

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-13338  
(P2021-13338A)

(43) 公開日 令和3年2月12日(2021.2.12)

(51) Int. Cl. F 1 テーマコード (参考)  
**C 1 2 N 1/13 (2006.01)** C 1 2 N 1/13 4 B O 6 5  
 C 1 2 N 15/55 (2006.01) C 1 2 N 15/55

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 19 頁)

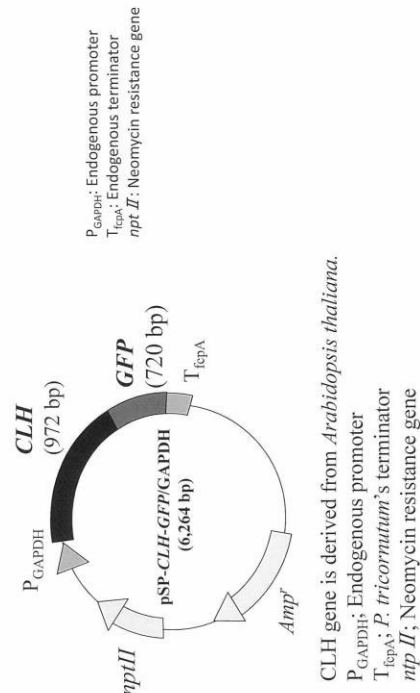
(21) 出願番号	特願2019-130559 (P2019-130559)	(71) 出願人	504132881 国立大学法人東京農工大学 東京都府中市晴見町 3-8-1
(22) 出願日	令和1年7月12日 (2019.7.12)	(71) 出願人	390013815 学校法人金井学園 福井県福井市学園3丁目6番1号
		(74) 代理人	110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
		(72) 発明者	田中 剛 東京都府中市晴見町 3-8-1 国立大学 法人東京農工大学内
		(72) 発明者	吉野 知子 東京都府中市晴見町 3-8-1 国立大学 法人東京農工大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換微細藻類及び当該形質転換微細藻類の培養方法

(57) 【要約】

【課題】 捕食生物に対する優れた耐性・防御能を示す。  
 【解決手段】 微細藻類に対して、クロロフィルを基質としてクロロフィリドを生成するクロロフィラーゼをコードするクロロフィラーゼ遺伝子を発現可能に導入する。  
 【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

微細藻類に対して、クロロフィルを基質としてクロロフィリドを生成するクロロフィラーゼをコードするクロロフィラーゼ遺伝子を発現可能に導入してなる形質転換微細藻類。

## 【請求項 2】

上記クロロフィラーゼ遺伝子は、以下 (a) 又は (b) のタンパク質をコードすることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換微細藻類。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列に対して 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、クロロフィラーゼ活性を有するタンパク質

10

## 【請求項 3】

上記クロロフィラーゼ遺伝子を導入する微細藻類は、Naviculaceae (フナガタケイソウ科) に属する珪藻類であることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換微細藻類。

## 【請求項 4】

上記Naviculaceae (フナガタケイソウ科) に属する珪藻類は、Fistulifera属、Mayamaea属、Navicula属、及びSeminavis属からなる群から選ばれる1つの属に属する珪藻類であることを特徴とする請求項 3 記載の形質転換微細藻類。

## 【請求項 5】

上記クロロフィラーゼ遺伝子を導入する微細藻類は、Fistulifera solarisであることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換微細藻類。

20

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 いずれか一項記載の形質転換微細藻類を培地にて培養する、形質転換微細藻類の培養方法。

## 【請求項 7】

屋外における培養であることを特徴とする請求項 6 記載の形質転換微細藻類の培養方法。

## 【請求項 8】

培養した形質転換微細藻類から生産目的物質を回収することを特徴とする請求項 6 記載の形質転換微細藻類の培養方法。

## 【請求項 9】

上記生産目的物質は、微細藻類が産生するオイル成分であることを特徴とする請求項 8 記載の形質転換微細藻類の培養方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、例えばオイル等の物質生産に利用されうる微細藻類を宿主とした形質転換微細藻類及び当該形質転換微細藻類の培養方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、CO<sub>2</sub>排出削減及び環境への負荷軽減の観点から、再生可能な生物資源 (バイオマス) を用いた物質生産が注目されている。光合成を行う単細胞生物である微細藻類は、光エネルギーを利用して、水とCO<sub>2</sub>から様々な代謝産物を産生することが知られている。微細藻類を用いて生産される物質としては、バイオ燃料の原料としての利用が可能なトリアシルグリセロール (TAG) やデンプン、健康サプリメント等に利用可能なタンパク質やアミノ酸、抗酸化作用等多様な生理活性を有するカロテノイド類等を挙げることができる。

40

## 【0003】

例えば、オイル高含有海洋珪藻であるFistulifera solaris JPCC DA0580株 (以下F. solaris) は、屋外での大量培養試験が試みられている。また、F. solarisについては全ゲノム解析やトランスクリプトーム解析の対象として網羅的な解析がなされており、様々な物質生産の宿主として期待されている。

50

## 【 0 0 0 4 】

但し、*F. solaris*等の微細藻類を使用する系では、屋外培養におけるバイオマス生産性は屋内と比較して顕著に低下する傾向にあり、コスト収支の低さの一因となっている。したがって、微細藻類を利用した有用物質生産の実現に向け、屋外大量培養におけるバイオマス生産性の向上は必要不可欠である。より具体的には、微細藻類の培養において最も問題視されているのが、培養系に対する他の生物種の混入（コンタミネーション）である。特に、屋外培養におけるバイオマス生産性の低下の要因には、栄養源の供給の不足、pHやCO<sub>2</sub>濃度など培養条件の変化、気候変動といった非生物的要因、及び生物的要因として他生物種のコンタミネーションが挙げられる。この中でもコンタミネーションは、" Pond crash " と呼ばれる、特に甚大な藻類バイオマス量の減少を引き起こす要因とされており、微細藻類の屋外開放系大量培養における大きな課題の一つである。

10

## 【 0 0 0 5 】

したがって、微細藻類を利用した物質生産において、コンタミネーションの抑制が微細藻類のバイオマス生産性の向上、並びに実用化に大きく寄与できると考えられる。微細藻類の培養系にコンタミネーションする具体的な生物種には、ワムシや繊毛虫、鞭毛虫、アメーバ等の動物プランクトン、真菌類や真正細菌等の従属栄養生物、他の微細藻類種、またはウイルスが挙げられる。なお、これら生物種の微細藻類に対する影響も様々であり、直接的な捕食、栄養源の競合、宿主としての感染がある。これらの中でも動物プランクトンによる微細藻類の直接的な捕食は特に甚大な被害をもたらす。藍藻*Oscillatoria*属に対する繊毛虫*Nassula*属、緑藻*Scenedesmus*属に対するアメーバ*Vampyrellida*属によって、いずれの場合も数日間でほとんどの藻類バイオマスが失われたことが報告されている。

20

## 【 0 0 0 6 】

そこで、分子育種技術を用いて、微細藻類そのものに捕食生物に対する耐性を付与する生物学的手法が有効な手法として考えられる。しかし、現在まで微細藻類及び動物プランクトンの捕食 - 被食関係の分子メカニズムに関する研究は殆どなされておらず知見に乏しい。それゆえ、生物学的手法による抑制した例は藍藻における一報のみに留まっている（非特許文献1：Simkovsky, R., Daniels, E. F., Tang, K., Huynh, S. C., Golden, S.

