

「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

H25 年度
実績報告

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

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
 - ・シズンにおける熱ショックによる導入遺伝子誘導発現系の構築
 - ・シズンにおけるシアノバクテリア *Acyl-ACP reductase* 強制発現による TAG 合成能の強化
 - ・シズンにおける環境耐性遺伝子候補の探索
 - ・酸性耐性緑藻 *Chlamydomonas eustigma* のゲノム解析及び環境耐性遺伝子候補の探索
 - ・新規酸性耐性緑藻の探索

(2) 育種技術グループ2

- ① 主たる共同研究者: 黒岩 常祥 (立教大学理学部、特定課題研究員)
- ② 研究項目
 - ・紅藻及び緑藻を用いて、貯蔵脂質(油滴、Lipid body)の合成・代謝経路における基本細胞小器官の役割の解析
 - ・紅藻及び緑藻を用いて、細胞増殖を維持しながら油滴を高生産させる培養系の開発
 - ・シアニジウム類 APX 遺伝子の過剰発現による耐高温性及び糖質増産能の付与の解析
 - ・シズンゲノムニュートラルサイトへの遺伝子導入及び強制発現系の開発
 - ・凍結保存法による有用藻類の保存

(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

- ・新規採種株の純化と物質生産に着目したキャラクタリゼーション
- ・高温耐性、各種環境ストレス耐性遺伝子の同定と機能解析
- ・細胞増殖を阻害しない貯蔵脂質合成強化に関する光条件の検討

(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

- ・新規極限環境藻類のドラフトゲノム解析
- ・比較ゲノム解析、トランスクリプトーム解析による極限環境耐性関連遺伝子の探索
- ・インフォマティクス解析面での各共同研究グループの支援

(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

- ・シゾン葉緑体における窒素応答の機能解析
- ・CO₂ 飢餓応答に関わる核ゲノム転写制御因子の探索

(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

- ・脂質代謝における TOR の機能解析
- ・紅藻と緑藻からの脂質抽出と GC-FID を用いたトリアシルグリセロール定量

§ 2. 研究実施の概要

藻類を利用して有用資源であるバイオマス生産(主に貯蔵脂質)を行う研究の多くは、中性付近の環境を好む藻類を用いて行われている。しかし、大量生産を目指した開放培養においては細菌等他の生物の混入による競合が起るため、これら藻類を優占増殖させることは難しい。我々は、これまで高温酸性の極限環境(30~60°Cの高温、pH 0.5~5.0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(*Cyanidioschyzon merolae*)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、遺伝子導入法や藻類として初めての相同組換えによる遺伝子破壊系の構築に成功してきた。シアニジウム類は、高温・酸性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。さらに各種金属に対する高い耐性能の利用、NO_x、SO_xの除去への応用などの可能性をも秘めている。

本研究の第一の目的は、紅藻シズンの遺伝子改変や培養法の改良を行うことで、高温・酸性等ストレス環境下でも高増殖能及び高バイオマス生産能をもつ藻類を作出することである。このためシズンのオミクス解析を基盤に、細胞内におけるCO₂固定並びに貯蔵脂質(油滴、Lipid Body)合成・代謝の基本機構を明らかにして、それらに関わる遺伝子群の探索および遺伝子改変株の作成を行う。さらに従来の貯蔵脂質生産・蓄積の誘導法である窒素飢餓は細胞の増殖停止も引き起こすことから、細胞増殖を停止させることなく貯蔵脂質の合成能を強化する培養法の開発を行う。第二の目的は、既存の有用藻類に適用可能な、酸性・高温耐性を付与する遺伝子資源を確保することである。このためシズンのオミクス解析に加え、シズン以外の酸性及び高温耐性の紅藻、緑藻の探索と解析を行う。

本年度は目的達成に必要な研究材料の確保、培養方法の開発、貯蔵脂質の定性定量法の確立、遺伝子情報の整備、代謝制御機構のオミクス解析を行うとともに、その情報を基に増殖能を減少させることなく貯蔵脂質量を高める手法の開発を行った。主な結果は以下の通りである。

- (1) 日本各地の硫酸温泉、鉱山廃水から、貯蔵脂質生産能の高い耐酸性藻類(紅藻及び緑藻)を複数株単離した。
- (2) 紅藻及び緑藻を用いて、貯蔵脂質の合成経路における基本細胞小器官の役割を解明した。また細胞増殖を停止させずに貯蔵脂質の合成能を高める複数の培養条件を同定した。
- (3) 窒素の有無を感知して窒素欠乏応答系や貯蔵脂質合成系にシグナルを伝達するリン酸化酵素等を同定し、窒素欠乏条件におけるシグナル伝達経路の解明に向けた基本情報を取得した。
- (4) 紅藻及び緑藻の貯蔵脂質(トリアシルグリセロール)をガスクロマトグラフィーで定量する実験系を確立した。
- (5) シズンを用いたオミクス解析の情報を基に、遺伝子工学を使い細胞増殖を停止せずに貯蔵脂質合成能が向上した遺伝子改変株を作出することに成功した。
- (6) 有用藻類の耐酸性能を高めることができる汎用性のある遺伝子資源確保のために、シズン及び酸性耐性緑藻を用いて酸性耐性に関与することが予想される遺伝子群を多数同定した。高温耐性に関しても、シズンより高温に棲息するシアニジウム株から高温耐性能に関与する遺伝子候補を見出した。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

