

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：55402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00676

研究課題名(和文)新規培養系を用いた藻類バイオ燃料生産の高率化に関する遺伝子工学的研究

研究課題名(英文) Genetic engineering study on increasing the production rate of algal biofuel using a novel culture system

研究代表者

大沼 みお (Ohnuma, Mio)

広島商船高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：70594076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：極限環境藻類を用いた、細胞増殖を阻害しない脂質蓄積条件における網羅的な遺伝子発現解析から、脂質の生産と蓄積に特に重要と考えられた4遺伝子について解析した。この4遺伝子についてRT-PCR解析を行ったところ、どれも脂質蓄積条件で発現量の上昇が見られた。当該遺伝子は脂質生産・蓄積に重要であり、過剰発現株は脂質生産に有用と考えられた。

平行して、アルカリ性温泉より、低コスト大量培養系に適した新規脂質高生産藻類を探索、単離した。本藻類は緑藻クロロコッカムに属し、主に9種類の脂肪酸を含む脂質を生産していた。得られた脂肪酸のうち、特に含有量の大きい脂肪酸は、他の脂質生産藻類と同様にオクタデセン酸であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高率的な藻類生産においては、脂質含有量が高く、増殖性の高い藻類が必須条件となる。ところが、一般の藻類では、細胞増殖と脂質の蓄積はトレードオフの関係があり、両立させることが困難である。シゾンを用いた遺伝子工学的研究により、細胞増殖をしながら脂質を蓄積する機構の基礎的知見が得られた。この知見は、広く藻類に適用できると考えられる。シゾンは培養温度40前後を好むため、当該遺伝子のシゾンの変異体は、脂質高生産株として、温泉地や工業施設などの近隣地域での藻類バイオ燃料生産に有用と考えられる。

並行して探索した新規脂質高生産藻類は、培養温度22前後を好むため、海洋などでの利用も視野に入れることができる。

研究成果の概要(英文)：Based on comprehensive gene expression analysis under lipid accumulation condition that does not inhibit cell proliferation using primitive eukaryotic red algae, *Cyanidioschyzon merolae*, RT-PCR analysis was demonstrated for four genes that were considered to be particularly important for lipid production and accumulation. RT-PCR analysis showed strong upregulation of these four genes. It was suggested that the gene is useful for increasing lipid production, and the overexpressing strain can be used for lipid production.

In parallel with the above study, we isolated a novel lipid-producing alga suitable for a low-cost mass-culture system from a high-pH hot spring. The alga belongs to the green alga *Chlorococcum* and produces lipids containing mainly nine kinds of fatty acids. Among the obtained fatty acids, the fatty acid with a particularly high content was octadecenoic acid as other lipid-producing algae.

研究分野：生物学

キーワード：藻類バイオマス燃料 極限環境 単離 オルガネラ 油滴 細胞増殖 脂質生産 ゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微細藻類からのバイオ燃料は、他植物に比べて単位面積当りの生産効率が高く(数十~数百倍)食・飼料との競合もないため、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。

高率な藻類生産においては、脂質含有量が高く、増殖性の高い藻類が必須条件となる。ところが、一般の藻類では、既知の脂質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、脂質含有量が低くなるという、細胞増殖と脂質の蓄積はトレードオフの関係があり、両立させることが困難である。

申請者らは、高温酸性温泉(pH 1-3、40-60)に棲息する原始紅藻類 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) が脂質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、脂質含有量を増大させることに成功した。シゾンは、全ゲノムが解読されており、高精度のトランスクリプトーム解析が可能であったため、本研究の開始時点で、細胞増殖を阻害しない脂質蓄積条件における網羅的な遺伝子発現解析を行っていた。

2. 研究の目的

本研究は、ゲノム情報を基盤に、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を解明し、これを他の藻類へも汎用化してバイオ燃料の普及・発展に寄与することを目的とする。

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。本研究で対象とする原始紅藻類シゾンは、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。我々は、先行研究で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。

