

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」
研究課題「微細藻類の倍数化と重イオンビーム照射
によるバイオ燃料増産株作出に関する新技術開発」

研究終了報告書

研究期間 平成23年 4月～平成28年 3月

研究代表者:河野重行
(東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

農業や園芸は勿論、発酵などでも生物を利用する産業の発展には、生育や増殖が速く、生産性や変換能が高く、環境耐性が強いなどといった優れた品種を育種できることが必要である。微細藻類の短い世代時間を考えると、5～10年間の研究期間で増産株や新たな品種を開発できる可能性がある。微細藻類を「育種する」という発想こそが、バイオエネルギー創成のための基盤技術を生み出す先駆けとなる。

本研究では、微細藻類の倍数化と重イオンビーム照射によって誘導されるDNA欠失とゲノム改変を利用した先端的な分子育種法を開発することを目標とした。また、この育種で得られた増産株についてゲノムとその転写産物などのオーミクス解析を実施して、微細藻類の増殖と代謝を何倍にも増強する新規の遺伝子を探索することで、DNA欠失とゲノム改変が新たな遺伝子を生み出すメカニズムを明らかにし、実際と理論の両面で微細藻類を用いた「先端育種」を確立したいと考えた。微細藻類の探索や突然変異体の単離は世界中で試みられているが、微細藻類を本格的に育種しようという発想はこれまでなかった。本研究は、単なる「株の探索」や「遺伝子組換え」ではなく、「育種」によってバイオ燃料生産に資するヘマトコッカス(*Haematococcus pluvialis*)やクロレラ(*Parachlorella kessleri*)の増産株の確立を目指すものである。

河野グループは、「微細藻類の人為的倍数性の誘導と重イオンビーム照射」というテーマで、人為的倍数性の誘導と重イオンビーム照射によるオイル増産株や様々な有用形質を備えた突然変異体を単離し、実験室レベルの小規模培養から屋外の150Lタイプのチェコ型大量培養装置による実用性検証実験を繰返し最終的には乾燥重量 5.8g/L、オイル含有量 66%というクロレラ株(PK4)の単離と屋外大量培養に成功した。また、ヘマトコッカスでもアスタキサンチンを含むオイルボディ(油体)の細胞内に占める割合が 52%にも達するような株で、悪環境でも死滅しないロバスト(頑強な)株の単離に成功している。

大矢グループは、細胞の顕微鏡画像から微細藻類の増殖状態および有用物質蓄積状態を定量的に把握することのできる汎用型 CalMorph (HematoCalMorph) をヘマトコッカスだけでなくクロレラなどの他の生物種に応用して、重イオンビーム照射により作成した変異体を評価し、物質生産に適した株のスクリーニングを行なった。この汎用型 CalMorph (HematoCalMorph) が出力した数値情報を多変量解析することで、重イオンビーム照射によって単離されたヘマトコッカスやクロレラの優良株の培養条件やコンタミの有無を検証することが可能となっている。

服部グループは、ヘマトコッカスとクロレラの親株(野生型)の高精度ゲノムシーケンスを取得し、この親株ゲノムのリファレンス配列をもとに、重イオンビーム照射して得られた種々のクロレラ変異株ゲノムとの比較解析を実施することで、重イオンビーム照射によって生じる一塩基多型(SNP)や欠失、重複、転座を含むゲノム再編の有無を検出できるようにした。このことで倍数性誘導と重イオンビーム照射によって得られた優良株のゲノムの状態を知ることができるようになっている。また、これらのゲノムデータを利用して、オイル蓄積誘導条件のトランスクリプトーム解析を実施し、オートファジーやリン酸トランスポーター関連遺伝子が発現誘導されることに加え変異株の表現型に関連した遺伝子等の機能領域の同定及び変異株の原因(有用)遺伝子を探索している。

都筑グループは、固相表面を利用した新規大量培養系を開発した。従来の装置に比べ2倍以上の効率を得ている。こうした固相表面培養法を重イオンビーム照射による変異株に適用して、優良株の多くが野生株と同様に培養可能であることを確かめている。脂質生産性の高いPK4株は、布への付着性が弱いこと、初期に付着処理を行ったところ、野生株に匹敵する増殖速度が得られている。

こうした各研究グループの取組みが功を奏し、PK4という優良株でオイル含有量 66%という大量培養が成功し、ゲノム解析の結果PK4にはマンノース関連酵素遺伝子の一塩基多型が認められ、少なくともそれはPK4株が布への付着性が弱いことの原因遺伝子である可能性が見出された。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 電顕3Dとアスタキサンチン蓄積の動態解析

概要:透過型の電顕観察では試料を100 nm以下の非常に薄い切片にするため三次元情報はわずかしか得られない。正確無比な連続超薄切片技術と3D画像再構築技術を融合させ(電顕3D)、直径約30 μmもあるヘマトコッカスの細胞丸ごと一個を立体画像として取得することに成功した。細胞内の構造は強光ストレス下で劇的に変化し、例えば、アスタキサンチンを含むオイルの体積は0.2%から52%まで増加し、42%もあった葉緑体は9.7%にまで減少することがわかった。(原著論文9)

・バイオ燃料増産株の評価に必要な細胞当たりのオイル量を測定する技術的な基盤となる。

2. デンプンとオイルのトレードオフと重イオンビーム照射変異体

概要:クロレラは培養後期には貯蔵物質をデンプンからオイルへシフトさせる。通常培地でも培養の進行にともなってデンプンが減少してオイルが増えるが、イオウ欠乏(S欠)培地にするこの過程は加速され、オイルを乾燥重量の40%を超えて蓄積するようになる。デンプンとオイルの間には一種のトレードオフがあるが、重イオンビーム照射で得られた変異体株のなかには、イオウや窒素の欠乏に対して際限なくオイル量を増大させ野生株の6.4倍にもなるような株があった。(原著論文8、10、13、16)

・バイオ燃料増産株でデンプンとオイルの収穫時期を特定する生理学的知見を提供するとともに、重イオンビーム照射でオイル増産株突然変異体の単離可能であることを初めて示した。

3. 細胞のオイル蓄積にともなうオルガネラの動態と遺伝子発現解析

概要:クロレラのオイル蓄積はS欠誘導できる。S欠誘導で蓄積されるオイルとオルガネラの動態を電顕3Dで経時的に解析したところ、ポリリン酸の急激な蓄積と高電子密度顆粒の発達が起こり、その後オイル蓄積が始まることわかった。このオイルの蓄積にともない液胞内ではミトコンドリアや葉緑体が分解されることがわかっており、こうした自食にともないリン酸トランスポーターやオートファジー関連遺伝子が発現されることもわかってきた。(原著論文26)

・クロレラがオイルを細胞内に蓄積する生理的意義を明らかにした。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. ヘマトコッカス培養と汎用 CalMorph の開発

概要:藻類等によるバイオエネルギー創成を目指し、細胞による有用物質の生産量向上のために、汎用 CalMorph をベースにした「細胞観察装置、細胞観察方法、画像解析プログラム」を発明した。これにより、培養条件の開発や有用物質高生産株の育種を行う際、(1)微細藻類の細胞の生理状態、(2)微細藻類の細胞による有用物質の生産量、(3)細胞の培地に混入する他種生物などの混入状況の各々をリアルタイムにモニターする細胞観察装置を「藻類生産監視システム」として提供することができるようになった。(特願 2012-259880、PCT/JP2013/081894、原著論文17、22)

・大量培養法に不可欠な画像解析手法によるモニタリング法を確立した。

2. 固相表面培養と戸外の大量培養

概要:重イオン照射で得た優良株を布などの固相表面上で微細藻類を培養する新規の培養系を構築した。この培養系は、培養液を容器に満たす場合と異なり、数mに及ぶ縦型設計が可能であり、そのため、工場等の建造物脇に設置することができる。野生株や優良株を用いた八王子市での実験から、補助光と加温により、通年の培養が可能であること、太陽光パネルを電源とする培養液通水により、独立運転が可能であることを示した。同様の株はチェコや東大の屋外大量培養装置を用いてその増産性を試験中である。(原著論文18)

・バイオ燃料増産に資する全く新しいコンセプトの培養法を提案した。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「河野」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
河野 重行	東京大学大学院新領域 創成科学研究科	教授	H23.4～
渡邊 光一	同上	特任研究員(PD)	H23.10～H24.8
山崎 誠和	同上	助教	H24.10～
大田 修平	同上	助教	H23.7～
吉澤 有子	同上	技術補佐員(短時間)	H23.7～H26.12
篠原 利香	同上	技術補佐員(短時間)	H23.7～H26.12 H27.2～H27.3
三木 弥名子	同上	技術補佐員(短時間)	H23.7～H26.5 H27.8～
工藤 恭子	同上	技術補佐員(短時間)	H23.9～
河口 理紗	同上	実験補佐 (M2)	H23.10～H26.3
平田 愛子	同上	バイオイメージングセンター特任研究員(PD)	H24.1～H24.3
石井 公太郎	同上	客員共同研究員(PD)	H23.4～H24.3
藤田 尚子	同上	D3	H23.4～H24.3
青沼 航	同上	D1	H23.4～H26.3
井元 祐太	同上	D1	H23.4～H26.3
佐藤 聖樹	同上	D2	H26.4～H27.3
和山 真里奈	同上	M2	H23.10～H24.3
鈴木 亮吾	同上	D2	H25.1～
竹下 毅	同上	D2	H24.1～
松田 尚大	同上	M1	H24.1～H25.3
鈴木 辰弥	同上	M2	H25.4～H26.3
瀧田 香織	同上	M2	H25.4～H26.3
平井 千鶴	同上	M2	H25.4～H26.3
川元 寛章	同上	D1	H26.4～H28.3
鴻巣 絵梨香	同上	M2	H26.4～H27.3
山下 雄一	同上	M2	H26.4～H27.3
吉原 真衣	同上	M2	H26.4～H27.3
武田 行平	同上	M2	H27.1～
三浦 昌也	同上	M2	H27.1～

研究項目 微細藻類の人為的倍数性の誘導と重イオンビーム照射

- ・人為的倍数性の誘導(河野グループ)
- ・重イオンビーム照射(河野・理研グループ)
- ・先端育種の実用性検証実験(河野・理研グループ)
- ・スクリーニング(大矢・河野グループ)
- ・有用遺伝子探索や欠損部位やゲノム改変領域の特定(河野・服部グループ)

②「大矢」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
大矢 禎一	東京大学大学院新領域 創成科学研究科	教授	H23.4～
野上 識	同上	特任准教授	H23.4～H26.3
大貫 慎輔	同上	研究員	H23.4～
小林 智英	同上	D5	H23.4～H27.3
盛永 星子	同上	技術員	H23.4～

研究項目 汎用 CalMorph の開発とダイナミック・スクリーニング

- ・汎用 CalMorph の開発 (大矢グループ)
- ・スクリーニング (大矢・河野グループ)
- ・CalMorph の実用性検証実験 (大矢グループ)
- ・HyperCalMorph の開発 (大矢グループ)

