様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ６ 月 ２１ 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2017～2021
課題番号：１７Ｈ００８００

研究課題名（和文）アルケノン生産性藻類の物質生産性向上のための基盤技術の研究

研究課題名（英文）Research and development for improvement of productivity of the alkenone-producing algae

研究代表者
鈴木　石根（Suzuki, Iwane）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：１０２９０９０９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　 32,700,000円

研究成果の概要（和文）：石油を代替する炭化水素系の油脂を光合成生物により生産することが持続可能社会構築に不可欠である。我々は長鎖のアルキルケトン（アルケノン）を合成蓄積するハプト藻Tisochyrysis luteaのアルケノン生産性を向上するべく、重イオンビーム照射によるランダム変位をほどこし、生産性を向上した株の獲得を目指した。アルケノンは安定な化合物で海洋底泥から見出されていた化合物である。数十年前にアルケノンがハプト藻と呼ばれる微細藻類によって生産されることが示された。これまでに5種のハプト藻のみが生産することが知られており、その合成経路も分解経路も未解明の物質であるので、突然変異による生産性向上を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
持続可能なカーボンゼロの社会を構築するためには、石油に代わる液体燃料や化学製品の材料を安定に供給することが不可欠である。ハプト藻が生産するアルケノンは、直鎖の炭化水素鎖の末端にメチルケトンをもつ分子で、石油を代替できるものである。アルケノン生産量を向上して二酸化炭素から合成できるようになれば、持続可能社会の構築に近づくと期待される。アルケノンの合成や分解系は未解明なので、ランダム変位を導入した系統から変位遺伝子を同定できれば、その新規の経路が明らかにできると期待される。

研究成果の概要（英文）：It is necessary to produce hydrocarbon-based oils by photosynthetic organisms for a sustainable society. The haptophyte Tisochrysis lutea synthesizes long-chain alkyl ketones (alkenones), which can be substituted for petroleum. We applied random mutation by heavy-ion beam irradiation to improve the alkenone productivity. Alkenone is a stable compound found in marine sediment. Decades ago, it was shown that alkenones are produced by microalgae called haptophytes. It is known that only five species of haptophytes produce alkenones, and their assimilation and dissimilation pathways are still unclear, so we aimed to improve productivity through random mutation.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：ハプト藻　アルケノン　重イオンビーム　突然変異　微細藻類　光合成

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

脂質アルケノンは、*Emiliania huxleyi, Tisochrysis lutea* を含むハプト藻 5 種のみで報告されている炭素数 37~39 の長鎖不飽和ケトンである。

従来のバイオディーゼルは、トリグリセリド(triacylglycerol, TAG)に含まれる脂肪酸をメチルエステル化して利用されているが、植物や藻類の脂肪酸は多価二重結合をもつために化学的に不安定で酸化し易く、長期保存に向かず実用化の大きな妨げとなっている。一方、アルケノンは非共役二重結合を持ち極めて安定である。我々は、これまでに寒天プレート上の *T. lutea* (T-Iso)株に高崎量子応用研究所で重イオンビームを照射し、C^{6+}イオンを 320 MeV で 20 Gy 照射したところ、コロニーが得られた株のうち、36%でアルケノン合成能が増強され、最大で元株の約 2 倍のアルケノン生産性を示す変異体の作出に成功している。

近年の研究から、放射線照射により変異を誘発する際の細胞の状態や外的環境によって変異の状況が異なることや、変異体への再照射による有用変異の蓄積によって、従来法では獲得困難な変異が得られる可能性が示唆されている。しかし、現状ではビームラインの形状から、寒天プレート上のコロニーにしか照射できないという制限があり、多様な環境条件の細胞に照射できない。本研究では、液体培養中の細胞にも照射ができる仕組みを開発し、多様な培養条件の細胞への変異導入を試みる。

また、我々の研究室では、共同研究者の遠藤らにより T-Iso 株を含むハプト藻の形質転換系を確立した。その手法を用いて、アルケノン合成経路遺伝子の増強、TAG あるいは多糖合成系遺伝子の発現抑制により、アルケノン産生量の増強を試みる。また、アルケノンの不飽和度、アルケノンの鎖長を改変した株の作成にも取り組む。

２．研究の目的

微細藻類による炭化水素系油脂アルケノン、エキネノンなどの有用物質を高生産し、培養環境条件の変動に高耐性なハプト藻株を確立する。重イオン照射による突然変異誘発と遺伝子改変の技術を組み合わせて用いる点が本研究の特徴である。

