

セルフクローニング法で 微細藻の油脂生産性改良に成功 ～ バイオ燃料生産実用化に期待～

学校法人 中央大学

概 要

中央大学研究開発機構研究員 笠井 由紀、機構教授 原山 重明らのグループは、外来遺伝子を使用しない遺伝子組換え*1（セルフクローニング）技術を用いて、微細藻 *Coccomyxa* の油脂生産性改良に世界で初めて成功しました。

近年、微細藻を利用したバイオ燃料の生産が注目を集めています。本研究グループは、微細藻 *Coccomyxa* が合成する油脂を原料としたバイオ燃料の実用化を目指し、セルフクローニング技術を利用した分子育種に取り組んできました。

遺伝子組換え技術とは、ある遺伝子がある生物のゲノムに人工的に組み込むことにより形質転換体*2を得る方法ですが、遺伝子がゲノムに組み込まれる頻度は低いので、一般には選択マーカー*3を利用して形質転換体を選抜します。現在 *Coccomyxa* のセルフクローニングに利用可能な選択マーカーは 1 つしかなく、同一株に複数の遺伝子を個々に導入する事ができませんでした。本研究グループは、*Coccomyxa* 形質転換体から選択マーカーを特異的に除去することにより、選択マーカーの繰り返し使用を可能にしました。本方法を使い、脂質合成に関与する 2 遺伝子を逐次導入し、油脂の生産性が元の株の 1.4 倍に増加した形質転換株の作製に成功しました。

本研究成果は、他の微細藻にも適用可能で、微細藻を利用したバイオ燃料の実用化を促進することで、CO₂削減等の環境問題の解決に貢献することが期待されます。

本研究成果は、英国時間 8 月 6 日 10:00(日本時間 8 月 6 日 18:00)に英国科学雑誌「Scientific Reports」のオンライン速報版で公開されました。

【主要研究者】 笠井 由紀（中央大学研究開発機構 専任研究員）
原山 重明（中央大学研究開発機構 機構教授）

【発表雑誌】 英国科学誌（Scientific Reports）の 2018 年 8 月 6 日（英国時間）
のオンライン速報版
論文タイトル “Metabolic engineering using iterative self-cloning to improve
lipid productivity in *Coccomyxa*”

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-30254-7>

【研究内容】

1. 背景

化石燃料の大量使用に伴う CO₂ 排出量の増加は地球温暖化を促進し、異常気象の遠因となっていると考えられています。近年、微細藻が合成する油脂を原料としたバイオディーゼル燃料が注目を集めていますが、そのコストは高く、未だ商業化に至っていません。この問題を解決するためには、油脂生産性を改良した微細藻を育種する必要があります。しかしながら、遺伝子組換え生物は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称「**カルタヘナ法**」）に基づく規制を受けます。一方、外来遺伝子を使用しない「セルフクローニング」という方法によって作られた遺伝子組換え体と同等の生物は、自然界における遺伝子組換えによっても生じ得ます。このことから、セルフクローニング株は、伝統的な育種及び選抜によって得られた育種株と同等と考えられています。

2015年、笠井らのグループは *Coccomyxa* のウラシル要求株を宿主に、同株由来の UMP 合成遺伝子 (*UMPS*) を選択マーカーとするセルフクローニング技術を開発しました (*Biotechnol Biofuels* 2015, 8, 1-12)。しかしながら、利用可能な選択マーカーが1つしかないため、同一株に複数の遺伝子を個々に導入する事ができないという問題がありました。そこで、本研究グループは、先ず、部位特異的組換え酵素 (Cre) を用いて、選択マーカーを繰り返し利用する技術を確立し、次いで、油脂合成系の遺伝子を逐次導入した高油脂生産株の創出に取り組みました。

2. 研究内容と成果

部位特異的組換え酵素^{*4}Cre は、*loxP* と呼ばれる 34 塩基対の DNA 配列によって挟まれた領域を切り出します (図 1)。そこで、両端に *loxP* 配列を持つ *UMPS* 遺伝子 (*loxP_UMPS_loxP*) を *Coccomyxa* ウラシル要求株 (Ura⁻) に導入し、ウラシル要求性を回復した細胞 (Ura⁺) を取得しました。続いて、精製した Cre 酵素タンパク質を Ura⁺ となった *Coccomyxa* に導入し、*loxP_UMPS_loxP* が正確に切り出されることで、再度ウラシル要求性を示すようになった細胞の取得に成功しました。すなわち、*UMPS* という選択マーカー遺伝子を繰り返し利用できる方法を確立しました。

