

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06215

研究課題名(和文)石油を作る微細藻類ボトリオコッカスの遺伝資源の潜在性評価と突然変異育種技術の開発

研究課題名(英文) Evaluation of potentiality of wild genetic resources and development of mutagenetic tools in the oil-producing microalga *Botryococcus braunii*

研究代表者

河村 耕史 (Kawamura, Koji)

大阪工業大学・工学部・准教授

研究者番号：00595613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：石油を作る微細藻類*Botryococcus braunii*の野生株の単離法、スクリーニング法を開発し、熱帯のインドネシアと日本各地から野生株を採取した。ここから、増殖性の高いものを選抜した結果、これまでの増殖速度の記録を更新する新たな新規高増殖株(OIT-678株)を発見した。本株は倍加時間が1.2日である。突然変異育種法の開発として、内在性のトランスポゾンを使った変異誘発の方法を開発するための研究を行った。Showa株の転写産物データベースからトランスポゾン遺伝子を単離し、転写活性を有するトランスポゾン4種特定した。これらの挿入位置の塩基配列情報を網羅的に取得する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Botryococcus braunii*は、コスモポリタンな微生物であるものの、一般に生息密度は低いため、自然環境中で発見することは容易ではない。本研究は、野生株を探索して単離する簡易な方法を開発した。また、合成する炭化水素の種類を推定する手法も開発した。これらを使えば、自然界のより多くの野生の遺伝資源を調査することができるだろう。私たちが単離した野生株のなかには、これまで記録されていた増殖速度の最速記録を更新するような株も見つかった。さらに、探索範囲を広げれば、より有用な株が見つかる可能性がある。また、本研究が開発した手法は、生息地の選好性や大量発生メカニズムなど、未知の生態解明にも役立つ。

研究成果の概要(英文)：New methods for isolation and screening of wild strains were developed for the oil-producing microalga *Botryococcus braunii*. By using the methods, a total of 600 wild strains have been isolated from Japan and Indonesia. Screening of fast-growers identified a novel fast-growing strain (OIT-678) which has a doubling time of 1.2 day. As a new tool for mutagenesis, I have investigated the activation of internal transposable sequences. From the transcript database of Showa strain, transposon-like genes were identified, and four transcriptionally-active retrotransposons were identified in the genome. For these retrotransposons, a high-throughput method for analyzing transposon insertion polymorphisms was developed.

研究分野：植物科学

キーワード：藻類バイオ燃料 突然変異育種 自然個体群 *Botryococcus braunii* ボトリオコッカス トランスポゾン 熱帯 遺伝資源

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。

1. 研究開始当初の背景

バイオ燃料化が期待される微細藻類の中で、*Botryococcus braunii* は際立った特質をもっている。大半の微細藻類は中性脂質を蓄積するのに対し、*B. braunii* は重油相当の炭化水素を乾燥重量の 25-75%も蓄積する (図1)。この炭化水素と同じ化学構造を持つ物質は、世界各地で産出する原油からも検出され、また、オイルシェールの断面には、*B. braunii* の化石が大量に見つかることから、*B. braunii* は化石燃料の生成に寄与した生物とされている (Crit. Rev. Biotechnol. 22 巻 245, 2002 年)。炭化水素は、中性脂質よりも燃料として優れているうえ、既存の石油精製施設を使って精製できる利点がある。さらに、*B. braunii* は炭化水素を細胞外マトリックスに蓄積するため、藻細胞を殺さずに炭化水素を回収できる可能性もある。

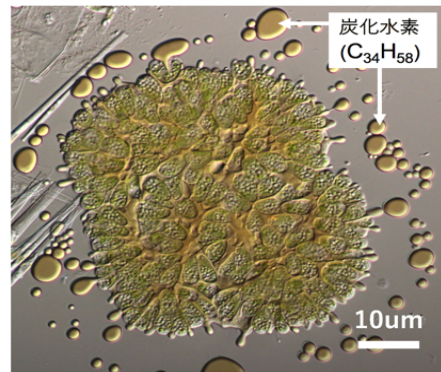


図1. 石油を作る微細藻類 *Botryococcus braunii*

淡水に生息する緑藻。カバーガラスで押しつぶした様子。

このようにユニークな特質をもつ一方で、*B. braunii* は微細藻類としては増殖が遅い欠点がある。通常の野生株で倍加時間は3-4日と遅い。本研究課題の核心をなす学術的な「問い」は、*B. braunii* の最大の欠点である増殖速度の遅さは、どうすれば改善できるのか?というものである。

