

研究成果報告書

研 究 題 目		ゲノム情報を基盤にした藻類の脂質高生産化と高効率燃料生産系の構築	実 施 年 度
			平成 28 年度
代 表 研 究 者	所 属	広島商船高等専門学校 一般教科	
	氏 名	大沼 みお	印
1. 研究の目的・背景 ＜藻類バイオマス燃料の意義と課題＞ 地球の温暖化抑制および枯渇性資源代替の一つとして、バイオ燃料（エタノール、ディーゼルなど）が利用されつつある。現在はナタネ、ダイズなど陸上植物を原料とするバイオ燃料が実用化されているが、耕地面積の問題から、食料・飼料生産との競合が避けられない。微細藻類を利用したバイオ燃料は、耕作地が不要なため、食・飼料と競合せず、陸上植物に比べて単位面積当りの生産効率が高い（数十～数百倍）ため、次世代バイオ燃料として、世界各国で様々な藻類を活用した研究・開発が盛んに進められている。 しかし、バイオ燃料の普及のためには、既存燃料と同等、またはそれ以下にまでコストを下げる必要があるが、微細藻類を利用したバイオ燃料においても、同様に、開発途上にある。コストを下げるために必要な高率的な藻類生産には、油脂含有量が高く、増殖性の高い藻類が必須条件となるが、一般の藻類では、既知の油脂含有量が增大する培養法では、細胞増殖が阻害され、逆に増殖率の高い培地では、油脂含有量が低くなるという相反的な課題がある。 ＜本研究の目的～新規培養系のゲノム情報に基づいた研究～＞ 藻類バイオ燃料の普及には低コスト大量培養系が必須であり、その育種や生産性の高いシステムの構築には、ゲノム情報に基づく技術革新が必要となる。本研究で主な材料とする、高温酸性温泉（pH 1-3、40-60℃）に棲息する原始紅藻類 <i>Cyanidioschyzon merolae</i>（シゾン）は、同調培養が可能で、細胞小器官の単離法が確立していること、ゲノムが真核生物で唯一100%解読されていることから、高精度なオミクス解析による、有用遺伝子の探索に適している。また、これまでの研究でシゾンを用いた様々な遺伝子操作系を、高温・強酸性の極限環境藻類に対して初めて確立している。 最近、我々は、シゾンが油脂を蓄積する条件を検討したところ、リン酸濃度を制限し、塩化ナトリウムなど塩の添加により、高い細胞増殖を維持したまま、油脂含有量を増大させることに成功した。本研究では、ゲノム情報を基盤に、遺伝子操作系等を駆使し、細胞増殖を維持したまま高率に脂質を生産するメカニズムの解明を目指す。さらに、藻類の育種や藻類の生産能を最大限に引き出すシステムの開発により、実験室レベルの高効率燃料生産システムの構築を最終目標とする。			

2. 研究成果及び考察（申請時の計画に対する達成度合を織込む）

本研究では、増殖が阻害される窒素飢餓培地の約 6 倍の細胞増殖を示し、対照（増殖培地）の約 100 倍もの脂質を脂肪滴に蓄積する新規脂質蓄積法を用いて、脂肪滴の形成過程と、脂質代謝に関わる細胞小器官の挙動を解析する予定であった。しかし、何回か試行を行ったが、研究室独立後の環境では、新規培養法でも窒素飢餓培地と同様に細胞増殖が阻害されてしまい、独立前の結果を再現できなかったため、脂質蓄積条件における解析は保留した。自身が独立直後で機器が不十分だったこともあり、独立前の培養条件が再現できなかったためと考えられる。脂質蓄積条件を再現するための必要条件の検討の必要性が明らかになった。

