

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360363

研究課題名(和文) オイル高生産微細藻類スクリーニングに向けた高速イメージサイトメトリーの開発

研究課題名(英文) Development of high throughput image cytometry for microalgal screening toward oil production

研究代表者

田中 剛 (Tanaka, Tsuyoshi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20345333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円、(間接経費) 3,570,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オイル高生産微細藻類の取得を目指し、藻体群の個々の藻体のコロニー形成までの過程を同時並列にモニタリングできるスクリーニング技術を開発した。微細アレイと寒天培地を組み合わせ、微細藻類の集積、培養及びオイル蓄積モニタリングが可能な細胞解析用プレートの開発に成功した。さらにCMOSイメージセンサを用いた広域視野一括撮像を行い、微生物のコロニー形成・生育を定量的に評価することができた。ここで開発されたシステムはオイル生産微細藻類の探索に加えて、カロテノイドやスフィンゴ糖脂質、高度不飽和脂肪酸といった有用化合物を生産する高付加価値突然変異株の網羅的なスクリーニングなどへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：High throughput image cytometry was developed for screening of microalgae with high oil production. The microcavity-culture device created large scale cell patterning, and then time-lapse imaging was performed to observe cell growth and oil accumulation. Additionally, colony formation monitoring system was also developed using a CMOS image sensor. It improved observation throughput, which allowed us to overcome current limitation of the microalgal screening. The image cytometry system developed in this study is expected to be used to explore promising microalgal producers of biofuel, as well as other variable materials including carotenoid, glycosphingolipid and polyunsaturated lipid.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：高速イメージサイトメトリー 微細藻類 スクリーニング バイオ燃料

1. 研究開始当初の背景

微細藻類バイオマスは、1) 食糧との競合がないこと、2) 高い二酸化炭素固定能を有すること、3) 陸生植物と比較して高い生育速度(生産性)を有することから、有望なエネルギー資源として期待されている。特に欧州各国で進められる再生可能燃料導入義務化の本格的普及を見据えて、関連する研究開発は加熱の一途にある。微細藻類は元来、バイオディーゼル燃料となるトリグリセリドを高度に蓄積することが知られており、オイル高生産藻類の大規模なスクリーニングが国内外で実施されている。

微細藻類によるオイル生産性は「オイル含有量」×「生育速度」×「最終藻体量」の積で表され、各パラメーターが包括的に向上した株を取得しなければならない。これまでのスクリーニングで用いられてきた顕微鏡観察に基づく方法では、定性的な高オイル含量の微細藻類の選抜は容易であったが、生育速度、最終藻体量を評価した正味のオイル生産性が向上した株の選出は困難であった。そのような株を選出するためには、コロニー形成や液体培養による藻体培養プロセスを評価する必要があり、実質的なハイスループット化は実現されていない。

このような背景から、米国・環境省 National Renewable Energy Laboratory (NREL) 主導のプロジェクト “Establishment of a Bioenergy-Focused Microalgae Strain Collection Using Rapid, High-Throughput Methodologies”(2007年)では、環境中の微細藻類の分離から培養、オイル同定までを自動化した大規模、かつハイスループットなスクリーニング技術の必要性を強調している。

そこで本研究では、ハイスループットな高オイル生産微細藻類のスクリーニングシステムの構築を目指し、数 cm 四方視野にある全単一藻体のコロニー形成までの過程を同時並列にモニタリングできる高速イメージサイトメトリーの開発を行った。本システムを確立することで、環境、もしくは突然変異株ライブラリーから有用微細藻類株のスクリーニングにおいて律速となっていた培養プロセスを省略することができ、それに関わるコスト、労力を極小化する技術として提供可能である。

2. 研究の目的

オイル高生産微細藻類の取得を目指し、藻体群の個々の藻体のコロニー形成までの過程を同時並列にモニタリングできるスクリーニング技術を開発した。多数の細胞群の個々の分裂過程のモニタリングを実現し、固体プレート培地上での生育速度の定量的評価を行い、有効性を実証した。本システムは、オイル生産微細藻類のスクリーニングに加えて、カロテノイドやスフィンゴ糖脂質、高