2. 研究の目的

前頁の「問い」に対し、本研究は、*B. braunii* の増殖性を向上させる手段として、野生の遺伝資源の潜在的可能性と突然変異育種による品種改良の有効性を検証する。具体的な研究目的と着眼点を次に説明する。

2-1. 遺伝資源の収集とスクリーニング

熱帯の遺伝資源を中心にこれまでにない規模で *B. braunii* の野生株を収集し、既存株よりも増殖性に優れた野生株の存在可能性を検証する。これまで世界最速の増殖速度(倍加時間 1.4 日: Biores. Technol. 133 巻 232, 2013 年)を記録した Showa 株は、カリフォルニアで 1980 年代に単離された野生株であり、特別な変異処理や人為選抜を受けたものではない。そのため、Showa 株よりも増殖性に優れた遺伝資源が存在する可能性は高い。

2-2. 突然変異育種技術の開発

内在性トランスポゾンによる変異誘導法の確立に取り組む。申請者は、Showa 株の EST データベースをもとに、転写活性を有するトランスポゾンを 4 種同定している。本研究ではこれらのトランスポゾンの転移活性を検証し、転移を活性化する培養条件を調べる。トランスポゾンの転移が確認できれば、*B. braunii* で初めての報告となる。

3. 研究の方法

3-1. 野生株の効率的単離スクリーニング法の開発と高増殖株の選抜評価

B. braunii は生息密度が低いいため発見が難しい傾向にある。そこで群体性で浮上する性質を利用した簡易濃縮単離法を開発する。さらに、単離した株が、有用な炭化水素を合成する品種かどうかを判定するための方法を開発する。熱帯の調査は、インドネシアの研究協力者と共同で行う。得られた野生株をから、増殖速度をもとにスクリーニングを行う。高増殖性株である Showa 株をベンチマークとし、それよりも増殖性の高い野生株を選抜する。

3-2. 突然変異育種技術の開発：トランスポゾンの転移活性化

Showa 株を元株とし、トランスポゾンの転移による突然変異誘導技術の開発をおこなう。転写活性が確認されている 4 種のトランスポゾンをターゲットに、挿入位置の塩基配列情報を次世代シーケンサーで網羅的に解析する方法を開発し、転移活性(新しい挿入位置の出現)の有無を検証する。転移活性が認められたものについては、転移が活性化する培養条件(たとえば、高温、低温、栄養飢餓などのストレス条件、シングルセル化)を調べる。

4. 研究成果

4-1. 野生株の効率的単離スクリーニング法の開発と高増殖株の選抜評価

B. braunii は群体を作る性質から浮上性が高いことを利用し、野生株を濃縮したうえで効率的に発見単離する方法を開発した (Kawamura et al. 2020)。方法の概略を図2に示す。プランク

トンネット湖沼の水を一晩静置したうえで上層部を 30mL の試験管に移し、さらに一晩静置する。その後、上層部を 100 μ L 程度マイクロピペットで採取して、顕微鏡観察し、*B. braunii* の群体を探す。見つかった場合は、希釈法によって単離する。30mL の試験管に下からスマートフォンなどのカメラの光源を照射すると、液中の懸濁物質が視認できる。このとき、*B. braunii* の群体も緑から赤色に光る物体として視認できるため、これをロングチップのピペットで直接吸い上げる方法でも採取できる。群体の密度が高い場合は、20 μ m 程度のナイロンメッシュで液中の群体を回収し、何度か洗浄することで、単細胞性のその他の微生物を洗い流す。その後、メッシュ上に残った群体を寒天培地に塗布すれば、多くの野生株を単離できる。

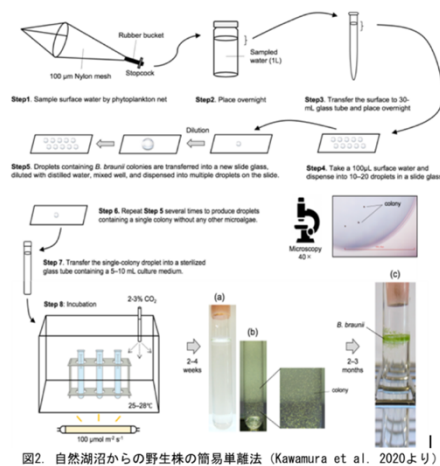


図2. 自然湖沼からの野生株の簡易単離法 (Kawamura et al. 2020より)

