

藻類バイオマス評価： クロレラの物質生産能を電顕3Dとゲノムで解析する

大田 修平*・河野 重行

藻類は、30億年前に嫌氣的地球環境を好氣的な大気につくり変え、その後の生命の進化に大きく寄与した¹⁾。藻類は多様性に富み、真核生物を大きく分けた7つの巨大系統群（スーパーグループ）のうち、オピストコンタとアメーボゾアを除く5つの系統群にまたがっている²⁾。最近、藻類の多種多様な高付加価値物質生産能に着目し、有用な機能をもつ未活用資源生物群として利活用され始めている。

トレボウクシア藻綱は緑色植物門の一つのグループであり、生活環を通じて不動性で、有性生殖は知られていない³⁾。クロレラ属はトレボウクシア藻綱のなかでもよく知られた藻類で、バイオマス生産効率が優れている種が多い。本稿では、*Parachlorella kessleri*のゲノム情報⁴⁾に基づき、オイル蓄積条件でのトランスクリプトームの変動と電顕3Dによる細胞内オイル生産評価について紹介する。

バラクロレラゲノムの概要

クロレラの最初のゲノムは、*Chlorella variabilis*で報告された⁵⁾。*C. variabilis*はミドリゾウリムシの細胞内に共生するクロレラで、培地中の無機塩類のみで生育することはできない特殊なクロレラである。一方、*Parachlorella kessleri*は、完全に独立栄養条件で生育することができ増殖能も優れている⁶⁾。*Parachlorella*属は、最近まで*Chlorella*属の中に含まれていたが、形態的特徴と分子系統解析に基づき、*Chlorella*属から独立

させ*Parachlorella*属と呼ばれるようになった⁷⁾。社会的、歴史的な背景を踏まえ、本稿では*Chlorella*属と*Parachlorella*属をまとめて「クロレラ」と呼ぶ。

*P. kessleri*は独立栄養条件で生育できるクロレラで最初にゲノム配列が報告された(表1)。*P. kessleri*ゲノム解読プロジェクトでは、454シーケンシングにより27.8×のシーケンスカバレッジの情報が得られた。解析の結果、5168個のコンティグから400個のスカフォールドがまとめられた。核ゲノムは62.5 Mbpと推定され、13,057遺伝子が同定された。もっとも近縁な*Chlorella variabilis*のゲノムサイズは46.2 Mbp、遺伝子数は9791である⁵⁾。遺伝子数は*P. kessleri*の方が単純に比較しただけでも、3266個も多い。また、近縁なトレボウクシア藻であるココミクサ(*Coccomyxa subellipsoidea*)や条件的従属栄養クロレラの*Auxenochlorella protothecoides*と比較しても遺伝子数は多い(表1)。*P. kessleri*は、クロレラの代表的な種である*C. vulgaris*と同じく、産業的に利用可能なクロレラである。解読されたゲノムは基礎から応用分野まで多方面の研究者に利用されることになるだろう。

硫黄欠乏条件でのトランスクリプトームの変動

クロレラは増殖が活発な条件では細胞内にデンプンやオイルをほとんど蓄積しない。一方、窒素(N)や硫黄(S)欠乏などの栄養塩欠乏ストレス条件では細胞内にオイルを蓄積するようになる。これは環境が悪化すると細胞増殖が停止し、代わりにデンプンやオイルなどのエ

表1. クロレラとその近縁藻類のゲノムの概要

	<i>Parachlorella kessleri</i>	<i>Chlorella variabilis</i>	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>
科名	クロレラ科	クロレラ科	クロレラ科	ココミクサ科
栄養的分類	独立栄養	共生藻	条件的独立栄養	独立栄養
ゲノムサイズ (Mb)	62.5	46.2	22.9	48.8
遺伝子数	13,057	9791	7039	9851
平均エクソン数/遺伝子	7.9	7.3	5.7	8.2
GC%	58.3	67	63	53
文献	Ota et al. (2016) ⁴⁾	Blanc et al. (2010) ⁵⁾	Gao et al. (2014) ¹⁵⁾	Blanc et al. (2012) ¹⁶⁾

*著者紹介 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻（特任助教） E-mail: ota_shuhei@edu.k.u-tokyo.ac.jp

