケンスをクロレラに対して約 100 万リード、ヘマトコッカスに対して約 200 万リードが含まれる。アセンブリの結果、クロレラでは約 61Mb(約 7,300 contigs)、ヘマトコッカスでは約 135Mb(約 17 万 contigs)の non-redundant 配列データが得られた。相同性検索 (blast) から、シーケンスしたヘマトコッカス株にはツボカビ (*Paraphysoderma sedebokerensis*) が寄生していることが分かった。調べたところ各国のストックセンターの標準株がほとんど全てツボカビに汚染していることが分かった。予備的な遺伝子探索の結果、クロレラで約 9,000 個、ヘマトコッカスに約 15,000 個の遺伝子が予測された。得られた遺伝子数はともにクラミドモナスやクロレラ近縁種の遺伝子数に類似していた。高精度なゲノム配列と長いスカフォールドサイズを得るために、30×相当のヘマトコッカスの BAC ライブラリ(約 100kb インサートサイズ、16,512 クローン)を構築し、ABI3730xl による両端シーケンス(33,024 反応)を完了した。一方、ヘマトコッカスの BAC ライブラリの作製が極めて困難であったため、30×相当の Fosmid ライブラリ(約 40kb インサートサイズ、90,000 クローン)を構築した。

(4) 変異株の大量培養適性評価による優良株の取得 (都筑グループ)

新規変異株の基準となるクロレラとヘマトコッカスのモデル株について、増殖特性(増殖速度・高密度化・環境耐性・有機炭素資化能など)や物質生産性(カロテノイド・脂肪酸・炭化水素などの組成と量)に関する増殖生理学・代謝工学的研究を実施し、人工光照射型屋内リアクタによるバッチ式光独立培養及び、有機炭素を用いた混合／従属培養、連続培養などの設定条件を検討する。これには物質生産量測定方法及び抽出条件の検討が必要である。本年度は、新規変異株の基準となるモデル株についてその生理学的特徴を解析した。また、従来行われてきた大量培養法とは異なる新規培養システムを開発した。緑藻クラミドモナスは硫黄(S)欠乏条件下では、S 含有膜脂質であるスルフォキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)が分解され、タンパク質合成の S 源となる一方、トリアシルグリセロール(TG)が次第に蓄積されることが明らかとなった。この時、TG 蓄積量は総脂質の 40%にも達した。その脂肪酸組成は、16:0 が多く、次いで 18:1、18:2 であった。また、N 欠損条件でも、TG 蓄積は顕著であったが、P 欠損での蓄積は見られなかった。クロレラでも、S 欠損に置くと TG は増加し、総脂質の 4 割に達した。その脂肪酸組成の分析では 18:2 が多く、18:1、16:0 と続いた。また、クロレラでは、S 欠損の時に温度を変えると、20°C では 18:1 の割合が高くなるのに対し、35°C では減少した。クロレラの 18:0 の割合は、クラミドモナスに比べて低かった。シアノバクテリアの SQDG 欠損を調べたところ、PCC6803 株では、SQDG が必須であることが明らかになった⁴⁾。また、微細藻類の連続的に細胞回収が可能な、新規のフォトバイオリアクターシステムを構築した⁵⁾。本システムの有効性に関して、さらなる検討を続けている。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Sumiya, N., Owari, S., Watanabe, K., and Kawano, S.: The role of multiple FtsZ rings in chloroplast division under oligotrophic and eutrophic conditions in the unicellular green alga, *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). J. Phycol. (in press).
2. Nishikawa, T., Moriyama, Y., Sato, M., Sano, T., Hasezawa, S., Ota, S., and Kawano, S.: Isolation of mitochondrial and plastid ftsZ genes and analysis of the organelle targeting sequence in the diatom *Chaetoceros neogracile* (Diatoms, Bacillariophyceae). Phycol. Res. (in press).
3. Sumiya, N., Watanabe, K., Owari, S., Yamamoto, M., and Kawano, S.: Chloroplast division and differentially regulated expression of FtsZ1 and FtsZ2 in *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Cytologia, 77, 59-66. (DOI: 10.1508/cytologia.77.59)
4. Aoki, M., Tsuzuki, M. and Sato, N.: Involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in DNA synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. BMC Res. Notes, 5, 98, 2012. (DOI: 10.1186/1756-0500-5-98)
5. Tsuzuki, M., Shiratake, T., Suzuki, M., Saijo, H., Asayama, M., Miyasaka, Y., Okada, K., Imamura, N., Konishi, J.: A new culture system for microalgae under LED illumination. The Journal of Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 15, 9-16, 2012. (in Japanese)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数 (国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数 (国内 2 件)