S., Brahmasha, B. (2012). Impairment of O antigen production confers resistance to grazing in a model amoeba cyanobacterium predator prey system. Proc Natl Acad

Sci USA, 109(41), 16678 16683)。非特許文献1によれば、藍藻のランダム変異体ライブラリーからアメーバによる捕食が認められなかった株を獲得したとある。また、この株の詳細な解析の結果、細胞表面のO抗原の欠損が捕食作用からの回避に寄与することを明らかにしている。しかし、この機構は原核生物に特有のものであり、これまで真核微細藻類において生物学的手法を用いて、捕食生物の抑制法を確立した報告はない。

30

## 【 0 0 0 7 】

一方、植物においては、植物細胞が元来有している有毒物質を産生させることで捕食生物に対する防御能（化学的防御）を向上させる試みが知られている。例えば、非特許文献2では、モデル高等植物*Arabidopsis thaliana*においてクロロフィラーゼ（Chlorophyllase; CLH）を高発現させた形質転換植物を作製し、当該形質転換植物を与えた捕食生物の生存率が低下することを見出している。クロロフィラーゼ（EC: 3.1.1.14）はクロロフィルを加水分解し、フィチル基とクロロフィリドを生成する反応を触媒する酵素である。

40

## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Simkovsky, R., Daniels, E. F., Tang, K., Huynh, S. C., Golden, S. S., Brahmasha, B. (2012). Impairment of O antigen production confers resistance to grazing in a model amoeba cyanobacterium predator prey system. Proc Natl Acad Sci USA, 109(41), 16678 16683

【 非特許文献 2 】 Hu, X., Makita, S., Schelbert, S., Sano, S., Ochiai, M., Tsuchiya T., Hasegawa S. F., Hoertensteiner S., Tanaka A., Tanaka, R. (2015). Reexamina

50

tion of chlorophyllase function implies its involvement in defense against chewing herbivores. *Plant Physiol*, 167(3), 660-670

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかしながら、微細藻類において、遺伝子操作技術や遺伝子情報を利用した分子育種によって捕食生物に対する耐性を付与するといった技術は知られていない。そこで、本発明は、このような実情に鑑み、捕食生物に対する耐性・防御能に優れた形質転換微細藻類及び当該形質転換微細藻類の培養方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上述した目的を達成するため本発明者が鋭意検討した結果、クロロフィラーゼ遺伝子を発現可能に導入した形質転換微細藻類は、クロロフィラーゼ活性により捕食生物に対して高度に毒性を発揮し、その結果、捕食生物によるコンタミネーションを抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

本発明は以下を包含する。

(1) 微細藻類に対して、クロロフィルを基質としてクロロフィリドを生成するクロロフィラーゼをコードするクロロフィラーゼ遺伝子を発現可能に導入してなる形質転換微細藻類。

(2) 上記クロロフィラーゼ遺伝子は、以下(a)又は(b)のタンパク質をコードすることを特徴とする(1)記載の形質転換微細藻類。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2のアミノ酸配列に対して80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、クロロフィラーゼ活性を有するタンパク質

(3) 上記クロロフィラーゼ遺伝子を導入する微細藻類は、Naviculaceae(フナガタケイソウ科)に属する珪藻類であることを特徴とする(1)記載の形質転換微細藻類。

(4) 上記Naviculaceae(フナガタケイソウ科)に属する珪藻類は、Fistulifera属、Mayamaea属、Navicula属、及びSeminavis属からなる群から選ばれる1つの属に属する珪藻類であることを特徴とする(3)記載の形質転換微細藻類。

(5) 上記クロロフィラーゼ遺伝子を導入する微細藻類は、Fistulifera solarisであることを特徴とする(1)記載の形質転換微細藻類。

(6) 上記(1)~(5)いずれかに記載の形質転換微細藻類を培地にて培養する、形質転換微細藻類の培養方法。

(7) 屋外における培養であることを特徴とする(6)記載の形質転換微細藻類の培養方法。

(8) 培養した形質転換微細藻類から生産目的物質を回収することを特徴とする(6)記載の形質転換微細藻類の培養方法。

(9) 上記生産目的物質は、微細藻類が産生するオイル成分であることを特徴とする(8)記載の形質転換微細藻類の培養方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明に係る形質転換微細藻類は、クロロフィラーゼ遺伝子を発現可能に有するもののクロロフィラーゼに起因する毒性が影響せず生育することができる。その一方、本発明に係る形質転換微細藻類は、クロロフィラーゼ遺伝子を発現可能に有することで、捕食した生物を死滅させることができる。このように、本発明に係る形質転換微細藻類は、捕食生物に対する優れた防御能を有している。

【0013】

本発明に係る形質転換微細藻類の培養方法では、上述のように、形質転換微細藻類が捕食生物に対する優れた防御能を有するため、培養系における当該捕食生物のコンタミネー

10

20

30

40

50

ションを防止することができる。これにより、本発明に係る形質転換微細藻類の培養方法を適用することによって、形質転換微細藻類が産生する生産目的物質を低コストに製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】実施例で作製したpSP CLH GFP/GAPDHプラスミドの構成を模式的に示す図である。

【図2】*F. solaris*野生株から抽出した色素のHPLCクロマトグラムであり、(A)がクロロフィラーゼ非活性条件の結果を示し、(B)がクロロフィラーゼ非活性条件の結果を示している。

10

【図3】*F. solaris*野生株及び19種類のクローンについて、ゲノムDNAにおけるクロロフィラーゼ GFP遺伝子の部分領域を増幅したPCRの結果を示す電気泳動図である。

【図4】*F. solaris*野生株及びクロロフィラーゼ遺伝子導入株におけるクロロフィラーゼ活性(A)及びクロロフィルプールサイズ(B)を測定した結果を示す特性図である(図中、\*は $P<0.05$ 及び\*\*は $P<0.01$ )。

【図5】*F. solaris*野生株及びクロロフィラーゼ遺伝子導入株における増殖曲線であり、Aは単独で培養したときの結果、Bは*Euplaesiobystra* sp.存在下で培養したときの結果、Cは*Neoparamoeba* sp.存在下で培養したときの結果を示している。

【図6】Aは*F. solaris*野生株又はクロロフィラーゼ遺伝子導入株の存在下における*Neoparamoeba* sp.の増殖曲線であり、Bは*F. solaris*野生株又はクロロフィラーゼ遺伝子導入株の存在下における*Euplaesiobystra* sp.の増殖曲線である。

20

【図7】Aは*F. solaris*野生株及びクロロフィラーゼ遺伝子導入株における異なる光量子束密度を与えたときの増殖曲線であり、Bは*Euplaesiobystra* sp.における異なる光量子束密度を与えたときの増殖曲線である

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明に係る形質転換微細藻類及び形質転換微細藻類の培養方法を、図面を参照して詳細に説明する。

【0016】

本発明に係る形質転換微細藻類は、宿主である微細藻類に対してクロロフィラーゼ遺伝子を発現可能に導入したものである。ここで、クロロフィラーゼ遺伝子とは、特に限定されず、クロロフィラーゼ(Chlorophyllase; CLH、EC: 3. 1. 1. 14)をコードする遺伝子を広く意味する。クロロフィラーゼは、クロロフィルを加水分解し、フィチル基とクロロフィリドを生成する反応を触媒する酵素を意味する。クロロフィラーゼに関しては、参考文献1 (Jeffrey, S. W., Hallegraeff, G. M. (1987). Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton: a problem for chlorophyll analysis. *Mar Ecol Prog Ser*, 293 304)に記載されるように、微細藻類を含む多くの植物細胞においてその活性が認められている。本発明に係る形質転換微細藻類を作製する際に、当該参考文献1に開示されたクロロフィラーゼ活性が認められた植物からクロロフィラーゼ遺伝子を定法に従って同定・単離し、得られたクロロフィラーゼ遺伝子を使用することができる。また、クロ

30

40

【0017】

一例として、シロイヌナズナ由来のクロロフィラーゼ遺伝子を使用することができる。シロイヌナズナ由来のクロロフィラーゼ遺伝子は、配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードしている。シロイヌナズナ由来のクロロフィラーゼ遺伝子におけるコーディング領域の塩基配列を配列番号1に示す。

【0018】

ただし、クロロフィラーゼ遺伝子としては、配列番号1及び2で特定されるものに限定

50

されず、例えば、配列番号2のアミノ酸配列に対して80%以上の同一性、好ましくは85%以上の同一性、より好ましくは90%以上の同一性、更に好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、クロロフィラーゼ活性を有するタンパク質をコードするものを使用することもできる。ここで、アミノ酸配列間の同一性の値は、BLASTアルゴリズムを実装したBLASTNやBLASTXプログラムにより算出することができる(デフォルトの設定)。なお、同一性の値は、一对のアミノ酸配列をペアワイズ・アライメント分析した際に完全に一致するアミノ酸残基を算出し、比較した全アミノ酸残基中の上記アミノ酸残基数の割合として算出される。

#### 【0019】

また、クロロフィラーゼ遺伝子は、例えば、配列番号2のアミノ酸配列に対して、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有し、クロロフィラーゼ活性を有するタンパク質をコードするものでも良い。ここで、数個とは、例えば、2~70個、好ましくは2~50個、より好ましくは2~30個、最も好ましくは2~15個である。