エネルギーへの転換が容易な炭水化物を蓄積するためである。微細藻類のオイル蓄積誘導に関する研究では、窒素(N)欠、リン(P)欠、硫黄(S)欠ストレスに関する報告が多い⁸⁾。S欠はN欠と比べてバイオマス生産量を落とさずに培養可能なことから注目されている。N欠はすべてのアミノ酸飢餓に相当するが、S欠は含硫アミノ酸であるシステイン・メチオニン飢餓のみに相当するため、栄養飢餓に応答する代謝経路数(考えるべき代謝経路数)がN欠と比べて少なくなり、より単純化した系として扱えるという利点がある。

チェコ科学アカデミー微生物学研究所のグループは、*C. vulgaris*を用いた実験で、N欠、P欠、S欠のうち、S欠がもっともデンプン蓄積率を高くすることを示している⁹⁾。実験室レベルでは、S欠条件での培養は、乾燥重量あたり60%ものデンプンを蓄積し、蓄積した後のデンプン量の減少は見られない。また、250 L系の屋外大量培養実験でも乾燥重量あたり最大50%のデンプン蓄積が見られた。このデータを基に試算すると、1シーズン(150日間)培養した場合、7t/haのデンプンが収穫

できると見積もられている⁹⁾。

解読したゲノムをKEGGデータベースと照合することで、パラクロレラの代謝経路を調べることができる。これを代謝マップとして再構築したのが図1である。この代謝マップはミトコンドリア、葉緑体、小胞体で反応する主要な代謝経路とオートファジー関連の反応経路を載せている。また、それぞれの遺伝子発現をトランスクリプトーム解析し、ヒートマップとして表示することにより、S欠応答で活性化される遺伝子あるいは抑制される遺伝子がひと目でわかるようにした。

S欠条件で大きく変動する遺伝子として遺伝子*PkLHCBM* (gene ID: 1779_t) があげられる。*PkLHCBM*はクラミドモナスの*LHCBM9*[光化学系IIのLHC(Light harvesting complex)タンパク質をコードする遺伝子の一つ]に相同性をもつ。硫黄源を除いた培地で培養した*P. kessleri*では、栄養塩が十分に含まれるTAP培地による培養と比較したとき、遺伝子*PkLHCBM*のRPKM値(正規化したリード数)は対数期で2050倍、定常期で5106倍も発現上昇に転じていた⁴⁾。これはストレス応答