③「服部」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
服部正平	早稲田大学理工学術院	教授	H23.4～
大島 健志朗	東京大学大学院新領域 創成科学研究科	准教授	H23.4～
須田 互	慶応義塾大学医学部	講師	H23.4～
金 錫元	東京大学大学院新領域 創成科学研究科	研究員	H23.4～H26.1
金 相完	東京大学大学院新領域 創成科学研究科	特任研究員	H23.4～H27.3
小鳥遊 景泰	東京大学大学院新領域 創成科学研究科 情報生 命科学専攻	特任研究員	H26.12～H27.3
小鳥遊 景泰	東京大学大学院新領域 創成科学研究科 メディ カル情報生命専攻	特任研究員	H27.4～
齊藤 かおり	早稲田大学理工学術院	研究補助員	H27.10～

研究項目 微細藻類の倍数化と欠失によるゲノム再編と有用遺伝子探索

- ・全ゲノム解析 (服部グループ)
- ・有用遺伝子探索や欠損部位やゲノム改変領域の特定 (河野・服部グループ)

④「都筑」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
都筑 幹夫	東京薬科大学生命科学部	教授	H23.4～
藤原 祥子	同上	准教授	H23.4～
佐藤 典裕	同上	講師	H23.4～
岡田 克彦	同上	助教	H23.4～
青木 元秀	同上	助教	H26.4～

高橋 マリイ	同上	アルバイト職員	H24.4～
五十嵐 麻衣子	同上	アルバイト職員	H26.4～27.3
佐藤 淳史	同上	M2～D3	H23.4～27.3
有賀 理沙	同上	M1～M2	H24.4～H26.3
佐藤 諒	同上	M1～M2	H25.4～27.3
平井 一帆	同上	D1～D2	H26.4～
越阪部 紗織	同上	M1	H27.4～
小川 稔明	同上	M1	H27.4～

研究項目 変異株の大量培養適性評価による優良株の取得

- ・変異株の取得(都筑グループ)
- ・大量培養適性評価(都筑グループ)

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

7. 2の「主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動」でも述べたが、2013年9月13日に日本植物学会第77回大会(北海道大学)で、シンポジウム「アルガルセックス: 有性生殖と生活環制御が切り拓く藻類バイオの新戦略」を開催したことによって、有性生殖と生活環制御に着目した藻類バイオの研究者ネットワークが形成され、CRESTの研究領域内のネットワークとは異なる視点でのサポートがあり有益であった。

また、2014年1月21日から12月2日まで連続して5回、「藻類培養とA-STEPに関する情報交換会を主な目的とした」産学ミーティングを東京薬科大学で開催したことは、産業界等との連携によるネットワーク形成に有益であった。このネットワークをコアとしてさらに研究開発から商品化・市場投入までの広がりのある強固なネットワークが形成されつつある。

§3 研究実施内容及び成果

3.1 微細藻類の人為的倍数性の誘導と重イオンビーム照射(東京大学 河野グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

①**研究のねらい:** 微細藻類を用いて倍数体化と重イオンビーム照射によるDNA欠失とゲノム改変を利用した先端的な分子育種法の開発を目指している。目標となるのは増殖能の向上による藻類バイオマスの増産であるが、アスタキサンチン、デンプン、オイルなどの有用物質そのものが増産される必要もある。また、オイルなどであれば、細胞外への取り出しやすさなどは優良形質の1つとなるだろう。重イオンビーム照射で得られたこうした変異株から、大量培養に供することができる優良株を確立するとともに、ゲノム解読やトランスクリプトーム解析で変異と代謝の分子機構を明らかにする。

②**研究実施方法:** 主にヘマトコッカス(*Haematococcus pluvialis*)とクロレラ(*Parachlorella kessleri*や*Chlorella sorokiniana*など)を用いる。クロレラと同じトレボキシア藻綱で最も微細なナノクロリス(*Nannochloris bacillaris*)、増殖力に優れ養殖産業で需要のある珪藻(*Chaetoceros neogracile*)なども用いて、温度、光強度、明暗条件はもとより栄養塩欠乏によるバイオマスや物質生産量を経時的に定量した。また、物質生産に関しては、電顕3D法による動態解析を新たに導入した。ヘマトコッカスとクロレラを微小管重合阻害剤コルヒチンで処理し倍数体化した大型細胞を単離し、それに重イオンビームを照射し、増殖性やロバスト性に優れた株を単離する。逆に、重イオンビーム照射した後でコルヒチン処理し、変異体の中から倍数体化した大型細胞を単離する。こうしたコルヒチン処理株を通常のリオン照射株と比較してその増殖性やロバスト性を調査する。

③**研究成果:** ヘマトコッカスは、明暗照明から連続照明に切り替えることで、緑色シスト細胞からアスタキサンチンを大量に蓄積した赤色シスト細胞へと変化する。この過程を電顕3D解析することで、アスタキサンチンとそれが溶解しているオイルドロップの動態が明らかになり、赤色

シスト細胞はその細胞体積の52%がアスタキサンチンを溶解したオイルドロップで占められていることが明らかとなった。ヘマトコッカスの重イオン照射ではこの値を超える株が育種目標となった他、アスタキサンチン合成誘導の際の強光ストレス下でもほとんどダメージを受けないロバスト株の単離などにも成功している。

クロレラ類は通常の TAP 培地でもデンブンを蓄積し、培養を続けるとデンブンはオイルに変換される。この過程はイオウ欠乏培地で培養すると加速される。この傾向はクロレラ類の中でも当該種(*Parachlorella kessleri*)で最も著しく、オイル量は乾燥重量当たり通常 10~20%だったものが 40~50%近くにもなる。デンブんとオイルの間にもトレードオフの関係が見られるが、重イオンビーム照射で得られた株のなかにはイオウや窒素が欠乏した培地でデンブン量が顕著に少なくなり、オイル量が野生株の6.4倍になるような株も単離され、クロレラでも重イオンビーム照射の有効性が再確認された。倍数化に関しては、コルヒチン処理することで倍数化する株を単離しようと様々な工夫をしてきたが、最近になってクロレラの染色体を数えることができるようになり、クロレラには少なくとも2~5倍程度の内部倍数性があることがわかった。増殖期には内部倍数性が亢進することもわかっており、重イオン照射のタイミングを調整するだけでも、内部倍数性効果による大規模欠失やゲノム再編を誘導できることがわかった。

重イオンビーム照射に関しては、理研・仁科センターにおいて、炭素、アルゴン、ネオン、鉄の4線種全てを用いた。現在、384 ウェルプレートを用いた液相の大規模($10^4 \sim 10^5$)スクリーニングが可能になっている。ただ、増殖速度と細胞サイズ(バイオマス)はトレードオフの関係にあるので、そうした制約を失った株をスクリーニングし、デンブンを蓄積し続ける株やデンブンを經由しないでオイルだけを高蓄積する株などの単離に成功している。また、商業的に価値のある長鎖脂肪酸株の単離もできている。

有望な重イオン照射株についてはチェコと共同研究で屋外大量培養実験を実施した他、当該研究室の屋上に設置した150Lタイプのバイオリアクターによる実証実験を繰り返し実施した。また、都筑グループと協力して、縦型の固相大量培養装置を実用化するために、新たな重イオンビーム照射によるハイスループットなスクリーニングで縦型に特化した増殖株のスクリーニングを実施した。大矢グループのHematoCalMorphとHyperCalMorphによるダイナミック・スクリーニングにサンプルを供給するほか、ゲノム解析に各種培養条件下で単離したRNAと優良変異株のDNAを提供し、重イオンビームによる遺伝子欠損部位やゲノム再編をシーケンスレベルで解析し、オイル生産に関わるいくつかの一塩基多型(SNPs)を見いだしている。この他にも大規模な欠失、重複、転座などゲノム構成が大きく変わった変異体も単離できた。

(2)成果の位置づけや類似研究との比較

重イオンビーム照射に関しては、理研・仁科センターにおいて、炭素、アルゴン、ネオン、鉄の4線種をクロレラとヘマトコッカスに計9回照射して、生存曲線などの基礎的なデータの収集に努めた。増殖速度と細胞サイズに関して、 10^4 規模のスクリーニングを繰り返し多くの高増殖株を単離した。増殖速度と細胞サイズの間には負の相関が見られトレードオフの関係にあるが、そうした制約の中でも重イオンビームで様々な有用形質の変異体が単離できている。こうした報告を受けて他でも重イオンビーム照射による微細藻類の育種が始まっている。

電顕3D法を確立したことで、微細藻類のデンブンやオイルといった物質生産は勿論、分裂増殖に関わる微細構造の動態解析ができるようになった。微細藻類の細胞動態や今後の変異体解析になくてはならないツールとなっている。また、得られた変異体は -196°C で冷凍保存することができるようになり、長期安定保存が可能か迅速に見分けられる方法も開発した。これなども、今後の微細藻類研究に広く活用される技術となろう。

3.2 汎用 CalMorph の開発とダイナミック・スクリーニング(東京大学 大矢グループ)

(1)研究実施内容及び成果

①研究のねらい: 先端的な分子育種法の開発のためには、定量的な先進スクリーニングシステムが必要である。コロニーの色と形状による古典的な一次スクリーニングも重要であるが、増殖ステージにある細胞集団は必ずしも単一ではなく、物質生産に関わる細胞が優占していると

は限らない。そこで、顕微鏡イメージングを利用した出芽酵母の画像解析ソフトウェアである CalMorph の汎用化を進め、微細藻類の培養過程をモニターする汎用システムの確立とそのシステムを用いたダイナミック・スクリーニングを実施した。

②**研究実施方法**: 様々な培養条件においてヘマトコッカスの生育状況および蓄積した色素量を簡便に把握するために、様々なタイプの細胞が示す細胞形態を正確に把握し、顕微鏡画像から数値データを取得できる画像解析ソフトウェアの開発を行った。同時に出力された数値情報を多変量解析することにより、細胞中の色素量の予測、特定の種類の細胞集団の計測、培養中の細胞集団の動的変化を追跡した。

③**研究成果**: ヘマトコッカスの細胞情報を取得する HaematoCalMorph を開発した(国内特許出願済み)。本ソフトウェアは、微細藻類のカラー顕微鏡画像から生きた藻類細胞を認識するプログラム、細胞の色情報および形態情報を数値化するプログラムからなる。細胞の大きさや位置、色素量など 14 種類の基礎的な特徴量を設定し、これらを組み合わせた計 50 の特徴量について定量値を算出することが可能になった。各種培養条件下でのヘマトコッカスの顕微鏡画像 300 枚を用いて性能評価を行ったところ、本ソフトウェアは、生きたヘマトコッカスを正しく識別でき、特徴量を正確に計測できることが明らかになった。

出力された数値情報を多変量解析することによって、生物学的に意味のある情報を抽出することを試みた。まず重回帰分析を使って、画像中のヘマトコッカス細胞部分の RGB の輝度という 3 つのパラメータを使ってクロロフィルとカロテノイド色素含量を正しく推測できることを証明した。機械学習アルゴリズムであるランダムフォレストを使って、培地に含まれる遊走子の判別を行なったところ、大きさと細長さという 2 つのパラメータを使った場合には 79%、個々の細胞に関する 25 全ての特徴量を使った場合には 89%の精度で判別が可能になった。最後にヘマトコッカス培養時のカルチャーのデータに主成分分析を応用することにより、培養時の経時的変化と条件依存的変化を示す特徴量をうまく抽出することに成功した。以上のように、HaematoCalMorph の出力データを多変量解析することにより、ヘマトコッカスの生育状況および色素量の簡便なモニタリングが可能となった。