このため、平行して行う予定であったシゾンの過剰発現法の開発を重点的に行い、そのために必要な藻類の培養に購入した人工気象器と培養用の容器等を使用した。これまでに申請者らは、ゲノムが完全解読されている単細胞性紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン)を用いた遺伝子導入技術の開発に成功し、アンチセンス核酸を用いた遺伝子抑制、相同組換えによる遺伝子破壊法を開発してきた。しかし、大腸菌などで広く用いられるプラスミドを用いる遺伝子操作法は開発されておらず、また、薬剤選択マーカーは 1 種類のみであったため、利用できる遺伝子操作法が限定されていた。

本研究では、シゾン細胞内で構成的に維持できるプラスミドと新たな抗生物質マーカーの開発をおこなった。シゾンの *URA5.3* 遺伝子を選択マーカーとした場合、直鎖状 DNA を用いて遺伝子挿入株を作製すると、シングルコピーの挿入が得られる。シゾンとその近縁種 *Galdieria sulphuraria* の *URA5.3* 遺伝子を用いて作製したキメラ *URA5.3* 遺伝子を選択マーカー (URAPCG) とした場合、直鎖状 DNA を形質転換に用いるとマルチコピーの挿入が得られている。そこで、キメラ *URA5.3* 遺伝子を選択マーカー (URAPCG) として、環状 DNA を用いた場合にどのような形質転換体 that 得られるかを解析した。

1. プラスミドの構築と大腸菌への形質転換

まず選択マーカー (URAPCG) を含むプラスミド pCfxQURAPCG (図 1a) を構築し、これをウラシル要求性のシゾンに導入した。得られたウラシル非要求性の形質転換体 (T1、T2、T3) と野生型 (WT) から抽出した total DNA を用いて大腸菌を形質転換すると、形質転換体由来の total DNA を導入した場合にのみカナマイシン耐性コロニーが得られた。この結果から、シゾンの形質転換体は、染色体外因子として、導入したプラスミドを維持していると考えられた (図 1b)。

2. 環状 PCR

次に、形質転換体が、プラスミド全体の塩基配列を保持しているかを解析した。pCfxQURAPCG を一周する様に設計したプライマー (図 2a) を用いて、形質転換体(T1)の total DNA を鋳型にして PCR 解析を行ったところ、pCfxQURAPCG を鋳型にしたコントロールと同じサイズのバンドが得られ、形質転換体内で、プラスミドの配列を保持しているこ

とが示された (図 2b)。

3. サザン解析

さらに詳細に調べるため、形質転換体 (T1) の total DNA を用いて、サザン解析を行った。プローブは、外来遺伝子のみが持つカナマイシン耐性遺伝子と、キメラ URAPCG 遺伝子の *G. sulphuraria* 由来の配列に相補的な配列を使用した (図 3a)。EcoRI、PuvII-EcoRI で消化した形質転換体の DNA は、pCfxQURAPCG と同じ位置にシグナルが得られたが、野生型の total DNA ではシグナルが得られなかった。未消化のサンプルでは、pCfxQURAPCG よりも大きな、20kb 付近にバンドがみられた (図 3b)。

カナマイシン耐性遺伝子の配列に相補的な配列をプローブとして用い (図 4a)、BamHI で DNA を消化した場合も、形質転換体 (T1、T2、T3) の DNA は pCfxQURAPCG と同じ位置にバンドが得られたが、部分消化、未消化のサンプルではより大きいサイズのバンドが得られた (図 4b)。野生型の未消化 DNA と同じ位置にバンドがみられることから、20kb 付近のバンドは、導入したプラスミドの一部がゲノム内に挿入されたと考えられる。また、20kb 付近よりもさらに大きいサイズのバンドは、プラスミドがコンカテマー化して染色体外で維持されていると考えられる。形質転換体 (T1, T2, T3) の平均の pCfxQURAPCG のコピー数は 33.9/cell であった。