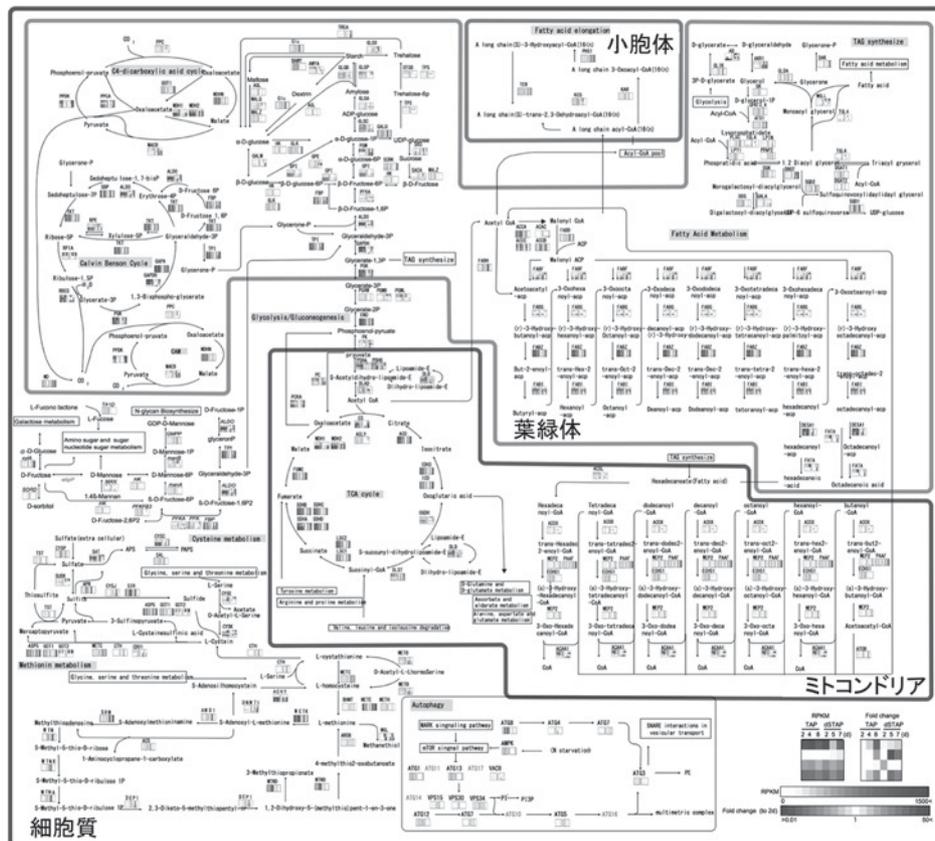


図1. ゲノムとトランスクリプトームより明らかになった*Parachlorella kessleri*の代謝マップ。全ゲノム解析をもとに構築された代謝マップとトランスクリプトーム解析結果を示した。KEGGデータベースをもとに代謝マップを構築して、それぞれの経路にトランスクリプトーム解析を施し、矢印の近くにヒートマップとしてトランスクリプトーム解析結果を示した。代謝マップの詳細は原論文⁴⁾にあるので、参照いただきたい。

と硫黄の節約の二つの原因が考えられる。LHCBMにはいくつかのパラログが知られているが、クラミドモナスでは、S欠条件においてLHCBM9の増加が確かめられており、S欠に反応した結果、集光性色素タンパク複合体がLHCBM9に置き換わっていることを示している。クラミドモナスのS欠条件でのトランスクリプトーム解析により、硫黄欠乏は酸化ストレスを引き起こすことが示唆された¹⁰⁾。さらに、LHCBM9は他のLHCBMと比べてクロロフィルの蛍光減衰が早くなり、一重項酸素発生が減少することから、クエンチャーとしての役割が示された¹¹⁾。パラクロレラの*PkLHCBM*が硫黄欠乏で急激に発現上昇したことから、PkLHCBMでもクラミドモナスのLHCBM9と同様な機能をもつと考えられる。LHCBM9転写産物が急激に増加する別の説明として、硫黄の節約が考えられる。上で述べたように、LHCBMタンパク質ファミリーは9個のLHCBMメンバー(LHCBM1~LHCBM9)からなるが、硫黄欠乏時にはLHCBM9の転写量が増加する。LHCBM9のアミノ酸配列を調べると、LHCBM9だけはシステイン残基、メチオニン残基が3残基少ないことがわかった¹⁰⁾。

硫黄が欠乏している条件では、含硫アミノ酸をなるべく使わなくて済むように転写調節されているのかもしれない。パラクロレラでも同じようなストレス応答機構や含硫アミノ酸節約機構が働いているものと推察される。

S欠によるオイル蓄積誘導に関して注目すべきものとして、オートファジー関連遺伝子群があげられる。オートファジーは細胞内分解機構の総称で、オルガネラや細胞質を分解し再利用する仕組みであり、発生と分化、有害タンパク質の分解、免疫応答、病原体の排除など、生命現象に広く関与している¹²⁾。オートファジーの研究は出芽酵母やマウスを使った研究が目覚ましいが、植物(とくに藻類)については研究が遅れている。*P. kessleri*でもオートファジー関連遺伝子がS欠ストレスに反応して発現変動する⁴⁾。たとえば、対数期後期のクロレラに注目すると、オートファジー関連遺伝子の多くが発現上昇していることを確認した。S欠条件においてオートファゴソーム(オートファジーに関与する二重膜構造を持つ小胞)形成に必要なタンパク質(ATG3, ATG4, ATG5, ATG6 (Beclin 1), ATG7, ATG8, ATG12)をコードする遺伝子群はRPKM比で1.2~3.0倍となり、対数期後