本研究では、これまでに開発した、細胞増殖の維持と脂質の高蓄積の双方を満足する高率な燃料生産性を実現できる培養系において、どのような遺伝子が機能しているかを、ゲノム情報を調べ、遺伝子操作系を用いて解析する。得られた知見により、なぜ細胞が高い増殖能を維持したまま脂質の高生産を維持できるのか、そのメカニズムが解明できると同時に、脂質高生産株の育種にもなる。他の種々の藻類へも、この培養系を適用し、この高率な燃料生産性の制御が汎用的に可能であるかについて確認する。

3. 研究の方法

先行研究として開発された、細胞増殖を阻害しない脂質蓄積条件における網羅的な遺伝子発現プロファイルから、脂質生産・蓄積に関わると考えられる遺伝子を選抜する。選抜した遺伝子の過剰発現株を作製し、その遺伝子の発現量(RT-PCR解析、ノザン解析)と脂質量(BODIPYによる脂質染色)から、脂質生産能を解析することなどにより、標的遺伝子の機能を明らかにする。

並行して、新規脂質生産藻類を探索・単離し、細胞増殖を阻害しない脂質生産条件を検討することにより、脂質生産・蓄積機構の一般性を明らかにし、より効率の高い燃料生産系の確立を目指す。

4. 研究成果

シゾンをを用いた遺伝子工学的解析

遺伝子発現プロファイルから、細胞増殖を阻害しない脂質蓄積条件において、発現量が上昇した遺伝子のうち、4遺伝子が脂質合成・蓄積に特に重要と考えられた。

選抜した4遺伝子について、RT-PCR解析を行ったところ、脂質蓄積条件で発現量が上昇し、遺伝子発現プロファイルの結果と一致した。この4遺伝子の過剰発現株を構築している。

新規脂質生産藻類の探索と脂質生産条件の検討

新規脂質高生産藻類の探索

藻類バイオ燃料の普及に必須な、低コスト大量培養系を可能にするには、開放培養系でも優先的に増殖する脂質生産性の高い藻類が求められる。我々は、この条件を満たす藻類を探索するため、高pH、低pH、高塩濃度、高温など極限環境に生育する藻類をサンプリングし、脂質生産性の高い藻類の分離を試みた。その結果、pH9の愛媛県鈍川温泉から、新規単細胞藻類を単離した。単離した藻類が、藻類バイオマス生産に適しているかどうかを検討するため、1/1000に希釈したハイボネックスを含んだ固形培地で1ヶ月間培養した細胞を、BODIPYを用いて脂質を染色し、観察したところ、大量の脂質の蓄積が認められた。このことから、本単離藻類はバイオマス生産に適していると考えられた。

新規脂質高生産藻類の系統解析

本藻類のゲノムを抽出し、PCRにより増幅した18S rDNAの塩基配列を決定した。得られた配列をML法およびbays法により解析した結果、緑藻クロコッカムに属し、高度脂質生産藻類 *Chlorococcum oleofaciens* と近縁種であった。 *Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A と名付けた。

Chlorococcum sp. Nibukawa HS-A の脂肪酸分析

1/1000 に希釈したハイポネックスを含んだ固形培地で培養した、定常期の *Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A 細胞をかきとり、Bligh-Dyer 法で総脂質を抽出した。得られた脂質は脂肪酸メチル化キット（ナカライテスク）を用いてメチル化をおこない、メチル化脂肪酸精製キット（ナカライテスク）を用いて精製した。ガスクロマトグラフ質量分析による脂肪酸解析をおこなった結果、*Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A は主に 9 種類の脂肪酸を含む脂質を生産していた。得られた脂肪酸のうち、特に含有量の大きい脂肪酸は、他の脂質生産藻類と同様にオクタデセン酸であった。ヘキサデカン酸、オクタデセン酸などの主に 9 種類の脂肪酸を含む脂質を生産していた。ヘキサデカン酸、オクタデセン酸は近縁の高脂質生産種 *Chlorococcum oleofaciens* にも共通して見られる脂肪酸である。また、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸など、有用な脂肪酸を生産しており、大量培養が可能になれば、栄養補助剤の原料生産としての利用も考えられる。