次いで、単離した *B. braunii* 野生株の品種を推定する PCR 法を開発した (Kawamura et al. 2022)。*B. braunii* には炭化水素の構造が大きく異なる 3 品種 (A 品種、B 品種、L 品種) が存在することが知られている。これらの 3 品種は炭化水素の構造だけでなく、炭化水素の含量にも違いがあり、一般的には A 品種と B 品種は炭化水素含量が高い。炭化水素の構造から予測される発熱量を比較すると、A 品種よりも B 品種の炭化水素のほうが発熱量が高いとされている。したがって、バイオ燃料生産の素材として、B 品種が最も有望であると考え、これを効率的に収集する必要があると考えた。しかしながら、3 品種を形態学的に識別することは難しい。そのうえ、同じ湖沼に異なる品種が同所的に生育している場合もある。GS/MC 解析によって炭化水素の構造を決定するためには少なくとも数 mg 以上の藻サンプルが必要であるため、多量の野生株について、一つ一つ品種を特定したうえで選抜する方法では、時間と労力がかかりすぎる。そこで、遺伝子情報を使って少量のサンプルから品種を推定する方法を開発することにした。その方法の概略を図 3 に示す。BoCAPS と命名した本方法では、単一の群体を PCR チューブに入れて、直接 PCR 反応を行い、18S リボソーム遺伝子を増幅させる。その後、CAPS と呼ばれる制限酵素処理後の断片長多型によって品種を推定する方法である。この方法であれば、PCR 装置と電気泳動設備があれば、品種が推定できる。

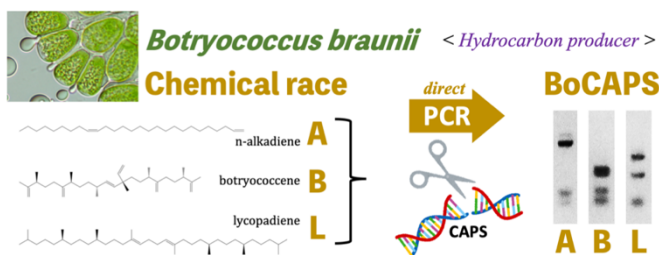


図3. 品種の簡易推定法BoCAPS (Kawamura et al. 2022より)

以上のような単離法や品種推定法を使って、国内外から 600 株余りの野生株を収集し、Showa 株を基準とした高増殖株のスクリーニングを行った (Kawamura et al. 2021)。その結果、これまで B 品種で記録されていた最速の倍加時間 1.4 日より短い 1.2 日で増殖する新たな高増殖株 (OIT-678 株) を発見した (図 4)。本種は、Showa 株よりも群体サイズが大きく、同じ培養条件下でより高密度に培養できることもわかった。Showa 株は先行研究によって高密度培養 (>10g/L) をすると、非常に高いバイオマス生産性 (1.5g/L/day) と炭化水素生産性 (340mg/L/day) を示すことが知られている (Khatri et al. 2014. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 493–503)。OIT-678 株は、Showa 株よりも高密度な培養ができる可能性があり、さらに生産性の記録を更新できるかもしれない。

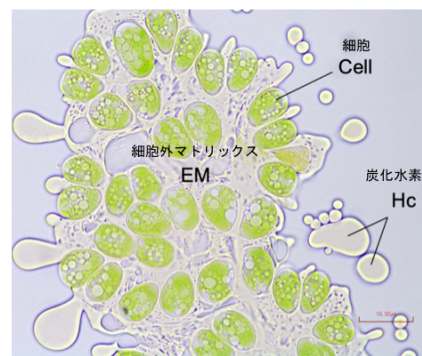


図4. *Botryococcus braunii* OIT-678 (Kawamura et al. 2020より)

OIT-678 株は熱帯のインドネシアで採取した株であるが、熱帯産の野生株が常に増殖速度が高いわけではなかった (Kawamura et al. 2021)。図 5 は、各地で採取した野生株を実験室の同じ培養条件下で培養して増殖速度を測定した結果を統計解析した結果である。アルファベットは採取した池の略称である。この結果から、野生株の増殖速度には気候帯に

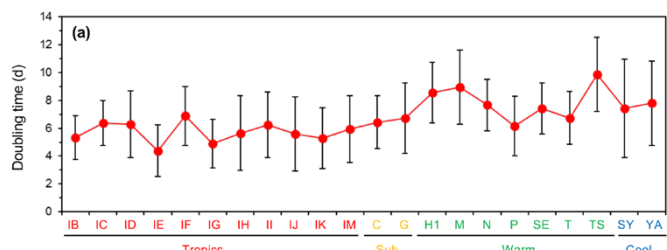


図5. 野生株の倍加時間と採取地の気候帯の関係 (Kawamura et al. 2021より)