1. Satoru Watanabe, Mitsumasa Hanaoka, Yusaku Ohba, Tomohiro Ono, Mio Ohnuma, Hirofumi Yoshikawa, Shigeru Taketani, Kan Tanaka. “Mitochondrial localization of ferrochelatase in a red alga *Cyanidioschyzon merolae*”, *Plant & Cell Physiology*, vol. 54, No. 8, pp. 1289-1295, 2013. (DOI: 10.1093/pcp/pct077)
2. Yamato Yoshida, Takayuki Fujiwara, Yuuta Imoto, Masaki Yoshida, Mio Ohnuma, Shunsuke Hirooka, Osami Misumi, Haruko Kuroiwa, Shoichi Kato, Sachihiko Matsunaga and Tsuneyoshi Kuroiwa, “The kinesin-like protein TOP promotes Aurora localisation and induces mitochondrial, chloroplast and nuclear division”, *Journal of Cell Science*, vol. 126, No. 11, pp.2392-2400, 2013 (DOI: 10.1242/jcs.116798)
3. Yuuta Imoto, Haruko Kuroiwa, Yamato Yoshida, Mio Ohnuma, Takayuki Fujiwara, Masaki Yoshida, Keiji Nishida, Fumi Yagisawa, Shunsuke Hirooka, Shin-ya Miyagishima, Osami Misumi, Shigeyuki Kawano and Tsuneyoshi Kuroiwa, “Single membrane-bounded peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based machinery”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.110, No. 23, pp.9583-9588, 2013 (DOI: 10.1073/pnas.1303483110)
4. Fumi Yagisawa, Takayuki Fujiwara, Mio Ohnuma, Haruko Kuroiwa, Keiji Nishida, Yuuta Imoto, Yamato Yoshida, and Tsuneyoshi Kuroiwa, “Golgi inheritance in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*”, *Protoplasma*, vol. 250, No.4, pp.943-948, 2013 (DOI: 10.1007/s00709-012-0467-6)
5. Takayuki Fujiwara, Kan Tanaka, Tsuneyoshi Kuroiwa and Tatsuya Hirano, “Spatiotemporal dynamics of condensins I and II: evolutionary insights from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*”, *Molecular Biology of the Cell*, vol.24, No. 16, pp. 2515-2527, 2013 (DOI: 10.1091/mbc.E13-04-0208)
6. Sousuke Imamura, Aiko Ishiwata, Satoru Watanabe, Hirofumi Yoshikawa and Kan Tanaka, “Expression of budding yeast FKBP12 confers rapamycin susceptibility to the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 439, No. 2, pp. 264-269, 2013 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.045)

7. Takayuki Fujiwara, Mio Ohnuma, Masaki Yoshida, Tsuneyoshi Kuroiwa and Tatsuya Hirano, “Gene targeting in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*: single- and multi-copy insertion using authentic and chimeric selection markers”, PLoS ONE, vol.8, No. 9, e73608, 2013 (DOI: 10.1371/journal.pone.0073608.s001)
8. Gaku Fujii, Sousuke Imamura, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka, “Nuclear-encoded chloroplast RNA polymerase sigma factor SIG2 activates chloroplast-encoded phycobilisome genes in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae*” FEBS Letters, vol. 587, No. 20, pp. 3354-3359, 2013 (DOI: 10.1016/j.febslet.2013.08.031)
9. Hitoshi Nakamoto, Kensaku Fujita, Aguru Ohtaki, Satoru Watanabe, Shouichi Narumi, Takahiro Maruyama, Emi Suenaga, Tomoko S. Misono, Penmetcha K. R. Kumar, Pierre Goloubinoff, Hirofumi Yoshikawa, “Physical Interaction between Bacterial Heat Shock Protein (Hsp) 90 and Hsp70 Chaperones Mediates Their Cooperative Action to Refold Denatured Proteins”, Journal of Biological Chemistry vol. 289, No. 9, pp. 6110-6119, 2014 (DOI: 10.1074/jbc.M113.524801)
10. Shin-ya, Miyagishima, Takayuki Fujiwara, Nobuko Sumiya, Shunsuke Hirooka, Akihiko Nakano, Yukihiro Kabeya, and Mami Nakamura “Translation-independent circadian control of the cell cycle in a unicellular photosynthetic eukaryote”, Nature communications (in press), (DOI: 10.1038/ncomms4807)
11. Yoshiko Misonou, Maiko Kikuchi, Hiroshi Sato, Tomomi Inai, Tsuneyoshi Kuroiwa, Kenji Tanaka and Isamu Miyakawa, “Aldehyde dehydrogenase, Ald4p, is a major component of mitochondrial fluorescent inclusion bodies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, Biology Open (in press).
12. Satoru Watanabe, Jun Sato, Sousuke Imamura, Mio Ohnuma, Yusaku Ohba, Taku Chibazakura, Kan Tanaka, Hirofumi Yoshikawa, “Stable expression of a GFP-reporter gene in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*”, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (in press).

(3-2) 知財出願

- ①平成 25 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ②CREST 研究機関累積件数(国内 1 件)