(2)成果の位置づけや類似研究との比較

ヘマトコッカスの顕微鏡画像から、ダイナミック・スクリーニングの際の指標として細胞サイズや色素量などの様々な細胞形質を定量的に取得できる多機能画像解析システム HaematoCalMorph を開発した(Ohnuki et al., 2013)。この基本システムから、ヘマトコッカスだけでなくクロレラなどの他の生物種に応用できる ChlorellaCalMorph を開発し、様々な培養条件下で得られる細胞動態情報を利用して、有用株の取得を行うことを可能にした。アウトプットされた情報を多変量解析することで、知りたい情報が簡単にわかるユーザーフレンドリーな「微細藻類生理状態モニタリングシステム」を開発した(特願 2012-259880、PCT/JP2013/081894)。一方、ハイパースペクトロカメラと組み合わせることで、より正確に細胞内に局所的に存在するクロロフィルやカロテノイドなどの色素量を算出する新しいシステムを開発した(Nogami et al., 2014)。

以上の様々な汎用 CalMorph システムを使って微細藻類のダイナミック・スクリーニングを行った。河野グループと共同して、重イオンビーム照射により作出された微細藻類の変異体を様々な条件で培養し、細胞の顕微鏡画像を取得し、その画像を汎用 CalMorph システムで解析して個々の細胞の定量的な形態情報を取得し、培養条件の違いによる影響を調べた。また、都筑グループと共同して固体培養系での定量的な形態情報を取得し、固体培養系特有の形態解析を行った。

3. 3 微細藻類の倍数化と欠失によるゲノム再編と有用遺伝子探索(東京大学 服部グループ)

(1)研究実施内容及び成果

①**研究のねらい**: 本課題は、重イオンビームによる分子育種法の開発における主たる対象である緑藻類のクロレラ(*Parachlorella kessleri* N-2152 株)とヘマトコッカス(*Haematococcus pluvialis* K-0084 株)の全ゲノム情報を解読し、これらのレファレンスゲノムと種々の重イオンビーム変異株ゲノムの比較解析及び転写物解析から変異株の有用性に関与する遺伝子あるいは

ゲノム領域を特定することを目標とした。

②**研究実施方法**:リファレンスとなる上記の両株の全ゲノム解読を行った。両株に関するゲノム解析はこれまでに報告されておらず染色体数等の詳細データもない。本課題では、長鎖のリードを生産するロシュ社製 454FLX+シーケンサーを用いた全ゲノムショットガン法による高精度なゲノム情報の獲得を目指した。両微細藻類のゲノムサイズは報告されている近縁藻類の推定ゲノムサイズから約 50Mb と 120Mb とそれぞれ仮定し、河野グループが調製したクロレラ及びヘマトコッカス DNA を解析した。

③**研究成果**:クロレラゲノム(62,555,498 bp)及びヘマトコッカス(131,136,432 bp)のゲノム情報を次世代シーケンサー(NGS)及び BAC/Fosmid の両端シーケンシングにより得た。ヘマトコッカスに対して約 750 万リード(約 3.2Gb)の配列データを得た。より高精度なゲノム配列(より少ないスカフォールド数からなる配列データ)を得るために、推定ゲノムサイズの約 30 倍をカバーするクロレラの BAC ライブラリー(約 100kb インサートサイズ、約 1.6 万クローン)の構築と ABI3730xl を用いた両端シーケンス(約 2 万リード)を得た。ヘマトコッカスについては、約 30 倍をカバーするフォスミドライブラリー(約 40kb インサートサイズ、6.5 万クローン)の構築と ABI3730xl を用いた両端シーケンス(約 13 万リード)を得た。これらの配列データは Newbler を用いてハイブリッドアセンブリした。シーケンス重複度は、27.4×(クロレラ)、24.7×(ヘマトコッカス)となった。さらに、GeneMark を用いてクロレラ(13,057 遺伝子)及びヘマトコッカス(19,873 遺伝子)の遺伝子を情報学的に同定した。クロレラに関しては、Scaffolds: 400、N50 Scaffold size: 596,279 bp、Longest Scaffold size: 1,876,038 bp という高精度の配列を得ることができた。一方、ヘマトコッカスでは、N50 Scaffold size: 1,565 bp、Longest Scaffold size: 22,191 bp となり、クロレラに比べて精度の低いゲノム配列となった。追加シーケンスを行ってもその改善が見られず、ヘマトコッカスのゲノム構成にコンティグやスカフォールドの伸張を妨げる内因(リピートや GC ストレッチ)があるのではと考えられている。

クロレラのバイオマス高生産株(PK4)をゲノムシーケンスして親株と比較解析した。検出された変異部位について PCR によってその確認がされた。2箇所を除きこれら変異候補はネガティブであったことが確認された。この残り2箇所については現在検証中である。また、硝酸代謝関連遺伝子異常株(#11)をゲノムシーケンスし親株と比較解析した。この株には大きな転座が起こっていることが検出され、この変異は PCR によって確認された。なお、この転座は硝酸代謝関連遺伝子群クラスターの中で起こっていることも明らかとなった。上記2株以外に、様々な変異株のゲノム解析を行ったが、それらの変異箇所の探索は現在進行中である。

通常培地あるいは硫黄欠乏培地での培養下におけるクロレラの遺伝子発現をトランスクリプトーム解析した。得られた cDNA 配列をリファレンス・ゲノムにマッピングすることで、遺伝子同定及び転写量の定量を行った。この解析から、それぞれの培養条件の違いによって発現量が有意に異なる遺伝子群を検出した。また、ヘマトコッカスのアスタキサンチン量が大きく異なる培養条件でそれぞれ得られた mRNA についてもトランスクリプトーム解析し、アスタキサンチン量の変動に関わる遺伝子を探索した。

(2)成果の位置づけや類似研究との比較

現在、クロレラゲノムの解読と遺伝子同定、代謝マップ解析についてまとめたクロレラゲノム論文は投稿中でこれが受理されれば、他の類似微細藻類のゲノムデータとの比較が可能になり研究も加速するだろう。

重イオンビーム照射で物質生産に優良なクロレラ変異体が数多く得られている。これらの株のリシーケンスとリファレンスとの比較による変異箇所(遺伝子・ゲノム構造の欠失)の探索が進めば、デンプンやオイル蓄積等の物質生産に関係する遺伝子及び代謝系の全貌解明も可能だろう。また、S欠培地などの種々の培養条件で得られた転写物のシーケンスによる定量的な発現解析等によっても、デンプンやオイル蓄積等の物質生産に関係する遺伝子と代謝系の全貌解明が加速されるだろう。

3.4 変異株の大量培養適性評価による優良株の取得(東京薬科大学 都筑グループ)

(1)研究実施内容及び成果

①**研究のねらい**:倍数化や重イオンビーム照射等の先端育種技術を駆使して単離した有望変異株について、ラボからパイロットスケールでの増殖能評価、代謝産物の組成変動と生産性、環境耐性を評価した。また、種々の培養法について検討し、優良株の選抜と取得、それによる生産性増大効果、コストメリット、生産安定性を評価する。これにより、先端育種技術の応用性、公益性、汎用性を検証した。大量培養を屋内外にて実施し適正に評価する。

②**研究実施方法**:クロレラが培養液組成等の生育環境条件により TAG を乾燥重量の 16%まで蓄積することを明らかにした。また、新規のフォトバイリアクターシステムを構築した。このシステムの改良と、それを用いた優良候補株の増殖特性(増殖速度など)や物質生産性(脂肪酸などの組成と量)に関する増殖生理学・代謝工学的な解析を実施した。また、このシステムを用いた屋外培養装置も作製し、優良候補株の大量培養適性を評価した。ヘマトコッカスやその他の微細藻類への当該新規育種技術の応用性・汎用性についても検証した。また、分子レベルの研究が比較的容易なクラミドモナスで、イオウ欠乏(S欠)により誘導される TAG 合成に関し、TAG 合成関連遺伝子を解析した。

③**研究成果**:新規大量培養系を用い、クロレラ株及び重イオンビームで得られた変異株1株について、検討を行った。その結果、有効な特性をもつことが判明した。また、TAG 蓄積も認められた。クラミドモナスにおけるS欠による TAG 合成誘導シグナルの概要を見出した。

パラクロレラを用い、固相表面培養系開発を行った。綿布を縦型に設置してパラクロレラ細胞を付着させ、培養液を流して光照射した。その結果、液体培養とほぼ同程度の速度で細胞が増殖し、増殖が進むと細胞の一部が培養液に出ることにより流出した。増殖特性を明確にするため、開始から一定期間での総増殖量を求め、本系での細胞増殖能力や影響する因子の解析を行った。それにより、大型化に進むための条件を明確にし、土地面積あたりの増殖速度が乾燥重量にして $100 \text{ g DW} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ 以上も可能と評価した。

(2)成果の位置づけや類似研究との比較

既存の大量培養システムにおける課題が明確になったため、固相表面を利用した新規大量培養系を開発した。従来の開放池型培養では1日あたり $25 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ の増殖速度であることから、4倍以上の効率が得られたことになる。本システムの有効性が明確になったため、大型化とさらなる効率化が求められる。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 13 件、国際 (欧文) 誌 35 件)