#### 【0020】

さらにまた、クロロフィラーゼ遺伝子は、例えば、配列番号1の塩基配列からなるDNAの相補鎖の全部又は一部に対して、ストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつクロロフィラーゼ活性を有するタンパク質をコードするものでもよい。ここでいう「ストリンジентな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件を意味し、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual(Third Edition)を参照して適宜決定することができる。具体的には、サザンハイブリダイゼーションの際の温度や溶液に含まれる塩濃度、及びサザンハイブリダイゼーションの洗浄工程の際の温度や溶液に含まれる塩濃度によりストリンジエンシーを設定することができる。より詳細には、ストリンジентな条件としては、例えば、ナトリウム濃度が25~500mM、好ましくは25~300mMであり、温度が42~68℃、好ましくは42~65℃である。より具体的には、5×SSC(83mM NaCl、83mMクエン酸ナトリウム)、温度42℃である。

#### 【0021】

上述したように、配列番号1と異なる塩基配列からなる遺伝子、又は配列番号2とは異なるアミノ酸配列をコードする遺伝子が、クロロフィラーゼ遺伝子として機能するか否かは、当該遺伝子を適当なプロモーターとターミネーター等の間に組み込んだ発現ベクターを作製し、この発現ベクターを用いて例えば大腸菌等の宿主を形質転換し、発現するタンパク質のクロロフィラーゼ活性を測定すればよい。クロロフィラーゼ活性とは、クロロフィルを加水分解し、フィチル基とクロロフィリドを生成する反応を触媒する活性である。したがって、クロロフィラーゼ活性は、例えば、基質であるクロロフィルの減少量及び/又は生成物であるクロロフィリドの増加量に基づいて評価することができる。

#### 【0022】

ここで、微細藻類とは、単細胞性の光合成生物群であって藻類に分類される生物を意味する。微細藻類には、緑藻類、黄色鞭毛藻類、珪藻類、渦鞭毛藻類、単細胞真核藻類、淡水性単細胞緑藻類(クロレラ)及びシアノバクテリア類に分類されるものが含まれる。本発明に係る形質転換微細藻類は、これら如何なる分類の微細藻類を宿主として使用することができる。

#### 【0023】

一例として、本発明に係る形質転換微細藻類の宿主として使用できる珪藻類とは、単に珪藻とも呼称され、珪藻綱(Bacillariophyceae)に属するものを挙げることができる。中でも、オイル蓄積能を有する珪藻類とすることが好ましい。珪藻類としては、中心目(Centrales)に属する藻類及び羽状目(Pennales)に属する藻類が挙げられる。中心目(Centrales)に属する藻類としては、シクロテラ属(Cyclotella)、ミニディスク属(Minidiscus)、タラシオシラ属(Thalassiosira)及びキートケロス属(Chaetoceros)に属する藻類等が挙げられ、羽状目(Pennales)に属する藻類としては、マヤマエア属(Mayamaea)、ディメレグラムマ属(Dimeregramma)、シリンドロテカ属(Cylindrotheca)、

10

20

30

40

50

ナビキュラ属 (Navicula)、及びフィストウリフェラ属 (Fistulifera) に属する藻類等が挙げられる。

【 0 0 2 4 】

より具体的に、オイル蓄積能を有する珪藻類としては、好ましくはFistulifera属又はMayamaea属に属する珪藻類である。

【 0 0 2 5 】

オイル蓄積能を有するFistulifera属に属する珪藻類として、特にW02010/116611に開示されているFistulifera sp. JPCC DA0580株 (Navicula sp. JPCC DA0580株から改名、本明細書ではFistulifera solaris JPCC DA0580株とも称する) を例示することができる。なお、Fistulifera solaris JPCC DA0580株は、W02010/116611に記載されているように、FERM BP 11201 (FERM P 21788より移管) として独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター (IPOD, NITE) (〒292 0818千葉県木更津市かずさ鎌足2 5 8) に国際寄託されている。

10

【 0 0 2 6 】

また、オイル蓄積能を有するMayamaea属に属する珪藻類として、Mayamaea sp. JPCC CT DA0820株を例示することができる。Mayamaea sp. JPCC CTDA0820株は、たとえ10 といった低温環境下においてオイル蓄積能を示すといった特徴を有する珪藻類である。Mayamaea sp. JPCC CTDA0820株は、電源開発株式会社にて分譲可能に保存されている。

【 0 0 2 7 】

さらに、オイル蓄積能を有する珪藻類としては、上述したFistulifera属又はMayamaea属に属する珪藻類以外にも例えば、Navicula属やSeminavis属に属する珪藻類を挙げることができる。すなわち、オイル蓄積能を有する珪藻類としてはFistulifera属、Mayamaea属、Navicula属、及びSeminavis属などを含むNaviculaceae (フナガタケイソウ科) に属する珪藻類を使用することができる。

20

【 0 0 2 8 】

ここで、オイル蓄積能を有するとは、特に限定されないが、例えば炭素数16~24の脂肪族炭化水素を蓄積する能力を有すると言い換えることができる。但し、オイル蓄積能を有する珪藻類とは、炭素数15以下の脂肪族炭化水素や、炭素数25以上の脂肪族炭化水素を生成及び蓄積するものであっても良い。

【 0 0 2 9 】

また、本発明に係る形質転換微細藻類は、糖、タンパク質、オイル或いは化合物等を産生する能力を有する微細藻類や、単細胞真核藻類に分類されるユーグレナ藻や濃緑色の単細胞微細藻類であるスピルリナ等のそれ自体が食品用途や化粧品用途を有する微細藻類を宿主として作製しても良い。宿主として使用できる微細藻類としては、アスタキサンチンを産生するHaematococcus pluvialis、抗酸化物質を産生するChlorella vulgaris、カロテン等のカロテノイドを産生するDunaliella salina、その抽出物が化粧品等に利用されるAphanizomenon flos aquae、その粉体等が食品サプリメントに使用されるArthrospira platensis、ドコサヘキサエン酸を産生するCryptocodinium cohnii、油脂生産能を有するNeochloris oleoabundans、油脂生産能を有するNannochloropsis oculata及び炭素鎖30以上の油脂を産生するBotryococcus braunii等を挙げることができる。

30

40

【 0 0 3 0 】

上述した微細藻類を宿主としてクロロフィラーゼ遺伝子を発現可能に導入するには、従来公知の形質転換方法を適宜使用することができる。例えば、微細藻類内でクロロフィラーゼ遺伝子を発現させる場合、藻類用の発現ベクター、例えば、pChlmyシリーズのベクター (Invitrogen社)、pOptシリーズのベクター (Chlamydomonas resource center) などを使用することができる。なお、クロロフィラーゼ遺伝子は、宿主となる微細藻類において機能するプロモーターの制御下に配置される。プロモーターとしては、例えば、HSP70A/RbcS2、beta tubulin、PSAD、CaMV35S、NIT1、Cyc6、SQD2などの過剰発現用プロモーターを挙げることができる。なお、発現ベクターには、3UTR、ターミネーター及び選択マーカー等が含まれていることが好ましい。

50

## 【0031】

微細藻類細胞への発現ベクターの導入は、公知の方法によって行うことができ、例えば、エレクトロポレーション法、ボンバードメント法、グラスビーズ法及びアグロバクテリウム法などにより行うことができる。

## 【0032】

また、得られた形質転換微細藻類は、通常の培地にて培養することができる。培地としては、宿主とした微細藻類に応じた組成の培地を準備することができる。例えば、微細藻類が淡水藻類である場合、蒸留水にTris、Glycylglycine、HEPES、TAPS、Bicine及びMES等の緩衝剤を適量加え、さらに各種栄養塩を適量加え、所望の値にpHを調整することで培地を作製することができる。また、微細藻類が、海水藻類である場合、蒸留水に緩衝材及び栄養塩類（NaCl、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、KCl及びCaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O）を適量加え、各種栄養塩を適量加え、所望の値にpHを調整することで培地を作製することができる。

10

## 【0033】

特に、本発明に係る形質転換微細藻類は、発現可能に導入されたクロロフィラーゼ遺伝子を備えている。クロロフィラーゼ遺伝子の発現に起因して本発明に係る形質転換微細藻類の生育、増殖及び物質生産に対する悪影響はなく、捕食生物に対して高度に毒性を発揮する。捕食生物としては、特に限定されず、微細藻類を特異的又は非特異的に捕食する生物全般を意味する。一例としては、微細藻類を捕食するアメーバ等の原生生物が挙げられる。アメーバ以外にも捕食生物としては、例えば、無色鞭毛虫類や繊毛虫類、ツボカビ類、さらに渦鞭毛藻や黄金色藻などにみられる藻類捕食性の微細藻類などを挙げるこ