よる違いや、特定の池に増殖性の高いものが集まっている傾向などは見られなかった。したがって、国内の池からも OIT-678 株に匹敵するような高い増殖速度を持つ野生株が見つかる可能性は十分あるといえる。

4-2. 突然変異育種技術の開発：トランスポゾンの転移活性化

内在性のトランスポゾンの転移を活性化させて突然変異を誘発する育種技術の開発に取り組んだ。Showa 株の転写産物のデータベースを使い、転写活性を有するトランスポゾンを4種特定した。ゲノムデータを使って全長配列を調べた結果、逆転写酵素をコードする Ty1 の LTR 型レトロトランスポゾンであることがわかった (図6)。

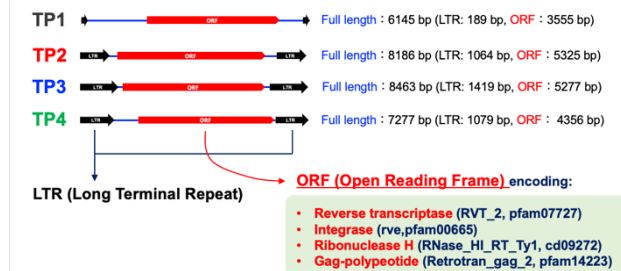
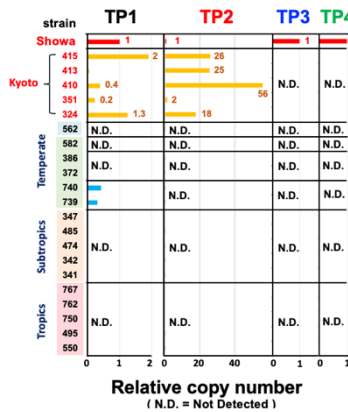


図6. Showa株より発見した転写活性のあるトランスポゾンTP1-4 (Kawamura et al. 2023より)

これらのトランスポゾンについて、ゲノムあたりのコピー数の株間変異をリアルタイム PCR 法を使って調べた。それぞれのトランスポゾン上に設計したプライマーと、各野生株の gDNA を鋳型に SyberGreen 法によるリアルタイム PCR を行った。内在性コントロール遺伝子として、18S rRNA についても同様にリアルタイム PCR を行った。得られた Ct 値をもとに、トランスポゾン遺伝子の増幅度合いを計算し、Showa 株の値を基準とした相対的なコピー数を推定した ($\Delta\Delta Ct$ 法)。



Strain No	Location	Climate
324	California, USA	/
351	Pond T, Kyoto, Japan	Warm temperate
410		
413		
415		
341	Pond C, Okinawa, Japan	Subtropics
342		
474		
485		
347	Pond G, Okinawa, Japan	Warm temperate
739	Pond TS, Kochi, Japan	
740	Pond N, Fukuoka, Japan	
372	Pond H2, Wakayama, Japan	Cool temperate
386		
562	Pond YA, Fukui, Japan	Tropics
550	Pond IB, Indonesia	
495	Pond IC, Indonesia	
750	Pond IE, Indonesia	
762	Pond IG, Indonesia	
767		

図7. トランスポゾン (TP1-4) のコピー数の株間変異 (Kawamura et al. 2023) Showa株を基準とした相対値で示す。左端のstrainの数値は株のIDを示し、右の表に採取地の情報を示した。

その結果、TP1-4のほとんどは、Showa株に特異的なトランスポゾンであると考えられた (図7)。TP2 に関しては、京都で単離した野生株から Showa 株よりも多くの最大 50 倍程度のコピー数をもつ株が見られた。これらの野生株は、18S rRNA の系統解析によって、Showa 株に近縁な株であることが分かった (図8)。そのため、TP2 は Showa 株やその近縁なグループの株に特異的なトランスポゾンであり、かつ、株間にコピー数の比較的大きな変異があることから、転移活性を有する可能性があることがわかった。