4. 薬剤耐性マーカーの開発

シズンは高温、強酸性条件下で生育するため、多くの抗生物質が効かないが、クロラムフェニコールは効果があるとの報告がある。今回、pCfxQURAPCG に耐熱性クロラムフェニコール耐性 (CAT) 遺伝子を挿入して pCmr を構築し、シズンに導入してマーカーとして利用可能かを検討した。pCmr を用いて、ウラシル要求性シズンを形質転換し、まずウラシル非要求性で選択した。得られた培養について、PCR 解析 (図 5a)、様々な濃度のクロラムフェニコール (CP) を添加した液体培地 (図 5b) およびプレート培地 (図 5c) で培養実験をおこなった。pCmr を導入した細胞のみが高濃度のクロラムフェニコール存在下で生育がみられ、CAT 遺伝子により薬剤耐性が得られたと考えられた。

以上のことから、本研究ではシズンの細胞内で構成的に維持できるプラスミドを開発した。pCfxQURAPCG はシズン細胞内にコンカテマーのプラスミドとして維持されることが示唆された。また、薬剤耐性マーカーを開発した。

これまで、構成的に維持できるプラスミドが無く、利用できる選択マーカーも 1 種類のみで、遺伝子操作に限界があったので、本研究によって、様々な遺伝子改変が可能になった。