1. Sumiya, N., Owari, S., Watanabe, K., and Kawano, S.: The role of multiple FtsZ rings in chloroplast division under oligotrophic and eutrophic conditions in the unicellular green alga, *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J. Phycol.* 48, 1187–1196, 2012. (DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01204.x)
2. Nishikawa, T., Moriyama, Y., Sato, M., Sano, T., Hasezawa, S., Ota, S., and Kawano, S.: Isolation of mitochondrial and plastid ftsZ genes and analysis of the organelle targeting sequence in the diatom *Chaetoceros neogracile* (Diatoms, Bacillariophyceae). *Phycol. Res.* 60, 123–136, 2012. (DOI: 10.1111/j.1440-1835.2012.00644.x)
3. Sumiya, N., Yamazaki, T., Owari, S., Yamamoto, M., Watanabe, K. and Kawano, S.: Chloroplast division and differentially regulated expression of FtsZ1 and FtsZ2 in *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Cytologia* 77, 59–66, 2012. (DOI: 10.1508/cytologia.77.59)
4. Murota, C., Matsumoto, H., Fujiwara, S., Hiruta, Y., Miyashita, S., Shimoya, M., Kobayashi, I., Hudock, M.O., Togaaki, R.K., Sato, N. and Tsuzuki, M.: Arsenic tolerance in a *Chlamydomonas* photosynthetic mutant is due to reduced arsenic uptake even in light conditions. *Planta* 236, 1395–1403, 2012. (DOI: 10.1007/s00425-012-1689-8)
5. Tabei, Y., Okada, K., Horii, E., Mitsui, M., Nagashima, Y., Sakai, T., Yoshida, T., Kamiya, A., Fujiwara, S. and Tsuzuki, M.: Two regulatory networks mediated by light and glucose involved in glycolytic gene expression in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 53, 1720–1727, 2012. (DOI: 10.1093/pcp/pcs115)
6. Miyashita, S., Fujiwara, S., Tsuzuki, M. and Kaise, T.: Cyanobacteria produce arsenosugars. *Environmental Chemistry* 9, 474–484, 2012. (DOI: 10.1071/EN12061)
7. Aoki, M., Tsuzuki, M. and Sato, N.: Involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in DNA synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Res. Notes*, 5, 98, 2012. (DOI: 10.1186/1756-0500-5-98)
8. Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., and Kawano, S.: Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresour. Technol.* 129, 150–155, 2013. (DOI: org/10.1016/j.biortech.2012.11.030)
9. Wayama, M., Ota, S., Matsuura, M., Nango, N., Hirata, A. and Kawano, S.: Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, 8: e53618, 2013. (DOI:10.1371/journal.pone.0053618)
10. Li, X., Pribyl, P., Bisová K., Kawano, S., Cepak, V., Zachleder, V., Cizkova, M., Branyikova, I., and Vitová, M.: The Microalga *Parachlorella kessleri*—A Novel Highly Efficient Lipid Producer. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 97–107, 2013. (DOI: 10.1002/bit.24595)
11. Yamazaki, T., Owari, S., Ota, S., Sumiya, N., Yamamoto, M., Watanabe, K., Nagumo, T., Miyamura, S. and Kawano, S.: Localization and evolution of septins in algae. *Plant J.* 74, 605–614, 2013. (DOI: 10.1111/tpj.12147)
12. Hirokawa, Y., S. Matsuzuka, S. Itayama, T. Uchida, S. Fujiwara, N. Okazaki, H. Nagasawa, and Tsuzuki, M.: Localization and associative strength of acid polysaccharides in coccoliths of *Pleurochrysis haptanemofera* (Haptophyta) predicted from their extractability from partially decalcified coccoliths. *Open J. Marine Science* 3, 48–54, 2013. (DOI: 10.4236/ojms.2013.31005)
13. Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A.A., Kawano, S., Bisova, K., Pribyl, P., Zachleder, V., and Vitova, M.: Relationship between starch and lipid accumulation

- induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technology* 144, 268-274, 2013. (DOI: org/10.1016/j.biortech.2013.06.096)
14. Imoto, Y., Kuroiwa, H., Yoshida, Y., Ohnuma, M., Fujiwara, T., Yoshida, M., Nishida, K., Yagisawa, F., Hirooka, S., Miyagishima, SY., Misumi, O., Kawano, S., Kuroiwa, T.: Single-membrane-bounded peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based machinery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110, 9583-9588, 2013. (DOI: 10.1073/pnas.1303483110)
 15. Ota, S., Matsuda, T., Takeshita, T., Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T. and Kawano, S.: Effect of heavy-ion beam irradiation on the survival and growth rates in *Parachlorella kessleri*, *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 46, 266 , 2013.
 16. Ota, S., Matsuda, T., Takeshita, T., Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T. and Kawano, S.: Phenotypic spectrum of *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta) mutants produced by heavy-ion irradiation. *Bioresource Technology*. 149, 432-438, 2013. (DOI: 10.1016/j.biortech.2013.09.079)
 17. Ohnuki, S., Nogami, S., Ota, S., Watanabe, K., Kawano, S. and Ohya, Y.: Image-based monitoring system for green algal *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) cells during culture. *Plant and Cell Physiol*. 54, 1917-1929, 2013. (DOI: 10.1093/pcp/pct126)
 18. Shiratake, T., Sato, A., Minoda, A., Tsuzuki, M. and Sato, N.: Air-Drying of cells, the novel conditions for stimulated synthesis of triacylglycerol in a green alga, *Chlorella kessleri*, *PLoS ONE*, 8, 11, e79630, 2013. (DOI: 10.1371/journal.pone.0079630)
 19. Yamazaki, T., Hirai, C., Ota, S., Kuwano, K. and Kawano, S.: Use of FM1-43, a membrane-specific fluorescent dye, to estimate plasma membrane integrity in the cryopreservation of green algae. *Cryo Letters*, 35, 180-187, 2014. PMID: 24997835 2014.
 20. Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V. and Kawano, S.: Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under strong illumination and aeration culture conditions. *Bioresour. Technol.* 158, 127-134, 2014. (DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.135)
 21. Sato, A., Matsumura, R., Hoshino, N., Tsuzuki, M. and Sato, N., "Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfur-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Frontiers in Plant Science* 5, 444, 2014. (DOI: 10.3389/fpls.2014.00444)
 22. Nogami, S., Ohnuki, S. and Ohya, Y.: Hyperspectral imaging techniques for the characterization of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)", *Journal of Phycology*, vol. 50, No. 5, pp. 939-947, 2014 (DOI:10.1111/jpy.12226)
 23. Yamazaki, T., Ota, S., Oshima, K. Hattori, M., Kazama, Y., Abe, T. and Kawano, S. Mutation rates of *Parachlorella kessleri* by heavy ion beam irradiation and classification of their genomic deletion types. *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, 47: 301, 2014.
 24. Okada, K., Horii, E., Nagashima, Y., Mitsui, M., Matsuura, H., Fujiwara, S. and Tsuzuki, M. "Genes for a series of proteins that are involved in glucose catabolism are upregulated by Hi8-cascade in *Synechocystis* sp. PCC 6803". *Planta* 236, 1395-1403, 2015. (DOI 10.1007/s00425-015-2270-z)
 25. Kobayashi, S., Tsuzuki, M. and Sato, N., Sulfite-stress induced functional and structural changes in the complexes of photosystem I and II in a cyanobacterium. *Synechococcus elongates* PCC 7942. *Plant Cell Physiol*. 56, 1521-1532, 2015. (DOI:10.1093/pcp/pcv073)
 26. Vítová, M., Bišová, K., Kawano, S. and Zachleder, S.: Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 33, 1204-1218. 2015. (DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.012.)
 27. Ota, S. and Kawano, S.: Life cycle and lectin-binding patterns in the chytrid fungus

- Chytriomycetes hyalinus*. Cytologia, 80:125-129, 2015. (DOI: 10.1508/cytologia.80.125)
28. Takeshita, T., Ota, S., Takeda, K., Yamazaki, T. and Kawano, S.: A simple method for measuring the starch and lipid contents in the cell of microalgae. Cytologia, 80, 475-481, 2015. (DOI: 10.1508/cytologia.80.475)
 29. Ota, S., Oshima, K., Yamazaki, T., Kim, S., Yu, Z., Yoshihara, M., Takeda, K., Takeshita, T., Hirata, A., Bišova, K., Zachleder, V., Hattori, M., Kawano, S.: Highly efficient lipid production in the green alga *Parachlorella kessleri*: draft genome and transcriptome endorsed by whole-cell 3D ultrastructure. Biotechnol. Biofuels. 9,13, 2016. (DOI: 10.1186/s13068-016-0424-2)
 30. Sakurai, T., Aoki, M., Ju, X., Ueda, T., Nakamura, Y., Fujiwara, S., Umemura, T., Tsuzuki, M., and Minoda, A.: Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in sulfotermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. Bioresource Technol. 200, 861-866, 2016. (DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.014)
 31. Yamamoto, N., Kudo, T., Fujiwara, S., Takatsuka, Y., Hirokawa, Y., Tsuzuki, M., Takano, T., Kobayashi, M., Suda, K., Asamizu, E., Yokoyama, K., Shibata, D., Tabata, S. and Yano, K.: Pleurochrysome: A web database of *Pleurochrysis transcripts* and orthologs among heterogeneous algae. Plant Cell Physiol. 57, e6, 2016. (DOI: 10.1093/pcp/pcv195)
 32. Sato, N., Kobayashi, S., Aoki, M., Umemura, T., Kobayashi, I., and Tsuzuki M.: Identification of genes for sulfolipid synthesis in primitive red alga Cyanidioschyzon merolae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 470:123-129, 2016. (DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.006)
 33. Yamamoto, M., Handa, S., Kawachi, K., Miyamura, S., Nagumo, T., Hirata, A., and Kawano, S.: Mother Cell Wall Cleavage during Filament Formation in *Stichococcus bacillaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Cytologia, 81, 35-39, 2016. (DOI: 10.1508/cytologia.81.35)
 34. Ota, S., Yoshihara, M., Yamazaki, T., Takeshita, T., Hirata, A., Konomi, M., Oshima, K., Hattori, M., Bišová, K., Zachleder, V., and Kawano, S.: Deciphering the relationship among phosphate dynamics, electron-dense body and lipid accumulation in the green alga *Parachlorella kessleri*. Sci. Rep. 6, 25731, 2016 (DOI: 10.1038/srep25731)
 35. Hirai, K., Hayashi, T., Hasegawa, Y., Sato, A., Tsuzuki, M., Sato, N.: Hyperosmosis and its combination with nutrient-limitation are novel environmental stressors for induction of triacylglycerol accumulation in cells of *Chlorella kessleri*. Sci. Rep. 6:25825, 2016. (DOI:10.1038/srep25825)

【査読審査の入る proceedings 等】

1. 都筑幹夫、白武拓磨、鈴木美穂、西條広隆、朝山宗彦、宮坂裕司、岡田克彦、今村信和、小西淳：人工光利用による微細藻類の生産技術開発、東京薬科大学研究紀要 15, 9-16 (2012)
2. 松井雄一郎、青木元秀、藤原棋多夫、都筑幹夫：微細藻類を利用したストロンチウム及びセシウムの回収、東京薬科大学研究紀要 16, 1-8 (2013)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 藤原祥子、都筑幹夫：5. 糖類—デンプンほか、藻類ハンドブック、エヌティーエス、渡辺監修、p. 174-177 (2012)
2. 佐藤典裕、都筑幹夫：9. 脂質—膜脂質・貯蔵脂質、藻類ハンドブック、エヌティーエス、渡辺信監修、p. 191-195 (2012)
3. 都筑幹夫：社会が求める光合成研究～微細藻類からバイオ燃料は作られるか？、東薬ニューズレター(学内報)No.108、p. 6 (2012)
4. 大矢禎一・木森義隆：出芽酵母で広がる細胞の画像解析研究 映像情報メディア学会誌

- 67,(9); 10-15 (2013)
5. 河野重行:重イオンビーム照射とバイオ燃料増産株作出に関する新技術、藻類オイル開発研究の最前線—微細藻類由来バイオ燃料の生産技術研究、エヌ・ティー・エス、pp51-81 (2013)
 6. 大矢禎一:バニリンによるアルコール発酵阻害機序の解明 バイオインダストリー・31, 58-64 (2014)
 7. 河野重行:藻類バイオとは何か—微細藻類の物質生産—増補新訂版 サイエンスビュー 生物総合資料、長野敬・牛木達男監修、実教出版、pp. 280-281. (2014)
 8. 松田尚大・竹下毅・大田修平・山崎誠和・風間裕介・阿部知子・平田愛子・河野重行:微細藻類への重イオンビーム照射によるバイオ燃料増産株の作出、生物工程 92, pp.602-606 (2014)
 9. 河野重行:細胞丸ごと1個:324枚の電顕写真、細胞工学、33、 p.699 (2014)
 10. Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya, H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I., Hyashi, Y., (eds): Atlas of Plant Cell Structure, Springer, pp.1- 202 (2014).
 11. 大田修平・河野重行:藻類バイオと電顕3D、Plant Morphology 27, pp.3-7 (2015)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 15件、国際会議 3件)