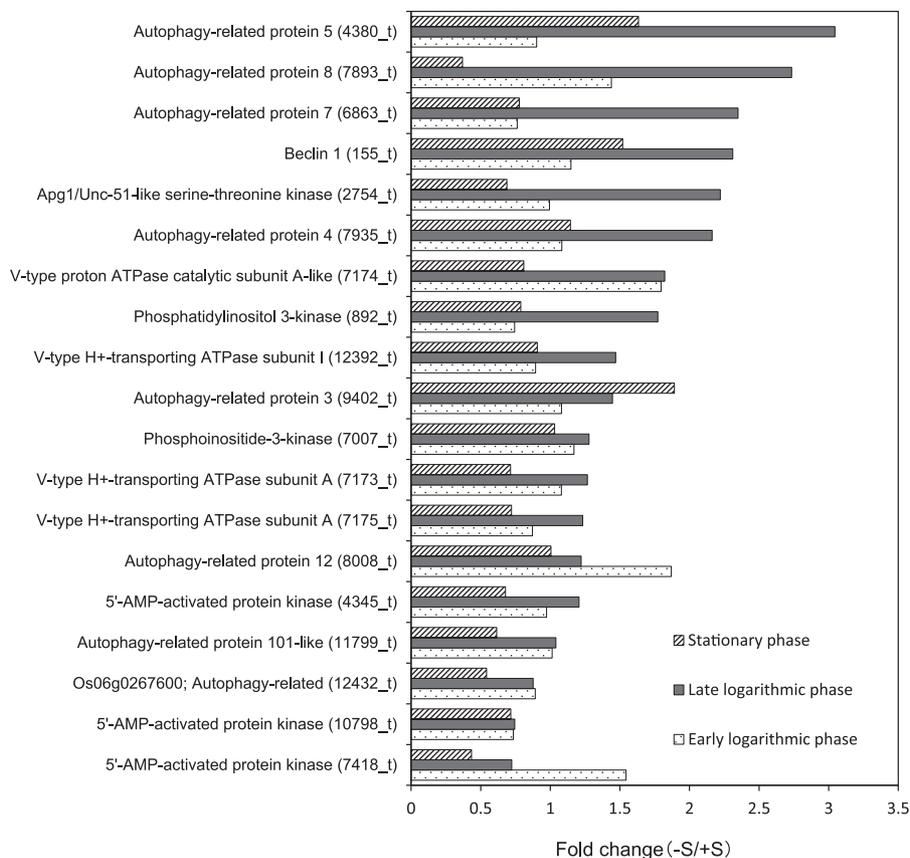


図2. オートファジー関連遺伝子に着目したトランスクリプトーム。硫黄欠乏遺伝子に反応するトランスクリプトームを棒グラフで表示した。縦軸にそれぞれの遺伝子のアノテーションおよび*P. kessleri* gene ID番号を対数期後期における発現比順に示し、横軸にコントロール(+S)に対する硫黄欠乏ストレス(-S)のRPKM比を示した。

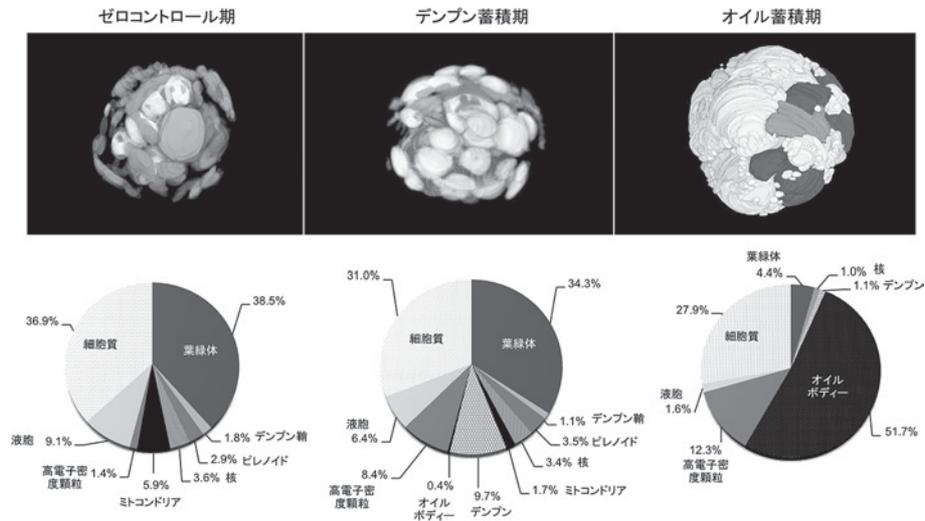


図3. 電顕3D技術による構造および体積比較. 上段: 電顕3D法による立体再構築画像. オルガネラの位置関係をわかりやすくするため、葉緑体を省略した. 下段: オルガネラの体積%を円グラフで示す. 3次元立体構築したムービーは原論文⁴⁾にあるので、参照いただきたい. それぞれ全細胞に占める各オルガネラの体積%をゼロコントロール期(栄養増殖期), デンプン蓄積期, オイル蓄積期に分けて示した.

期ではいずれも発現上昇していた(図2). このことから少なくともmRNAレベルではS欠のオイル蓄積条件でオートファジーが誘導されていることがわかった.

