

研究報告書

「高脂質含有円石藻 *Pleurochrysis carterae* の形質転換技術の確立と有用脂質高生産に向けた応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 遠藤 博寿

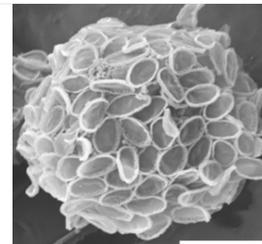
1. 研究のねらい

海洋微細藻円石藻(ハプト植物門)には、細胞内に油滴を形成し脂質を著しく多く貯蔵するものや、現在利用されている化石燃料のもとになった特殊な脂質を生産するものなどがあり、近年では海洋環境学のみならずバイオエネルギー研究の観点からも注目を集めている。また、円石藻は、細胞表面にココリス(円石)と呼ばれる炭酸カルシウムの微結晶をもち、このココリス形成と光合成を介して海洋の炭素循環に大きな影響を及ぼす重要な一次生産者であるという一面を持つ。さらに、近年ではココリスの光学特性の研究が進められ、新たなナノデバイス開発の観点からもその重要性が見直されている。しかしながら、これまでこの藻類においては、高度かつ先進的な研究を遂行する上で不可欠な、遺伝子導入の技術が確立されていない。そこで、本研究では、まず、同種の形質転換技術の確立を行い、その技術を軸に、脂質代謝系および炭酸カルシウムの蓄積機構の解析を目的とした。

2. 研究成果

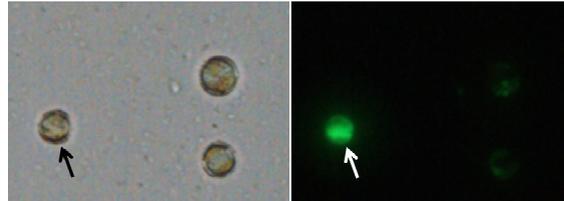
(1) 概要

円石藻は世界中の海に広く分布する微細藻であり、細胞表面にココリスと呼ばれる炭酸カルシウムを蓄積させ、海洋の炭素循環にも大きく寄与する生物群である。中でも研究対象種である *Pleurochrysis carterae* は、脂質の含有量が高く、屋外での長期にわたる大量培養が可能なることから、次世代のバイオエネルギーの原材料として期待されている(図1)。



〈図1 *Pleurochrysis carterae*〉

円石藻の細胞は、図1に見られるように、強固に石灰化したココリス(円石)と呼ばれる鱗片状の構造で覆われている。これまで、ハプト植物門において遺伝子導入実験の成功例が皆無である要因はこの特殊な細胞壁が外来物質の導入を妨げているためであると考え、まずこれらの細胞壁を除去し、プロトプラストを調整する方法の開発を行った。その結果、ProteinaseK および低浸透圧溶液処理により、大量のプロトプラストを短時間で調製できることを見出した。さらに、このプロトプラストは、低浸透圧溶液から通常の培地に戻すことで、数日間で再び細胞増殖期に入ることから、遺伝子導入、特に形質転換体の作出に適していると考え、さらに一過性発現系および形質転換系の開発を進めた。一過性発現系には、GFP(green fluorescent protein)および GUS(beta-glucuronidase)をマーカーとして用い、



〈図2 GFPを発現する円石藻〉

PEG(polyethylene glycol)により、その遺伝子の導入を試みた。その結果、効率はやや低いものの、両方のマーカー遺伝子の発現をタンパク質レベルで確認することに成功した(図2)。さらに、抗生物質ハイグロマイシン耐性遺伝子(*Aph7*)を用いて形質転換体の取得を試みた。一過性発現と同様、PEG を用いて発現コンストラクトを導入し、液体およびプレート培地で選抜を行った結果、約 $7/10^6$ 細胞程度の効率で、形質転換体の取得に成功した。さらに、この遺伝子導入の技術を用いることにより、ココリスに含まれるタンパク質をコードする遺伝子の発現抑制に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「*Pleurochrysis carterae* の一過性発現系の開発」

一過性発現系における発現用コンストラクトは、pBI221 をベースに、プロモーターとして *P. carterae* の FCP (*fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein*)、EF-1 (*elongation factor-1*)、CSAP-1 (*coccolith scale associated protein-1*) の上流配列、レポーターとしてコドン改変がなされた GUS (*-glucuronidase*) である PyGUS、および NOS (*nopaline synthase*) ターミナータを組み込んだものをそれぞれ作製した。これらを *P. carterae* の無処理の細胞、またはプロトプラストに、エレクトロポレーション、ポリエチレングリコール(PEG)、パーティクルガンおよび silicon carbide whisker を用いて細胞内に導入を試みた。さらに細胞を2日間培養後、藻体を回収し、RT-PCR および GUS 染色を用いて GUS 遺伝子の発現を調べた。上述の組み合わせのうち、FCP のプロモーターを含むコンストラクトを PEG でプロトプラストに導入した実験区、およびパーティクルガンを用いて無処理の細胞に導入を行った実験区において mRNA レベルでの発現が確認された。また、PEG の実験区においては、EF-1 のプロモーターを含むベクターでも微弱ながら発現が確認された。また、PEG の実験区においては、効率は低いものの、GUS 染色陽性の細胞が確認された。以上の結果により、円石藻 *P. carterae* における外来遺伝子の一過性発現系の確立が達成された。