(国内会議)

1. 河野重行:藻類によるバイオ燃料生産の研究/技術開発動向、「微細藻類の倍数化と重イオンビーム照射によるバイオ燃料増産株作出に関する新技術開発」、技術情報センター (2012年12月13日)
2. 河野重行「藻類バイオと電顕3Dイメージング」、東京理科大学・イメージングフロンティア機構、第5回 イメージングワークショップ、2012年12月22日
3. 河野重行:次世代バイオマスエネルギーの可能性を秘めた微細藻類によるバイオ燃料生産システム構築と最新研究動向、「重イオンビーム照射とバイオ燃料増産株作出に関する新技術」、NTSセミナー (2013年1月30日)
4. 都筑幹夫:微細藻類の基礎知識 ～種類・培養・光合成特性・応用展開について～、「微細藻類セミナー ～藻類の基礎知識からバイオ燃料開発、大量栽培技術、実用化へ向けた将来展望まで～」、情報機構 (2013年5月22日)
5. 河野重行:微細藻類の基礎知識 ～種類・培養・光合成特性・応用展開について～、「微細藻類セミナー ～藻類の基礎知識からバイオ燃料開発、大量栽培技術、実用化へ向けた将来展望まで～、～重イオンビームを用いた微細藻類の新しい育種法～」、情報機構 (2013年5月22日)
6. 河野重行「藻類バイオとは何か」、東京大学生命科学シンポジウム、2013年6月8日
7. 都筑幹夫、藻類大量培養技術の新しい展開—固相表面連続培養系について—、第5回藻類バイオ燃料生産技術研究会、名古屋 (2014年3月10日)
8. 都筑幹夫、微細藻類の生理機構とその利用技術開発—光合成、栄養ストレス、そして培養—、日本農薬(株)研究所、河内長野 (2014年11月13日)
9. 河野重行:微細藻類の先端育種:クロレラと重イオンビームの可能性、科学技術振興機構 さきがけ・CREST 公開シンポジウム、新宿 NSビル 30階 NSスカイカンフェランス、東京都、新宿区 (2014年12月4日)
10. 河野重行:藻類の雌雄非対称性の成立、ゲノム支援公開シンポジウム 東京国際フォーラム、東京都、千代田区 (2014年12月12日)
11. 都筑幹夫、基調講演『バイオテクノロジー』、一般社団法人日本鉄鋼協会第170回秋季講演大会シンポジウム、『バイオ&パイロサイクル4』、福岡 (2015年9月17日)
12. 河野重行:微細藻類の倍数化と重イオンビーム照射によるバイオ燃料増産株作出に関する新技術開発、「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」研究領域公開シンポジウム、さきがけ研究者(平成24

年度採択)研究成果報告会、CREST 研究成果報告会、新宿 NSビル 30 階 NS スカイカンフェランス、東京都、新宿区 (2015 年 12 月 3 日～4 日)

13. 河野重行: Microalgal breeding: Potential of chlorella and heavy ion beam irradiation 筑波大学藻類バイオマス・エネルギーシステム開発研究センター開所記念国際シンポジウム、筑波大学茗荷谷キャンパス、東京都、文京区 (2015 年 11 月 17 日)
14. 河野重行: 特別講演: 藻類バイオ: クロレラと重イオンビーム育種の可能性、理研シンポジウム、国立研究開発法人理化学研究所和光研究所、埼玉県、和光市 (2016 年 1 月 21 日)
15. 河野重行: 七色のクロレラ 微細藻類が世界を救う、イオンビーム育種研究会による公開講演会、福井県県民ホール AOSSA、福井県 福井市 (2016 年 5 月 26 日)

(国際会議)

1. Matsuura, H., Wayama, M., Hirata, A. and Kawano, S.: Microstructure of the astaxanthin accumulating cell induced by the light stress in *Haematococcus*. 5th European Phycological Congress, Rhodes Island, Greece, September 4-9, 2011.
2. Yamamoto, M., Handa, S., Miyamura, S., Nagumo, T. and Kawano, S.: The filament and colony formation caused by deficiency of cleavage and dissociation of the mother cell wall in Trebouxiophyceae. The 6th Asian Pacific Phycological Forum, Yeosu, Korea, October 9-14, 2011.
3. Ota, S., Takeshita, T., Yamazaki, T., Vítová, M., Zachleder, V., Abe, T., Kawano, S.: Phenotypic spectrum and 3D/TEM analysis of *Parachlorella kessleri* mutants produced by heavy-ion irradiation. BioTech2014 and 6th Czech-Swiss Symposium Prague (Czech Republic) June 13, 2014.

② 口頭発表 (国内会議 38 件、国際会議 3 件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

(国内会議)

1. 小林里美、都筑幹夫、佐藤典裕(東京薬科大・生命): 亜硫酸がシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 の光合成に及ぼす影響. 日本植物学会第 75 回大会、東京大学 駒場キャンパス、(2011 年 9 月 17 日～9 月 19 日)
2. 佐藤淳史、松村理恵、都筑幹夫、佐藤典裕(東京薬科大・生命): 緑藻クラミドモナスにおける各種栄養塩欠乏条件下でのトリアシルグリセロール蓄積の比較. 日本植物学会第 75 回大会、東京大学 駒場キャンパス、(2011 年 9 月 17 日～9 月 19 日)
3. 長島祥晃、岡田克彦、都筑幹夫(東京薬科大・生命): *Synechocystis* sp. PCC6803 の従属栄養条件下における sll1334 の役割. 日本植物学会第 75 回大会、東京大学 駒場キャンパス、(2011 年 9 月 17 日～9 月 19 日)
4. 岡田克彦、堀井瑛介、田部井陽介、吉田拓哉、神谷明男、藤原祥子、都筑幹夫(: *Synechocystis* sp. PCC6803 の fbaA における二系統の発現誘導光シグナル. 第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学、(2012 年 3 月 17 日)
5. 水野雄介、佐藤淳史、渡邊光一、大田修平、平田愛子、佐藤典裕、都筑幹夫、河野重行: クロレラにおける硫黄欠乏条件により誘導されるデンプンと脂質の蓄積動態. 日本藻類学会第 36 回大会、北海道大学、(2012 年 7 月 15 日)
6. 大田修平、松田尚大、竹下毅、渡邊光一、風間裕介、阿部知子、河野重行: 単細胞緑藻 *Parachlorella kessleri* における高増殖能を有する重イオン照射株のスクリーニング. 日本藻類学会第 36 回大会 北海道大学、札幌市 (2012 年 7 月 15 日)
7. 和山真里奈、松浦葉月、大田修平、渡邊光一、平田愛子、風間裕介、阿部知子、河野重行: ヘマトコッカスにおけるアスタキサンチン蓄積の電顕三次元動態解析と突然変異体の単離. 日本植物学会第 76 回大会 兵庫県立大学姫路書写キャンパス、

(2012年9月15日～17日)

8. 大田修平、松田尚大、竹下毅、水野雄一、渡邊光一、平田愛子、風間裕介、阿部知子、河野重行:クロレラにおけるデンプン・オイル蓄積の動態解析と物質生産変異株の単離戦略。日本植物学会第76回大会、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、(2012年9月15日～17日)
9. 大貫慎輔、野上識、大田修平、渡邊光一、河野重行、大矢禎一:*Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)の培養モニタリングシステム、日本分子生物学会、神戸(2012年12月5日)
10. 野上識、大貫慎輔、大田修平、渡邊光一、河野重行、大矢禎一:
HaematoCalMorph: *Haematococcus pluvialis* のための多機能細胞画像処理ソフトウェア、日本藻類学会第37回大会、甲府(2013年3月28日)
11. 野上識、大貫慎輔、大田修平、渡邊光一、河野重行、大矢禎一:
HaematoCalMorph: *Haematococcus pluvialis* のための多機能細胞画像処理ソフトウェア。日本藻類学会第37回大会、山梨大学甲府キャンパス、(2013年3月27日～29日)
12. 大田修平、南郷脩史、篠原利香、工藤恭子、平田愛、河野重行:B27 シングルセル3次元立体構築法によって微細構造解析したヘマトコッカスとクロレラの物質蓄積動態。日本藻類学会第37回大会、山梨大学甲府キャンパス、(2013年3月27日～29日)
13. 竹下毅、山崎誠和、大田修平、河野重行:クロレラ6種8株の強光通気培養下のイオウ欠乏に対するオイルとデンプンの蓄積の動態。日本藻類学会第37回大会、山梨大学甲府キャンパス、(2013年3月27日～29日)
14. 松田尚大、三木弥名子、吉澤有子、風間裕介、阿部知子、大田修平、河野重行:クロレラ類 *Parachlorella kessleri* の重イオン照射の効果とデンプン・オイル蓄積の動態。日本藻類学会第37回大会、山梨大学甲府キャンパス、(2013年3月27日～29日)
15. 白武拓磨、磯田春奈、戸谷藍子、出雲旦子、小高徹郎、西條広隆、藤原祥子、都筑幹夫:気相及び液相中におけるクロレラの光合成と増殖特性ーバイオマス生産の生物学的基礎ー。第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館、(2013年6月1～2日)
16. 河野重行:藻類バイオとは何か、第13回 東京大学生命科学シンポジウム、伊藤国際学術研究センター、東京大学、東京都(2013年6月8日)
17. 井元祐太、黒岩晴子、吉田大和、大沼みお、藤原崇之、吉田昌樹、西田敬二、八木沢 芙美、廣岡俊亮、宮城島進也、三角修己、黒岩常祥、河野重行:ポストゲノミクスを基盤としたペルオキシソーム分裂装置(Pod-machinery)の構造同定と分子機構の解明、日本植物学会第77回大会、北海道大学、高等教育推進機構、札幌市(2013年9月15日)
18. 大田修平、吉原真衣、南郷脩史、平田愛子、河野重行:電顕 3D を用いた栄養塩欠乏ストレスによるクロレラのデンプン・オイル蓄積動態解析、日本植物学会第77回大会、北海道大学 高等教育推進機構、札幌市(2013年9月15日)
19. 加藤翔一、井元祐太、大沼みお、松永朋子、黒岩晴子、河野重行、黒岩常祥、松永幸大:原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の分裂期におけるオーロラキナーゼの機能解析、日本植物学会第77回大会、北海道大学 高等教育推進機構、札幌市(2013年9月13日)
20. 井元祐太、大沼みお、黒岩晴子、河野重行、黒岩常祥:単膜系ペルオキシソーム分裂マシンの構造・機能解析とその起源、日本植物生理学会第55回大会 第16回植物オルガネラワークショップ 富山大学 富山(2014年3月17日)
21. 竹下毅、山崎誠和、大田修平、Vilém Zachleder、河野重行:強光培養系と屋外大量培養系によるパラクロレラ変異株のデンプンとオイルの蓄積動態の解析、日本藻類学会第38回大会 東邦大学 習志野キャンパス 船橋市(2014年3月16日)

22. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、仲野靖孝、許斐麻美、平田愛子、河野重行：
Parachlorella kessleri に見られるポリリン酸様高電子密度顆粒の同定とその蓄積動態、日本藻類学会第 38 回大会 東邦大学 習志野キャンパス 船橋市 (2014 年 3 月 16 日)
23. 都筑幹夫、藤原祥子、佐藤典裕、岡田克彦：微細藻類の光合成とその応用、
Biotech2014、東京(2014 年 5 月 15 日)
24. 佐藤諒、有賀理沙、白武琢磨、今村信和、朝山宗彦、岡田克彦、都筑幹夫、固相表面を利用した微細藻類の屋外通年培養、第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、
三重大(2014 年 5 月 31 日)
25. 大田修平、河野重行 藻類バイオと電顕3D 日本植物学会第 78 回大会、明治大
学 生田キャンパス、神奈川県、川崎市 (2014 年 9 月 13 日)
26. 河野重行 藻類バイオ：微細藻類の先端育種とその可能性について、日本植物
学会第 78 回大会 明治大学 生田キャンパス、神奈川県、川崎市 (2014 年 9 月
13 日)
27. 松永朋子、加藤翔一、坂本卓也、井元祐太、大沼みお、野村有子、中神弘史、黒
岩晴子、河野重行、黒岩常祥、松永幸大：原始紅藻シズンのおーロラキナーゼによ
るミトコンドリア分裂制御機構の解析、日本植物学会第 78 回大会 明治大学 生田
キャンパス、神奈川県、川崎 (2014 年 9 月 13 日)
28. 吉原真衣、大田修平、山崎誠和、竹下毅、許斐麻美、平田愛子、河野重行、クロレ
ラ類の栄養飢餓条件における物質の蓄積動態を電顕3D法で立体構築する 日本
植物学会第 78 回大会 明治大学 生田キャンパス、神奈川県、川崎市 (2014 年 9
月 12 日)
29. 佐藤典裕、平井一帆、林泰平、佐藤淳史、長谷川柚里、都筑幹夫、緑藻クロレラのト
リアシルグリセロール蓄積における混合ストレスの有効性、第 56 回日本植物生理学
学会年会、東京農大(2015 年 3 月 17 日)
30. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、南郷脩史、平田愛子、河野重行：Chlorella
sorokiniana におけるオートファジーの 3 次元微細構造学的研究、日本藻類学会第
39 回大会 九州大学箱崎キャンパス、福岡県、福岡市 (2015 年 3 月 22 日)
31. 竹下毅、山下雄一、大田修平、山崎誠和、大島健志朗、服部正平、風間裕介、阿部
知子、河野重行：クロレラの重イオンビーム照射による突然変異誘導と屋外大量培養
株の作出、日本藻類学会第 39 回大会 九州大学箱崎キャンパス、福岡県、福岡市
(2015 年 3 月 22 日)
32. 佐藤諒、有賀理沙、青木元秀、梅村知也、都筑幹夫：自然光下におけるクロレラ固
相表面培養の検証実験、第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会、東京(2015 年 5
月 31 日)
33. 都筑幹夫、今村信和：光合成バイオテクノロジーのスケールアップと実用化構想、一
般社団法人日本鉄鋼協会第 170 回秋季講演大会シンポジウム、『バイオ&パイロリ
サイクル 4』、福岡(2015 年 9 月 17 日)
34. 岡村枝里佳、松永朋子、加藤翔一、坂本卓也、井元祐太、大沼みお、野村有子、
中神弘史、黒岩晴子、河野重行、黒岩常祥、松永幸大：Cyanidioschyzon merolae
におけるおーロラキナーゼを介したミトコンドリア分裂制御メカニズムの解析、日本植
物学会第 79 回大会 朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター、新潟県、新潟市、
(2015 年 9 月 8 日)
35. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、大島健志朗、許斐麻美、平田愛子、服部正平、
河野重行：栄養飢餓ストレスによるクロレラ類の液胞内ポリリン酸とオートファジーの
動態、日本植物学会第 79 回大会 朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター、新潟県
新潟市 (2015 年 9 月 6 日)
36. 竹下毅、大田修平、山崎誠和、河野重行：クロレラ 6 種 8 株の実験室培養系おける
デンプンとオイルの蓄積と屋外培養系への展開。第 57 回日本植物生理学会年会、

岩手大学上田キャンパス、岩手県、盛岡市(2016年3月18日)

37. 山崎誠和、鴻巣絵梨香、竹下毅、武田行平、大田修平、平田愛子、風間裕介、阿部知子、河野重行:硫黄飢餓におけるクロレラの脂質とデンプンの蓄積動態、第57回日本植物生理学会年会、岩手大学上田キャンパス、岩手県、盛岡市(2016年3月18日)
38. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、大島健志朗、服部正平、平田愛子、河野重行:イオウ飢餓で誘導されるクロレラのオイル蓄積とミトコンドリアと葉緑体のオートファジー、日本藻類学会第40回大会、日本歯科大学生命歯学部、東京都、千代田区、(2016年3月20日)

(国際会議)

1. Sato, A., Tsuzuki, M., and Sato, N.: Lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella* under sulfur deprivation, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, July 13-16, 2012.
2. Ota, S., Wayama, M., Nango, N., Hirata, A. and Kawano, S.: Three-dimensional ultra-structural study of encystment and astaxanthin accumulation in the green alga, *Haematococcus pluvialis*. Protist 2012 (19th ISEP and 62nd ISOP joint meeting) Oslo, Norway, July 29-August 3, 2012.
3. Kawano, S., Watanabe, K., Ota, S.: Establishment of innovative technology to create new microalgal strains increasing biofuel production by polyploidization and heavy-ion beam irradiation. The 90th Anniversary Meeting, The Society for Biotechnology, Japan International Symposium on Biotechnology for Green Growth Kobe, Japan, October 24-26, 2012.

③ ポスター発表 (国内会議 34 件、国際会議 6 件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

(国内会議)

1. 近藤慶典、藤原祥子、宮下振一、松村静香、上大介、都筑幹夫(東京薬科大・生命):緑藻とシアノバクテリアにおけるヒ素に対する感受性と蓄積量、第14回マリンバイオテクノロジー学会、東海大学、静岡市(2011年5月28日)
2. 佐藤淳史、松村理恵、都筑幹夫、佐藤典裕(東京薬科大・生命):栄養塩の種類によるクラミドモナスでのトリアシルグリセロール蓄積の違い、第24回植物脂質シンポジウム、東京大学(2011年9月19日)
3. 遠藤博寿、笠島大貴、藤原祥子、都筑幹夫、猿渡和子、小暮敏博、長澤道:円石藻 *Pleurochrysis carterae* におけるココリス形成の分子生物学的解析、第6回バイオミネラルイゼーション研究会、東京大学(2011年12月3日)
4. 大島健志朗、広瀬侑、大田修平、渡邊光一、河野重行、服部正平:微細藻類 *Parachlorella kessleri*, *Haematococcus pluvialis* のゲノム解析、日本ゲノム微生物学会、立教大学(2012年3月10日)
5. 青木元秀、都筑幹夫、佐藤典裕:SQDG は *Synechocystis* sp. PCC 6803 での DNA 複製に関与する、第53回日本植物生理学会年会、京都産業大学(2012年3月17日)
6. 森田彩子、小林里美、都筑幹夫、佐藤典裕:亜硫酸がシアノバクテリアの脂質合成系へ及ぼす影響、第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館(2012年6月1日)
7. 佐藤淳史、松村理恵、星野奈緒実、都筑幹夫、佐藤典裕:緑藻クラミドモナスにおけるトリアシルグリセロールの蓄積機構、日本植物学会第76回大会、兵庫県立大学

(2012年9月15~17日)

8. 大貫慎輔、野上識、大田修平、渡邊光一、河野重行、大矢禎一: 微細藻類の多機能画像解析ソフトウェア、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場 (2012年12月13日)
9. 大島健志朗、金相完、大田修平、山崎誠和、渡邊光一、河野重行、服部正平(東京大学・院・新領域・先端生命): 微細藻類 *Parachlorella kessleri* と *Haematococcus pluvialis* のゲノムシーケンス、第7回日本ゲノム微生物学会年会、長浜バイオ大学 (2013年3月8日~10日)
10. Sato, A., Matsumura, R., Hoshino, N., Tsuzuki, M., Sato, N.: Mechanisms of triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山 (2013年3月21~23日)
11. 岡田克彦、長島祥晃、堀井英介、都筑幹夫: *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光合成一解糖系酵素遺伝子の発現調節に関わる複数の調製系、第54回日本植物生理学会年会、岡山大学 (2013年3月21~23日)
12. Sato, A., R. Matsumura, N. Hoshino, M. Tsuzuki, and N. Sato (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.): Mechanisms of triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*, 第54回日本植物生理学会年会、第54回日本植物生理学会年会、岡山大学 (2013年3月21~23日)
13. 森田彩子、小林里美、都筑幹夫、佐藤典裕: 亜硫酸がシアノバクテリアの脂質合成系へ及ぼす影響、第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館 (2013年6月1~2日)
14. 西弘貴、佐藤典裕、藤原祥子、都筑幹夫: シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のポリリン酸キナーゼ遺伝子破壊株(Δ ppk1)の解析. 第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館、(2013年6月1~2日)
15. 岡田克彦、長島祥晃、堀井英介、都筑幹夫: *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光合成一解糖系酵素遺伝子の発現調節に関わる複数の調製系、第54回日本植物生理学会年会、岡山 (2013年3月21-23日)
16. 大貫慎輔、野上識、大田修平、渡邊光一、河野重行、大矢禎一: *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)の培養モニタリングシステム、日本分子生物学会、神戸 (2013年12月5日)
17. 佐藤諒、白武拓磨、有賀理沙、朝山宗彦、今村信和、岡田克彦、都筑幹夫: 固相表面を用いた微細藻類の屋外連続培養系、ユウグレナ研究会第29回研究集会、筑波 (2013年11月9日)
18. 竹下毅、山崎誠和、大田修平、河野重行: クロレラ6種8株の強光通気培養下のイオウ欠乏に対するオイルとデンプンの蓄積の動態、第65回日本生物工学会 広島国際会議場 広島 (2013年9月19日)
19. 山崎誠和、大田修平、佐藤聖樹、竹下毅、風間祐介、阿部知子、河野重行: 微細藻類への重イオンビーム照射による突然変異率の算出と凍結保存法による変異体の安定性評価、第65回日本生物工学会 広島国際会議場 広島 (2013年9月18日)
20. 白武拓磨、佐藤淳史、蓑田歩、都筑幹夫、佐藤典裕: 乾燥処理は緑藻細胞でのトリアシルグリセロール蓄積をもたらす、植物脂質シンポジウム、札幌 (2013年9月15日)
21. 白武拓磨、佐藤淳史、蓑田歩、都筑幹夫、佐藤典裕: 緑藻におけるトリアシルグリセロール蓄積のための新規誘導条件、日本植物学会第77回大会、札幌 (2013年9月13日)
22. 長谷川友里、平井一帆、佐藤淳史、都筑幹夫、佐藤典裕: 緑藻 *Chlorella* におけるトリアシルグリセロールの蓄積、日本藻類学会第38回大会、船橋 (2014年3月15日)