20

## 【0034】

以上のように、本発明に係る形質転換微細藻類は、捕食生物に対する毒性を有するため、培養系における捕食生物のコンタミネーションによる被害を防止することができる。例えば、本発明に係る形質転換微細藻類を利用して物質生産等を行う場合、実験室レベルと比較して大規模な培養系を適用することが好ましい。また、大規模な培養系は、通常、屋外に設置される場合が多い。このように、大規模培養、特に屋外大規模培養においては、周囲の環境に曝されることから捕食生物のコンタミネーションが大きな問題となる。コンタミネーションによる問題としては、培養対象である微細藻類の増殖不良や死滅、生産目的物質の生産量低下或いは低品質化等をあげることができる。

30

## 【0035】

本発明に係る形質転換微細藻類を利用することで、これら捕食生物のコンタミネーションの問題を回避し、形質転換微細藻類の増殖を維持し、生産目的物質の生産量及び/又は品質を維持することができる。したがって、本発明に係る形質転換微細藻類を利用することによって、生産目的物質（形質転換微細藻類自体を含む）を低コストに生産することが可能となる。

## 【0036】

一例として屋外の大量培養系としては、特に限定されないが、レースウェイ型培養装置、カラム型培養装置及びパネル型培養装置を挙げることができる。これら培養装置には、未滅菌f/2培地を100~200Lの規模で使用し、パドルやスターラーで培地を攪拌しながら形質転換微細藻類を培養することができる。このとき、これら培養装置では、温度調節しながら培養しても良いし、また、CO<sub>2</sub>吹き込みによりpH制御しながら培養してもよい。さらに、大規模な屋外培養系としては、攪拌機として浮遊式水耕機を備える円形ポンド型培養装置（例えば、直径5m、培養内容積10,000L）を適用することができる。この円形ポンド型培養装置は、例えば水深0.5mの培養槽とし、f/2培地及び人工海水を培養液としてCO<sub>2</sub>吹き込みによりpHを7.7~8.5の範囲にコントロールしながら培養することができる。また、円形ポンド型培養装置では、水中ポンプにより培養液を輸送することができ、また40W浮遊式攪拌装置により培養液を攪拌しながら形質転換微細藻類の培養を継続することができる。

40

## 【実施例】

50



## 【 0 0 3 7 】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

## 【 0 0 3 8 】

## 1. 実験方法

## 1.1. 使用した試薬及び機器

試薬の調製及び実験操作にはMilli Q Integral 5 バイオタイプシステム (メルク株式会社製)を用いて処理した蒸留水、または超純水を用いた。色素抽出及び高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography; HPLC)分析に用いた試薬は全て和光純薬工業株式会社のHPLCグレードとし、その他の試薬は全て試薬特級品又はそれに準ずるものを使用した。F. solaris細胞数の計数にはバクテリアカウンター (サンリード硝子株式会社製)、アメーバ細胞数の計数にはフックスローゼンタル (サンリード硝子株式会社製)を用いた。F. solarisの前培養にはロータリーシェーカーNR 20 (タイテック株式会社製)を用いて行った。遠心分離には微量高速冷却遠心機MX 305 (株式会社トミー精工社製)を用いた。PCR反応及びシーケンシングに用いたプライマーはライフテクノロジーズジャパンに合成を委託し、サーマルサイクラーはVerti 96 well サーマルサイクラー (Applied Biosystems社製)を使用した。シーケンス解析の際の、シーケンサーには3730x DNA Analyzer (Applied Biosystems社製)を使用し、シーケンス反応にはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific社製)を用いた。このシーケンス解析はタカラバイオ株式会社に委託し行った。HPLC分析の際の分析システムにはWaters e2695 Separation Module及び2489 UV/Vis Detector (日本ウォーターズ株式会社製)を用いた。

## 【 0 0 3 9 】

## 1.2. 使用藻体及び培養方法

海洋珪藻 *Fistulifera solaris* JPCO DA0580株 (以下、F. solaris)の培養にはhalf strength of Guillard 's f solution (以下、f/2培地) (75mg NaNO<sub>3</sub>、5mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O、0.5 µg vitamin B<sub>12</sub>、0.5 µg biotin、100 µg thiamine HCl、30mg Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>・9H<sub>2</sub>O、4.36 mg Na<sub>2</sub>EDTA、3.15mg FeCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>O、10 µg CoCl<sub>2</sub>・5H<sub>2</sub>O、22 µg ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、180 µg MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O、9.8 µg CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O、6.3 µg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O)を用いた。なお、塩濃度の調整にはマリンアートSF 1 (株式会社富田製薬社製)を37.0g/l用いて行った。藻体の前培養として、100 ml三角フラスコ内にて、アンピシリン50 µg/ml含有f/2培地50 mlを用いて14日間振盪培養 (回転数120rpm、温度25 °C、光量子束密度50 µmol/m<sup>2</sup>/s、Light/Dark=24h/0h) した。なお、形質転換体の維持には500 µg/ml G418 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社製)含有f/2培地を用い、継代は1週間ごとに行った。本培養として、扁平フラスコ内にてf/2培地500mlを用いて7日間培養 (温度25 °C、流量0.8l/min/l、CO<sub>2</sub>濃度2%、光量子束密度130 µmol/m<sup>2</sup>/s、Light/Dark=24h/0h) した。

## 【 0 0 4 0 】

## 1.3. アメーバの単離及び培養方法

本研究に用いたアメーバは電源開発株式会社若松研究所 (Kitakyushu, Fukuoka, Japan)より単離した。2016年6月及び9月のF. solaris屋外培養試験において、F. solarisの顕著な死滅が認められた培養槽 (d=5m、V=10kL)の培養液を採取し、顕微鏡観察を行った。その結果、アメーバ運動を行う、形態的に異なる生物を確認し、以下の操作により、培養を行った。アメーバの培養は25cm<sup>2</sup>ペントキャップフラスコ (イワキ株式会社製)内にて行った。f/2培地10mlに対し、アメーバ細胞及びF. solaris細胞約5 × 10<sup>5</sup> cellsを加え、室温、暗所下にて静置培養した。F. solaris細胞の添加は週に1度の頻度で行った。

## 【 0 0 4 1 】

## 1.4. 顕微鏡観察

35mm フィルターボトムディッシュ (松浪硝子工業株式会社製)に、f/2培地4ml、F. solaris細胞1 × 10<sup>5</sup> cells、及びアメーバ細胞1 × 10<sup>5</sup> cellsを加え、室温、暗所下にて静置した。アメーバ細胞の様子を倒立型蛍光顕微鏡OLYMPUS IX 70 (OLYMPUS株式会社製)を用い

て観察した。観察したアメーバ細胞の面積をimageJを用いて算出した。

【 0 0 4 2 】

形質転換体におけるGFP蛍光の確認は、正立型蛍光顕微鏡OLYMPUS BX 51 (OLYMPUS株式会社製)を用いて行った。クロロフィル自家蛍光及びGFP蛍光の観察にはそれぞれ、U MWIB 3 (Ex:460 495nm、Em:510nm)、U MNIGA3 (Ex:540 550nm、Em:575 625nm)をフィルタユニットとして用いた。また、光源にはファイバ光源システムU HGLGPS (OLYMPUS株式会社製)水銀ランプ(強度100%)を用い、露光時間はそれぞれ、1/10秒及び1秒とした。

【 0 0 4 3 】

1 5. 18S rDNAシーケンス解析

アメーバ及び*F. solaris*それぞれ約 $1 \times 10^6$  cells及び $1 \times 10^7$  cellsからNucleoSpin Tissue XS (タカラバイオ株式会社)を用いてゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNAをテンプレートとし、PrimeStar Max (タカラバイオ株式会社)によりPCR増幅 ((98 °Cで1min) × 1サイクル、(98 °Cで10sec、55 °Cで10sec、72 °Cで10 sec) × 30サイクル、(72 °Cで3min) × 1サイクル)を行った。プライマーには2種類のプライマーセット1500F 1500R及びMoonA MoonBを使用した(表 1)。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