度不飽和脂肪酸といった有用化合物を生産する高付加価値突然変異株の網羅的なスクリーニングへの応用が期待され、波及効果は非常に大きいと考えられる。

3. 研究の方法

酵母細胞、及び微細藻類細胞の集積、培養、モニタリングが可能な細胞解析用プレートの開発を行った。細胞解析用プレートの基板材料には、Poly(ethylene terephthalate) (PET, 18 mm × 18 mm, thickness 50 μm) を使用した。微細貫通孔の直径は 3 μm、中心間距離 25 μm として、320 × 320 = 102,400 個を格子状に配する設計とした。基板下部にはシリコンチューブ (0.5 × 1 mm) と PDMS からなる、溶液を吸引するラインを配した下部流路を接着することで細胞捕捉デバイスを作製した。下部流路を介して、細胞懸濁液を流量 200 μl、1 分間吸引することで、微細孔上に細胞を捕捉した。更に、細胞の培養モニタリングを目的として、細胞の培養基材として軟寒天培地を導入した。固化した軟寒天培地を基板上から剥離し、共焦点レーザー走査型顕微鏡上に設置した。軟寒天培地上に固定した珪藻細胞に対して、オイル蓄積誘導条件下でタイムラプス撮像を行った。共焦点レーザー走査型顕微鏡により取得した画像から細胞内の油滴と葉緑体、細胞の体積を測定した。

また、スクリーニング技術のハイスループット化を実現するため、Complementary Metal-Oxide Semiconductor (CMOS) イメージセンサを用いた広範囲イメージング方法の検討を行った。CMOS センサーによるレンズレスイメージングによって、細胞上に固定化した二色の Qdot のイメージングを試みた。

更に突然変異株スクリーニングに先駆けて、UV 照射及び化学変異剤処理 (NTG/EMS) により微細藻類の突然変異株ライブラリーを作製した。得られた突然変異株を、構築したシステム、及びフローサイトメトリーや顕微鏡観察など既存の解析手法を組み合わせて評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞高密度パターンニング法の開発

微細孔が高密度にアレイ化された基板と溶液吸引機構からなる単一細胞捕捉プレートによって、培養液中の細胞を捕捉することを試みた。モデル生物として出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を細胞捕捉デバイス上に導入し、吸引操作によって微細孔上に捕捉した。更に軟寒天培地を滴下し、固化した培地を基板から剥離したものを顕微鏡観察したところ、25 μm 間隔の格子状に細胞がアレイ化されていることが確認できた (図 1a)。出芽酵母は珪藻細胞と同等の大きさであることから、本手法は珪藻細胞にも適用可能であると考えられた。

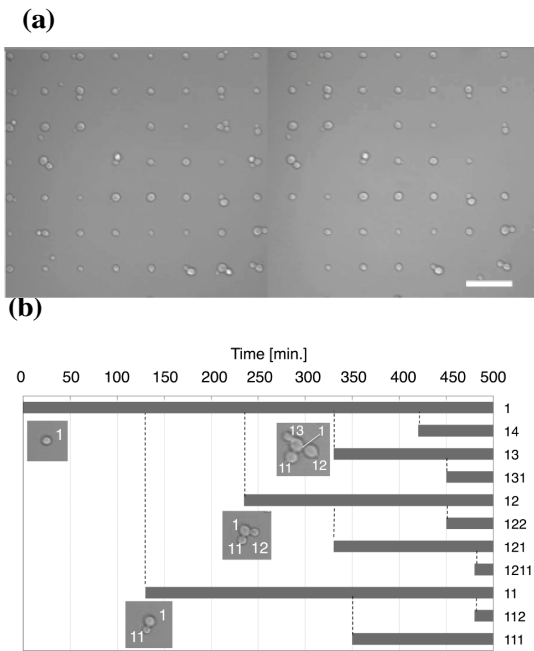


図 1. (a) 細胞高密度パターンニングによる出芽酵母のアレイ化、(b) 単一酵母からの出芽モニタリング

また、細胞の位置情報を保持したまま培養が可能であるかを評価する為に、任意の出芽酵母の出芽過程をモニタリングした。その結果、約 8 時間、同一座標軸上で出芽酵母の出芽過程を観察することが可能であった (図 1b)。出芽酵母の倍加時間は約 100 分、珪藻細胞の倍加時間は約 12 時間であることを考慮すると、本パターンニング方法によって珪藻細胞のコロニー観察は充分に行うことができると考えられた。