次に、この選択マーカー遺伝子の再利用技術を用いて、*Coccomyxa* 由来の脂質合成に関与する二つの遺伝子 (*FAT1*: 油脂の原料である脂肪酸の細胞内移動に関与する遺伝子、および *DGAT2d*: 油脂合成に関与する遺伝子) を逐次導入した油脂高生産株を図 2 に示す手順で作製しました。この方法では、遺伝子を導入する毎に、油脂生産性が最も向上した形質転換体を選抜しました。*FAT1* 遺伝子を導入した組換え株では、脂質生産性が野生株の 1.1 倍にしか増加しませんでした。更に *DGAT2d* 遺伝子を導入することにより、脂質生産性は野生株の 1.4 倍に増加しました。図 3 の写真は、遺伝子組換えにより細胞中の油脂含量が増加している様子を示しています。

本研究では、2つの遺伝子を導入しましたが、本方法を繰り返し行うことでさらに多くの遺伝子を高発現させた育種株を作製することが可能です。また、本方法は他の微

細藻にも適用可能です。

3. 今後の展開

本技術により、同一細胞に複数の遺伝子を逐次導入したセルフクローニング株の作製が可能になりました。この技術を活用して微細藻の油脂生産性をさらに向上させることで、バイオ燃料の実用化に貢献することが期待されます。また、薬剤耐性遺伝子等、従来利用されていた外来遺伝子を全く使用しないセルフクローニング株の作製によって、より安全・安心な屋外大量培養による有用物質生産が促進されることが期待されます。

【参考文献】

1. 微細藻類利用国際シンポジウム;

http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf

●本研究は、以下の事業を受けて実施されました。

新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）委託事業

「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」

【お問い合わせ先】

<研究に関すること>

笠井 由紀 （カサイ ユキ）

中央大学研究開発機構 専任研究員

TEL : 03-3817-7360

E-mail: ykasai@bio.chuo-u.ac.jp

<広報に関すること>

加藤 裕幹 （カトウ ユウキ）

中央大学 研究支援室

TEL 03-3817-1603, FAX 03-3817-1677

E-mail: k-shien@tamajs.chuo-u.ac.jp

【用語解説】

*1 遺伝子組換え技術

目的とする遺伝子を取り出し、必要に応じてそれに改変を加え、受け手となる生物に導入する技術

*2 形質転換体

遺伝子組換え技術（*1を参照）により、遺伝的な性質が変化した個体・細胞

*3 選択マーカー

遺伝子組換え生物を作成する時に、目的とした遺伝子が導入された確率の高い組換え体を選抜するための目印として導入する遺伝子

*4 部位特異的組換え酵素

特定の配列を認識し、その部位でのみ遺伝子組換えを起こす酵素

【図】

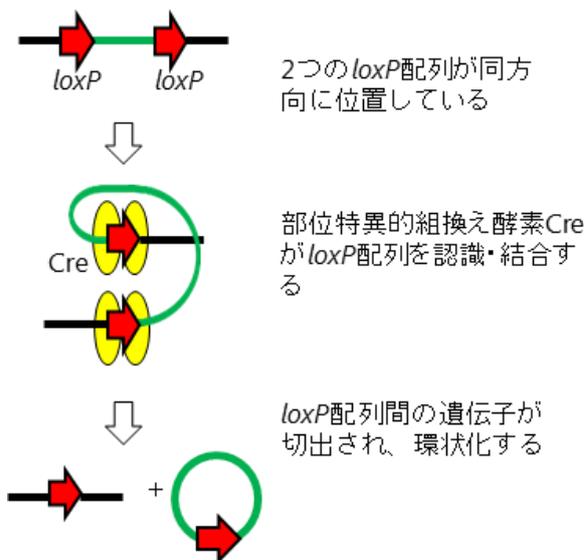


図1 部位特異的組換え酵素 Cre による DNA 鎖の切出し

黒色の線は、細胞のゲノム DNA の一部を。赤矢印は *loxP* 配列を示します、また、黄色い楕円は部位特異的組換え酵素 Cre を、*loxP* 配列の間に挟まれた緑色の線は Cre によって切出される DNA を示します。Cre によって切り出された環状 DNA（緑色の DNA+*loxP* 配列）は自己複製できず、細胞分裂後に、環状 DNA を持たない細胞が出現します。