Name	Direction	Sequence (5'→3')	SEQ ID No
1500F	Forward	GGTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG	3
1500R	Reverse	GATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACC	4
MoonA	Forward	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	5
MoonB	Reverse	TGATCCTTCCGCAGGTTAC	6
M13-P5	Forward	CAGGAAACAGCTATGAC	7
M13-21	Reverse	TGTAAAACGACGGCCAGT	8

【 0 0 4 5 】

1%アガロースゲル電気泳動にてバンドを確認後、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen社製)を用いてPCR産物を精製した。その後、pCR Blunt II TOPO vector (Thermo Fisher Scientific)にサブクローニングし、このプラスミドをOne Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*に対し、ヒートショック法により導入した。カナマイシン (50 µg/ml)含有LB寒天培地に播種し培養(37 °C、12時間)後、得られたコロニーをカナマイシン (50 µg/ml)含有LB液体培地5mlで培養 (12時間、37 °C、120rpm)し、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)を用いてプラスミドを抽出した。制限酵素EcoRI(England Biolabs社製)にて処理後 (37 °C、15分)、電気泳動にてインサートの確認ができたものについてシーケンス解析を行った。解析に使用したプライマーはユニバーサルプライマーであるM13 P5、M13 21及びそれぞれのサンプルに対し独自に設計したプライマーを用いた。得られた塩基配列をクエリとし、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のGenBankをデータベースとしてBlastn相同性検索を行った。

【 0 0 4 6 】

1 6. In silico解析

高等植物*Arabidopsis thaliana*由来CLH1 (NCBI Gene ID: 838554)及びCLH2 (834408)の配列をクエリとし、*F. solaris*、モデル珪藻*Phaeodactylum tricornutum*及び*Thalassiosira pseudonana*の全遺伝子配列に対してBlastn相同性検索を行った。また、モチーフ配列解析ツールMEMEのMASTを用いてセリンリパーゼモチーフPS00120 [LIV] {KG} [LIVFY] [LIVMST] G [HYWV] S {YAG} G [GSTAC]を有する遺伝子を抽出した。

## 【 0 0 4 7 】

## 17. 色素分析

本培養を行った藻体をセルカウントし、 $5 \times 10^8$  cellsとなるよう遠心回収 (8,000g、25、5分)し、直ちに液体窒素にて凍結後、色素の抽出まで80℃で保存した。色素抽出はJeffreyら及びHuらの方法に従い、アセトンを用いて行った (Jeffrey, S. W., Hallegraeff, G. M. (1987). Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton: a problem for chlorophyll analysis. *Mar Ecol Prog Ser*, 293 304、Hu, X., Tanaka, A., Tanaka, R. (2013). Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant Methods*, 9(1), 19)。藻体に対し30℃の90%アセトン1mlを添加し、氷水中にて10分間超音波破碎 (W 170ST、本多電子株式会社製)を行った。遠心分離 (13,000g、4、5min)後のアセトン層を回収し、残渣に対して4ml、及び5mlの90%アセトンを用いて同様に抽出を行った。これら10mlのアセトン層をフィルター濾過 (DISMIC 13 JP、ADVANTEC社製)し、CLH不活性化条件色素サンプルとした。また、CLH活性化条件として50%アセトン1mlを添加し、室温で30分インキュベーションした。その後4mlの100%アセトンを用いて反応を停止させ、先と同様に超音波処理後、上清を回収した。残渣に対し、5mlの90%アセトンを用いて抽出後、回収したアセトン層をフィルター濾過し、CLH活性化条件色素サンプルとした。

10

## 【 0 0 4 8 】

Zapataらに倣い、抽出した色素サンプルのHPLC分析を行った (Zapata, M., Rodriguez, F., Garrido, J. L. (2000). Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine containing mobile phases. *Mar Ecol Prog Ser*, 29 45)。固定相にはWaters Symmetry C8 Column (150×4.6mm、3.5µm、100µm、日本Waters株式会社製)を用い、移動相にはメタノール:アセトニトリル:0.25Mピリジン液=2:1:1(v:v:v)、及びメタノール:アセトニトリル:アセトン=1:3:1(v:v:v)を用いた。色素サンプルは100%メタノールを用いて2倍希釈し、10µlを分析に供した。664nmにおける吸光度をモニタリングし、クロマトグラムを作成した。標準試料には100%メタノールで調製したクロロフィルa (和光純薬工業株式会社)、及びクロロフィルd (DHI Lab Products、HOERSHOLM社製)を用いた。クロロフィルa標準試料の濃度はマイクロプレートリーダーSH 9000 (コロナ電気株式会社製)にて663nm及び645nmにおける吸光度を測定し、Mackenneyの式 ( $\text{Chlorophyll a} (\mu\text{g/ml}) = 12.72 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$ )に基づいて算出した。

20

30

## 【 0 0 4 9 】

## 18. プラスミドの構築

pSP GFP/GAPDHプラスミド (Maeda, Y., Tateishi, T., Niwa, Y., Muto, M., Yoshino, T., Kisailus, D., Tanaka, T. (2016). Peptide mediated microalgae harvesting method for efficient biofuel production. *Biotechnol Biofuels*, 9(1), 10)はenhanced Green Fluorescence Protein (eGFP)遺伝子の5'上流に当該株由来グリセルアルデヒド 3リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)遺伝子のプロモーター配列とEcoRVサイトを、下流に*P. tricornutum*由来のフコキサンチンクロロフィルa/c結合タンパク質A(fcpA)遺伝子のターミネーター配列を有している。このプラスミドのEcoRVサイトに人工合成した*A. thaliana*由来CLH遺伝子(972bp)を導入し、pSP CLH GFP/GAPDHプラスミドを構築した(図1)。

40

## 【 0 0 5 0 】

19. パーティクルガン法による*F. solaris*の形質転換

50%グリセロール中に懸濁された60mg/mlタングステン粒子 (直径0.6µm)懸濁液 (高純度化学研究所製) 50µlに対し、5µg分のpSP CLH GFP/GAPDH、2.5M CaCl<sub>2</sub> 50µl及び0.1Mスペルミジン 20µlを添加し、粒子上へのプラスミド固定化処理を行った。培養3日目 (対数増殖期中期)の藻体を遠心回収(8,500g、25℃、10分間)し、 $5 \times 10^7$  cellsをf/2寒天培地 (直径3.6cmシャーレ)上に塗布し、風乾させた。Biolistic PDS 1000/He Particle Delivery System (Bio Rad Laboratories社製)内にシャーレをセットし、打ち出し圧力1,100

50

psiにてプラスミド導入を行った。その後、復活培養 (25 °C、24時間、50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )を行い、f/2液体培地を加え、セルスクレーパーで細胞を回収した。回収した藻体を500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418含有f/2寒天培地 (直径9.0cmシャーレ)に塗布し、21日間培養を行った (25 °C、140  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )。形成した薬剤耐性コロニーを爪楊枝を用いて、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418含有f/2培地入り96穴プレートに移し、培養 (25 °C、140  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、7日間)した。

#### 【 0 0 5 1 】

##### 1 10. 導入遺伝子領域のPCR増幅

液体培地にて培養したクローン及び野生株を遠心回収 (8,500g、25 °C、5分間)し、Nucl eoSpin Tissue XS(タカラバイオ株式会社)を用いてゲノムDNAを抽出した。CLH GFP遺伝子領域の一部 (1,205bp)を増幅するようにプライマーForward (5' CGC AAC TAC TTC TAC T CT GAC G 3' (配列番号9))、Reverse (5' GAC GTT GTG GCT GTT GTA GTT G 3' (配列番号10))を設計し、Prime STAR Maxを用いてPCR増幅((98 °Cで1min)×1サイクル、(98 °Cで10sec、63 °Cで10sec、72 °Cで10sec)×30サイクル、(72 °Cで3min)×1サイクル)を行った。ポジティブコントロールとしてpSP CLH GFP/GAPDHプラスミドをテンプレートとし、ネガティブコントロールとして超純水をテンプレートとした。また、ゲノムDNAの抽出の確認のために、1500FRプライマーを用いて増幅を行った。PCR増幅産物の1%アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドを確認した。

