

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22681010

研究課題名（和文） 微細藻類を用いた軽油生産：軽油生産遺伝子の同定による軽油生産能を高めた株の作出

研究課題名（英文） Genetic Engineering of Algae for Enhanced Lipid Production

研究代表者

今村 壮輔（Imamura Sousuke）

東京工業大学・資源化学研究所・准教授

研究者番号：70548122

研究成果の概要（和文）：本研究では、脂質生産に関わる候補遺伝子を微細藻類内で構成的に発現させることにより、脂質生産性を向上させることを目指した。まず始めに、候補遺伝子をトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析にて同定した。次に、*Pseudochoricystis ellipsoidea* における遺伝子導入系を確立し、その最適条件について検討を行った。その後、構築した形質転換系を用いて、脂質合成に関わると予想された候補遺伝子を構成的に発現する株の作出を試みた。

研究成果の概要（英文）：To improve the lipid productivity in microalga with genetic engineering, a genetic transformation system was established for *Pseudochoricystis ellipsoidea*. Analyses of transcriptome and proteome revealed candidate genes for the lipid production. Based on the technique and information, I tried to obtain transformants in which each candidate gene is constitutively expressed in the cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			0
年度			0
総計	9,500,000	2,850,000	12,350,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術、環境材料

キーワード：環境負荷低減技術、バイオマスエネルギー

1. 研究開始当初の背景

近年、単細胞性藻類（以下、微細藻類と呼ぶ）によるバイオ燃料生産が提案され、恐らくこの方法のみが、現在の化石燃料の代替となり得るであろうと予想する人も多い。その理由は幾つかあるが、(i)増殖の早さ(ii)小スペースでの培養が可能(iii)培養するのに必要になるのは、太陽光、二酸化炭素、そし

て水であり、二酸化炭素削減とエネルギー生産がカップルしているため、循環型社会に対応した燃料源となり得る、などが挙げられる。バイオマスの増加率という点では、確かに、微細藻類は有利であると考えられる。しかし、微細藻類のバイオマスからどのようにエネルギーを取り出すかについては、具体的な提案は少ない。その中で、単細胞緑藻である

Botryococcus braunii は、“重油”相当のアルカンを作ることから有名である。しかし、*B. braunii* の増殖は非常に遅い（ダブリングタイム、2〜3日）上に、重油は安価であり、それを燃料とするにはクラッキング等の精製処理が必要であり、費用とエネルギーの点で問題が多い。一方、一般には知られていないが、エネルギーとして直ぐに使用可能な“軽油”相当の炭化水素を生産する単細胞緑藻が単離されている。この緑藻は *Pseudochoricystis ellipsoidea* と仮称されており、増殖が早く（ダブリングタイム、約10時間）、窒素欠乏条件下で、炭素長19を中心とした飽和および不飽和炭化水素やトリグリセリド画分を、藻体乾燥重量の30%の割合で蓄積する。このことから、*P. ellipsoidea* は、バイオ燃料生産に適した藻類と考えられている。

2. 研究の目的

前述したように、微細藻類によるバイオエネルギー生産は、次世代のエネルギーになる可能性がある。しかし、この結論は短絡的である。微細藻類を用いたバイオ燃料生産のためには、微細藻類の培養にある程度の手間とエネルギーをかけなければならない。そのようなコストを勘案すると、エネルギー生産生物としての微細藻類の優位性という地位は揺らいでくる。*P. ellipsoidea* によるバイオ燃料生産においても、より増殖速度が速い、より炭化水素などの脂質含量の多い、より培養が容易な藻の開発が望まれている。具体的には、遺伝子工学技術を用いた、*P. ellipsoidea* における脂質高生産株の作出や、*P. ellipsoidea* よりも増殖が早く、形質転換が容易なシアノバクテリアに、軽油生産遺伝子を導入すれば、軽油を更に効率的に生産する可能性が開ける。そのような遺伝的改変を行うためには、まず、軽油などの脂質生産に関わる遺伝子の同定が必要である。しかしながら、その仕組みについての基礎科学的な知見は全く蓄積していない。

よって、本研究では、微細藻類を用いた脂質生産のためのバイオテクノロジー研究の第一歩として、まず、*P. ellipsoidea* における脂質生産に関わる遺伝子候補の同定を第1の目的とした。それらの情報を基にして、遺伝子を人為的にコントロールするために必要な形質転換系の確立を第2の目的にし、その技術を用いることにより、*P. ellipsoidea* における脂質生産能を高めた株の作出を本提案の最終目的とした。

