

図2. 海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株のオイル蓄積の様子。(A) オイル蓄積誘導前, (B) 誘導後。

一方、トリグリセリドのもっとも高い含有量を有する株として海洋珪藻 *Fistulifera* 属 JPCC DA0580 株が得られている²⁾。同株は乾燥重量あたり60%のトリグリセリドを蓄積する。これら海洋微細藻類の乾燥藻体の熱量は、25.8 MJ/kg (炭化水素生産株)、26.9 MJ/kg (トリグリセリド生産株)であり、石炭の熱量(約27 MJ/kg)とほぼ同等の値を示しており、固形燃料としても有用であると考えられる。一般的には、トリグリセリドは軽油の代替燃料(バイオディーゼル燃料)として用いられている。トリグリセリドをバイオディーゼル燃料として用いる際には、アルカリ触媒とメタノールを添加して脂肪酸メチルエステルに変換して用いられる。また、トリグリセリドから直接軽油として利用可能な短鎖の炭化水素への変換方法として、触媒を用いた水素化や熱分解法等が検討されている。JPCC DA0580株から生産されるバイオディーゼル燃料は、炭素数16のパルミチン酸、パルミトレン酸から成る脂肪酸メチルエステルが全体の76%を占める。多くの高等植物が有するトリグリセリドの脂肪酸は炭素鎖18を主成分とするが、微細藻類には異なる組成のものも多い。今後、微細藻類から得られるバイオディーゼル燃料の有効性を実証していく必要がある。

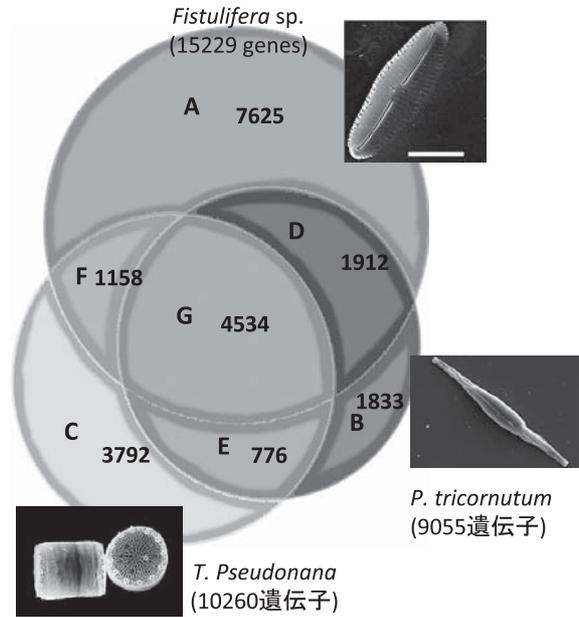


図3. 海洋珪藻 *Fistulifera* sp. JPCC DA0580 株と近縁種との比較ゲノム解析。A, B, C:各珪藻株での独自性の高い遺伝子。D, E, F:珪藻2株間で共通性の高い遺伝子。G:珪藻3株間で共通性の高い遺伝子。

ゲノム情報を利用した バイオ燃料生産性向上への取り組み

海洋珪藻は生態学、地質学的な興味から多くの研究がなされており、これまでに2株の珪藻の全ゲノム解析が報告されている^{3,4)}。ただし、これら2株のトリグリセリド蓄積は20%(w/w)に満たないものである。そこで、前述のトリグリセリド高含有株であるJPCC DA0580株の全ゲノム解読に着手し、比較ゲノム解析に基づくトリグリセリドの蓄積メカニズムの解明、および、生育が著しく阻害されるストレス条件に依存しないトリグリセリドオイル高生産株の創出に着手している(図3)。これまでにJPCC DA0580株の次世代シーケンサを利用した全ゲノム解読、遺伝子発現解析により、トリグリセリド高蓄積に関わる生物学的因子の探索に取り組んでいる⁵⁾。また、分子育種によるバイオ燃料生産の向上を推し進め、その生産性の理論限界の把握を目指している。

微細藻類の細胞内へのオイル蓄積は、栄養枯渇条件、あるいは細胞増殖が停止するようなストレス条件下において開始することが知られている(図2)。たとえば、培地中の窒素源や鉄イオン、リン酸イオンなどが欠乏した条件において中性脂質蓄積量が増加するが、これらの応答は微細藻類の属、種間によっても大きく異なる。これらのストレス条件下における中性脂質合成の誘導メカニ

ズムについてはいまだ十分に解明されていない。微細藻類による中性脂質生産性向上に向けて、中性脂質合成の誘導メカニズムを理解することが極めて重要であり、全ゲノム解析を始めとするオミクス解析が有効な手法として考えられる。これまでに、真核微細藻類のゲノム情報はドラフトシーケンスのものも含めると、20株近く報告されている⁶⁾。そのうち、バイオ燃料生産株で、ゲノム情報が公開されているのは緑藻 *Botryococcus braunii*⁶⁾ と *Chlorella variabilis*⁷⁾ である。一方、バイオ燃料生産株としてすでにパイロットプラントレベルでの培養が行われている緑藻 *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, 真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* を含む21株について現在ゲノム解析が進行中であり、今後ますます微細藻類に関する基礎的知見が蓄積されていく事が期待される。