新規脂質高生産藻類の培養と脂質生産

まず、*Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A の至適培養 pH を検討した。1/1000 に希釈したハイポネックスに KOH または CH₃COOH を添加し、pH を調整した液体培地に、単離した藻類細胞を接種し、22℃、連続明条件で 16 日間培養した。中性～塩基性側では、pH12 まで生育可能だが、中性付近の pH が至適培養 pH だった。酸性～中性側は、中性～塩基性側と比較して、増殖が著しく減少したが、pH5 付近まで生育可能だった。HCl、H₂SO₄ で pH を調整した場合も同様の結果が得られた。

次に *Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A の脂質生産条件を検討した。固形培地と液体培地を組み合わせでおこなった単離と植え継ぎの操作、液体培地でおこなった至適培養 pH の検討において、本藻類は、固形培地を用いたほうが良好な増殖が見られたので、本実験は固形培地を用いた。(1) 様々な希釈倍率のハイポネックスに、NH₄Cl を様々な濃度で添加した培地と(2) TAP 培地をベースに様々な NH₄Cl とリン酸の濃度について変化させた培地を用いて 16 日間培養した。増殖には NH₄Cl 7.5 mM、リン酸 1 mM (TAP 固形培地のオリジナルの濃度) が最も適していた。HSM 培地で検討した場合も同様の結果が得られた。脂質生産量について、細胞の脂質を脂質染色試薬 BODIPY で染色し、蛍光顕微鏡観察により、各培地の培養 18 日後の脂質生産量を検討した。本単離藻類は、他の緑藻と同様に、窒素飢餓、リン酸飢餓の条件で良く脂質を生産した。特に NH₄Cl 7.5 mM、リン酸 0.01 mM の TAP 培地の培養において、細胞増殖の阻害が少なく、脂質を大量に生産した。

藻類バイオ燃料の実用化を目指すには、液体培地を用いた大量培養系の開発が不可欠である。大量培養系には、固形培地による培養よりも液体で培養をおこなえることが望ましい。そこで、より高増殖、高脂質生産を示す液体培養条件の決定をめざし、培養条件の検討をおこなった。1/1000 に希釈したハイポネックス液体培地に糖や有機酸を添加して、生育の改善に効果のある物質を探索した。糖や有機酸を添加した液体培地に、*Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A 細胞を接種し、22℃、連続明条件で 12 日間静置培養したところ、クエン酸がハイポネックス液体培地での良好な生育に効果のあることが示された。

実験室スケールの脂質生産条件の大量培養系の開発のため、まず 500 mL の系で脂質生産条件を検討した。マリンプラスコに TAP 培地 (リン酸 1 mM) またはリン酸を制限した TAP 培地 (リン酸 0.01 mM) を 500 mL 調整し、*Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A 細胞を接種した。22℃、連続明条件、通気条件で培養し、生育と脂質生産を解析した。培養 7 日目までは、生育の様子にリン酸濃度による大きな違いは見られなかった。7 日目以後、リン酸の制限された TAP 培地 (リン酸 0.01 mM) の色が黄化し始め、細胞増殖速度が TAP 培地と比較して緩くなった。この時点で BODIPY 染色により、脂質の蓄積を確認すると、リン酸を制限することにより、脂質の生産が増大していた。

技術的な問題により、シゾンの過剰発現株を構築、解析できなかったが、RT-PCR 解析により、遺伝子発現プロファイルから選抜された 4 遺伝子は、リン酸制限環境下で発現が上昇していることが確認され、遺伝子操作を用いた脂質生産増強株作製に利用可能と考えられる。

新規に単離した *Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A は、高増殖、高脂質生産性であり、藻類バイオマス燃料に適していると考えられた。シゾンの細胞増殖を阻害しない脂質蓄積条件を参考にしてデザインした培養液により、*Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A においても細胞増殖をしながら脂質を増強することに成功した。