23. 西弘貴、辻下真貴、佐藤典裕、藤原祥子、都筑幹夫:シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 のヒ素耐性に及ぼすポリリン酸代謝の影響、日本藻類学会第 38 回大会、船橋 (2014 年 3 月 15 日)
24. 平井一帆、長谷川柚里、佐藤淳史、林泰平、都筑幹夫、佐藤典裕: 高浸透圧ストレスは緑藻クロレラのトリアシルグリセロール蓄積を誘導する、第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大 (2014 年 5 月 31 日)
24. 竹下毅、山崎誠和、大田修平、Zachleder Vilém、河野重行、クロレラ類のデンブリン・オイル蓄積とその生産性に及ぼす強光と屋外大量培養系の影響 第 66 回日本生物工学会大会 札幌コンベンションセンター、北海道、札幌市 (2014 年 9 月 10 日)
25. 山崎 誠和、大田 修平、竹下毅、佐藤聖樹、大島健志朗、服部正平、河野重行、オイル蓄積を誘導する硫黄飢餓に対する微細緑藻 *Parachlorella kessleri* のトランスクリプトーム解析 第 66 回日本生物工学会大会 札幌コンベンションセンター、北海道、札幌市 (2014 年 9 月 11 日)
26. 吉原真衣、大田修平、山崎誠和、竹下毅、許斐麻美、平田愛子、河野重行、電顕 3D で見たクロレラ類の栄養塩飢餓条件における物質の蓄積動態 日本植物形態学会第 26 回総会・大会 明治大学 生田キャンパス、神奈川県、川崎市 (2014 年 9 月 11 日)
27. 平井一帆、林泰平、長谷川柚里、佐藤淳史、都筑幹夫、佐藤典裕: 緑藻において蓄積誘導される中性脂質の解析、日本植物学会第 78 回大会、明治大、川崎 (2014 年 9 月 12 日)
28. 辻下真貴、室田知里、山下貴矢、松元寛子、西弘貴、佐藤典裕、藤原祥子、都筑幹夫: シアノバクテリアとクラミドモナスにおけるヒ素・リン酸の取り込みと代謝、日本植物学会第 78 回大会、明治大、川崎 (2014 年 9 月 12 日)
29. 室田知里、辻下真貴、藤原祥子、都筑幹夫: シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のリン、ヒ素取り込み、日本藻類学会第 39 回大会、福岡 (2015 年 3 月 21 日)
30. 平井一帆、林泰平、佐藤典弘、都筑幹夫: 光合成生物の脂質代謝解析—貯蔵脂質トリアシルグリセロールを中心として—、第 4 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム (2015 年 6 月 20 日)
31. 林泰平、平井一帆、都筑幹夫、佐藤典裕: 低温がクロレラのトリアシルグリセロール蓄積に及ぼす影響、日本植物学会第 79 回大会 (2015 年 9 月 6-8 日)
32. 大田修平、吉原真衣、山崎誠和、許斐麻美、平田愛子、河野重行: 栄養塩飢餓ストレス下のクロレラ類の高電子密度顆粒の微細構造とリンの蓄積動態、日本植物形態学会第 27 回総会・大会 朱鷺メッセ: 新潟コンベンションセンター、新潟県、新潟市 (2015 年 9 月 5 日)
33. 林泰平、平井一帆、都筑幹夫、佐藤典裕: クロレラにおけるトリアシルグリセロール蓄積—低温と混合ストレスの有効性—、第 28 回日本植物脂質シンポジウム、上智大 (2015 年 9 月 10 日)
34. 佐藤典裕、小林里美、青木元秀、小林功、都筑幹夫: 紅藻シアニディオシジムのスルホ脂質合成系遺伝子、第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大 (2016 年 3 月 18 日)

(国際会議)

1. Zachleder, V. and Kawano, S. Microalgae—novel highly-efficient producers of starch or oil. 5th European Phycological Congress, Rhodes Island, Greece, September 4-9, 2011.
2. Zachleder, V., Jitka Šítalová, Kateřina Bišová and Shigeyuki Kawano.: Comparison of starch and oil production by *Chlamydomonas reinhardtii* and other algae. Poster in The 15th International Conference on the Cell and Molecular Biology of

Chlamydomonas. Potsdam, Germany, June 5-10, 2012.

3. Itayama, S., S. Matsuzuka, Y. Hirokawa, S. Fujiwara, K. Nakanishi, and M. Tsuzuki (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.), Localization and associative strengths of acidic polysaccharides in coccoliths of *Pleurochrysis haptanemofera*. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, June 13-16, 2012.
4. Takeshita, T., Ivanov, V., Ota, S., Yamazaki, T., Zachleder, V., Kawano, S.: Starch and lipid accumulation in *Chlorella* species under high light intensity in the laboratory and outdoor mass cultures. BioTech2014 and 6th Czech-Swiss Symposium Prague (Czech Republic) 11-14 June, 2014.
5. Ivanov, V., Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Kawano, S., Zachleder, V., Bisova, K.: Production of lipids and starch in *Parachlorella kessleri*. BioTech2014 and 6th Czech-Swiss Symposium Prague (Czech Republic) 11-14 June, 2014.
6. Ota, S., Oshima, K., Yamazaki, T., Kim, S., Yu, Z., Yoshihara, M., Takeda, K., Takeshita, T., Hirata, A., Bišova, K., Zachleder, V., Hattori, M., and Kawano, S.: The *Parachlorella* genome provides insight into trebouxiophycean evolution and oil production traits for biofuel potential 6th European Phycological Congress (EPC6), London (UK) 25 August, 2015.

(4)知財出願

①国内出願 (3件)

1. 細胞観察装置、細胞観察方法及びそのプログラム、大矢禎一・河野重行・野上識・大貫慎輔・大田修平・渡辺光一、出願人:(独)科学技術振興機構、2012年11月28日、特願2012-259880
2. 長鎖脂肪酸生産藻類及びそれを用いた長鎖脂肪酸生産方法、河野重行・山崎誠和・大田修平・鴻巣絵梨香・竹下毅・阿部知子・風間祐介、出願人:東京大学、2014年7月25日、特願2014-152376
3. カロテノイドの大量生産方法、河野重行・山崎誠和・大田修平・竹下毅・宮下英明、出願人:東京大学、2014年12月22日、特願2014-259462

②海外出願 (3件)

1. 細胞観察装置、細胞観察方法及びそのプログラム、大矢禎一・河野重行・野上識・大貫慎輔・大田修平・渡辺光一、出願人:(独)科学技術振興機構、2013年11月27日、PCT/JP2013/081894、
2. 長鎖脂肪酸生産藻類及びそれを用いた長鎖脂肪酸生産方法、河野重行・山崎誠和・大田修平・鴻巣絵梨香・竹下毅・阿部知子・風間祐介、出願人:東京大学、2015年7月24日、PCT/JP2015/071156
3. カロテノイドの大量生産方法、河野重行・山崎誠和・大田修平・竹下毅・宮下英明、出願人:東京大学、2015年12月22日、PCT/JP2015/085796

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 日本藻類学会研究奨励賞「細藻類を用いたバイオ燃料増産株作出に関する基礎研究と新技術開発」大田修平、2014年3月16日

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 日経産業新聞
Tech フォロンティア 「藻で次世代燃料(下)」100万種から宝探し
2012年9月14日
2. 日刊工業新聞

「藻類細胞内にオイル蓄積 東大、3Dで微細観察」

13 面 科学技術・大学、2013 年 1 月 15 日

3. 日本経済新聞

Science & Tech. フラッシュ「油をためる藻類 仕組みを解明」

14 面 科学技術、2013 年 1 月 22 日

③その他

1. Wayama et al. PLoS ONE, 8: e53618 (2013)の論文発表のプレスリリースに以下のインターネット配信があった。

1) プレス発表 (発表主体: 東京大学) 「細胞を丸ごと一個 3D に」
http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/22_entry176/ 2013 年 1 月 12 日

2) 時事ドットコム(時事通信)「藻類の精密な立体画像＝ミクロの「CT」技術開発－産業利用加速に期待・東大」 http://www.jiji.com/jc/c?g=soc_30&k=2013011200222
2013 年 1 月 12 日

3) 日刊工業新聞 Business Line「東大、藻類のオイル蓄積を微細に観察する技術開発」
<http://www.nikkan.co.jp/news/nkx0720130115eaai.html> 2013 年 1 月 15 日

4) マイナビニュース「東大、超薄連続切片技術と3D画像再構築技術で藻類の細胞内の変化を明らかに」 <http://news.mynavi.jp/news/2013/01/16/185/> 2013 年 1 月 16 日

5) 日本経済新聞 Web 刊 「東大、藻類が油をためる仕組みを解明」
http://www.nikkei.com/article/DGXNASGG1400J_R20C13A1TJM000/ 2013 年 1 月 21 日

2. さきがけ研究者(蓑田歩氏)との共同研究で、以下のようにプレスリリース(硫酸性紅藻が強酸性条件下でレアアースを効率的に回収する、筑波大学、産業技術総合研究所、大阪大学、JST、2014 年 10 月 1 日)した。ただし、蓑田氏が中心の研究成果であり、学術的には、下の論文で発表した。

Minoda, A., Sawada, H., Suzuki, S., Miyashita, S., Inagaki, K., Yamamoto, T., Tsuzuki, M.: Recovery of rare earth elements from sulfothermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria* using aqueous acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1513-1519 (2015) (DOI: 10.1007/s00253-014-6070-3)

3. 微細藻類の固相表面連続培養系の実用化を目指して、建設、化学等の複数の企業4社(内 1 名は個人の形)及び東大、東薬大、茨城大の間での情報交換会を主に東京薬科大学で月に1回程度開催している。

4. 微細藻類ゲノム解析進捗月例報告会を東京大学・新領域・生命棟とオーミクスセンターで持ち回り開催している。

5. 教育研究に資するため、次の記事も執筆した。都筑幹夫、藤原祥子、佐藤典裕、岡田克彦、“微細藻類における光合成の無機炭素固定と石灰化—環境応答植物学研究室における最近 10 年間の研究報告—”、東京薬科大学研究紀要 18: 19-25, 2015

6. Ota et al. *Biotechnol. Biofuels*. 9, 13 (2016)のゲノム論文をプレスリリースしたところ以下のような反響があった(2016 年 1 月 26 日～2 月 1 日)。

1) J-Net21(中小機構)、「高オイル産生クロレラの全ゲノム解読に成功～オイル産生機構の解明と応用研究の加速に期待～」

<http://j-net21.smrj.go.jp/headline/report/234973.shtml>

2) 日本の研究.com「高オイル産生クロレラの全ゲノム解読に成功 — オイル産生機構の解明と応用研究の加速に期待—」 <https://research-er.jp/articles/view/42725>