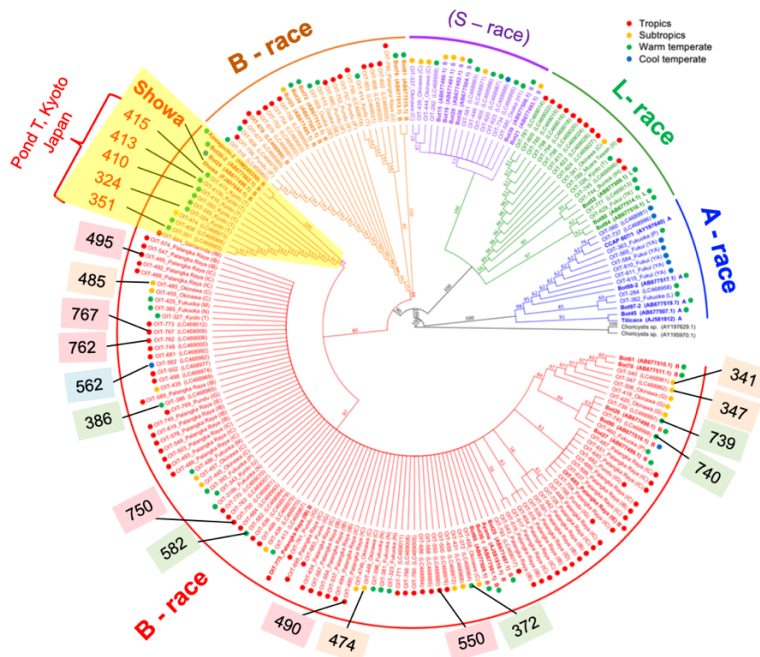


図8. 18S rDNA 遺伝子の分子系統樹 (Kawamura et al. 2023より) 黄色部分が Showa 株と京都で単離した野生株のサブクレード

次に、これらのトランスポゾンについて次世代シーケンサーを使った網羅的な挿入位置の多型を調べる方法を開発し、BoTIPseq法と命名した。この方法の概要を図9に示す。ゲノムDNAを制限酵素処理したうえで、断片末端にアダプターを付与し、トランスポゾン上に設計したプライマーとアダプタープライマーを使ってトランスポゾンが含まれる断片をPCR増幅する。そのPCR産物の塩基配列を次世代シーケンサーを使って網羅的に取得する方法である。以下の

BoTIPseq: Transposon-insertion polymorphism sequencing

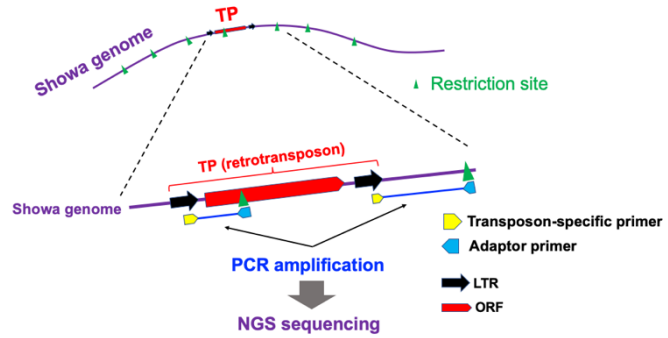


図9. トランスポゾン挿入位置多型の網羅的解析法BoTIPseq (Kawamura et al. 2023)

ような工夫を行い、目的の配列を効率的に取得できる方法を開発した：(1) 使用する制限酵素をトランスポゾンの内部に認識部位を持たないものを選ぶ、(2) アダプターはY型アダプター (Uren et al 2009. *Nat. Prot.* 4: 789-798) を使い、両端のアダプタープライマーだけで増幅するPCR産物を減らす、(3) タッチダウンPCRとNested PCRを使い、非特異的なPCR産物の割合を減らす。

BoTIPseqを使って転移活性を検証するため、Showa株をいくつかの異なるストレス条件(暗所、栄養塩なし、1%NaCl添加、水温35度)で20日間培養したうえで、gDNAを抽出し、それを鋳型にBoTIPseqによる配列取得を行った。これにより、ストレス条件下において、トランスポゾンの転移活性が高まるかどうかを検証した。下の写真は培養直後のShowa株を示す(図10)。

次世代シーケンサーで各種トランスポゾンについて配列情報を取得したところ、約5000リードの情報が取得できた。これらをShowa株のドラフトゲノムにマップし、既存の挿入位置との整合性を確認したところ、95%以上の既存挿入位置がBoTIPseqによる配列取得で検出されていた(表1)。さらに、ゲノムデータには挿入が確認されていない場所への新たな挿入と考えられる配列がいくつかあることがわかった。このような潜在的新規挿入配列の割合は、特にTP2で38%と高く、このトランスポゾンが転移活性を持つ可能性が高いと考えられた。

これらの潜在的新規挿入配列が、特定のストレス条件下で培養した場合に発生しているかどうか調べたが、どのストレス条件下でも同じ挿入位置が検出されていることがわかった。したがって、この潜在的新規挿入配列は、本研究室で扱っているShowa株特有のものであり、各種ストレス条件によって発生した新たな転移に起因するものではないと結論づけた。今後は、トランスポゾン遺伝子の発現解析によって、どのようなストレス条件が転移の活性化に有効かをあらためて調べる必要がある。また、培養の開始時点と終了時点でBoTIPseqによる配列取得を行い、新規の転移による挿入を特定できるかどうか検証を進める必要がある。



250-mL Culture bottles after 20-days cultivation of the Showa strain in a variety of stress conditions.

図10. 各種ストレス条件下で培養したShowa株

表1. BoTIPseqによる配列取得とその解析結果 (Kawamura et al. 2023より)

	BoTIPseq (reads)	Number of insertion sites (BoTIPseq)	Number of insertion sites in database†	Number of Potentially new Insertion sites
TP1	7,446	106	101 (98%)	7 (6%)
TP2	6,115	21	14 (93%)	8 (38%) ←
TP3	17,320	131	111 (100%)	20 (15%)
TP4	5,711	40	30 (100%)	10 (25%)

† Showa genome database: Browne et al (2017) *Genome Announc.* 5: e00215

% of insertion sites detected by BoTIPseq

% in total number of insertion sites detected by BoTIPseq

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kawamura, K., Nishikawa, S., Hirano, K. et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Large-scale screening of natural genetic resource in the hydrocarbon-producing microalga <i>Botryococcus braunii</i> identified novel fast-growing strains.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86760-8	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 該当する

1. 著者名 Koji KAWAMURA, Kotaro HIRANO, ARDIANOR, Rudy Agung NUGROHO	4. 巻 10
2. 論文標題 The oil-producing microalga <i>Botryococcus braunii</i> : A method for isolation from the natural environment and perspectives on the role of ecological studies in algal biofuel production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Ecosystem & Ecography	6. 最初と最後の頁 274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 Kawamura K, Nishikawa S, Hirano K, Ardianor A, Nugroho RA	4. 巻 66
2. 論文標題 BoCAPS: Rapid screening of chemical races in <i>Botryococcus braunii</i> with direct PCR-CAPS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.algal.2022.102789	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Koji KAWAMURA
2. 発表標題 Microalgae as potential resource for red, white, and green biotechnology
3. 学会等名 The 1st OCTAL International conference on "Natural products from Tropical Rainforest, Sustainable Development, and Environmental Studies". (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上杉一馬・Holger Jenke-Kodama・松永茂樹・岡田 茂・河村耕史
2. 発表標題 微細緑藻 <i>Botryococcus braunii</i> S品種はlycopaotaeneを生産するL品種である
3. 学会等名 令和4年度水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上杉一馬・松永茂樹・岡田 茂・河村耕史
2. 発表標題 微細緑藻 <i>Botryococcus braunii</i> S品種はS品種特異的な炭化水素を作らない
3. 学会等名 令和3年度水産学会春季大会（オンライン発表）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koji Kawamura, Naoya Komatsubara, Shigeru Okada
2. 発表標題 BoTIPseq: Transposon-insertion polymorphism sequencing technique for <i>Botryococcus braunii</i>
3. 学会等名 International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (AlgalBBB 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaya Hashimoto, Sho Matsubara, Haruki Fujisaki, Koji Kawamura
2. 発表標題 High-density continuous culture of <i>Botryococcus braunii</i> under strong light conditions
3. 学会等名 International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (AlgalBBB 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sho Matsubara, Keito Yasuda, Koji Kawamura
2. 発表標題 Survivorship and regrowth potential of single cells released from a colony of <i>Botryococcus braunii</i>
3. 学会等名 International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (AlgalBBB 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shotaro Ohmae, Shogo Imai, Ryota Sueyoshi, Koji Kawamura
2. 発表標題 Bioprospecting of the oil-producing microalga <i>Botryococcus braunii</i> : Isolation of high temperature stress tolerant strains
3. 学会等名 International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (AlgalBBB 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>石油を作る微細藻類の研究 http://www.oit.ac.jp/env/voice/201911002 河村 耕史 (2021) 石油を作る微細藻類ボツリオコッカス：高増殖野生株の探索と隠れた生活史解明に向けて. アグリバイオ, 5 (10): 49-52.</p>

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

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
---------	---------