次に、実際の標的である油脂高蓄積珪藻細胞のアレイ化を試みた。吸引方法など諸条件等の検討により、酵母細胞と同様に微細孔アレイへの捕捉すること、更に捕捉した細胞に対して軟寒天培地を導入することで、高密度

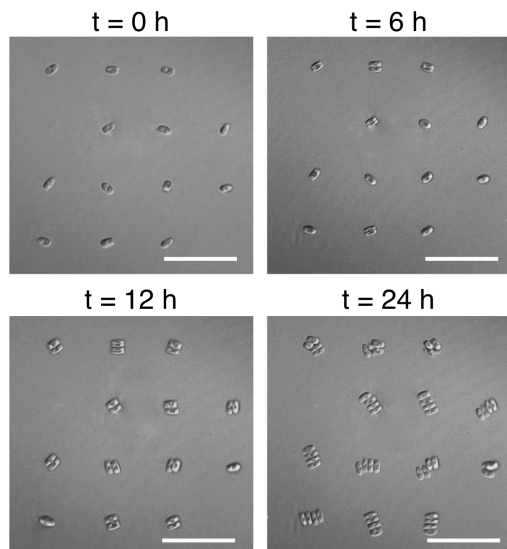


図 2. 細胞高密度パターンニングによる珪藻細胞の増殖モニタリング

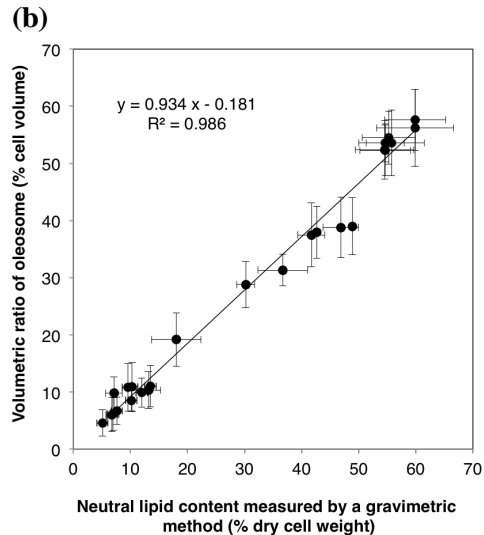
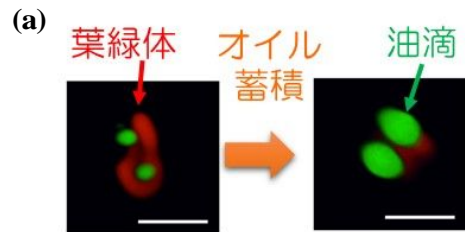


図 3. (a) オイル蓄積時における珪藻細胞の共焦点イメージング、(b) 細胞体積に対する脂質体積率と脂質含有量の相関

パターンニングされた細胞を、効率的に培地に転写することが可能であった。培地上にパターンニングされた細胞を顕微鏡観察したところ、細胞分裂の様子をモニタリングすることができた (図 2)。単位時間当たりの分裂回数から細胞増殖率を算出したところ、液体培養の場合と同等であった。このことから、細胞パターンニング工程は生育に大きな影響を与えないことが示された。以上の研究から、固体培地上における微細藻類の増殖をリアルタイムに、定量的に評価することのできるデバイスを構築することができた。