3) セキュリティーオンラインニュース「高オイル産生クロレラの全ゲノム解読に成功」 科学技術振興機構 <http://ssanet.biz/?p=46624>

4) 日経バイオテク ONLINE(日経 BP 社)「東京大学、科学技術振興機構、高オイル産生クロレラの全ゲノム解読に成功」

- <https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/release/16/01/27/00501/>
- 5) 日経プレスリリース「東大、高オイル産生クロレラの全ゲノム解読に成功」
<http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=405020&lindID=5>
 - 6) 2チャンネルニュース速報+ナビ「【遺伝学/観察技術】高オイル産生クロレラの全ゲノム解読に成功 オイル産生機構の解明と応用研究の加速に期待」
<http://www.2nn.jp/scienceplus/1453897833/>
 - 7) 環境展望台「東京大など、高オイル産生クロレラの全ゲノム解読に成功」
<http://tenbou.nies.go.jp/news/jnews/detail.php?i=17975>
 - 8) 科学ちゃんねるニュース「バイオ燃料のクロレラ 全ゲノム解読に成功 燃料を生む仕組みの解明と応用研究の加速に期待」
<http://kagaku-ch.blog.jp/archives/1051001427.html>
7. Ota et al. Sci. Rep. 6, 25731 (2016) のポリリン酸論文をプレスリリースしたところ以下のような反響があった(2016年5月16日~6月2日)。
- 1) 環境展望台(国立環境研究所)で「東京大など、リンを高蓄積するクロレラを発見」として紹介
<http://tenbou.nies.go.jp/news/jnews/detail.php?i=18955>
 - 2) MOTOR CARS.jp で「東京大学大学院、地上で失われつつあるリンの水中回収に目処」として紹介
<http://motorcars.jp/prospect-university-of-tokyo-in-the-water-recovery-of-phosphorus-that-is-being-lost-in-the-ground20160518>
 - 3) 日本の研究.com で「東京大学 プレスリリースアクセスランキング(21位)」として紹介
<https://research-er.jp/ranking/article/institution:1511>
 - 4) イマコトで「東大、クロレラが硫黄源欠乏ストレスを受けると細胞内にリンを高蓄積することを解明」として紹介
<http://ima-koto.city-walk.com/detail/46403/>
 - 5) バイオ塾Blogで「リンを高蓄積するクロレラ 一地上から失われつつあるリンの水中での回収に期待」として紹介
<http://plaza.rakuten.co.jp/bio21/diary/201605190000/>
 - 6) 日立ハイテク SI NEWS フェイスブック「蓄積場所の調査に用いられた透過電子顕微鏡 HT7700 の紹介付き」として紹介
 - 7) 早稲田大学・大竹先生より「リンの事典」の執筆依頼

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・ 2015年2月6日に東京で開催された新技術説明会(JST主催)で「微細藻類生理状態モニタリングシステム」というタイトルで発表し、好評であった。
- ・ 企業とのマッチングを模索する一方で自らベンチャーの起業を希望する研究参加者もいるのでSTARTに応募し、27年度下期~28年度末までの助成が決った。(河野グループ)

②社会還元的な展開活動

- ・ 得られた成果のうちヘマトコッカスの電顕3Dに関して、第9回 科学技術の「美」パネル展に出展し、パンフレットに掲載された。
- ・ 高校生物の生物総合資料として定評のある実証出版の『サイエンスビュー』にコラムとして「藻類バイオとは何かー微細藻類の物質生産ー」が採用された(長野敬・牛木達男監修、実教出版、pp. 280-281. (2014))。
- ・ 先の総合資料の反響もあって、茨城県立竹園高校のサイエンスゼミ「藻類バイオとは何か？」を東京大学・新領域・生命棟で開催した。クロレラからオイルを抽出する実験などが大変好評であった。

- Todai Research に「バイオ燃料」が提言として Editor's Choice された。
(<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/todai-research/editors-choice/biofuel/>)
- VISIBLE QUESTIONS 2014 にも選考された
(<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/projects/vq2014/vq11.html>)
- 英語版のウィキペディアに動画が掲載される。
(https://en.wikipedia.org/wiki/Haematococcus_pluvialis)
- 「アートな科学」に画像が採択された。
(<http://www.jst.go.jp/extra2.html>)
(<http://www.jst.go.jp/extra/150722.html>)
- 本研究成果はインターネット(URL; <http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pls/index.html>)で公開し、一般に情報提供している。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011年7月 23日～24日	チーム内ミーティング (非公開)	青梅「かんぼの宿」	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年8月 27日～28日	チーム内ミーティング (非公開)	青梅「かんぼの宿」	12人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年1月 16日	チーム内ミーティング (非公開)	東京大学 新領域・生命棟	13人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年8月 27日	チーム内ミーティング (非公開)	東京大学 新領域・生命棟	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年9月 13日	シンポジウム「アルガルセックス:有性生殖と生活環制御が切り拓く藻類バイオの新戦略」	日本植物学会第77回大会、北海道大学 高等教育推進機構、札幌市	80人	藻類バイオの研究戦略の紹介と他分野との学融合を目指したシンポジウム
2013年11月 9日	メンデル講演会「藻類バイオとは何か？」	下諏訪総合文化センター	30人	一般市民に藻類バイオとは何か講演した。
2014年 1月21日 2月24日 4月7日 5月30日 12月2日	産学ミーティング (非公開)	東京薬科大学	15人	藻類培養とA-STEPに関する情報交換会
2014年10月 8日～9日	チーム内ミーティング (非公開)	青梅「かんぼの宿」	14人	研究進捗報告のためのミーティング
2015年7月 27日～28日	茨城県立竹園高校サイエンスゼミ「藻類バイオと	東京大学 新領域・生	18人	クロレラの顕微鏡観察とオイルの抽出実際にやってみて

	は何か？」	命棟		好評だった。
2015年8月7日～8日	チーム内ミーティング (非公開)	青梅「かんぼの宿」	13人	研究進捗報告のためのミーティング

§6 最後に

研究の目標等から見た達成度: タイトルは「微細藻類の倍数化と重イオンビーム照射によるバイオ燃料増産株作出に関する新技術開発」で、本プロジェクトは「倍数化」と「重イオンビーム照射」を売りの効用を意識した研究目標になっている。「新技術開発」というのがそのことをよく表している。研究期間中に国内特許および国外特許を複数出願することが出来た。また、重イオンビーム照射株については、今も相当数の企業からも問い合わせがあり、「重イオンビーム照射」と「新技術開発」に関しては大きな成果を上げられたと考えている。

得られた成果の意義等の自己評価: 重イオンビーム照射によるバイオ燃料増産株の作出が優れているのは、得られた株を直ちに戸外の実証実験に出せることにある。微細藻類の培養には微妙な点も多いし、S欠誘導を掛けるような場合、実験室の数値がそのまま戸外で出せるものでもない。戸外の大型培養槽で結果を出せなければ、社会的・経済的なインパクトはないだろう。チェコとの共同研究でオイル含有量 66%という数値を出せたのは大きな成果である。27年度に「屋外大量培養と遺伝子解析」に関する提案が承認され、東京大学柏キャンパスの生命棟屋上に屋外大量培養装置が設置できた。日本の季節や風土の中でクロレラの大量培養を是非とも成功させたい。

今後の研究の展開: ヘマトコッカスとクロレラの全ゲノム解析を完了させた。クロレラの全ゲノム解読については 2016 年 1 月に国際誌に発表済みである。全ゲノム解読は完了したが、微細藻類のゲノム構造にはこれまで予想しなかった特徴があるかも知れない。重イオンビームを照射した場合、ゲノムの著しい欠失や損傷に関わらず、増殖性に優れたオイル蓄積株をスクリーニングすることができるし、オイルを細胞外に出しやすい性質やS欠誘導しなくともデンブンプやオイルを蓄積する株、悪環境でも死滅しないロバスト(頑強な)株など特徴的な変異体も多数単離できている。問題は重イオンビーム照射に“gain of function”的な効果(機能獲得効果)があり、これがクロレラの内部倍数性と関わっていきそうなことである。有性生殖能を失い減数分裂しないはずのクロレラに減数分裂関連遺伝子のほとんどが残されていて発現量も十分あることと絡めてクロレラのゲノムの謎を解明したと考えている。

研究代表者としてのプロジェクト運営について(チーム全体の研究遂行、研究費の使い方等): 本プロジェクトのコアは、東京大学・柏キャンパスにあって、大学院新領域創成科学研究科(河野グループ)と研究科付属のバイオイメージングセンター(大矢グループ)とオーミクス情報センター(服部グループ)とで形成されている。これに重イオンビーム照射は和光市にある理化学研究所で、企業との連携は八王子市の東京薬科大学(都筑グループ)が担当した。地理的にコンパクトにまとまっており、顔を合わせての研究打ち合わせが可能だったので、プロジェクト運営は比較的うまくいったと評価できる。研究費に関しては、「研究加速案件の追加配賦承認」や「国際強化支援にかかる追加的支援」などによって、研究進捗と必要度に応じた支援がなされていたので、研究が加速できるとともに、大きなインセンティブとなった。「国際強化支援にかかる追加的支援」ではこれによってチェコとの国際共同研究が動き出し大きな研究成果をあげることができた。

その他: 研究期間中にメンバーが一堂に会したチーム内ミーティングは計6回開催し、そのうち4回は青梅「かんぼの宿」で合宿し研究方針を話し合った(写真1)。また、アウトリーチ活動の一環として、高校生のサマーセミナーでクロレラからオイルを抽出する実験をやったと好評だった(写真2)。「屋外大量培養と遺伝子解析」に関する提案が承認され、東京大学柏キャンパスの生命棟屋上に屋外大量培養装置が設置できた。また、PK4などの重イオンビーム照射したオイル増産株のゲノム解析が可能となった(写真3)。



写真1 2014年10月8日～9日に開催のチーム内ミーティング、合宿会場となった青梅「かんぼの宿」の看板前での記念撮影、研究グループの長が勢揃いしている。

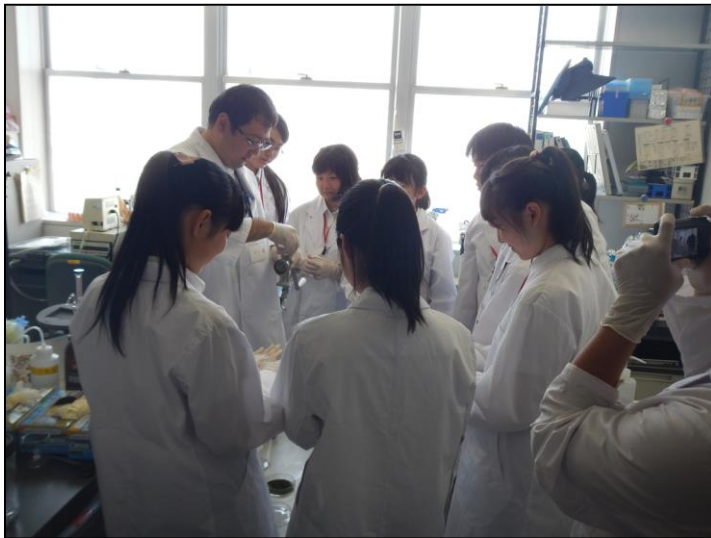


写真2 2015年7月27日～28日に開催の茨城県立竹園高校サイエンスゼミ「藻類バイオとは何か？」の一课、大学院生がクロレラを破碎してオイルを抽出する方法を説明している。



写真3 東京大学柏キャンパスの生命棟屋上に設置された150Lタイプの屋外大量培養装置、雨天でも運転できるようフード付きになっている。遠景から屋上であることがわかる。