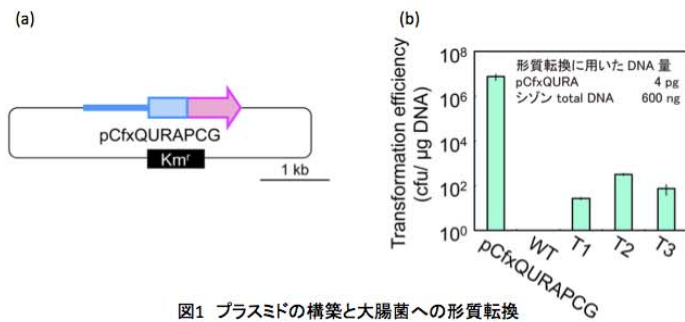


図1 プラスミドの構築と大腸菌への形質転換

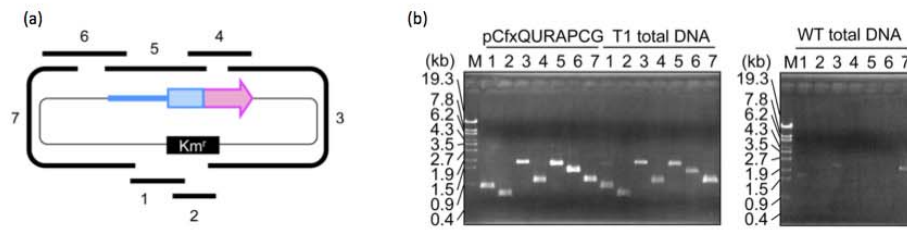


図2 環状PCR

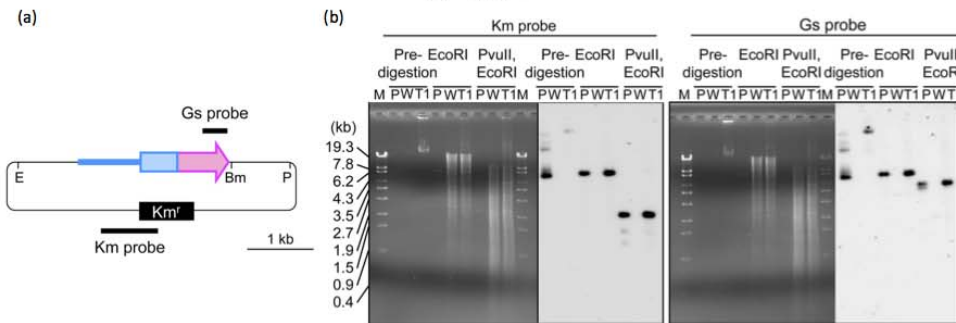


図3 サザン解析 1

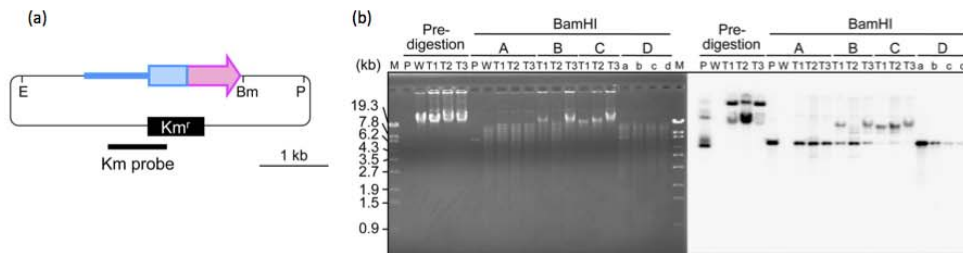


図4 サザン解析 2

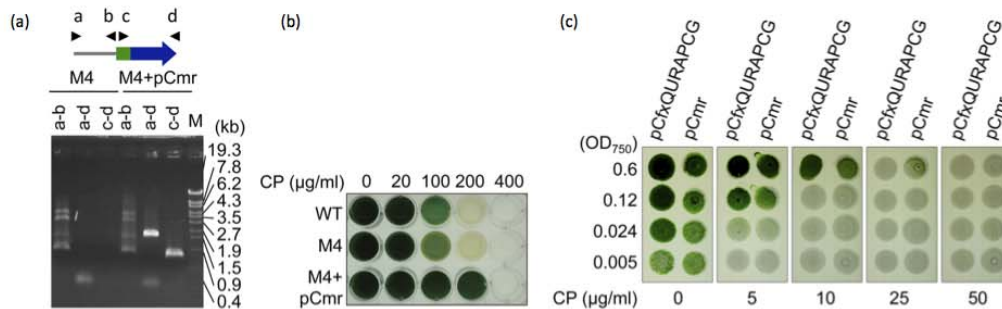


図5 薬剤耐性マーカーの開発

3. 経費の使用状況（申請時の計画に対する実績を記述）

設備費として、卓上型人工気象器を1台、予定通り購入した。24 ウェルプレートと酸素吸収・二酸化炭素発生剤は別経費で購入し、実験を行った。その分の予算は、下記理由で必要のなくなった旅費の分と合わせて、書籍や、培養用容器等の消耗品の購入に充てた。

平成28年9月に開催された日本植物学会第80回大会にて、共同研究者の山口大学三角修己准教授と打合せをすることができたため、申請していた旅費が必要なくなった。そのため、旅費は消耗品費として使用した。

経理は、本学総務課において委任経理を行い、適正に使用しました。

4. 将来展望（今後の発展性、実用化の見込み等について記述）

本研究では機器が不十分だったこともあり、再現できず、保留した。一方、本研究で過剰発現法の開発を進めることができた結果、科研費の交付を受けることができ、必要な機器を揃えることができるようになった。このため、脂質蓄積条件を再現するための必要条件の検討と、脂質蓄積条件における諸解析については、今後行っていく予定である。

本助成によって、構成的プラスミドを用いた過剰発現法や、選択マーカーが開発できたことにより、シゾンの遺伝子操作の幅が広まった。今後は、脂質蓄積に重要な役割を果たすと考えられる遺伝子群の遺伝子破壊株および過剰発現株を作成して解析を行うことにより、藻類の増殖機構やバイオマスの生産機構を理解し、望ましい藻類の育種や藻類の生産能を最大限に引き出すシステムの構築を目指す。

5. 成果の発表（学会での発表、学術誌への投稿等を記載。予定を含む）

1. 大沼 みお、藤原 崇之、井元 祐太、黒岩 晴子、宮城島 進也、田中 寛、黒岩 常祥、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の構成的プラスミドと抗生物質耐性マーカーの開発、日本植物学会第 80 回大会、平成 28 年 9 月 16 日(金)～19 日(月)、沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）

2. Ohnuma et al. Development of constitutive plasmid and antibiotic marker for the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 投稿予定