#### 【 0 0 5 2 】

##### 1 11. Reverse Transcription (RT) PCR

凍結保存した野生株及び形質転換体 (5 × 10<sup>5</sup> cells)を乳鉢・乳棒を用いて破碎した。破碎物に対してPlant RNA Isolation Reagent (Invitrogen社製)を用い、プロトコールに従ってTotal RNAを抽出した。得られたTotal RNAに対しDNaseI (タカラバイオ株式会社)を加え、インキュベーションし (37 °C、30分間)、更にRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて精製した。処理後のTotal RNA 1  $\mu\text{g}$ を鋳型とし、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ株式会社)を用いてcDNAを合成した。得られたcDNA 1  $\mu\text{g}$ をテンプレートとし、CLH遺伝子に対するプライマーForward (5' TTG ATC CAG TGG CAG GAA CT 3' (配列番号11))、Reverse (5' GGC ATC ACG TTG TTC CAC TT 3' (配列番号12))により、PCR増幅((98 °Cで1min)×1サイクル、(98 °Cで10sec、63 °Cで5sec、72 °Cで10sec)×30サイクル、(72 °Cで3min)×1サイクル)を行った。なお、cDNAの合成を確認するために、GAPDH遺伝子に対するプライマーForward (5' TTG GAG TCA ATG GCT TTG GC 3' (配列番号13))、Reverse (5' TTC ACC ATC ACT ACG TTC GC 3' (配列番号14))を設計し、同様に増幅した。増幅産物に対し、Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies社製)を用いてAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)によるキャピラリー電気泳動を行なった。

#### 【 0 0 5 3 】

##### 1 12. アメーバによるF. solarisの捕食実験

F. solaris野生株及び形質転換体を、f/2培地500mlを用いて本培養 (25 °C、130  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、0.8l/min/l、2%CO<sub>2</sub>)した。7日間後の培養液を、新たなf/2培地500mlに対し、初期濃度1 × 10<sup>5</sup> cells/mlとなるように加えた。更に、アメーバの培養液を、先のフラスコ内にそれぞれ1 × 10<sup>5</sup> cells/mlとなるように加えた。25 °C、100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、0.8l/min/l、2%CO<sub>2</sub>の条件で7日間培養を行い、24時間ごとに培養液を1ml回収した。F. solaris及びアメーバの細胞数を計数し、それぞれの増殖曲線を作成した。また、光量子束密度500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ として同様に検討を行った。

#### 【 0 0 5 4 】

## 2. 結果及び考察

### 2 1. F. solaris捕食性アメーバのキャラクタリゼーション

#### 2 1 1. 形態観察

F. solaris培養槽より単離された2種のアメーバ(A、B)に対し、顕微鏡観察を行い、形態的特徴を獲得した。いずれのアメーバも仮足(pseudopod)と呼ばれる細胞質の一時的な突出を用いた運動(=アメーバ運動)をすることが確認された。それぞれの有する仮足は形

10

20

30

40

50

態的に異なっており、アメーバAは丸みを帯びた葉状仮足を進行方向に対し突出させていることが確認された。一方でアメーバBでは、dactylopodiumと見られる仮足を進行方向に限らず複数突出させていることが確認された。また、いずれのアメーバにおいても細胞内に*F. solaris*細胞を取り込んでいることが確認された。クロロフィル蛍光を確認した結果、アメーバ細胞内の*F. solaris*細胞内では色素体の形状を確認できなかったことから、細胞内構造が維持されていないことが示唆された。培養2週間後の細胞を確認した結果、アメーバBでは顕著な形態的变化は認められなかったものの、アメーバAは多くの細胞がシスト形成していることが確認された。これは*F. solaris*細胞が枯渇したために休止状態となったためであると考えられる。

#### 【 0 0 5 5 】

ImageJを用いてアメーバ細胞の面積を測定した。その結果、アメーバAの運動細胞では $179.4 \pm 59.5 \mu\text{m}^2$  (n=30)であり、シスト細胞では $62.6 \pm 16.5 \mu\text{m}^2$  (n=28)であり、シスト形成により細胞が縮小することが示唆された。また、アメーバBは $205.0 \pm 118.4 \mu\text{m}^2$  (n=42)であり、アメーバAと比較してわずかに大きいことが示唆された。その一方で、アメーバAでは $100.4 \sim 337.1 \mu\text{m}^2$ 、アメーバBでは $76.2 \sim 594.9 \mu\text{m}^2$ のサイズの細胞が観察され、アメーバBの方が細胞サイズのばらつきが大きいことが示唆された。以上の形態観察より、*F. solaris*培養槽から単離された2種のアメーバは形態的に大きく異なることが示唆された。

#### 【 0 0 5 6 】

##### 2 1 2. 18S rDNA配列に基づく分子系統解析

形態的に異なることが示された2種のアメーバ(A、B)の18S rDNA配列に基づく分子系統解析を行った。プライマーとして1500F及びR並びにMoonA及びBを用いてPCR増幅を行った結果、いずれのプライマーを用いた場合においても、増幅産物が確認された。しかし、MoonA及びBプライマーを用いた場合、アメーバA、B及び*F. solaris*ゲノムのいずれについても、500~2,000bpの非特異的な増幅が確認された。その一方で1500F及びRプライマーを用いた場合、アメーバAでは約1,800bpのシングルバンドが得られ、アメーバBでは3本のバンド(2,000、1,800及び1,200bp)が得られた。また、いずれのバンドも*F. solaris*ゲノム由来のバンド(約1,800 bp)とは長さが異なったことから、*F. solaris*由来ではないことが考えられた。そのため、1500F及びRプライマーによる増幅産物を対象にシーケンス解析を行った。サブクローニング後のアメーバA由来の2クローンをシーケンス解析した結果、共に1,871bpの一致した配列が獲得された。Blastnによる相同性検索の結果、*Euplaesiobystra hypersalinica* strain A2 (Accession No.: FJ222604.1)と高い相同性(88%)を示した。*E. hypersalinica*に関する報告は少ないものの、当該株は韓国の高塩濃度環境中(20%)から単離された株である (Park, J. S., Simpson, A. G., Brown, S., Cho, B. C. (2009). Ultrastructure and molecular phylogeny of two heterolobosean amoebae, *Euplaesiobystra hypersalinica* gen. et sp. nov. and *Tulamoeba peronaphora* gen. et sp. nov., isolated from an extremely hypersaline habitat. *Protist*, 160(2), 265-283)。

#### 【 0 0 5 7 】

また、アメーバB由来の4クローンを解析した結果、長さ(1,790、2,094、2,090及び2,092bp)及び配列が異なることが示された。その一方で、いずれの配列も*Neoparamoeba branchiphila*と最も高い相同性(99%)を示した。したがって、複数種のアメーバが混在していたためではなく、18S rRNA遺伝子における塩基多型によって様々な配列が得られたと考えられる。18S rRNA遺伝子における塩基多型は真核生物において確認されており、アメーバにおいても報告されている。なお、*N. branchiphila*はサーモンのエラの感染症を引き起こすことが広く知られている。以上、18S rDNA配列に基づく分子系統解析の結果、アメーバAはヘテロロボサ生物の*Euplaesiobystra*属、アメーバBはアメーボゾア生物の*Neoparamoeba*属に分類されることが示唆された。以降アメーバAを*Euplaesiobystra* sp.、アメーバBを*Neoparamoeba* sp.と称する。ヘテロロボサ及びアメーボゾアはそれぞれ真核生物において主要な系統の1つであり、シアノバクテリア培養槽より同時に単離されたことが報告されている。

#### 【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

以上、顕微鏡観察に基づく形態観察、及び18S rDNA配列に基づく分子系統解析により、2種の*F. solaris*捕食性アメーバは形態的及び系統的に大きく異なり、*F. solaris*の捕食者はある種には限られないことが示唆された。

【0059】

## 2.2. *F. solaris*野生株におけるクロロフィラーゼ(CLH)活性評価

CLH活性はこれまで微細藻類を含む多くの植物細胞において見出されている一方で、その有無は種特異的であり、系統からその有無を判断することも難しい。そこでまず初めに、*In silico*解析及び色素分析により、*F. solaris*野生株におけるCLH活性の有無を評価した。