電顕3Dによる物質蓄積の評価

現在の生物学では、オミックス的なアプローチに加え、生命現象を実際に「見る」バイオイメージングの重要性が増している. 細胞内の生命現象をナノレベルで観察するためには透過型電子顕微鏡(TEM)が不可欠である. TEMは高い分解能をもつが、見えるのは電子線が透過できる80–100 nmの超薄切片の厚みに限られ、細胞内部構造を一度に観察することはできない. しかし、細胞内の物質蓄積の動態を解析するには、細胞内全体の3次元情報が不可欠である. 3次元情報を得るために電顕トモグラフィ法が開発されているが、厚い切片(>400 nm)は不向きである. それに対して、超薄切片を連続的に取得し、細胞丸ごと一個の断層像をコンピューター上で三次元立体構築する方法(電顕3D法)がある. この方法は立体構築までに多少の時間を要するが、一枚一枚の写真はTEMの解像度を保持しており、直径5 μmのクロレラでも丸ごと細胞一個を立体構築することができる. 緑藻ヘマトコッカスのように直径が30 μmを超える大きな細胞でも、300枚以上の連続切片を取得すれば全細胞を立体構築できることを実証している^{13,14)}.

電顕3D法は全オルガネラの体積を正確に計測することができる. 今のところ、すべてのオルガネラを同時に識別して体積動態を計測する方法は電顕3D法しかない.

*P. kessleri*のオイル蓄積過程の細胞内の構造変化を電顕3D法で可視化したところ、オイルボディーの体積は増殖が活発な細胞で0%であったのに対し、オイル蓄積期になると52%まで増加することがわかった(図3). また葉緑体とミトコンドリアに注目すると、オイルボディーの体積の増加にともない、その体積が劇的に減少し、オルガネラとオイルボディーの体積の間にはトレードオフの関係があることがわかった. トランスクリプトーム解析で確認されたオートファジー関連遺伝子群の発現上昇と電顕3D法で確認されたオイルとオルガネラの体積トレードオフの関係から、オルガネラ縮退の過程にはオートファジーが主要な役割として関与していることが示されている.

おわりに

*P. kessleri*のゲノムとトランスクリプトームの解析によって、クロレラのオイル蓄積にはオートファジーが重要な役割をもつことが示された. また、電顕3D解析によってオイルが蓄積すると同時に葉緑体やミトコンドリアが著しく縮退していることが明らかにされた. これらのデータは、オイルの蓄積とオルガネラの縮退過程にオートファジーが深く関与していることを示している. 現在、オートファジー研究は、動物細胞や酵母細胞を用いた解析が進んでおり、ノーベル賞の影響もあって、ここ数年で医療分野への応用も期待されている. 藻類バイオマスや藻類の高度利用の研究分野でも、今後、オートファジーは重要なテーマになりそうだ. クラミドモナス

のようなモデル生物だけでなく、最近では多様な藻類のゲノムが利用できるようになりつつある。ゲノムや微細構造解析といった基礎データを基盤として、藻類を利用した今後の産業創成と応用研究が発展することが期待される。

文 献

- 1) 井上 勲：藻類30億年の自然史—藻類から見る生物進化・地球・環境，東海大学出版会 (2007).
- 2) 河野重行，大田修平：科学，**84**, 779 (2014).
- 3) Friedl, T.: *J. Phycol.*, **31**, 632 (1995).
- 4) Ota, S. *et al.*: *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 13 (2016).
- 5) Blanc, G. *et al.*: *Plant Cell*, **22**, 2943 (2010).
- 6) Takeshita, T. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **158**, 127 (2014).
- 7) Krienitz, L. *et al.*: *Phycologia*, **43**, 529 (2004).
- 8) Vítová, M. *et al.*: *Biotechnol. Adv.*, **33**, 1204 (2015).
- 9) Brányiková, I. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 766 (2011).
- 10) González-Ballester, D. *et al.*: *Plant Cell*, **22**, 2058 (2010).
- 11) Grewe, S. *et al.*: *Plant Cell*, **26**, 1598 (2014).
- 12) Mizushima, N. *et al.*: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 107 (2011).
- 13) Wayama, M. *et al.*: *PLoS One*, **8**, e53618 (2013).
- 14) 大田修平，河野重行： *Plant Morphol.*, **27**, 3 (2015).
- 15) Gao, C. *et al.*: *BMC Genomics*, **15**, 582 (2014).
- 16) Blanc, G. *et al.*: *Genome Biol.*, **13**, R39 (2012).