形質転換では、これまで明らかとなってきたアルケノン合成、修飾関連の遺伝子に加えて、トリグリセリド（TAG)、多糖の合成に関わる遺伝子の発現抑制に取り組む。また、この株が合成するカロテノイド（エキネノン）の高生産化にも取り組む。これまでの重イオンビーム照射からアルケノン合成量の低下した株を得ており、それらの株では TAG の蓄積量が増加していたことから、アルケノン以外の貯蔵炭素の合成抑制はアルケノン生産量の向上に繋がると期待できる。また、突然変異から見出される候補遺伝子座についても、遺伝子改変により確実にその機能を証明する。

３．研究の方法

本研究では、アルケノンを生産するハプト藻 *Tisochyrysis lutea* やスクワレンを蓄積するラビリンチュラ *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株に重イオンビーム照射を行い、利用価値の高いアルケノンを高生産する株、有用脂質やカロテノイドを生産する *Aurantiochytrium* 株を取得することを目的とした。そのため寒天培地上に塗布した細胞または浅い培養液中に懸濁した細胞に重イオンビームを照射する。まず、照射する線量に対する生存率を明らかにし、10%～数%の生存率となる様な条件で照射を行う。照射後に生存した株を寒天培地から単離し培養して、油脂生産性、油脂の分解能、あるいはコロニーの色調が変化することを指標にしてスクリーニングを実施する。

４．研究成果

寒天培地上に塗布した Tisochyrysis lutea の細胞の 320 MeV のエネルギーの C^{6+}イオンビーム照射による生存率は、図 1 に示すとおりで、およそ 50 Gy で 10%、70 Gy で 1%程度であった。この値を元に条件を設定し、照射後に得られたコロニーを用いて、アルケノン含量が高まった細胞をスクリーニングした。それらの細胞を評価した結果、光合成の活性が上昇した株が見出され、ランダムな変異導入によって光合成の活性を高めることが可能であることが示された。どの様なメカニズムで光合成の活性が向上できるかに大いに興味が持たれるが、これまでのところ変異の導入された遺伝子群の同定には至っておらず、また光合成の機能解析によっても向上した機能がどこにあるのかは特定できていない。また、野生株では細胞を暗所におくと時間とともに蓄積したアルケノンの減少が見られる。このことはアルケノンが貯蔵炭素として蓄積されていることを示唆する結果であるが、アルケノンの含量が高まった株の中には、細胞を暗所で維持してもアルケノンの減少、すなわち分解が抑制されるためアルケノンの蓄積が向上したと考えられる株も単離することができた。

さらに T. lutea のアルケノンは最大で 3 つまで不飽和結合が導入される。培養温度が低下する

につれて導入される不飽和欠乏の数が増加することがわかっている。アルケノンを分解して液体燃料を生産し、石油代替物質として利用するためには、高い温度で培養しても不飽和の多く導入されたアルケノンを生産することが望まれる。細胞の活性はある程度温度が高い方が活発なため、アルケノン蓄積量は温度の低下とともに減少する。これまでに野生株に比べて不飽和度の高いアルケノンを合成する株を入手した。我々のグループの遠藤らは、3 つ目の不飽和を導入するアルケノン不飽和化酵素遺伝子を同定しており、この株でこの不飽和化酵素遺伝子の構造や発現パターンにどの様な変化が生じているかたいへん興味が持たれる。しかしながらこの株はアルケノン蓄積量が野生株に比べて極めて少ない。ただし、この株の TAG 蓄積量は野生株と同等のため、アルケノン蓄積量の低下は光合成の機能の欠損などではないと考えられた。そこでこの細胞に、さらに重イオンビーム照射による変異を導入して、高い不飽和度を維持したまま野生株以上のアルケノン生産を可能にした細胞を得たいと思っている。