【0060】

Blastnを用いて、*A. thaliana*由来CLH遺伝子の塩基配列と相同性を持つ遺伝子を検索した結果、モデル珪藻*P. tricornutum*及び*T. pseudonana*を含め、3種の珪藻において相同性を有する遺伝子の存在は認められなかった。これは*A. thaliana*においてパラログのCLH1及びCLH2遺伝子の塩基配列の相同性は40%であるように、CLHは配列の相同性が低いためであると考えられる。一方で、セリンリパーゼモチーフPS00120が共通モチーフとして保存されていることが示唆されている。したがって*F. solaris*の全遺伝子における当該モチーフを検索した結果、34遺伝子においてその存在が認められた( $E \text{ value} < e^{-35}$ )。また、これらの内、16遺伝子がCLHと同様の / hydrolase superfamilyであった。以上の解析から、*F. solaris*野生株においてCLH様活性を示すタンパク質をコードする遺伝子が複数存在することが示唆された。

【0061】

*F. solaris*においてCLH様遺伝子の存在が示唆されたため、CLH不活性化条件(90%アセトン)及びCLH活性化条件(50%アセトン)にて色素を抽出し、HPLC分析によってCLH活性を評価した。各サンプルより得られたクロマトグラムと、クロロフィルa及びクロロフィリドa標品より得られたクロマトグラムとを比較した結果、CLH不活性化条件サンプルではクロロフィルa由来のピーク(Rt:33.2min)が確認された(図2A)。この前後に現れた小さなピークは、抽出又は分析過程にて生じたクロロフィルaの酸化物によるものであると考えられる。また、CLH活性化条件サンプルのクロマトグラムにおいては、クロロフィルa由来のピークに加え、クロロフィリドa由来のピーク(Rt:9.3min)が認められた(図2B)ことから、クロロフィリドaの存在が認められた。

【0062】

珪藻において、CLHは高等植物と同様に葉緑体外に存在することが示唆されている。50%アセトン溶液中においては、CLHとクロロフィルaが反応し、クロロフィリドaが生じる。したがって、細胞破碎を行わずに、CLH不活性化条件である90%アセトンによる抽出を行った色素サンプルではクロロフィリドaは検出されず、一方でCLH活性を維持した場合にのみクロロフィリドが検出されたと考えられる。また、植物細胞においてクロロフィルからクロロフィリドを生成する酵素として、CLHに加え、クロロフィルデフィチラーゼ (CLD1)が近年同定されている。しかしながら、この酵素は7%以上のアセトン溶液中にて著しく失活することが示されている。したがって、今回確認されたクロロフィリドaは*F. solaris*におけるCLH様タンパク質によって生じたものであると考えられた。以上のことから、*F. solaris*野生株はCLH活性を有することが示唆された。

【0063】

## 2.3. CLH活性向上形質転換体の作出

*F. solaris*野生株に対し、高等植物*A. thaliana*由来CLH遺伝子を発現可能に導入してなる形質転換*F. solaris*を作出した。*F. solaris*  $1.25 \times 10^5$  cellsに対してpSP CLH GFP/GAPDHプラスミドを導入したところ、薬剤耐性株を33コロニー獲得した。この時の形質転換効率は2.6colonies/ $10^5$  cellsであり、ポジティブコントロールとしてpSP GFP/GAPDHプラスミドを導入した場合の2.7colonies/ $10^5$  cells (8colonies/ $3.0 \times 10^5$  cells)とほぼ同等の値であった。これらのコロニーを液体培地にて培養し、1か月以上安定して培養可能であった19クローン(#1-19)について、PCR増幅によりゲノム上への目的遺伝子の導入を確認した

。その結果、19クローン中7クローン (#5、#6、#8、#10、#11、#12、#17)において、プラスミドをテンプレートとしたポジティブコントロールと同様の位置に目的のシングルバンド (1,206bp)が確認された(図3)ことから、CLH GFP遺伝子のゲノム上への導入が示唆された。その他のクローンについて、18S rDNAユニバーサルプライマーを用いた場合に増幅産物 (約1,800bp)が得られたことから、ゲノムDNAは抽出できていたと考えられ、目的遺伝子のバンドが確認されなかったクローンでは、薬剤耐性遺伝子のみが導入されたこと、または培養期間中におけるCLH GFP遺伝子の欠失が示唆された。更に、これら7クローンについてGFP蛍光観察を行った結果、全てのクローンについてGFP蛍光が認められたことから、全てのクローンにおいてCLH GFP遺伝子の発現が示唆された。

#### 【0064】

CLH GFP遺伝子のゲノム上への導入、及び発現が示唆された7クローンについてCLH活性を算出し、野生株と比較した。CLH活性は、一般的に用いられているクロロフィルa/(クロロフィルa+クロロフィルb)のモル比から算出した。その結果、CLH活性は3クローン(#5、#12、#17)において野生株と比較して有意な活性の向上が認められた(図4A)。特に、野生株と比較した場合の活性の向上の最大値はクローン#12における $1.54 \pm 0.10$ 倍であった。また、野生株及び7クローン全てにおいて、クロロフィルaプールサイズ(クロロフィルa+クロロフィルb(fg/cell))に有意な差は認められなかった(図4B)ことから、CLH活性の向上は外来遺伝子の導入や発現等によるクロロフィル量の減少によるものではなく、導入したCLHの活性によることが示唆された。なお、微細藻類のクロロフィルプールサイズは種や培養条件によって異なるものの、珪藻*P. tricornutum*におけるクロロフィルaプールサイズは50 300fg/cellであることから、今回の*F. solaris*における値は妥当であると考えられる。

#### 【0065】

CLH活性の向上したクローン#5、#12、#17に対してRT PCRを行い、CLH遺伝子のmRNAレベルでの発現を確認した。野生株及び上記3クローンからRNAを抽出し、cDNAを合成後、導入したCLH GFP遺伝子領域(151bp)に対しPCR増幅を行った。その結果、野生株から得られたcDNAをテンプレートとした場合では目的のバンドは得られなかった。同一のテンプレートに対してGAPDH遺伝子(95bp)を標的とした場合では目的の位置にバンドが得られたことから、cDNAは獲得されていると考えられる。また、CLH GFP発現プラスミド及び形質転換体からcDNAをテンプレートとした場合では、いずれも目的の位置にバンドが確認された。以上より、クローン#5、#12、#17において導入したCLH遺伝子の発現が示唆され、これによってCLH活性が向上したと考えられた。

#### 【0066】

#### 2.4. CLH活性の向上によるアメーバ捕食能への影響評価

獲得された形質転換体において最もCLH活性の向上が認められたクローン#12を用いて、アメーバによる捕食実験を行い、その影響を評価した。*F. solaris*野生株及び形質転換体を2種類のアメーバ*Euplaesiobystra* sp.及び*Neoparamoeba* sp.の存在下で培養し、*F. solaris*及びアメーバの細胞数を基に生育曲線を作成した。その結果、アメーバ非存在下では野生株及び形質転換体間で顕著な差は見られず、共に培養4日目に定常期に達したことから、外来性CLH遺伝子の導入による生育への影響は認められなかった(図5A、実線がクローン#12、破線が野生株)。また、*Euplaesiobystra* sp.存在下では、非存在下と比較して顕著な*F. solaris*細胞数の減少が確認され、野生株及び形質転換体共に同様の傾向を示した(図5B、実線がクローン#12、破線が野生株)。その一方で、*Neoparamoeba* sp.存在下では、*Euplaesiobystra* sp.存在下と同様に*F. solaris*細胞数の減少は認められたものの、4日目以降では野生株と形質転換体の細胞数に有意な差がみられた(図5C、実線がクローン#12、破線が野生株)。特に7日目においては、コントロールと比較して野生株では79.4%細胞濃度が減少した一方で、形質転換体においては62.5%であった。

#### 【0067】

また、この時のアメーバの生育曲線を作成した結果、*Euplaesiobystra* sp.では野生株及び形質転換体を与えた場合で生育に顕著な差は認められなかった(図6A、実線がクロー

ン#12の存在下、破線が野生株の存在下)。一方、Neoparamoeba sp.では野生株を与えた場合と比較して、形質転換体を与えた場合、顕著に細胞増殖が抑制されることが認められた(図6B、実線がクローン#12の存在下、破線が野生株の存在下)。したがって、Neoparamoeba sp.の捕食によるF. solaris形質転換体細胞数減少の抑制は、アメーバ細胞数の減少に起因すると考えられた。