遺伝子組換え系の構築

藻類からのバイオ燃料生産を効率化するには、遺伝子組換え技術が担う役割は大きい。これまでに原核藻類である藍藻においてはホスト株の選定やベクター系の構築など遺伝子組換え技術は汎用的な手法となってきた。一方で、バイオエタノールやバイオディーゼル燃料への応用が期待される真核微細藻類や大型藻類における遺伝子組換えの成功例は極端に少ない。真核微細藻類の遺伝子組換えに関する研究は、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* をモデル生物として進められてきた。1988年に *C. reinhardtii* の葉緑体に外来遺伝子を導入する方法が報告され、植物における葉緑体の遺伝子組換えの初めての成功例となった。このとき、外来遺伝子を含むDNAをナノ微粒に固定化し、細胞内に撃ち込むパーティクルガン法が利用されたが、現在微細藻類の形質転換でもっとも汎用的な方法となっている。近年、ケイ酸質の外殻で覆われた珪藻への遺伝子組換えに関する研究は、1996年に羽状珪藻の一種である *Phaeodactylum tricorutum* の遺伝子組換え技術が確立して以来、現在までに *Thalassiosira pseudonana* や *Navicula saprophila* など、計6種の珪藻の遺伝子組換え系が報告されている(表1)。珪藻への遺伝子導入方法もパーティクルガンを用いた方法であり、その高効率化が望まれている。しかしながら、いずれの方法においても形質転換効率は $10^{-6} \sim 10^{-5}$ と低く、真核微細藻類における遺伝子組換え系の汎用化への大きな障壁となっている。さらに、導入した遺伝子の発現効率と形質転換効率を上昇させるため、最適なプロモーターの選択が行われている。これまでに、珪藻、緑藻、紅藻を含む30株以上の微細藻類において遺伝子導入の報告がなされている(表1)。これらの微細藻

表1. 遺伝子組換え系が確立している真核微細藻類

	核	葉緑体
珪藻		
<i>Cyclotella cryptica</i>	+/-	+/-
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	+/-	+/-
<i>Navicula saprophila</i>	+/-	+/-
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	+/-	+/+
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	+/-	+/-
<i>Fistulifera</i> sp.	+/-	-/-
緑藻		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	+/+	+/+
<i>Chlorella</i> spp.	+/-	+/-
<i>Dunaliella</i> spp.	+/-	+/+
<i>Haematococcus pluvialis</i>	+/-	+/-
<i>Volvox carteri</i>	+/-	+/-
渦鞭毛藻		
<i>Amphidinium</i> sp.	+/-	+/-
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	+/-	+/-
紅藻		
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	+/-	+/+
<i>Porphyridium</i> sp.	-/+	+/-
ブラシノ藻		
<i>Ostreococcus tauri</i>	-/-	-/-
ユーグレナ藻		
<i>Euglena gracilis</i>	-/+	+/-
真正眼点藻		
<i>Nannochloropsis oculata</i>	+/-	+/-

ノックイン/ノックダウン

類の核ゲノムへ遺伝子導入をおこなった場合、通常導入遺伝子は核ゲノム中ヘランダムに挿入される。緑藻 *C. reinhardtii* においては、効率は低いが葉緑体ゲノムおよび核ゲノムへの相同性組換えが行われている。核ゲノムの遺伝子ノックダウンはRNA干渉を利用した方法が用いられており、*C. reinhardtii* および珪藻 *P. tricorutum* において複数の報告例がある⁸⁾。筆者らはパーティクルガン法を用いて、高いトリグリセリド蓄積能を有する *Fistulifera* 属 JPCC DA 0580 株の形質転換を行い、導入遺伝子を安定に保持、発現する組換え体の作出に成功した。また、さまざまなプロモーターを検討した結果、内在性プロモーターを用いた場合にもっとも高い形質転換効率が得られることが確認されている。現在、オミクス解析により得られた情報を基に、これまで基礎的知見が乏しかった藻類の代謝モデルが構築されつつあり、遺伝子組換え技術と組み合わせる事ですでにバイオ燃料生産株として用いられている藻類のさらなる高機能化が期待される。

おわりに

我が国は海洋資源大国であり、メタンハイドレートやレアメタルなどの天然資源の他、陸上にはない特殊環境下で生息する多種多様な海洋生物資源を保有している。その恩恵により、さまざまな元素の取り込みに始まり、遺伝子発現、代謝パスウェイから成り立つ一連のカスケードを理解することで、医薬品・化成品・エネルギー開発に繋がる有用物質生産が可能である。近年、次世代シーケンサをはじめとする遺伝子解析支援ツールの登場やデータベースの充実により、遺伝資源による有用物質生産技術の開発は加速の一途をたどっており、システムバイオロジーに基づく物質生産時代が到来している。

トリグリセリドの藻体内への蓄積は、特定のストレス条件下で促進されるが、同条件下で藻体の生育は著しく抑制される。つまり、正味のトリグリセリド生産性は、恒常性を保つように調節される傾向にある。これを打開するためには、恒常性を調節した微細藻類を作出する必要

があり、遺伝子組換え技術が担う役割は大きい。また、遺伝子組換え技術を利用してバイオ燃料の生産効率を向上させるアプローチには、いくつか道筋がつけられているが、その対象となる微細藻類のゲノム配列に関する知見は非常に乏しいのが現状である。ゲノム情報の蓄積が進めば、より効率的にバイオ燃料を生産する遺伝子変異株を設計可能になると期待される。

文 献

- 1) Matsunaga, T. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **31**, 1367 (2009).
- 2) Matsumoto, M. *et al.*: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **161**, 483 (2010).
- 3) Armbrust, E. V. *et al.*: *Science*, **306**, 79 (2004).
- 4) Bowler, C. *et al.*: *Nature*, **456**, 239 (2008).
- 5) Tanaka, T. *et al.*: *Photosynth. Res.*, **109**, 223 (2011).
- 6) <http://www.jgi.doe.gov>.
- 7) Blanc, G. *et al.*: *Plant Cell*, **22**, 2943 (2010).
- 8) Posewitz, C. *et al.*: *Eukaryot. Cell*, **9**, 486 (2010).