さらに同システムを用いて、微細藻類細胞内のオイル生産量の評価を試みた。まず、中性脂質 (オイル) を標識する蛍光色素 BODIPY 505/515 によって細胞内に局在する油滴を蛍光染色した。染色細胞を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察し、細胞構造、光合成色素を含む葉緑体、及び染色したオイルを含む油滴などの 3 次元画像を取得した (図 3a)。取得した画像から蛍光領域のみを抽出し、各細胞内小器官の体積を測定した。その結果、細胞内のオイル含量の増加に伴って葉緑体体積が減少する様子が観察された。これは珪藻細胞のオイル蓄積時における、細胞内オルガネラの再編成をリアルタイムモニタリングした初めての例となる。さらに、細胞体積と油滴体積の比率から油滴脂質含有量を算出した。これを乾燥藻体から抽出した脂質を重量測定した結果を比較した結果、両者は非常に高い相関性を持つことが示された (図 3b)。こ

れにより、少量の細胞サンプルから、大規模な培養系全体の中性脂質生産量を推定することが可能となった。本技術は、微細藻類のオイル含有量を短時間に、少量サンプルから測定できることから、微細藻類ライブラリー中の有望株を迅速に探索する際にも有効な手段になりうると考えられる。

(2) CMOS イメージセンサによるコロニー形成イメージング

寒天培地上における微細藻類の生育モニタリングが可能であったため、スクリーニングの更なる高速化に向けて、CMOS イメージセンサによる広範囲イメージング方法の検討を行った。レンズを搭載しない CMOS イメージセンサを用いることにより、顕微鏡と比較して広範囲の領域を一括撮像できることを確認した。さらに、細胞と同等サイズの粒子を異なる蛍光波長を有する 2 種の Qdot 標識粒子で標識し、カラーイメージの撮像を試みた。その結果、赤色、及び緑色の 2 色カラーイメージを同時に取得することに成功した。赤色、および緑色はオイルを BODIPY 染色した微細藻類のモニタリングに必須の蛍光流域であることから、本システムが微細藻類内の油滴及び葉緑体の観察にも適用可能であると考えられた。

(3) 微細藻突然変異株ライブラリーの作成と生育能向上株のスクリーニング

これまで構築したシステム、及びフローサイトメトリーや顕微鏡観察など既存の解析手法を組み合わせ、突然変異株ライブラリーの中から有用な株をスクリーニングする実験を行った。まず微細藻類への化学変異剤暴露条件の検討を行い、約 3 万株の突然変異株ライブラリーを構築した。作出した変異株の増殖速度を定量的に評価したところ、コントロールと比較して有意に生育能が向上した株を取得することに成功した。以上より、突然変異株の生育をハイスループットに評価することのできるスクリーニング法の基盤技術を確立することができた。

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 9 件)

- 1) Kyoko Osada, Masahito Hosokawa, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka "Monitoring of Cellular Behaviors by Microcavity Array-Based Single-Cell Patterning" *Analyst*, 139, 425-430 (2014) DOI: 10.1039/C3AN01698F (査読有り)
- 2) Tatsuya Saeki, Masahito Hosokawa, Tae-kyu Lim, Manabu Harada, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka "Digital Cell Counting Device Integrated with a Single-Cell Array" *PLoS One*, 9, e89011 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0089011 (査読有り)

- 3) Masaki Muto, Yorikane Fukuda, Michiko Nemoto, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka "Establishment of a Genetic Transformation System for the Marine Pennate Diatom *Fistulifera* sp. Strain JPCC DA0580 - a High Triglyceride Producer" *Marine Biotech.*, 15, 48-55 (2013) DOI: 10.1007/s10126-012-9457-0 (査読有り)

- 4) Akira Satoh, Kyonosuke Ichii, Mitsufumi Matsumoto, Chihiro Kubota, Michiko Nemoto, Masayoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka "A Process Design and Productivity Evaluation for Oil Production by Indoor Mass Cultivation of a Marine Diatom, *Fistulifera* sp. JPCC DA0580" *Bioresource Technology*, 137, 132-138 (2013) DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.087 (査読有り)

- 5) 田中剛 「2030 年への挑戦「藻類を燃料に」」 *太陽エネルギー*, vol.39, 27-35 (2013) (査読無し)

- 6) 田中剛 「海洋バイオマスからのバイオディーゼル燃料生産」 *化学と生物*, vol.51, 183-188 (2013) (査読無し)

- 7) 田中剛 「藻類から得られるバイオ燃料の可能性と今後の課題」 *未来材料*, vol.12, No.3, 37-43 (2012) (査読無し)