【0068】

上記の通り、CLH活性の向上によってその捕食能への影響が示唆されたNeoparamoeba sp.について、光量子束密度100、500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ にて形質転換体に対する捕食実験を行った。Neoparamoeba sp.非存在下において、F. solarisは、いずれの光量子束密度においても同様の生育を示し、100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 以上の光量子束密度による影響は認められなかった(図7A、円形マーカーはNeoparamoeba sp.非存在下、菱形マーカーはNeoparamoeba sp.存在下、破線が100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 条件、実線が500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 条件)。これは100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ において既に光化学系が還元状態となったためであると考えられる。Neoparamoeba sp.存在下においては、いずれの光量子束密度条件においてもF. solaris細胞濃度の減少が認められたが、500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ においては有意な減少の抑制が認められた。また、アメーバの生育についても、強光条件下において顕著に抑制されることが確認されたことから(図7B、破線が100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 条件、実線が500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 条件)、光量依存的なアメーバによる捕食の影響の低減が示唆された。本研究では、クロロフィル類による光毒性(光照射による一重項酸素の発生)に着目していることから、強光条件下においてアメーバ細胞内でより多量の一重項酸素が発生したことが考えられる。

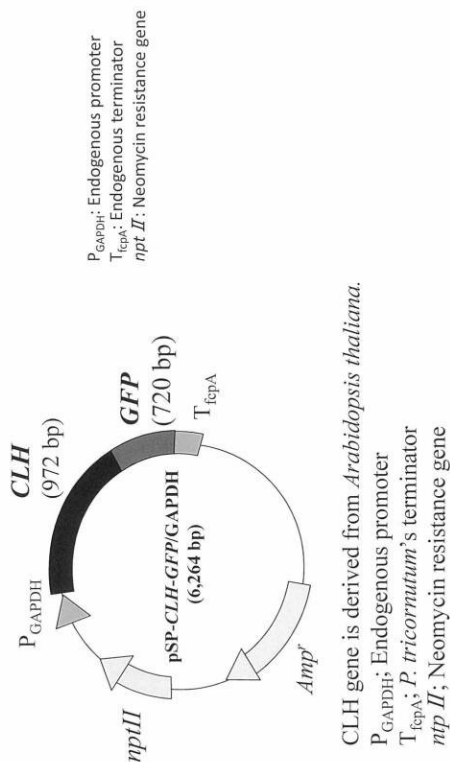
10

20

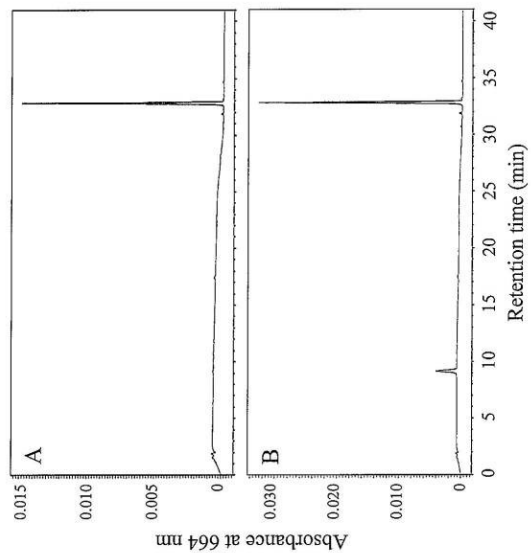
【0069】

以上の結果より、CLH活性の向上により、F. solarisの捕食生物であるNeoparamoeba sp.の抑制が可能であること、加えて、その作用には光量が重要な因子となることが示唆された。

【図1】

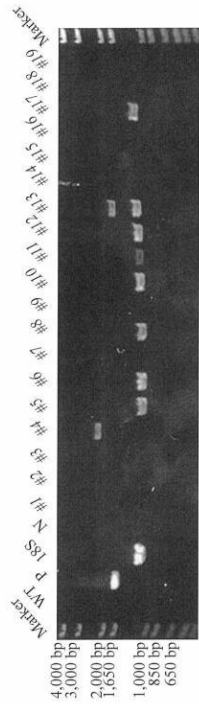


【図2】

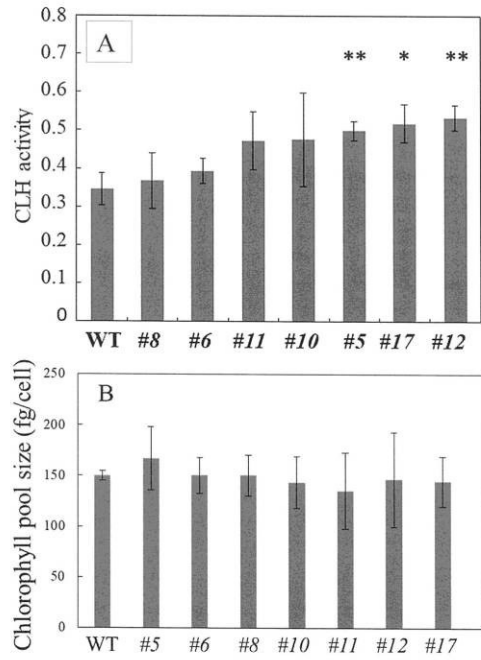




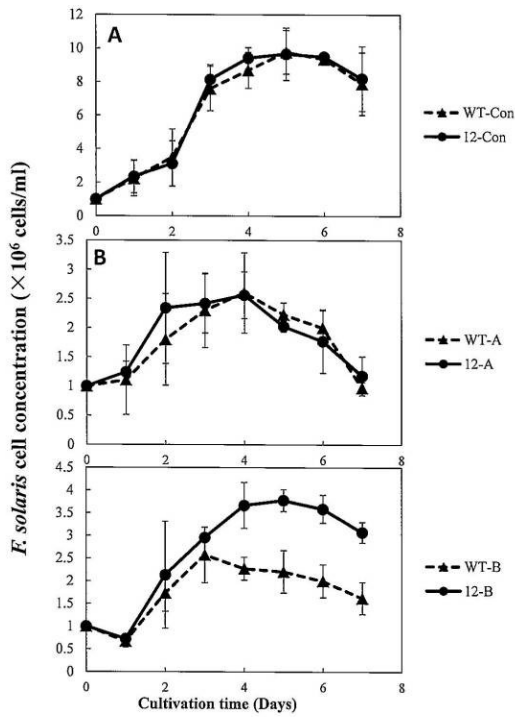
【 図 3 】



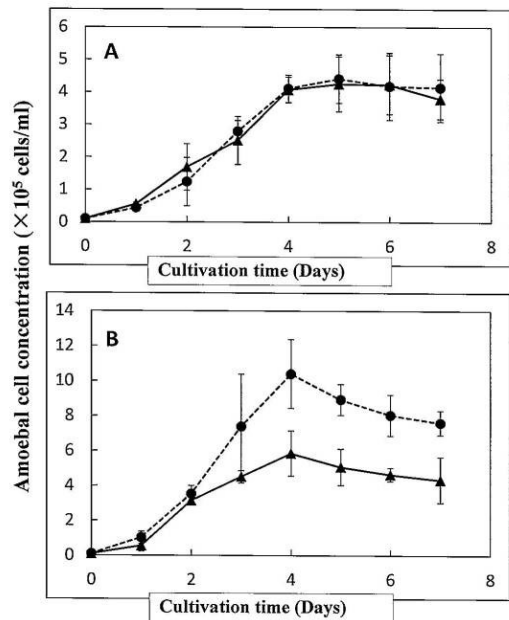
【 図 4 】



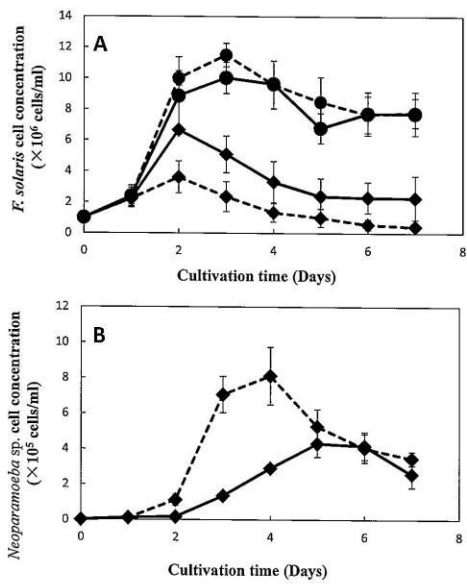
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

2021013338000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 柏山 裕一郎

福井県福井市学園3丁目6-1 福井工業大学内

Fターム(参考) 4B065 AA83X AB01 AC14 AC20 BA01 CA13 CA60