

「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23年度採択研究代表者

H23年度 実績報告

宮城島 進也

大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構
国立遺伝学研究所新分野創造センター・特任准教授

高バイオマス生産に向けた高温・酸性耐性藻類の創出

§1. 研究実施体制

(1) 育種技術グループ1

- ① 研究代表者: 宮城島 進也 (国立遺伝学研究所新分野創造センター、特任准教授)
- ② 研究項目
 - ・シズン¹の形質転換において汎用性と利便性の高いベクター系の構築
 - ・シズンの細胞内で複製するプラスミドの開発
 - ・シズンにおける導入遺伝子の強制発現系の構築
 - ・緑藻に対する遺伝子導入の準備

(2) 育種技術グループ2

- ① 主たる共同研究者: 黒岩 常祥 (立教大学大学院理学研究科、特任教授)
- ② 研究項目
 - ・シズン類の高温・酸性など環境変動に関わる遺伝子の選定と、PEGを用いた化学的遺伝子導入法の開発
 - ・強制発現により、遺伝子の機能強化を計る基本遺伝子操作技術の開発の開始
 - ・極限環境藻類等が持つ脂質・糖質の局在・定量の顕微測光技術の開発の開始
 - ・有用藻類株の凍結等保存技術の開発の開始

(3) 環境耐性・遺伝子資源グループ1

- ① 主たる共同研究者: 三角 修己 (山口大学大学院医学系研究科、准教授)
- ② 研究項目

- ・日本各地の硫酸酸性の硫黄泉より極限環境紅藻類の採種、その分離・純化
- ・新規採種株の環境耐性や物質生産性のキャラクタリゼーションならびに有用形質株の選抜
- ・選抜した有用形質株のドラフトゲノム解析に着手(環境耐性・遺伝子資源グループ2と協力)
- ・シゾンのトランスクリプトーム解析により高温耐性、酸化ストレス耐性遺伝子の選抜

(4) 環境耐性・遺伝子資源グループ2

① 主たる共同研究者: 吉川 博文 (東京農業大学応用生物科学部、教授)

② 研究項目

- ・次世代シーケンサーによる新規シアニジウム類選抜株のショートリード・シーケンスの取得
- ・上記配列の *de novo* アセンブルの試行と、コンティグ配列の作製
- ・新規シアニジウム類選抜株からの既知の環境耐性付与遺伝子群の探索

(5) 代謝機能・制御グループ1

① 主たる共同研究者: 田中 寛 (東京工業大学資源化学研究所、教授)

② 研究項目

- ・環境中 CO₂ 濃度の変動による、シゾン核/オルガネラ遺伝子発現変化の網羅的解析
- ・CO₂ 同化に関わる転写調節因子候補の同定
- ・上記で得られた候補遺伝子の欠損株の取得
- ・窒素同化の制御因子 MYB1 の標的遺伝子の検索

(6) 代謝機能・制御グループ2

① 主たる共同研究者: 今村 壮輔 (東京工業大学資源化学研究所、准教授)

② 研究項目

- ・TOR 活性測定のための特異的抗体の作製
- ・TOR 活性を人為的にコントロール可能な株の作出
- ・紅藻からの脂肪酸と炭化水素の抽出法の確立
- ・GC-MS を用いた脂肪酸と炭化水素の定性・定量解析法の確立

§ 2. 研究実施内容

1. 研究目的

藻類のバイオマス利用に関する研究の多くは緑藻とシアノバクテリアを中心に進められているが、これらの多くは中性付近の環境を好み、開放培養においては他の生物の増殖との競合が起こるため優占増殖させることが難しい。一方で、我々は、これまで広大な火口湖や温泉など、高温強酸性の極限環境(30~60°C の高温、pH0.5~ pH5.0 の酸性条件)に棲息し、唯一光合成を行うこと

のできる、原始紅藻シアニジウム類の増殖機構の解析を行ってきた。特にその一種であるシズンについては、その全ゲノムの塩基配列を、真核藻類として初めて解読し、遺伝子導入や、藻類として初めて相同組換えによる遺伝子破壊系の構築等に成功した。極限環境紅藻類は、高温・酸性（高硫酸、高硝酸）条件下で優占種として生息するため、開放系におけるバイオマス生産技術開発に適していると期待されるだけでなく、NO_x, SO_x の除去への応用の可能性を秘めている。

本研究ではシズンのオミクス解析を基盤に、藻類に高い環境耐性を付与する遺伝的要因、藻類における CO₂ 固定並びに糖質・脂質合成の調節機構を明らかにする。その情報を基に、藻類に対して遺伝学的改変を施し、高温・酸性等のストレス環境でも高増殖能及び、高バイオマス（糖類、脂肪酸）生産性をもつ藻類の作出を行う。研究者は「育種技術」、「環境耐性・遺伝子資源」、「代謝機能・制御」の3つのグループより構成され、目標を達成する。育種技術グループは本研究遂行の中心であり、シズン等の極限環境紅藻類への遺伝子導入技術、開放培養技術の開発を基盤とした、極限環境藻類の育種技術開発を行う。さらに他2グループの研究により提供される、生物資源、遺伝子資源、バイオマス（脂質、糖質）生産向上法を集約し、高環境耐性・高バイオマス生産紅藻類の創出を行う。加えて、環境耐性・遺伝子資源グループと共同で、遺伝子導入による緑藻類の環境耐性能の向上を行う。環境耐性・遺伝子資源グループは、高い環境耐性能を有する新規極限環境紅藻の探索と、比較ゲノム解析により、高環境耐性をもたらす有用形質遺伝子群を同定し、見いだされた遺伝子資源を育種技術グループに提供するとともに、育種技術グループによって創出される有用形質藻類の評価を行う。代謝機能・制御グループは、脂質や糖質など藻類バイオマス生産向上の鍵となる、調節遺伝子群、調節経路を同定し、バイオマス生産向上法を開発し、その情報を育種技術グループに提供するとともに、育種技術グループによって創出される有用形質藻類の評価を行う。全研究期間内に上記の目標を達成すべく、本年度は以下のように必要な研究材料の整備、遺伝子情報の整備、方法の開発、代謝制御機構の解析を行った。

2. 研究成果

(1) 育種技術グループの成果

シズンにおける導入遺伝子の強制発現系について、従来の一過的発現ではなく、恒常的発現系を構築するため、シズンにおいて複製するプラスミドの開発を進めた。さらに発現量及び細胞内における発現場所を効率よく検出するために、シズンで機能する高温耐性型 GFP の開発を行った。本研究で使用する極限環境藻類や、遺伝子改変で得られた藻類が持つ脂質・糖質について、細胞内での局在の検知と定量法を確立するため、今回脂質について BODIPY 蛍光染色法を開発した。その結果、従来より簡便に、より確実に細胞内脂質を検出、定量する顕微測光技術を確立した。有用藻類株の凍結等保存技術について、従来凍結保存の際使用してきた溶媒を、複数種混合して使用する方法を開発し、更にその混合比について検討した。

(2) 環境耐性・遺伝子資源グループの成果

シズンのトランスクリプトーム解析より高温耐性、酸化ストレス耐性、金属耐性に関与することが予想さ

れる遺伝子の候補を多数選抜し、その一部について機能の解析を進め、有用形質を付与するための遺伝資源としての適性について検討を行った。また、日本各地の硫酸酸性の硫黄泉より極限環境紅藻類を採種し、純化を進め、delta 株を含め新規に約 10 系統を株化し、各株の特性解析を始めた。選抜された *Cyanidium caldarium delta* 株の核ゲノム DNA とオルガネラゲノム DNA を次世代シーケンサー (Illumina GA2) により解読し、それぞれ 2.5 G base、25.4 M base 分のショートリード・シーケンスデータを取得した。これらを *de novo* アセンブルし、コンティグを得た。また次世代シーケンサーを利用したリシーケンス解析や ChIP-seq 解析の手法を確立した。

(3) 代謝機能・制御グループの成果

窒素・炭素代謝制御におけるシグナル伝達において、TOR は重要な役割を發揮する事が想定されるため、その活性を人為的にコントロール可能な株の作出を試みた。また、TOR の活性を簡便に測定するために、TOR 制御下にある事が考えられる RRN3 と S6K のリン酸化状態を検出可能な抗体を作製した。炭素同化に関わる遺伝子発現の制御因子を同定するために、炭酸ガス濃度の低下による遺伝子発現変化をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。これにより光呼吸関連遺伝子など、多くの核遺伝子の転写が活性化されることが明らかとなったが、その調節に関わる転写因子の特定には至らなかった。今後は、多数のマイクロアレイデータを用いたクラスター解析を進めることで、炭素同化制御因子の同定を試みる。窒素同化系の転写因子である MYB1 については、これまでに ChIP-chip 法により制御因子の網羅的同定実験を行ない、現在データの解析中である。脂質分析では、シズンからの脂質抽出法を確立し、GC-MS を用いた脂肪酸と炭化水素の定性解析を行った。