- 8) 田中剛 「海洋珪藻の次世代バイオ燃料への応用」 *生物工学*, vol.90, 392-395 (2012) (査読無し)

- 9) 田中剛 「海洋微細藻類を用いた液体燃料生産技術の可能性と今後の展開」 *Journal of the Japanese Institute of Energy*, vol.91, 1161-1165 (2012) (査読無し)

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) 向井将一郎、田中剛 「顕微ラマン分光法による海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株の脂質解析」 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18 日-20 日, 広島国際会議場(広島県)

- 2) 佐伯達也、田中剛 「Microcavity array を用いた shadow imaging に基づく細胞カウンターの開発」 2013 年電気化学秋季年会, 2013 年 9 月 27 日-28 日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都)

- 3) 長田響子、田中剛 「単一細胞パターンニングによる海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株のオイル蓄積過程のタイムラプス解析」 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2013 年 6 月 1 日-2 日, 沖縄県市町村自治会館(沖縄県)

- 4) 吉野知子、田中剛 「顕微ラマン分光法による海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株の脂質イメージング解析」 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2013 年 6 月 1 日-2 日, 沖縄県市町村自治会館(沖縄県)

- 5) 向井将一郎、田中剛 「In vivo lipid analysis of marine diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580 using Raman Microspectroscopy」 *The First Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy*, 2013 年 7 月 4 日-5 日, National

Chiao Tung University, Taiwan

6) 武藤正記、田中剛「高オイル生産海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株における delta 9 desaturase 遺伝子の機能解析」日本化学会第 93 春季大会, 2013 年 3 月 22 日-25 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)

7) 田中剛「Multiple Omics Analysis of the Oleaginous Marine Diatom for Oil Production」Innovative Bio-Production of Fuels Chemicals from Renewable, 2013 年 1 月 21 日-22 日, Breakthrough Theastrette, Biopolis, Singapore

8) 長田響子、田中剛「Microcavity Array-Based Living Cell Patterning for Tracking Cellular Behavior at the Single-Cell Level」International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, 2012 年 11 月 27 日-28 日, Kyoto Research Park, Kyoto, Japan

9) 久保田千尋、田中剛「Isolation and Functional Analysis of Novel Desaturases Involved in Triglyceride Biosynthesis from Oleaginous Marine Diatom *Fistulifera* sp. Strain JPCC DA0580」The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012 年 7 月 13 日-16 日, Kochi City Cultural Praza “CUL-PORT”, Kochi, Japan

10) 武藤正記、田中剛「Establishment of Gene Transformation Technique of Marine Pennate Diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580 for Effective Biodiesel Production」112th General Meeting American Society for Microbiology, 2012 年 6 月 16 日-19 日, Moscone center, San Francisco, USA

11) 田中剛「Transcriptomic Analysis of The Oleaginous Marine Diatom *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 toward Biodiesel production」The 2nd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, 2012 年 6 月 10 日-13 日, The Weatin Gaslamp Quarter, San Diego, USA

12) 根本理子、田中剛「RNA-seq に基づく海洋珪藻 *Fistulifera* sp. solaris 株のオイル蓄積機構の解析」日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 28 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県)

13) 長田響子、田中剛「細胞集積化基板を用いた浮遊細胞のタイムラプス解析」日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 28 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称:細胞解析方法及び装置

発明者:田中剛、松永是、佐伯達也、原田学、林泰圭

権利者:国立大学法人東京農工大学、株式会社マルコム

種類:特許

番号:特願 2014-30547

出願年月日:2014 年 2 月 20 日

国内外の別:国内

名称:細胞解析方法及び装置

発明者:田中剛、松永是、佐伯達也、原田学、林泰圭

権利者:国立大学法人東京農工大学、株式会社マルコム

種類:特許

番号:特願 2014-30550

出願年月日:2014 年 2 月 20 日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~biomol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 剛 (TANAKA TSUYOSHI)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号:20345333

(2)研究分担者

福田 頼謙 (FUKUDA YORIKANE)

東京農工大学・大学院工学府・特任助教

研究者番号:40435855