研究テーマ B「*Pleurochrysis carterae* の形質転換系の確立」

形質転換系においては、発現用コンストラクトとして、pBI221 をベースに、プロモーターとして *P. carterae* の FCP (*fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein*) の上流配列、薬剤耐性遺伝子として、コドン改変がなされた *Aph7* (hygromycin 耐性遺伝子) である PyAph7、および CrRbcS (*Chlamydomonas reinhardtii RbcS*) ターミナータを組み込んだものを作製した。次に、プロトプラストを調整し、ポリエチレングリコール(PEG)を用いて上記のコンストラクトを *P. carterae* 細胞内に導入した。変異株の選抜は、通常の培地で3日間培養を行った後、hygromycinB を含む液体培地において4週間、さらにプレート培地において4週間行った。次に、選抜された変異株のコロニーを非選択培地に移し、2か月間培養を行った後、RT-PCR とサザンブロット解析により、外来遺伝子の発現と遺伝子型の解析を行った。その結果、得られた10株の変異株すべてにおいて、PyApy7の発現が確認された。また、これらのうちの7株についてサザンブロット解析を行った結果、すべての株において外来遺伝子の挿入を示すシグナルが確認され、形質転換効率は 10^6 細胞あたり約7細胞であると算出された。以上の結果により、外来遺伝子のゲノムへの挿入、mRNA および機能を持つタンパク質の発現が確認さ

れ、円石藻 *P. carterae* における外来遺伝子の形質転換系の確立が達成された。

研究テーマ C「ココリス形成に關与する遺伝子の機能解析」

円石藻による大規模な炭酸固定は海洋の炭素循環に大きな影響を及ぼすが、その分子機構の詳細は不明である。そこで、本研究では、ココリスに含まれる基質タンパク質を同定し、形質転換技術を用いて恒常的発現抑制株の作出を試みた。その結果、基質タンパク質遺伝子の発現抑制により、正常なココリス形成能を失った株の取得に成功し、ココリス形成の分子機構の一端を明らかにすることに成功した。

3. 今後の展開

これまでハプト植物門において遺伝子導入の成功例が皆無であった要因は、その特殊な細胞壁の構造に依るところが大きいと思われる。本研究で開発したプロトプラストの調製法は、強力な内在性プロモーターの発見とともに、他のハプト藻類への応用が期待されるものである。また、本技術は外来遺伝子の強制発現に限らず、内在性遺伝子の機能解析にも応用可能であることが示された。クラミドモナスや珪藻等、他の微細藻の例でも明らかなように、形質転換技術の開発は分子生物学的研究のみならず、生化学・生理学的研究諸分野の発展を強力に促すものである。そのため、本研究で開発された技術は、ハプト藻研究における大きな技術革新につながるものと期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

現在の海洋は、珪藻・渦鞭毛藻・円石藻という 3 種の微細藻類により優占されており、これらは海洋における主要な一次生産者である。これまで、前者の 2 類については、90 年代の後半に、すでに形質転換技術の確立が報告されている。そのため、本研究は、その後の約 20 年間なし得なかった技術開発に初めて成功したものであり、その点は高く評価できると考えている。その一方、本研究の期間内では、代謝改変による有用変異株の作出には至らなかった。しかしながら、今回開発した技術は、再実験を数多く重ね、再現性を完全に確認してから発表するものであり、今後、世界中の多くの研究者に利用されうるものであると自負している。変異株の作出と、その大量培養の実行にはまだ少し時間を要するが、それらの実現への基盤技術を開発した意味では、科学技術への波及効果は大きいであろうと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

本研究は、円石藻における形質転換技術の確立を軸に有用脂質を生産する品種を確立する目的で開始された。研究を開始した当初は、円石藻を含むハプト植物門全体において、同技術が適用できる種は皆無であった。その点では本研究で *Pleurochrysis carterae* 種において技術開発に成功した成果は、科学技術の発展への貢献という意味で非常に大きく評価できる。また、後半は GREST のグループとの共同研究で全ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析といったより大規模な研究を展開し、成果を出しつつあるため、研究実施体制の管理や研究

費の執行についても堅実に行っていると評価できる。一方で、開発した技術の応用利用に関しては今後の課題であり、本研究で開発された技術が多くの研究者に利用されることを期待したい。また、本研究で研究対象とした *P. carterae* 種は円石藻の中でも屋外での長期大量培養の実績がある貴重な種である。そのため、同種の代謝改変による有用脂質形成種が確立されれば、海洋性微細藻を用いたエネルギー生産の実用化への大きな手掛かりとなることが予想され、社会・経済への波及効果も大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hirotoishi Endo, Megumi Yoshida, Toshiki Uji, Naotsune Saga, Koji Inoue & Hiromichi Nagasawa. Stable Nuclear Transformation System for the Coccolithophorid Alga *Pleurochrysis carterae*. Scientific Reports 6, Article number: 22252 (2016)

(2) 特許出願

該当なし。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 学会発表(平成 26 年度日本水産学会大会口頭発表)

「円石藻 *Pleurochrysis carterae* における形質転換技術の確立」

2. プレスリリース

「脂質含有量が多い海洋性微細藻類、円石藻の形質転換に成功
～脂質合成能力の強化によるバイオ燃料生産に期待～」(2016 年 3 月 7 日)