3. 研究の方法

本研究は大きく分けて3つの段階からなる。第1段階では、トランスクリプトーム・プロテオーム解析により、*P. ellipsoidea* における脂質合成に関わる候補遺伝子をリストアップする。第2段階では、リストアップされた遺伝子の詳細な遺伝子発現パターンを解析し、その候補を絞り込む。第3段階では *P. ellipsoidea* における形質転換系の確立を行う。そして、最終段階では、候補遺伝子の構成的高発現株を作製し、それら株における脂質生産量を指標にして脂質生産経路に関わる遺伝子か否かを判断する。

4. 研究成果

(1) 脂質生産に関わる遺伝子の同定

まず始めに、脂質合成が行われていると考えられる、小胞体を多く含む画分（ミクロソーム）の単離法の確立を試みた。*P. ellipsoidea* は、細胞壁が非常に頑丈であったため、細胞破碎方法を検討した結果、フレンチプレスを用いることにより、ほぼ完全に細胞破碎することに成功した。脂質が蓄積する培養条件である窒素欠乏条件に細胞を曝した後、0時間と24時間で細胞を回収し、ミクロソームをそれぞれ単離した。その後、単離したミクロソームを可溶化し、二次元電気泳動にてタンパク質を分離し、窒素欠乏条件0時間を対象とし、スポットのバンド強度が上昇しているものに加え、減少しているものをピックアップした。その内、窒素欠乏条件24時間後のサンプルで増減が観察された計20スポットについて、LC-MSを用いて配列を決定した。その後、相同性検索にてタンパク質を同定した。

一方、遺伝子発現レベルについては、次世代シーケンサーを用いて、窒素欠乏条件における増減を観察した。その結果、窒素同化系遺伝子に加え、転写制御因子をコードする幾つかの遺伝子のmRNAレベルが上昇していることが明らかになった。その後、定量リアルタイムPCRにて解析を行った結果、それらの一部の転写制御因子がトランスクリプトーム解析同様に窒素欠乏条件下において顕著に誘導されることが確認された。

(2) 形質転換系の確立

形質転換系の確立は、脂質高生産株の作出に欠かすことのできない技術である。前述した様に、本株の細胞壁は非常に強固である。そのため、物理的に外来遺伝子を細胞内に導入することが可能な、パーティクルガン法による形質転換体取得を試みた。まず始めに、

マーカー遺伝子を選定するため、各種抗生物質に対する本株の感受性を調べた。その結果、G418 に対して強い感受性を示すことが明らかになったため、*NPTII (neo)* 遺伝子をマーカー遺伝子として使用することにした。様々な遺伝子のプロモーターとターミネーターを用いて打ち込み実験を行った結果、*NPTII* 遺伝子の 5' 末端にチューブリンのプロモーター領域を、3' 末端側にアクチンのターミネーター領域を結合させて構築したプラスミドを用いた際に G418 耐性株を得ることに成功した。G418 耐性株における *NPTII* 遺伝子がゲノム DNA に組込まれ、安定的に保持されていることに加え、それら細胞における *NPTII* 遺伝子の発現を確認した。次に、緑藻のモデル生物である *Chlamydomonas reinhardtii* で使用されているプロモーターが、*P. ellipsoidea* においても使用できるか否かについて検討を行った。その結果、*HSP70/RBCS* プロモーターを用いた時に G418 耐性株を取得することに成功した。このことから、*C. reinhardtii* で機能するプロモーターが、*P. ellipsoidea* においても機能することが示された。これらで得られた形質転換体の形質転換効率、 10^7 細胞あたり 1.7~5.8 個であった。その後、打ち込みに供する細胞の状態、パーティクルの径や種類、細胞壁の再生条件など検討を行い、形質転換効率を向上させることに成功した。