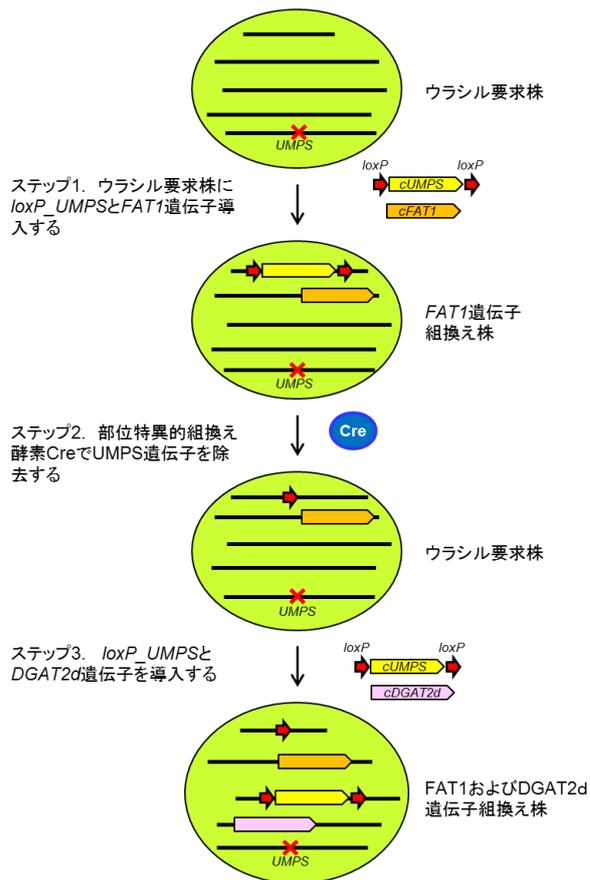


図2 選択マーカー遺伝子の再利用技術を用いた、油脂高生産 *Coccomyxa* 株の作製手順
 黄色いボックス矢印 ($cUMPS$) はUMP合成遺伝子(選択マーカー遺伝子)、オレンジのボックス矢印 ($cFAT1$) は油脂の原料となる脂肪酸の細胞内移動に関与する遺伝子、ピンクのボックス矢印 ($cDGAT2d$) は油脂合成に関与する遺伝子。

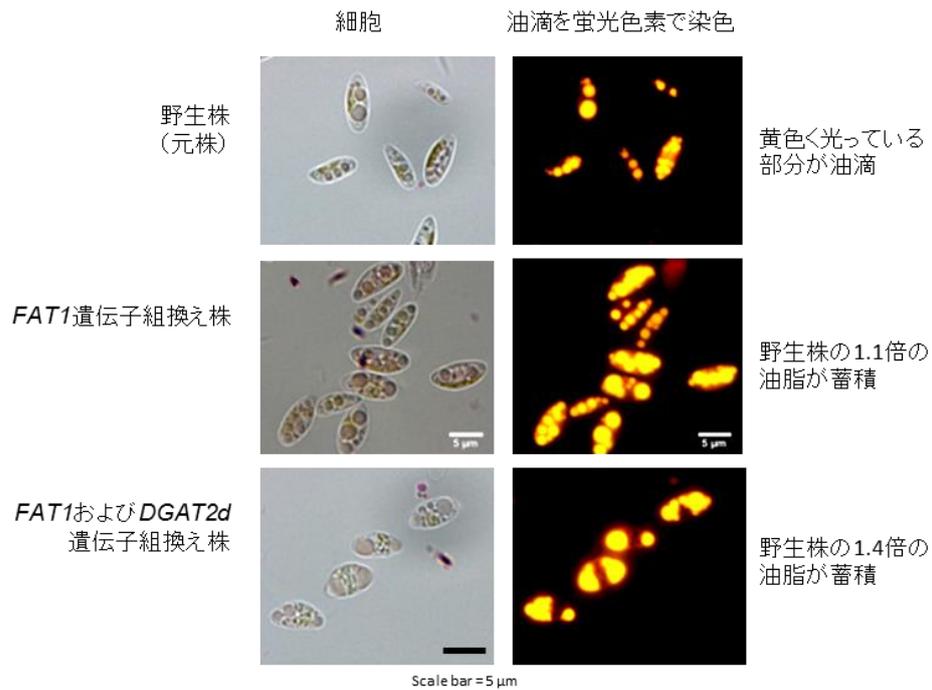


図3 *Coccoomyxa* 細胞の油脂蓄積

左側のパネルは光学顕微鏡像。油脂が油滴状に蓄積していることが観察された。右側のパネルは、この油滴を蛍光色素で染色し、その黄色の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した像。遺伝子組換え株は野生株に比べてより大きな油滴を持ち、油脂蓄積量が増えていることが分かる。