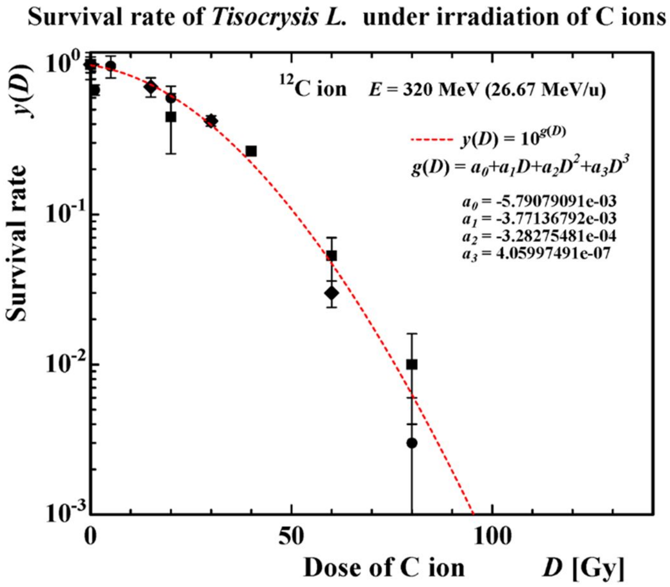

図. C イオンビーム照射による *T. lutea* の生存率

一方、ラビリンチュラ *Aurantiochytrium* については、これまでにスクワレン合成の前駆体（イソプレニル二リン酸）を合成するメバロン酸経路の律速酵素、HMG-CoA 還元酵素（ヒドロキシメチルグルタリル CoA 還元酵素）の活性が高い条件でスクワレン含量が高まること、HMG-CoA 還元酵素を過剰に発現すると、スクワレン量が増加することがわかっていた。HMG-CoA 還元酵素の過剰発現株では、同じくイソプレニル二リン酸から合成される、カロテノイドの含量も高まることが示されていた。そこで、コロニーの色調を指標にスクリーニングを行うこととした。これまでに野生株に比べてカロテノイドの含量の低下した白っぽい株、野生株に比べてカロテノイド含量の増加したオレンジまたは赤色の色調の強い株を複数得た。これらの株のスクワレン含量を比較したところ、ほとんどの株で野生株のスクワレン含量の 2 倍以上のスクワレン量が認められ、中には 5 倍高い株も含まれていた。この株は白色を呈する株で、カロテノイド含量が低下することに、スクワレン合成の経路が高まっていると考えられた。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　0件）

1．著者名	4．巻
Junaid Muhammad、Inaba Yu、Otero Ana、Suzuki Iwane	in press
2．論文標題	5．発行年
Development of a reversible regulatory system for gene expression in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 by quorum-sensing machinery from marine bacteria	2021年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Journal of Applied Phycology	1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1007/s10811-021-02397-0	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	該当する

1．著者名	4．巻
Inada Takashi、Machida Shuntaro、Awai Koichiro、Suzuki Iwane	53
2．論文標題	5．発行年
Production of hydroxy fatty acids and its effects on photosynthesis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803	2021年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Algal Research	102155～102155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1016/j.algal.2020.102155	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	－

1．著者名	4．巻
Lee Jinwoong、Iwata Yasushi、Suzuki Yuji、Suzuki Iwane	60
2．論文標題	5．発行年
Rapid phosphate uptake via an ABC transporter induced by sulfate deficiency in Synechocystis sp. PCC 6803	2021年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Algal Research	102530～102530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1016/j.algal.2021.102530	無
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	－

〔学会発表〕　計9件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

1．発表者名
岩田 康嗣、鈴木 石根、鈴木裕司、細田忍、西川 暢子
2．発表標題
15N共鳴核反応による微細藻標的遺伝子改変とエネルギー生産性利用を目指して
3．学会等名
第7回機能性バイオミニシンポ
4．発表年
2019年

１．発表者名 副島敬佑、岩田康嗣、長谷純宏、大野豊、鈴木石根、新家弘也
２．発表標題 ハプト藻におけるオイル分解抑制変異体の解析
３．学会等名 関東学院大学　理工／建築・環境学会　研究発表講演会
４．発表年 2019年

１．発表者名 新家弘也、栗木愛菜、鈴木石根
２．発表標題 ハプト藻Tisochrysis luteaにおけるオイル蓄積機構の解析
３．学会等名 日本藻類学会年会
４．発表年 2018年

１．発表者名 鈴木石根
２．発表標題 重イオンビーム照射によるハプト藻のオイル高産生性株の作出
３．学会等名 第1回重・クラスターイオンビーム利用による微生物由来高生産性、エネルギー、環境シンポジウム
４．発表年 2019年

１．発表者名 岩田康嗣
２．発表標題 15N共鳴核反応を利用した生物照射損傷の定量
３．学会等名 第1回重・クラスターイオンビーム利用による微生物由来高生産性、エネルギー、環境シンポジウム
４．発表年 2019年

１．発表者名 長谷純宏
２．発表標題 生物資料に対するMeV級クラスターイオン照射効果の検討
３．学会等名 第1回重・クラスターイオンビーム利用による微生物由来高生産性、エネルギー、環境シンポジウム
４．発表年 2019年

１．発表者名 新家　弘也、佐藤　瑠希、長谷　純宏、岩田　康嗣、大野　豊、白岩　善博、鈴木　石根
２．発表標題 重イオン照射変異体からの高オイル産生藻探索
３．学会等名 高崎サイエンスフェスタ
４．発表年 2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	新家　弘也 (Araie Hiroya) (30596169)	関東学院大学・理工学部・助教 (32704)	
研究分担者	長谷　純宏 (Hase Yoshihiro) (70354959)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所　放射線生物応用研究部・上席研究員（定常） (82502)	
研究分担者	岩田　康嗣 (Iwata Yasushi) (80356534)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・招聘研究員 (82626)	

6．研究組織（つづき）

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	織田　望 (Orita Nozomi) (10356743)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員 (82626)	削除：2018年9月28日

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関