(3) 脂質高生産株の作製

上記の実験により、脂質合成に関わる遺伝子候補として挙げた遺伝子について、*NPTII* 遺伝子と同様にチューブリンのプロモーター領域とアクチンのターミネーター領域に結合したコンストラクトを持つプラスミドを構築した。尚、候補遺伝子には発現マーカーとして、FLAG タグを C 末端に付加した。数個の候補遺伝子を *P. ellipsoidea* のゲノム上に導入し、構成的に高発現する株の取得を試みた。しかし、*NPTII* マーカー遺伝子の発現は認められたものの、標的遺伝子からの発現は確認されなかった。これらのことは、2 個のコンストラクト (マーカー遺伝子と標的遺伝子) を同時に形質転換することが現在の実験系では困難であり、形質転換効率の更なる向上や、発現コンストラクトの改良などの必要性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Kan Tanaka and Sousuke Imamura. Nitrogen assimilatory pathway and the regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *The Japanese Society of Photosynthesis Research*, 22(3): 167-173 (2012). 査読無
<http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>
- (2) Sousuke Imamura, Daisuke Hagiwara, Fumi Suzuki, Norihide Kurano, and Shigeaki Harayama. Genetic transformation of *Pseudochoircystis ellipsoidea*, an aliphatic hydrocarbon-producing green alga. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58(1): 1-10 (2012). 査読有
DOI: 10.2323/jgam.58.1
- (3) Yu Kanesaki, Sousuke Imamura, Ayumi Minoda, Kan Tanaka. External light conditions and internal cell cycle phases entrain accumulation of chloroplast and mitochondrial transcripts in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Research*, 19(3): 289-303 (2012). 査読有
DOI: 10.1093/dnares/dss013
- (4) Yuki Kobayashi, Sousuke Imamura, Mitsumasa Hanaoka, and Kan Tanaka. A tetrapyrrole-regulated ubiquitin ligase controls algal nuclear DNA replication. *Nature Cell Biol.*, 13(4): 483-487 (2011). 査読有
DOI: 10.1038/ncb2203
- (5) Sousuke Imamura, Masaru Terashita, Mio Ohnuma, Shinichiro Maruyama, Ayumi Minoda, Andreas P.M. Weber, Takayuki Inouye, Yasuhiko Sekine, Yuichi Fujita, Tatsuo Omata, and Kan Tanaka. Nitrate assimilatory genes and their transcriptional regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: Genetic evidence for nitrite reduction by a sulfite reductase-like enzyme. *Plant Cell Physiol.*, 51(5): 707-717 (2010). 査読有
DOI: 10.1093/pcp/pcq043

(6) 大沼 みお、吉田 大和、今村 壮輔、
田中 寛、黒岩 常祥
シゾンの分子遺伝学的解析法の開発
生物工学会誌 88(9): 473-476 (2010). 査
読無
[https://www.sbj.or.jp/wp-content/upload
s/file/sbj/8809_tokushu_3.pdf](https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8809_tokushu_3.pdf)

[学会発表] (計 20 件)

(1) シゾン核コードシグマ因子 SIG2 による
葉緑体フィコビリソーム遺伝子群の転写活
性化
藤井 岳、今村 壮輔、華岡 光正、田中 寛
2013 年 3 月 21~23 日、岡山

(2) 単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* に
おける分裂期特異的なヒストン H3K9 のアセ
チル化の解析
曾根 俊之、今村 壮輔、華岡 光正、黒岩 常
祥、田中 寛
第 5 4 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月
21~23 日、岡山

(3) 単細胞性緑藻 *Pseudochoricystis*
ellipsoidea を用いた、バイオ燃料生産のため
の有用形質を持つ突然変異体のゲノム解析
井出 曜子、早川 准平、坂本 美佳、今村
壮輔、藏野 憲秀、原山 重明
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、2013 年 3
月 8 日~10 日、滋賀

(4) 微細藻類によるバイオ燃料生産
Pseudococcomyxa ellipsoidea における油脂
合成関連因子の同定に向けて
並木 友亮、今村 壮輔、藏野 憲秀、原山
重明
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、2013 年 3
月 8 日~10 日、滋賀

(5) オイル生産藻類 *Pseudochoricystis*
ellipsoidea における安定した導入遺伝子発
現系の開発
阿部 淳、高木 さつき、吉満 勇也、福原 い
ずみ、藏野 憲秀、今村 壮輔、原山 重明
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、2013 年 3
月 8 日~10 日、滋賀

(6) 微細藻類 *Pseudochoricystis*
ellipsoidea の遺伝子ノックアウト技術開発
吉満 勇也、今村 壮輔、福原 いずみ、藏野 憲
秀、福田 裕章、原山 重明
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、2013 年 3
月 8 日~10 日、滋賀

(7) Nitrogen assimilatory pathway and the
regulation in a eukaryotic red alga
Cyanidioschyzon merolae.

Kan Tanaka, Tsubasa Hosoya, Masaru
Terashita, Yu Kanesaki and Sousuke
Imamura.