Chlorococcum sp. Nibukawa HS-A が生産する脂質に含まれる脂肪酸には、栄養補助剤などに利用可能であり、燃料以外の利用の可能性もみいだされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imoto Yuuta, Abe Yuichi, Honsho Masanori, Okumoto Kanji, Ohnuma Mio, Kuroiwa Haruko, Kuroiwa Tsuneyoshi, Fujiki Yukio	4. 巻 9
2. 論文標題 Onsite GTP fuelling via DYNAMO1 drives division of mitochondria and peroxisomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07009-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nozaki Hisayoshi, Takusagawa Mari, Matsuzaki Ryo, Misumi Osami, Mahakham Wuttipong, Kawachi Masanobu	4. 巻 58
2. 論文標題 Morphology, reproduction and taxonomy of <i>Volvox dissipatrix</i> (Chlorophyceae) from Thailand, with a description of <i>Volvox zeikusii</i> sp. nov.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phycologia	6. 最初と最後の頁 192 ~ 199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1080/00318884.2018.1540238	査読の有無 有
オープンアクセス 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	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yamato, Kuroiwa Haruko, Shimada Takashi, Yoshida Masaki, Ohnuma Mio, Fujiwara Takayuki, Imoto Yuuta, Yagisawa Fumi, Nishida Keiji, Hirooka Shunsuke, Misumi Osami, Mogi Yuko, Akakabe Yoshihiko, Matsushita Kazunobu, Kuroiwa Tsuneyoshi	4. 巻 114
2. 論文標題 Glycosyltransferase MDR1 assembles a dividing ring for mitochondrial proliferation comprising polyglucan nanofilaments	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 13284 ~ 13289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1073/pnas.1715008114	査読の有無 有
オープンアクセス 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	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Takayuki, Ohnuma Mio, Kuroiwa Tsuneyoshi, Ohbayashi Ryudo, Hirooka Shunsuke, Miyagishima Shin-Ya	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of a Double Nuclear Gene-Targeting Method by Two-Step Transformation Based on a Newly Established Chloramphenicol-Selection System in the Red Alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大沼みお, 黒岩晴子, 黒岩常祥, 三角修己
2. 発表標題 愛媛県鈍川温泉からの新油脂生産藻類の単離
3. 学会等名 日本植物学会中国 四国支部大会（山口）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大沼みお, 黒岩晴子, 黒岩常祥, 三角修己
2. 発表標題 愛媛県鈍川温泉から単離された新油脂生産藻類の脂肪滴
3. 学会等名 日本植物形態学会 第30回大会（広島）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大沼みお, 黒岩晴子, 黒岩常祥, 三角修己
2. 発表標題 愛媛県鈍川温泉から単離された新油脂生産藻類の脂肪滴
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会（広島）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三角修己, 田草川真理, 加藤翔一, 乾弥生, 松永幸大, 黒岩晴子, 黒岩常祥
2. 発表標題 緑藻メダカモ（Medakamo hakoo）のオルガネラゲノムの特徴について
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会（広島）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三角修己
2. 発表標題 極小の微細藻類を用いた細胞の研究
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第8回例会山口大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osami Misumi
2. 発表標題 Algae sense exact temperatures: Analyses of small heat shock proteins at the survival threshold temperature in microalgae
3. 学会等名 The International Symposium on Cellular Responses, Adaptation and Fermentation in Stress Environments (Yamaguchi) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三角修己, 斎藤貴史
2. 発表標題 原始紅藻のバイオマス合成を誘導する外的要因と共通する代謝応答
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会 (京都)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tsuneyoshi Kuroiwa, Shinya Miyagishima, Sachihiko Matsunaga, Naoki Sato, Hisayoshi Nozaki, Kan Tanaka, Osami Misumi, Shunsuke Hirooka, Yuuta Imoto, Yamato Yoshida, Fumi Yagisawa, Motomichi Matsuzaki, Masaki Yoshida, Takayuki Fujiwara, Mio Ohnuma, Haruko Kuroiwa, Mitsumasa Hanaoka, Nobuko Sumiya	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 365
3. 書名 Cyanidioschyzon merolae A New Model Eukaryote for Cell and Organelle Biology	

〔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	三角 修己 (Misumi Osami) (90583625)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・准教授 (15501)	