Physiology and Biotechnology of
Microalgae, Russian Academy of Science,
Oct 16, 2012, Moscow, Russia

(8) 油脂生産性微細藻類によるバイオ燃料
生産-*Pseudochoricystis ellipsoidea* におけ
る油脂合成関連遺伝子の同定に向けて-
並木 友亮、今村 壮輔、藏野 憲秀、原山
重明
第 6 回日本ゲノム微生物学会若手の会、2012
年 9 月 27 日 ~ 28 日、静岡

(9) 微細藻類 *Pseudochoricystis*
ellipsoidea の遺伝子改変
吉満 勇也、今村 壮輔、福原 いずみ、藏野 憲
秀、福田 裕章、原山 重明
第 6 回日本ゲノム微生物学会若手の会、2012
年 9 月 27 日 ~ 28 日、静岡

(10) R2R3-type MYB transcription factor,
CmMYB1, is a central nitrogen assimilation
regulator in *Cyanidioschyzon merolae*
Sousuke Imamura, Yu Kanesaki, Mio Ohnuma,
Takayuki Inouye, Yasuhiko Sekine, Takayuki
Fujiwara, Tsuneyoshi Kuroiwa, Kan Tanaka
The 12th Asian Conference on Transcription,
June 6-9, 2012, Cheju Island, Korea

(11) 紅藻シゾン *Cyanidioschyzon merolae* に
おける代謝制御研究
田中 寛、今村 壮輔
光合成学会公開シンポジウム「光合成と藻類
バイオテクノロジー」、2012 年 6 月 1 日、横
浜

(12) 単細胞紅藻シゾンにおける分裂期特異
的なヒストン H3K9 のアセチル化と転写活性
化における役割
曾根 俊之、廣岡 俊亮、今村 壮輔、黒岩 常
祥、華岡 光正、田中 寛
第 5 3 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月
16~18 日、京都

(13) 植物で初めて同定された窒素代謝を制
御する転写因子
今村 壮輔、兼崎 友、大沼 みお、井上 貴之、

関根 靖彦、藤原 崇之、黒岩 常祥、田中 寛
第6回日本ゲノム微生物学会年会、2012年3月10日～12日、東京

(14) Genetic analysis of "*Pseudochoxicystis ellipsoidea*", an aliphatic hydrocarbon-producing green alga
Sousuke Imamura, Hagiwara Daisuke, Norihide Kurano, Shigeaki Harayama
International Symposium on Algal Biofuels, Nov 17, 2011, Tokyo

(15) 軽油を生産する単細胞緑藻 "*Pseudochoxicystis ellipsoidea*" -分子生物学的手法を用いた軽油生産性向上への取り組み-
今村 壮輔、藏野 憲秀、原山 重明
第5回日本ゲノム微生物学会若手の会、2011年9月29日～30日、静岡

(16) 植物で初めて同定された窒素代謝を制御する転写因子
今村 壮輔、兼崎 友、大沼 みお、井上 貴之、関根 靖彦、藤原 崇之、黒岩 常祥、田中 寛
第5回日本ゲノム微生物学会年会、2011年3月14日～16日、仙台

(17) 炭化水素生産性緑藻 "*Pseudochoxicystis ellipsoidea*" のゲノム構造
原山 重明、今村 壮輔、岩舘 満雄、近藤 伸二、小沢 理津子、足立 直樹、Todd Taylor、鈴木 穰、菊池 淳、藏野 憲秀
第5回日本ゲノム微生物学会年会、2011年3月14日～16日、仙台

(18) 単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における窒素飢餓応答機構の解析
今村 壮輔、細矢 翼、華岡 光正、田中 寛
第52回日本植物生理学会年会、仙台、2011年3月20日～22日

(19) 単細胞紅藻シズンで初めて明らかにされたリボソーム合成系の進化過程
今村 壮輔
第4回日本ゲノム微生物学会若手の会（招待講演）、2010年10月1日～2日、神戸

(20) R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae*
Sousuke Imamura, Yu Kanesaki, Mio Ohnuma,

Takayuki Inouye, Yasuhiko Sekine, Takayuki Fujiwara, Tsuneyoshi Kuroiwa, Kan Tanaka
Microalgal Biotechnology-"Food・Environment・Energy" May 31, 2010, Tokyo

〔図書〕（計1件）
藏野 憲秀、萩原 大祐、今村 壮輔、原山 重明
軽油生産能を有する単細胞緑藻の生産性向上
微細藻類によるエネルギー生産と事業展望、シーエムシー出版、73-78（2012）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.res.titech.ac.jp/%7Ebiores/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 壮輔 (Imamura Sousuke)
東京工業大学・資源化学研究所・准教授
研究者番号：70548122

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし