

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」
研究課題「形質転換ユーグレナによるバイオ燃料
生産基盤技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者:石川 孝博
(島根大学生物資源科学部 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究で着目する微細藻類ユーグレナ (*Euglena gracilis* Z) は、工場排気ガスを炭素源に光合成により貯蔵多糖パラミロン (β -1,3-グルカン) を合成し、嫌気条件下に移行することでパラミロンからバイオ燃料に適したワックスエステル (主成分はミリスチルミリスレート) を生産する能力を持つ。本研究では、このユーグレナの特性を活用したワックスエステル生産性増大のための基盤技術の確立を目指し、石川グループを代表に6つのグループ (田茂井、鈴木、中澤、柏山、粟井、早出) が協力し、「パラミロンおよびワックスエステル代謝の分子機構解明とその効率的な生産系の構築」に焦点を絞って以下の成果を挙げた。

1) 嫌気/好気条件下におけるパラミロン/ワックスエステル代謝調節機構: 石川グループを中心に、トランスクリプトーム解析により未解明だったユーグレナ発現遺伝子情報を整備し、パラミロンおよびワックスエステル合成酵素などユーグレナ独自の新奇有用遺伝子を取得、各酵素のパラミロンおよびワックスエステル合成機能を明らかにした。また、フルクトース-1,6-ビスフォスファターゼを含めた糖代謝関連酵素の機能を解明した (田茂井グループ)。さらに嫌気条件に応答したワックスエステル代謝には、ユーグレナ独自の酸素感受性酵素ピルビン酸:NADP⁺ オキシドレダクターゼが不可欠であること (中澤グループ)、ワックスエステル代謝調節には、タンパク質のリン酸化制御が重要であることを突き止め、リン酸化プロテオーム解析によりその調節酵素の同定に成功し (石川グループ)、ワックスエステル生産性改変のための知見を得た。実際に、リン酸化プロテオームにより同定したタンパク質リン酸化酵素の一つ STD1 の発現を意図的に抑制することで、パラミロンおよびワックスエステル生産性の向上が可能であることを示した (石川グループ)。

2) ワックスエステル生産性の向上: ワックスエステル生産性向上に為には、その前段階としてパラミロンを含めたバイオマスの増産が不可欠である。そこで、有用形質強化ユーグレナの作出と機能評価として、まずは形質転換による光合成機能の改変に着目した。ユーグレナへの遺伝子導入発現ベクターの開発とともに形質転換法を改善し、植物バイオマス生産性向上に実績のあるラン藻由来の光合成関連酵素遺伝子 (FBP/SBPase) をユーグレナに導入したところ、光合成活性、クロロフィル量、バイオマス量の増加とともに、培養体積あたりのパラミロン蓄積量は約2倍に、ワックスエステル量は約100倍に増加させることに成功した (田茂井グループ)。また、形質転換以外にも、同調培養と窒素欠乏条件の組み合わせや (柏山グループ)、フラットパネルの自律型 PhotoBioReactor により培養条件の制御により (池袋グループ)、パラミロン含量の増強に有効であることを示した。その他、好気/嫌気応答時の膜脂質の動態解析により、嫌気条件下において生産されたミリスチン酸はワックスエステル以外にもホスファチジルコリンにも多く含まれることを明らかにし、ワックスエステル生産性向上に繋がる足掛かりを得ることができた (粟井グループ)。

3) 排気ガスによる効率的なユーグレナ培養法の開発: 工場排気ガスを炭素源にした効率的な大量培養法確立のため、500L容のバイオリクターを改変した受光面確保のため700L容量の大型透明チューブ型のバイオリクターを利用し、15%炭酸ガスを含有する火力発電所からの排気ガスによって光合成を促進し、ユーグレナ細胞の増殖を誘導することができた (鈴木グループ)。一方で排気熱や亜硫酸ガスによる生育抑制が問題点として挙げられた。そこで、問題解決の一策として重イオンビーム照射による熱および亜硫酸ガス耐性株取得を試み、32°Cで有意に増殖可能な高温耐性株および亜硫酸耐性株を獲得した (鈴木グループ)。

本研究課題の逐行により、微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル代謝経路および嫌気条件に応答した調節機構を分子レベルで初めて明らかにすることができた。さらに形質転換によるバイオマス量改変の成功と排気ガスによる培養法に目処を付けることができた点は、ユーグレナ活用の基盤技術開発に寄与したと考えられる。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. ユーグレナ発現遺伝子の包括的解析とデータベースの整備:

概要: RNA-Seq 解析により、ゲノム配列や完全な転写物情報が皆無だったユーグレナの遺伝子発現情報を世界で初めて整備するとともに、ワックスエステル生産が促進される嫌気条件における包括的遺伝子発現解析を行った。アッセムブルの結果得られた 49,826 の配列情報より、新規パラミロン合成酵素およびワックスエステル合成酵素を含めたワックスエステル代謝関連酵素全ての転写物情報を得、これらの機能解析促進に繋がっている。また得られた配列情報は、その後のプロテオーム解析の参照配列としても活用しており、ユーグレナオミクス解析の推進に貢献した。本成果は、CREST 課題目標のうちユーグレナの機能を把握・制御し、効率的なバイオ燃料生産のための基盤的な技術シーズの創出に寄与している。論文: Yoshida, Y., et al., De novo assembly and comparative transcriptome analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic conditions. BMC Genomics, 17:182, 2016

2. ユーグレナの貯蔵多糖パラミロン(β -1,3-グルカン)合成酵素の同定:

概要: パラミロンはグルコースが 500~700 個 β -1,3-グルコシド結合した均一の顆粒構造をもつユーグレナ独自の貯蔵多糖であり、機能性分子として食品や保湿剤、バイオポリマーとして代替プラスチックやバイオフィルムへの応用のみならず、バイオ燃料としてのワックスエステル合成の糧としても有用である。前項の発現遺伝子データより相同性解析の結果得られたグルカン合成酵素のオルソログの一つ GSL2 が、パラミロン合成酵素であることを初めて明らかにし、その機能を解析した。本成果は、CREST 課題目標のうち、藻類等の機能の利用に関する多様な技術創出に寄与し得る成果である。論文: Tanaka, Y., et al., Glucan Synthase-Like 2 is indispensable for paramylon synthesis in *Euglena gracilis*. FEBS Lett., 591(10): 1360-1370, 2017; 特許: 特願 2017-091320

3. ワックスエステル合成酵素の同定と機能解析:

概要: ユーグレナのワックスエステル合成酵素(WSD: Wax Ester Synthase/Diacylglycerol acyltransferase)を遺伝子レベルで初めて単離・同定に成功した。組換え体酵素および細胞工学的解析により、WSD オルソログのうち 2 つ(WSD2, WSD5)はワックスエステル合成酵素として、1つ(WSD3)はワックスエステルと TAG の両方の合成に係る酵素であることが示され、ワックスエステル生産性改善の繋がる可能性を示した。本成果は、CREST 課題目標のうち、藻類等の機能の利用に関する多様な技術創出に寄与し得る成果である。論文: Tomiyama, T., et al., Wax ester synthase/diacylglycerol acyltransferase isoenzymes play a pivotal role in wax ester biosynthesis in *Euglena gracilis*. under revision, 2017

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 形質転換によるユーグレナ光合成機能強化とバイオマス増産技術の開発:

概要: ユーグレナのワックスエステル生産性向上を目的として、ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入による光合成能およびバイオマス生産能への影響を調べた。その結果、遺伝子導入ユーグレナ(EpFS4 株)は、野生株と比較して、光合成活性、クロロフィル量、バイオマス量の増加とともに、培養体積あたりのパラミロン蓄積量が約 2 倍に、ワックスエステル量が約 100 倍に増加した。ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入は、ユーグレナにおいても光合成能強化、バイオマス生産量およびワックスエステル生産性の向上に有用であることを示した。本成果は、CREST 課題目標のうち、効率的なバイオ燃料生産をはじめとする藻類等の機能を利用した基盤的な技術シーズの創出に寄与している。論文: Ogawa T., et al. Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial

fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. *Biotchnol. Biofuel.*, 8:801, 2015 特許:出願番号 PCT/JP2014/055161 (US20160010070)

2. タンパク質キナーゼの発現抑制によるバイオマス量の改変:

概要: リン酸化プロテオーム解析の過程で見出した DYRK タンパク質リン酸化キナーゼのオルソログについて、遺伝子発現抑制によるパラミロンおよびワックスエステル代謝に及ぼす影響を調べた。その結果、3つの DYRK ファミリーのうち、STD1 と STD2 の発現抑制はパラミロンおよびワックスエステル量をそれぞれ約 1.4 倍に増加することが示され、ワックスエステル増産への応用が期待された。本成果は、CREST 課題目標のうちユーグレナの機能を把握・制御し、効率的なバイオ燃料生産のための基盤的な技術シーズの創出に寄与している。論文: Kimura, M., Ishikawa, T. Suppression of DYRK orthologs expression affects wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *J. Appl. Phycol.*, in press, 2017

3. 有用物質生産に係る新奇ユーグレナ株の探索および新奇変異株の取得:

概要: 現行の *E.gracilis* 株以外に産業利用可能な新奇ユーグレナ株の単離を試み、*Euglena anabaena* var. *minor* を取得・同定した。*E. anabaena* 株の生産するパラミロンは、*E. gracilis* 株よりも粒径が小さい、含量が高いこと (~45% dw)、また静置後の細胞沈降が速いことなどの特徴を有しており、基礎研究や産業利用に有用であることが示された。また重イオンビーム照射を利用し、排ガスに含まれる亜硫酸ガス耐性および高温耐性を持つ変異体を実施し、100 mg/L ピロ亜硫酸カリウムに対し耐性を獲得した株および 32°C で有意に増殖可能な高温耐性株を取得した。本成果は、CREST 課題目標のうち効率的なバイオ燃料生産をはじめとする藻類等の機能を利用した基盤的な技術シーズの創出に寄与している。論文: Suzuki, et al., "Selection and characterization of *Euglena anabaena* var. *minor* as a new candidate *Euglena* species for industrial application." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79: 1730-1736, 2015; Yamada, et al., "Production of a thermal stress resistant mutant *Euglena gracilis* strain using Fe-ion beam irradiation." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80: 1650-1656, 2016; 特許: 特開 2017-35060

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「石川」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
石川 孝博	島根大学大学生物資源 科学部	教授	H24.10～
丸田 隆典	同上	准教授	H24.10～
小川 貴央	同上	准教授	H28.4～
田中 優史	同上	博士研究員	H26.4～
羅 軍	同上	研究支援者	H25.4～
木村 光宏	同上	博士研究員	H28.4～H29.4
後藤 京	島根大学大学院生物資 源科学研究科	M1～M2	H28.4～
石井 侑樹	同上	M1	H29.4～
荒川 和晴	慶應義塾大学大学院政 策・メディア研究科	特任講師	H25.4～
鈴木 健吾	株式会社ユーグレナ	部長	H28.4～
山田 康嗣	同上	研究員	H28.4～
西野 耕平	鳥取大学大学院連合農 学研究科(島根大学配 属)	D3	H29.4～H29.7
山口 由貴	島根大学大学生物資源 科学部	研究支援者	H25.4～H27.3
新部 かお里	島根大学大学生物資源 科学部	研究支援者	H27.5～H28.3
玉木 峻	鳥取大学大学院連合農 学研究科(島根大学配 属)	D1～D3	H24.10～H27.9
富山 拓矢	島根大学大学院生物資 源科学研究科	M1～M2	H26.4～H28.3
栗原 佳恵子	同上	M1～M2	H27.4～H29.3

研究項目

- ・ RNA-Seq による発現遺伝子解析
- ・ 包括的プロテオミクス解析
- ・ 脂肪酸の代謝プロファイリング解析
- ・ 単離遺伝子の解析
- ・ 形質転換ユーグレナのワックスエステル生産性および生産コストの検証

②「田茂井」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
田茂井 政宏	近畿大学農学部バイオサ イエンス学科	准教授	H24.10～
重岡 成	同上	教授	H24.10～
作山 治美	同上	研究支援者	H24.10～

乾 博	大阪府立大学地域保健学域総合リハビリテーション学類栄養療法学専攻	教授	H24.10～
藪田 行哲	鳥取大学農学部生物資源環境学科	准教授	H24.10～
野志 昌弘	近畿大学農学部バイオサイエンス学科	博士研究員	H28.4～H29.3
三根 彩佳	近畿大学大学院農学研究科バイオサイエンス専攻	M1～M2	H24.10～H26.3
小川 貴央	近畿大学農学部バイオサイエンス学科	博士研究員	H25.4～H28.3
木村 彩子	同上	特別嘱託職員	H26.4～H27.5
菅野 愛	近畿大学大学院農学研究科バイオサイエンス専攻	M1～M2	H27.4～H29.3
松井 伶真	同上	M1	H28.4～H29.3
岡村 桃子	近畿大学農学部バイオサイエンス学科	研究支援者	H29.5～

研究項目

- ・ ワックスエステル生合成系に関わる酵素タンパク質の同定
- ・ 新規ベクターの開発
- ・ 発現遺伝子情報によるユージェナ内在性プロモーターの単離
- ・ ユージェナ内在性プロモーターの形質転換系への利用と機能評価
- ・ 光合成機能強化ユージェナの機能評価
- ・ 有用遺伝子導入ユージェナの作製
- ・ 有用遺伝子導入ユージェナの生理機能評価

③「鈴木」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
鈴木 健吾	株式会社ユージェナ	部長	H24.10～H28.3
吉田 絵梨子	同上	主任研究員	H24.10～H26.6
中島 綾香	同上	研究員	H24.10～H28.3
山田 康嗣	同上	研究員	H26.4～H28.3
横山 一樹	同上	研究員	H26.4～H28.3
岩田 修	同上	研究員	H25.4～H28.3

研究項目

- ・ 排気ガスを利用した高密度培養法検討
- ・ 閉鎖系バイオリアクターによる最適培養条件の検討
- ・ 形質転換ユージェナのワックスエステル発酵生産に適した培養条件の確立

④「中澤」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
----	----	----	------

中澤 昌美	大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科	助教	H27.4～
安藤 博子	同上	技術補助員	H28.4～
天田 克己	同上	M1	H29.4～
松原 裕樹	同上	M1	H29.4～
太田 剛志	同上	M2	H27.4～H28.3
小山 啓一郎	同上	M2	H27.4～H28.3
林 龍太	同上	M1～M2	H27.4～H29.3
奥野 仁美	同上	M1～M2	H27.4～H29.3

研究項目

- ・ NADP⁺依存型ピルビン酸オキシドレダクターゼの酸化還元調節機能の解明とその応用
- ・ ワックス生産性向上に関わるミトコンドリア電子伝達系の役割解明

⑤「柏山」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
柏山 祐一郎	福井工業大学環境情報学部	教授	H28.4～
丸山 萌	同上	M1～M2	H28.4～
加山 基	同上	M1～M2	H28.4～
宗京 朋美	同上	研究補助員	H28.4～

研究項目

- ・ パラミロン蓄積が亢進する窒素欠乏条件下の細胞内窒素フラックスの解明
- ・ C/N バランスに着目したユーグレナの細胞リズムの解析と制御因子の解明

⑥「栗井」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
栗井 光一郎	静岡大学大学院理学領域	准教授	H28.4～
松本 玉恵	静岡大学理学部	研究補佐員	H28.4～H29.3
柴田 栞里	静岡大学大学院総合科学技術研究科	M1	H29.4～
Wiluk Chacuttayapong	同上	研究支援者	H29.4～

研究項目

- ・ ユーグレナ膜脂質解析法の確立
- ・ 嫌気応答による膜脂質代謝変化の解析

⑦「早出」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
池袋 一典	東京農工大学大学院工	教授	H28.8～

	学研究院生命機能科学 部門命環境科学研究科		
早出 広司	同上	客員教授	H28.8～
小嶋 勝博	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	特任准教授	H28.8～
塚越 かおり	東京農工大学大学院工 学研究院生命機能科学 部門	助教	H28.8～
Dwi Ariyanti	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D2～D3	H28.8～
永田 まどか	同上	D1～D2	H28.8～
高松 祥平	同上	M1～M2	H28.8～
小林 俊一	同上	M1～M2	H28.8～
上野 絹子	同上	M1～M2	H28.8～
塩谷 幸弓	同上	M1	H29.4～
布施 沙織	同上	M2	H28.8～H29.3
生野 千佳	同上	M2	H28.8～H29.3

研究項目

- ・ 野生株ユーグレナ最適化培養条件の確立
- ・ 形質転換ユーグレナの最適化培養条件の検討

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

2013年11月に開催された第1回 Kore-Japan Microalga Symposiumに参加し、日本および韓国の微細藻類研究グループとの交流し、研究者間のネットワークを形成した。

オミクス解析に関して、慶応義塾大学 SFC 研究所、大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科、神戸大学自然科学系先端融合研究環の研究者と共同研究を実施した。

同領域におけるさきがけ研究者との合同報告会をきっかけとして、平成27年度から新たに大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 中澤昌美助教、また平成28年度からは同さきがけの福井工業大学工学部環境生命化学科 柏山祐一郎教授と静岡大学理学部 粟井光一郎准教授のグループに本プロジェクトに参加していただいた。また、同領域のCREST代表者であった東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門命環境科学研究科早出広司教授（途中、同 池袋一典教授に交代）にも参加いただき、ネットワークの形成と研究体制の充実を図った。

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 オミクス解析による有用遺伝子の探索と機能解析(島根大学 石川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本項目では、好気/嫌気条件に応答したパラミロンおよびワックスエステル代謝の調節機構について、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析により好気/嫌気応答機構に係る鍵因子を探索・同定するとともに、ワックスエステル生産に関わる有用遺伝子を単離しその機能を明らかにすることで、高ワックスエステル生産ユージェレナの作出に繋げることを目的に、次の研究項目を実施した。1) RNA-Seq による発現遺伝子解析、2) 包括的プロテオミクス解析、3) 脂肪酸の代謝プロファイリング解析、4) ワックスエステル生合成系に関わる酵素タンパク質の同定、5) 単離遺伝子の機能解析。その成果について以下に述べる。

1) RNA-Seq による発現遺伝子解析:

初めにユージェレナの発現遺伝子情報を整備するため、RNA-Seq 解析を実施し、de novo アセンブルを実施した。その結果、重複を除いて得られた約 50,000 個のコンティグのうち、遺伝子発現の指標となる FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments)値が 1 以上のコンティグ約 26,000 個の配列情報を得て、データベースに登録した(DRA accession number SRP060591)。BlastX 解析により、パラミロンおよびワックスエステル代謝関連酵素遺伝子情報を得、これらの情報は4)および5)で述べるワックスエステル生合成系に関わる酵素タンパク質の同定および単離遺伝子の機能解析の成果に繋がっている。次に、好気/嫌気に応答したワックスエステル代謝調節機構についてアプローチすべく、嫌気処理後経時的に採集したユージェレナ細胞に対し、RNA-Seq による発現解析を実施した。その結果、嫌気 24 時間までに有意差を持って発現変動した遺伝子 (Differential Expressed Genes; DEG) 数は、約 2,000 であり、このうち 2 倍の閾値で発現変動遺伝子を調べたところ約 90 と極めて少数であること、またこれらの中にはパラミロンおよび脂質代謝関連酵素遺伝子は含まれていないことから、ワックスエステル代謝調節に転写レベルでの制御は関与していないと結論した。

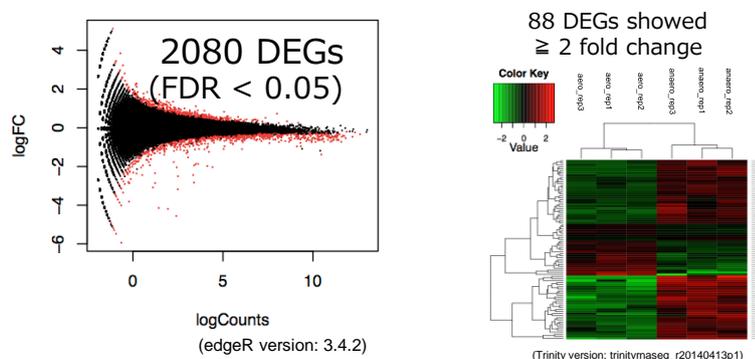


図 3.1.1 RNA-Seq による嫌気応答時の遺伝子発現解析の結果。左のボルケーノプロットは全発現遺伝子の変化を示し、赤字箇所が有意 (FDR<0.05) に変動した遺伝子(2,080 遺伝子)を示す。右は、2 倍以上に発現変動した遺伝子(88 遺伝子)のみを集めたヒートマップの結果を示す。ワックスエステル代謝関連遺伝子にはこの中に含まれていなかった。

2) 包括的プロテオミクス解析:

1) 項の結果を受け、転写後調節の可能性について検討するため、整備した発現遺伝子情報より推定タンパク質配列を参照に nanoLC-MS による比較プロテオーム解析を実施した。その結果、嫌気応答後のパラミロンおよびワックスエステル代謝関連酵素タンパク質の発現レベルは、ピルビン酸:NAD⁺オキシドレダクターゼを除き、ほとんど変動しないことが示され、翻訳調節も代謝制御には関与していないことが強く示唆された。そこで翻訳後修飾

の可能性、特にタンパク質のリン酸化修飾に着目し、プロテインキナーゼおよびプロテインフォスファターゼ阻害剤のワックスエステル代謝に及ぼす影響を調べた。嫌気後のワックスエステルの蓄積は、プロテインキナーゼ阻害剤 K252a 処理により顕著に抑制されたことより、タンパク質リン酸化が調節の鍵を握っていることが示唆された。そこで嫌気応答時のリン酸化タンパク質を包括的に解析するため、リン酸化プロテオーム解析を実施した結果、約 4,500 個のリン酸化ペプチドを同定し、そのうち約 2,000 個のリン酸化ペプチド(約 490 タンパク質に相当)が好気/嫌気条件下において有意に変動した。有意にリン酸化レベルが変動した約 490 タンパク質より、嫌気応答時のタンパク質リン酸化修飾に関与する可能性のあるプロテインキナーゼを 26 種類見出した。そこでこれらの酵素を個別に遺伝子サイレンシングし、嫌気後のワックスエステル生産への影響を調べたところ、1つのプロテインキナーゼの発現抑制細胞において嫌気後のワックスエステル蓄積が顕著に抑制されていることを見出した。そこでこのプロテインキナーゼを Wax ester Synthesis Regulation Kinase (WSRK)と命名した。

パラミロン代謝調節機構について、好気/嫌気応答時の細胞から調製したパラミロンより可溶化したタンパク質について nanoLC-MS および Progenesis QI により比較プロテオーム解析を実施し、嫌気条件に反応して検出レベルが増加した約 100 タンパク質を得た。有意に変動したタンパク質の中には、パラミロン分解への関与が示唆されるグルカナゼ様タンパク質および糖結合モチーフを有する複数の候補タンパク質が含まれていた。

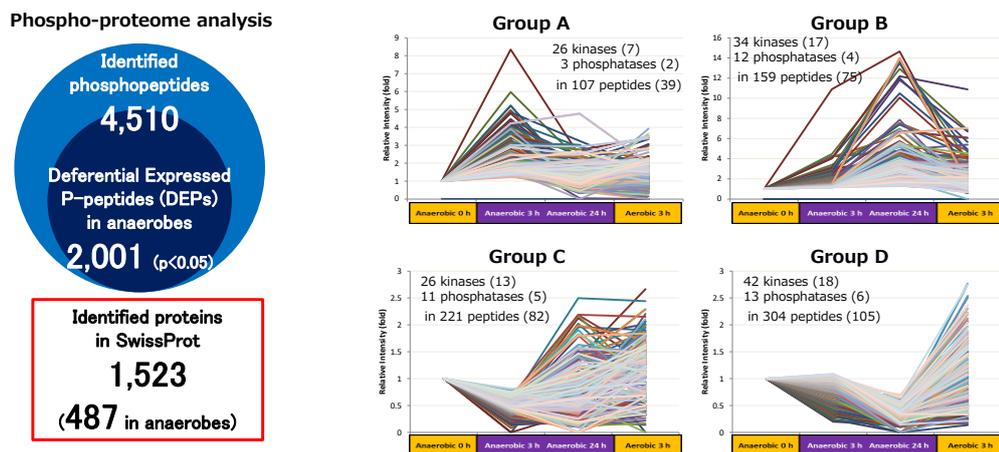


図 3.1.2 好気/嫌気条件に反応したリン酸化プロテオーム解析の結果。右は、検出した全リン酸化タンパク質(4,510 個)のうち、有意差を持って変動したリン酸化ペプチド総数(2,001)およびタンパク質数(487 タンパク質)を示す。左は、有意差を持って変動したリン酸化ペプチドに対するクラスタリング解析の結果。黄色は好気条件、紫は嫌気条件(3 時間および 12 時間)を示す。

3、4) 脂肪酸の代謝プロファイリング解析およびワックスエステル生合成系に関わる酵素タンパク質の同定: ワックスエステル生合成に関わる酵素として、ワックスエステル合成酵素の同定と機能解析を実施した。ワックスエステル合成酵素は、動植物で既知のワックスシンターゼ(WS)および原核生物と植物に存在するワックスシンターゼ/ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(WSD)が知られているが、ユグレナは 1 種類の WS および 6 種類の WSD オルソログが存在した。酵母のトリアシルグリセロール合成変異株 H1246 をホストに WS および WSD を発現させ、培地中に脂肪酸および脂肪アルコールを添加した結果、WS 組換え体ではコントロール株と比較して有意なワックスエステルの蓄積が観察されなかったが、WSD では WSD2 および WSD5 において顕著なワックスエステル合成能が示されたこと、またさらにユグレナ細胞において WS および各 WSD 遺伝子発現抑制細胞を作出した結

果、嫌気処理 24 時間後に WS 発現抑制細胞ではワックスエステルの蓄積に全く影響が見られなかったのに対し、WSD では特に WSD2/WSD5 を同時に発現抑制した際、ワックスエステルの蓄積が顕著に抑制されたこと、から WSD が実質的なワックスエステル合成酵素であると結論した。WSD2/WSD5 二重発現抑制細胞においては、パラミロンの蓄積レベルおよび嫌気後のパラミロン分解レベルにコントロール細胞との違いが観察されないこと、嫌気 24 時間後の総脂肪酸レベルもコントロール細胞と同程度であったことから、WSD2/WSD5 はワックスエステル代謝経路全体の制御には関与していないこと、また嫌気時に de novo 合成された脂肪酸は、ワックスエステル以外の物質に分配されている可能性が示唆された。脂質代謝プロファイリング解析の結果、。WSD2/WSD5 二重発現抑制細胞では、トリアシルグリセロールが顕著に増加していることが示され、実際に薄層クロマトにより分離・回収したトリアシルグリセロールにはミスチン酸含量の増加が認められた。一連の解析より、脂肪酸再分配先のトリアシルグリセロール合成の抑制は、ワックスエステル生産性の改善に繋がる可能性が示唆された。脂質の代謝プロファイリング解析は、その後平成 28 年度より粟井グループに移管してさらに詳細な解析を実施している(4.7 項)。

5) 単離遺伝子の機能解析： 上述のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析より、パラミロンおよびワックスエステル代謝に係る有用遺伝子をいくつか単離し、その機能解析を進めた。これまで未同定であったパラミロン合成酵素に関して、ユーグレナの発現遺伝子データベースより植物カロース合成酵素のオルソログを2つ単離し、GSL1(Glucan Synthase Like)およびGSL2とした。ユーグレナのGSL1およびGSL2は、N末端領域にグルコシルハイドラーゼドメインを有する点で、既知のグルカン合成酵素とは異なる構造を有していた。GSL1とGSL2を個別に遺伝子発現抑制した結果、GSL2においてパラミロンの蓄積が著しく抑制されたことに加え、GSL2発現抑制細胞から単離・抽出したパラミロン画分には、基質となるUDP-グルコースの取込み活性が顕著に低下していたことから、GSL2が実質的なパラミロン合成酵素であることを同定し、工業的なパラミロン生産の可能性を示すことができた。また、リン酸化プロテオーム解析の結果、得られたタンパク質リン酸化キナーゼの一つにクラドモナス等で脂質代謝の制御に関与することが報告されているDYRKタンパク質キナーゼのオルソログが存在していた。そこでユーグレナ発現遺伝子に見つかったTAR1、STD1、STD2の各DYRKファミリー遺伝子についてサイレンシングによるパラミロンおよびワックスエステルへの影響を評価した。その結果、STD1とSTD2の発現抑制により、パラミロンおよびワックスエステル量はそれぞれ約1.4倍に増加することが示され、ユーグレナにおいてもDYRKファミリー短タンパク質が脂質代謝に寄与していることが示され、ワックスエステル増産への応用が期待された。その他にも、リン酸化プロテオーム解析の結果より、嫌気条件から好気条件に細胞を移行した際、リン酸化レベルが著しく上昇する植物SDP1リパーゼオルソログ一つを得ることができた。同遺伝子サイレンシングの結果、好気移行後のワックスエステル分解が抑制されることから、同オルソログが好気時に活性化されるワックスエステラーゼであることが強く示唆された。

3.2 ユーグレナ形質転換法の改善（近畿大学 田茂井グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

ユーグレナの有用性をより高めるためには、効率的な遺伝子導入法および安定的な導入遺伝子発現のための基盤技術の確立が重要である。本テーマでは、ユーグレナ核ゲノムへの遺伝子導入・発現に適したプロモーターおよび薬剤耐性マーカー遺伝子の探索、ベクターの構築、導入条件の検討を行った。

種々の抗生物質を用いたスクリーニング条件を検討した結果、従来用いていたカナマイシンよりもパロモマイシンの方が効率よく選抜できることを明らかにした。また、RNA-Seq によるユーグレナ遺伝子発現データより、ユーグレナで高発現しているグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）および β -tubulin 遺伝子のプロモーター領域に加え、各遺伝子の 3' 下流のターミネーター領域を単離した。両遺伝子の mRNA の配列情報からターミネーター領域を含む未知領域を PCR により増幅し、GAPDH は終止コドンから下流約 1.4 kbp、 β -tubulin については約 1.5 kbp の推定のターミネーター領域を単離した。さらに、薬剤耐性遺伝子カートリッジと

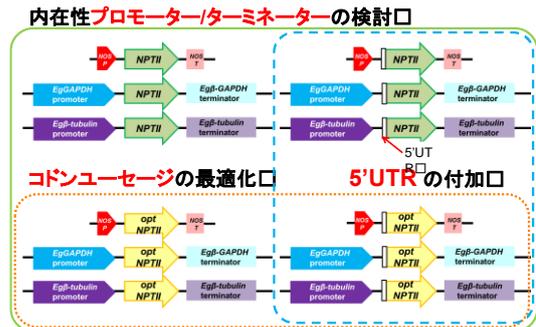


図 3.2.1 ユーグレナ形質転換用ベクター。NPTII 遺伝子の前後には制限酵素サイトがあり、導入遺伝子と入れ替えることにより簡単にベクター構築が出来る。

して用いる NPTII (neomycin phosphotransferase type II) をユーグレナのコードンユーザーに最適化した遺伝子を合成した。これらを組み合わせたベクターを構築し、NPTII と導入遺伝子を入れ替えることにより簡単にベクター作成が出来るシステムを構築した(図 3.2.1)。

一方、プロジェクト開始当初はパーティクルガンを用いて遺伝子導入を行っていたが、それに加えて本研究費で購入したエレクトロポレーターを用いた遺伝子導入条件の検討も並行して行ってきた。エレクトロポレーション法での導入に用いるユーグレナ細胞の生育時期、細胞濃度、導入遺伝子濃度、遺伝子導入時のポアリングパルスおよびトランスファーパルスの電圧・パルス幅・パルス間隔・回数・減衰率などを検討した。その結果、これまでに報告されているケイ藻(Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 874-876, 2013)およびクラミドモナス(J. Biosci. Bioeng. 115, 691-694, 2013)と比較すると高効率とは言えないものの、パーティクルガン法に比べて高い遺伝子導入効率を得られるようになった(図 3.2.2)。また、操作自体もエレクトロポレーション法の方が簡便であり、より効率よく形質転換体を作成できるようになった。

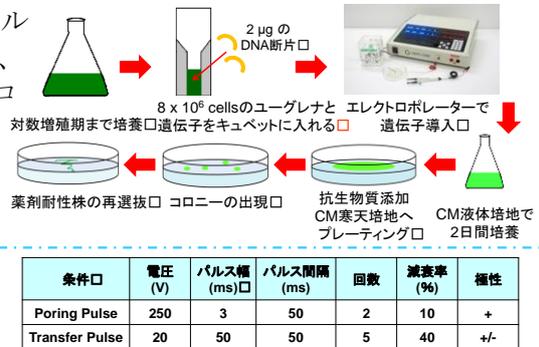


図 3.2.2 エレクトロポレーターを用いたユーグレナ形質転換の流れ

3.3 形質転換による有用形質強化ユーグレナの作出と機能評価（近畿大学 田茂井グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

ユーグレナにおいてワックスエステル量を増加させるためには、その原料となるパラミロンを高蓄積させることが一つの手段となる。そのためには遺伝子導入によりユーグレナの光

合成能力を高める必要がある。一方、ユーグレナは培養条件によってパラミロンおよびワックスエステル含量に大きな違いがあるが、それは嫌気条件下でのパラミロン分解およびワックスエステル生産能の違いによるものだと考えられる。したがって、ユーグレナのワックスエステルの生産性を向上させるためには、パラミロンの分解およびワックスエステル生合成系における律速因子と考えられる酵素遺伝子導入による機能強化、ならびに発酵条件の最適化によってこれらの速度を最大限に高めることが必要となる。本テーマでは、ラン藻カルビン回路で機能するフルクトース-1, 6-セドヘプツロース-1, 7-ビスホスファターゼ (FBP/SBPase) 遺伝子をユーグレナに導入およびユーグレナワックスエステル生合成系遺伝子導入が、ワックスエステル生産性に及ぼす影響について検討した。

35S プロモーター制御下で FBP/SBPase を発現させた形質転換株 (EpFS) を用いて、通常条件および強光・高 CO₂ 条件での生育比較を行った。その結果、通常条件下において、生育速度に顕著な差は認められなかったが、EpFS 株において細胞体積の増加が認められた (図 3.3.1)。一方、強光・高 CO₂ 条件 (350 μmol photons/m²/s, 0.3% CO₂) で生育比較を行った結果、EpFS 株は野生株と比較して生育速度の上昇、細胞体積の増加が認められた (図 3.3.1)。また、EpFS 株の光合成活性は、野生株の約 1.2~1.7 倍、クロロフィル量は野生株の約 1.3~1.6 倍に増加していた (図 3.3.2)。さらに、EpFS 株のバイオマス量 (乾燥重量) は野生株の約 1.3~2 倍、パラミロン蓄積量は細胞あたり野生株の約 1.1~1.2 倍、培養体積あたりでは約 1.5~2 倍にまで増加していた (図 3.3.2)。さらに、強光・高 CO₂ 同条

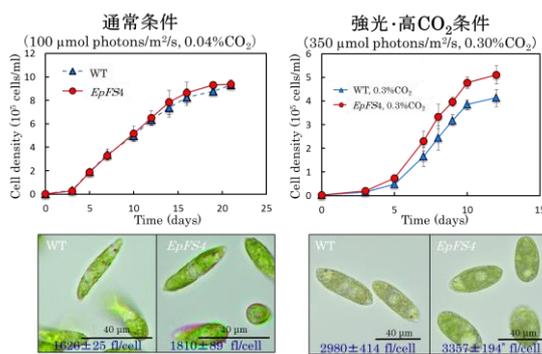


図 3.3.1. FBP/SBPase 導入ユーグレナの表現型。EpFS 株は強光/高 CO₂ 条件で、生育速度の上昇、細胞体積の増加が認められた。

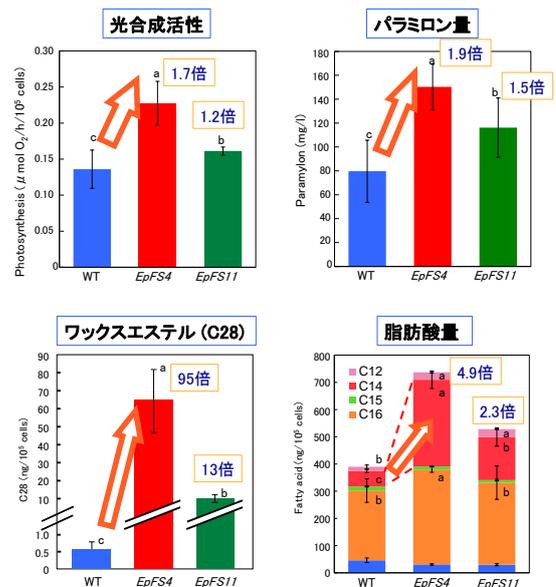


図 3.3.2. FBP/SBPase 遺伝子導入ユーグレナ株におけるパラミロンやワックスエステルの生産性の評価。

件下で培養した細胞を 24 時間嫌気処理し、ワックスエステル (C28) および脂肪酸を定量した結果、EpFS 株のワックスエステル (C28) 量は野生株の約 17~109 倍に増加しており、脂肪酸の中でも C14 は野生株の約 2.8~5.6 倍に増加していた (図 3.3.2)。これらの結果から、FBP/SBPase 遺伝子導入による光合成能の強化は、ユーグレナのバイオマスおよびワックスエステル生産性の向上を可能にすることを示した。また、本成果はユーグレナに初めて遺伝子導入ができた成果として、Biotechnol. Biofuel に掲載され、高い評価を受けた。その一方で、独立栄養条件下で培養したユーグレナ細胞におけるパラミロンからワックスエステル (C28) への変換効率が低いことが明らかとなった。ワックスエステル生合成経路を構成する酵素の中で、トランスエノイル CoA 還元酵素 (TER) の酵素活性は低く、解糖系への NAD⁺ 供給における律速段階であると推測されている。そこで、ユーグレナ由来 *EgTER1* 遺伝

子を導入することによって、ワックスエステル変換効率への影響を検討した。ベクターの構築および形質転換体の作成には、項目 3.2 で作成したベクターおよび形質転換法を用いることにより、短期間で組換え体の作出が出来た。CM 培地で定常期まで培養した *EgTER1* 導入株における TER 活性の測定を行ったところ、野生株と比較して 1.56~2.27 倍高い TER 活性を示した。これらの株は、細胞の形態、細胞増殖速度は野生株およびベクターコントロール株と有意な差は見られなかったことから、*EgTER1* の過剰発現は、生育には影響しないことが示された。次に、CM 培地で定常期まで培養したこれらの株を用いて、嫌気処理時のパラミロン分解速度を野生株およびベクターコントロール株と比較した。その結果、嫌気処理 6 時間後までの *EgTER1* 導入株におけるパラミロン分解速度は、野生株およびベクターコントロール株のそれと比較して 1.5~2.6 倍に上昇していた(図 3.3.3)。嫌気処理 6 時間後までと比較して、6 時間後以降は *EgTER1* 導入株のパラミロン分解速度は低下していたが、嫌気処理 24 時間後のパラミロン残存量は野生株およびベクターコントロール株では 41~45%であったのに対し、*EgTER1* 導入株では 30~33%と有意に多量のパラミロンが分解されていた(表 3.3.1)。*EgTER1* 導入株ではパラミロン分解速度が促進されていたことから、ワックスエステル含量も増加していることが予想された。そこで、嫌気処理 12 時間後の *EgTER1* 導入株、野生株およびベクターコントロール株細胞内の脂質を BODIPY により可視化した結果、*EgTER1* 導入株では野生株およびベクターコントロール株と比較して有意に BODIPY 蛍光が増加していることが明らかとなった(図 3.3.4、図 3.3.5)。さらに、嫌気処理 12 および 24 時間後の *EgTER1* 導入株におけるワックスエステル(C28)の定量を行ったところ、野生株およびベクターコントロール株の約 5 倍に増加していた。これらの結果から、ユーグレナへの *EgTER1* の導入は、嫌気処理時のワックスエステル発酵能を向上させることが示唆された。

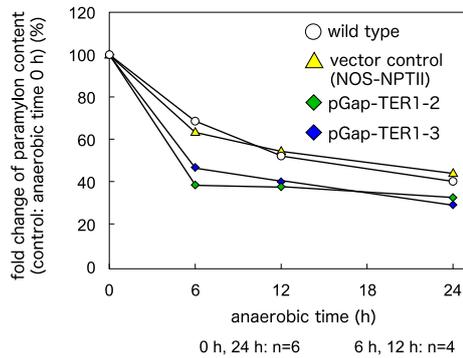


表 3.3.1. 嫌気処理時のパラミロン分解率に及ぼす *EgTER1* 導入の影響

Genotype	Paramylon content (mg / 10 ⁶ cells)			
	0 h	6 h	12 h	24 h
wild type	33.19±1.29 (100%)□	22.85±4.00 (68.8%)□	17.54±3.72 (52.8%)□	13.62±0.44 (41.0%)□
vector control	36.52±3.54 (100%)□	23.52±8.53 (64.4%)□	20.22±4.67 (55.4%)□	16.41±0.80 (44.9%)□
GAPDH-TER1-2	44.18±7.71 (100%)□	17.35±0.08 (39.3%)□	16.99±8.78 (38.5%)□	14.74±1.86 (33.4%)□
GAPDH-TER1-3	47.21±6.15 (100%)□	22.62±9.07 (47.9%)□	19.22±8.55 (40.7%)□	14.14±3.06 (29.9%)□

0 h, 24 h: n=6 □ 6 h, 12 h: n=4

図 3.3.3. 嫌気処理時のパラミロン分解率に及ぼす *EgTER1* 導入の影響

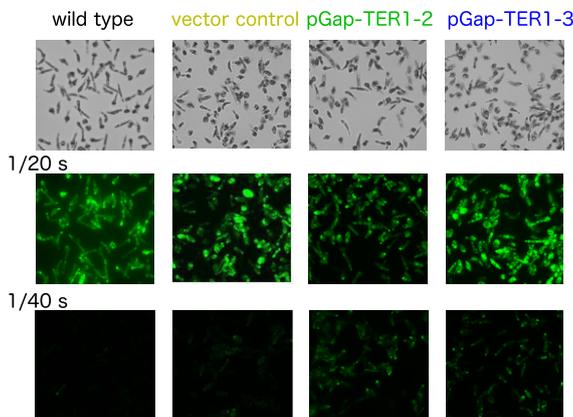


図 3.3.4. BODIPY 染色による嫌気処理時 24 時間後のユーグレナ細胞内の脂質量の比較

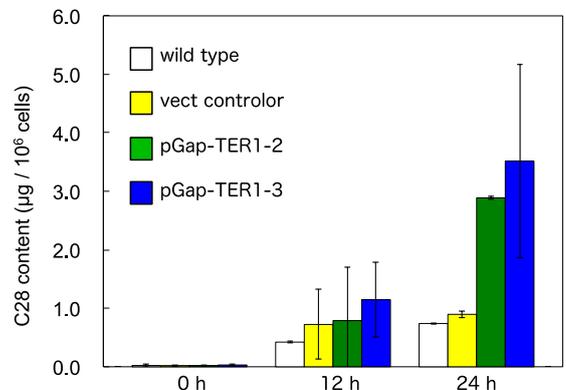


図 3.3.5. BODIPY 染色による嫌気処理時 24 時間後のユーグレナ細胞内の脂質量の比較

以上の結果を踏まえ、FBP/SBPaseとEgTER1を同時に導入した形質転換ユーグレナ株の作出を試みた。FBP/SBPaseを前回よりも高発現させる為に内在性GAPDHプロモーター下流に、EgTER1も同様に高発現させる為に内在性 β -tubulinプロモーター下流に連結したプラスミドを構築し、エレクトロポレーション法によりユーグレナ野生株に導入した。ゲノミックPCRにより、FBP/SBPase遺伝子とEgTER1遺伝子の両方の導入が確認出来た株のうちの4株(EgT-FS1, 2, 6, 8株)を強光・高CO₂条件下(350 μ mol photons/m²/s, 0.37% CO₂)で培養したところ、EgT-FS株の細胞内には非常に多くのパラミロン顆粒が蓄積していることが明らかとなった。今後、嫌気処理時の細胞内ワックス含量を比較することにより、光合成能力とワックスエステル発酵能力の同時強化が、ユーグレナでの燃料生産に有効であることを明らかにする。

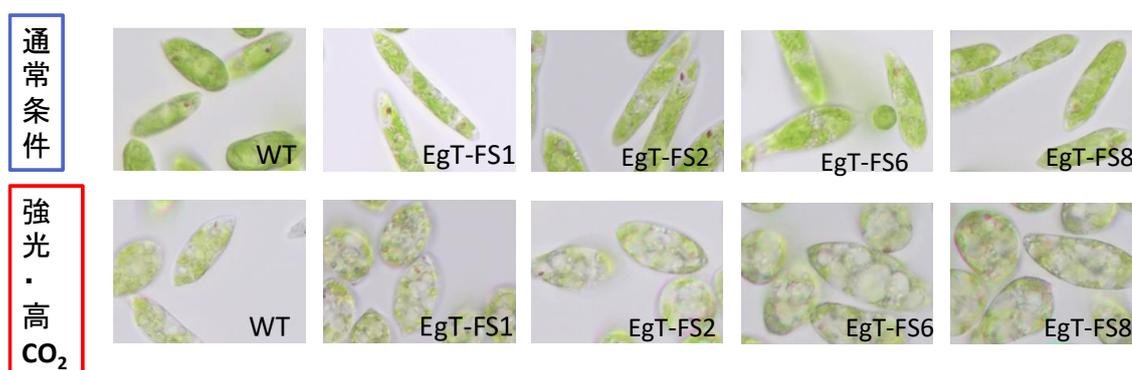


図 3.3.6. 強光・高CO₂条件下(350 μ mol photons/m²/s, 0.37% CO₂)におけるFBP/SBPaseおよびEgTER1同時導入株の表現型

3.4 ワックスエステル生産実用化に向けた効率的培養法の確立 ((株)ユーグレナ 鈴木グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

工場の排気ガスからワックスエステル生産に最適な培養条件の確立を試みた。火力発電所で排出される二酸化炭素を炭素源として利用して、フラスコ内150 mLの液量で予備実験を行い、10~20%CO₂ 15 mL/min (0.1 vol/vol min)程度の流量で十分な量の二酸化炭素濃度となることを確認した。また、これ以上曝気量を増やすと、逆に増殖が阻害されることを確認した。さらに大きなスケールでの培養が可能であることを確認するために、屋外の自然光を利用する500Lの培養槽内で、火力発電所の排気ガスを利用した培養を試みた。500L培養槽での増殖は遅かったが、排気ガスを炭素源としてユーグレナが増殖することを確認でき、細胞数は 9×10^4 cells/mLから10日後に 2.4×10^5 cells/mLまで増殖した(1.5×10^4 cells/mL/day)。500Lの培養槽での増殖が小規模の培養装置の場合に比べて遅いのは、各細胞が受ける光量が少ないためと予想された。これを改善するためにバイオリクターから大型の透明チューブ内(700L容量)に培養液を循環させることにより、受光面積を広くした装置を作製しユーグレナの培養を試みた。このチューブを利用した培養装置を利用することにより、 5.7×10^4 cells/mL/dayの増殖を示し、約4倍に培養効率を上げることができた(図3.4.1)。

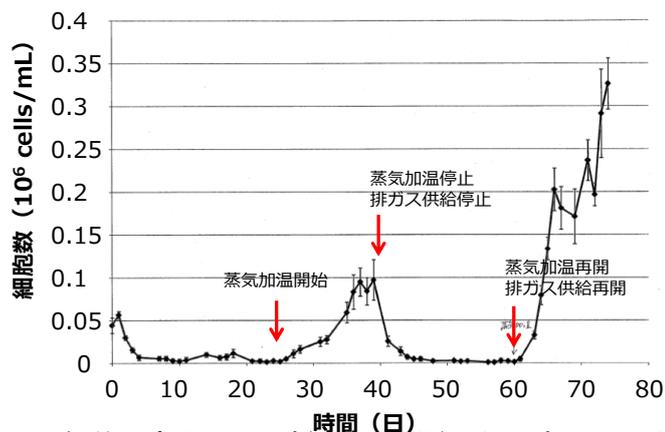
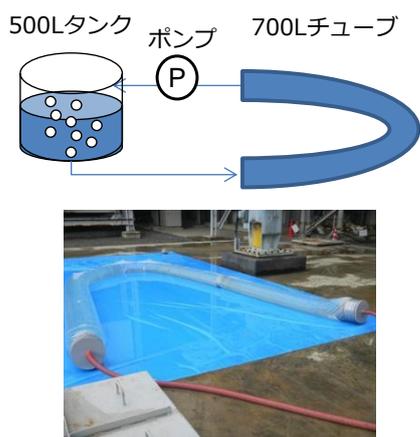


図 3.4.1 500L バイオリアクターから大型の透明チューブ (700L 容量) を組み合わせた培養例(左)および生育曲線。

本実験は冬季に実施したため、火力発電所からの蒸気で加温し培養液温度を 10℃程度から 17℃～22℃とすることで、さらに顕著な増殖がみられ、結果として 20 cm 水深での培養プールで通常得られる増殖効率 (1～2 x 10⁵ cells/mL/day) と同程度となった。一方で、夏季には排ガスの熱が加わることもあり、高水温のため培養は困難であった。

重イオンビーム照射を利用した変異導入と育種では、排ガスに含まれる亜硫酸ガスに対する耐性を持った変異体と、排ガスによる熱に影響されにくいように、高温耐性を持つ変異体のスクリーニングを実施した。亜硫酸ガスに対する耐性については、ワイン醸造に用いられる程度の亜硫酸濃度には耐性を持ち得ると考え、基準となる分子状亜硫酸 8 mg/L に対応する値として、pH3.5 におけるピロ亜硫酸カリウム 100 mg/L に対する耐性を目標に変異体スクリーニングを実施した。その結果、野生型個体がピロ亜硫酸カリウム 100 mg/L で全滅するのに対し、同条件で生存、増殖可能な変異体株を獲得した (図 3.4.2 左)。ユーグレナの高温への感受性は、特に葉緑体の転写系に由来し、35℃で長期間培養すると次第に死滅することが報告されていた。一方で、条件検討の結果、32℃ (100 μmol/m²s 恒常光) ではゆっくりと増殖することが確認できた。これを踏まえて、35℃、33℃で順次変異体集団の培養を実施し、高温での生存率が高い変異体を選抜した上で、32℃で 1 カ月程度培養を維持し、32℃での増殖が速い個体を濃縮した。最終的に単離し3株の変異体株として樹立し、それぞれの表現型を確認したところ、32℃での増殖が野生株より速いことが確認できた。

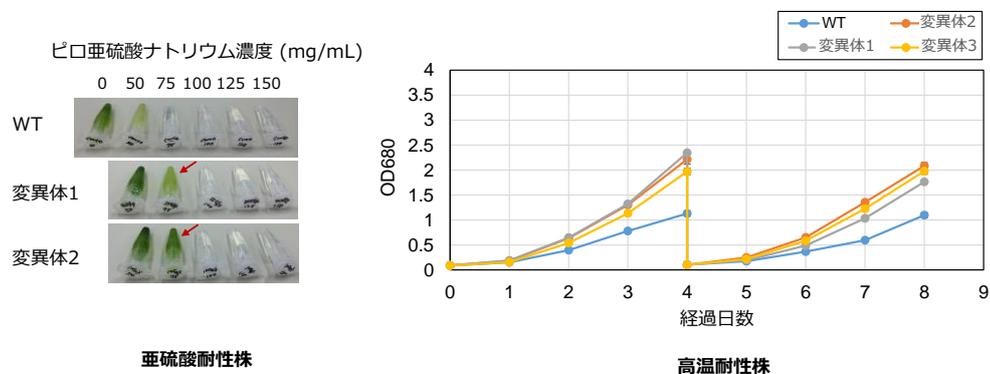


図 3.4.2. 単離した亜硫酸耐性株(左)、および単離した高温耐性株の 32℃における増殖(右)

また、現行の *E.gracilis* 株以外に産業利用可能な新奇ユーグレナ株の単離を試み、TAP 培地において効率的に増殖可能な株を新規に得た。16S および 18S rDNA 解析の結果、*Euglena anabaena* var. *minor* と同定された。*E. anabaena* 株の生産するパラミロンは、*E. gracilis* 株よりも粒径が小さく、含量が高いこと (~45% dw)、また静置後の細胞沈降が速いことなどの特徴を有しており、*E. gracilis* 株との比較によるパラミロン合成機構の解明など基礎研究や産業利用に有用であることが示された。

3.5 ワックスエステル生産向上に関する研究 (大阪府立大学 中澤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

ワックスエステル生産性の向上には、生産フェイズである嫌気状態における代謝を理解し、制御することが必要である。本研究では、ワックスエステル生産の中間反応である酸素感受性酵素 NADP⁺依存型ピルビン酸オキシドレダクターゼの生体内における酸化還元調節機構を解析することにより、細胞内での本酵素の寄与を明らかにする。また、ミトコンドリア電子伝達系の調節がワックスエステル合成に及ぼす影響について解析し、ワックスエステル生産性の向上につなげる。

1) NADP⁺依存型ピルビン酸オキシドレダクターゼの酸化還元調節機能の解明とその応用

ワックスエステルは、ミトコンドリアにおけるアセチル-CoA からの *de novo* 脂肪酸合成を経て合成されることが予想されている。そこで、ユーグレナの有するユニークなピルビン酸代謝について、ピルビン酸からアセチル-CoA への酸化的脱炭酸反応を触媒する酵素に着目し、遺伝子サイレンシングの手法を活用した解析を行った。その結果、ユーグレナのミトコンドリアに存在するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDHC) および NADP⁺依存型ピルビン酸オキシドレダクターゼ (PNO) はともにピルビン酸の酸化的脱炭酸反応を触媒するが、それぞれの生理的な役割は明確に異なっていることを明らかにした。具体的には、PDHC は、その活性は PNO と比べて極めて低いが、好気状態での生育に必須であり、ピルビン酸から TCA サイクルへのアセチル-CoA の供給に働いていた。一方で、PNO は嫌気・低酸素下での代謝に重要であり、ワックスエステル発酵にのみ機能していた (Nakazawa et al. 2017 BBB)。

組換え PNO による酸素感受性低減 PNO の作出を目指し、野生型組換え PNO の機能発現を可能にする系を探索した。鉄硫黄クラスター過剰生産大腸菌株である BL21(DE3) Δ *iscR* による組換え PNO 作製では、発現タンパク質を可溶性タンパクとして獲得することができなかった。新たに酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による発現系を構築したが、発現タンパク質は得られなかった。PNO タンパク質の不安定性および構造の特徴に起因すると考え、以降の検討は断念した。

3.6 窒素代謝に関連したパラミロン蓄積亢進メカニズムの研究 (福井工業大学 柏山グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

パラミロンのユーグレナ細胞への蓄積は、有効なワックスエステル生産実現の前提条件であり、特に光独立栄養条件でのパラミロン蓄積効率の向上は、CO₂ 回収を伴う燃料生産を実現するうえで重要である。一方、炭素源を巡って、パラミロン蓄積効率は細胞増殖効率とトレードオフの関係にあると思われ、細胞内の窒素フラックスの変化がこれら二者のバランスを支配し、かつ細胞の C/N 比に反映されるものと考えられる。従って、たとえば、対数増殖期には光合成産物をアミノ酸合成側に誘導し、ワックスエステル誘導直前のフェイズ (増殖後期 ~ 定常期) でパラミロン合成側に誘導を切り替えるようなマニピュレーションは有効であると考えられる。ユーグレナの窒素代謝に関する知見は未だ少ないが、細胞内の窒素フラックスの観点からユーグレナの物質生産を理解することは新規かつ有意義である。そこで本研究では、窒素枯渇条件がパラミロン蓄積亢進を導くメカニズムについて、アンモニア

同化に関連する酵素に着目して究明した。

1) パラミロン蓄積が亢進する窒素欠乏条件下の細胞内窒素フラックスの解明：

独立栄養条件下では、ユーグレナは明期を通して DNA の複製を連続的におこない、暗期において細胞分裂が進行するという 2 段階の周期性を示した。しかし、DNA 複製および細胞分裂に関連する遺伝子 (PCNA, CYCB) の転写量は細胞周期を通して全く変化がみられなかった。これら遺伝子をノックダウンすると細胞の分裂が阻害されることも確認された。このような転写制御によらない代謝制御は、これまでのチームの研究で得られている知見と一致するものであり、細部周期に関連する因子のリン酸化-脱リン酸化サイクルの存在が考えられる。また、アミノ酸・窒素代謝関連の遺伝子については、MSICL などにおいて若干の変動が見受けられるものの、基本的には転写量の明瞭な変動は見受けられなかった。一方、細胞の平均体積は明期に連続的に増加して倍加し、暗期において細胞分裂に伴い半減する明瞭な周期が確認された (図 3.6.1)。また、細胞あたりのパラミロン量についても同様の周期性が確認できたが、その変化が正に転じるタイミングは細胞体積が増加に転じる明期の始まりより数時間遅れる傾向が観察された (図 3.6.1)。

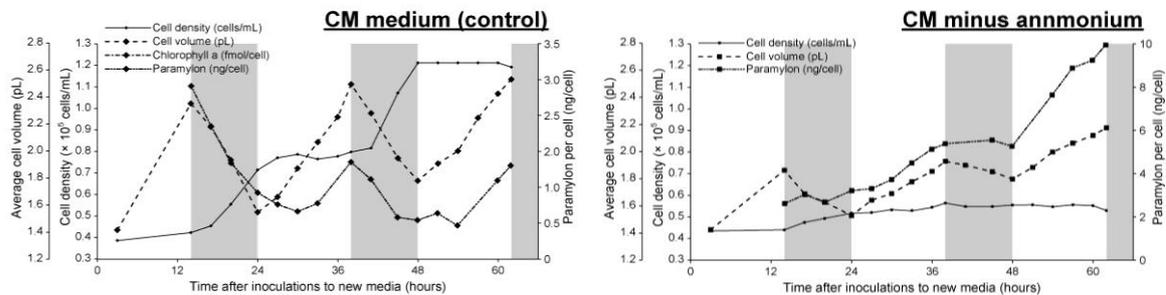


図 3.6.1. 日周期に細胞周期を同調させたユーグレナ細胞のタイムコース測定実験。a) 通常の独立栄養培地である CM 培地を用いた場合には各パラメータについて明瞭な細胞周期が観測されるが、b) 窒素源であるアンモニウムを除いた培地を用いると細胞の分裂が止まりパラミロンが蓄積する。

次に、窒素栄養制限のストレスをかけた条件で同様に実験を行ったところ、明期においてパラミロンの蓄積が亢進し、一方で窒素制限直後の明期以降で細胞分裂がほぼ完全に抑制されるため、窒素制限以降数日以上にわたって細胞内へパラミロンが継続的に蓄積し、5 日後には窒素ありのコントロール実験に対して 15 倍程度のパラミロンが細胞内に蓄積することが確認された。また、このような窒素栄養制限ストレス条件下では、一細胞当たりの光合成活性 (酸素発生速度の測定に基づく) が、低下していくことが示された。一細胞当たりのクロロフィル量やクロロフィル a/b 比の変化はなく、また、顕微鏡観察から明瞭な葉緑体の劣化なのは観察されず、光合成活性の低下が葉緑体の機能劣化によるものではなく、栄養条件の変化を受けて能動的に制御されている可能性が示唆された。このため、窒素制限により誘導されるパラミロン蓄積亢進は暴走的な現象ではなく、ユーグレナの生理的なフィードバックにより上限値がコントロールされるものと考えられた。

2) C/N バランスに着目したユーグレナの細胞リズムの解析と制御因子の解明

まず、独立栄養条件下において意図的に C/N バランスを操作することを目指した。ユーグレナのデータベース上から窒素 (アンモニア) 同化に関わると考えられた遺伝子群の中から、NADPH 依存型グルタミン脱水素酵素に着目し、これについて RNAi ノックダウン実験を試み、細胞の変化を観察した。遺伝子のノックダウンが数日間継続したことが確認できたにもかかわらず、細胞の増殖や形態に顕著な変化は現れなかった。このことから、他の同化経路や未

確認のユーグレナ特有の酵素が機能している可能性が示唆された。

ところで、微細藻類にとって、窒素リソースのほとんどは、光合成器官である葉緑体のタンパク質、特に光合成器官や炭酸同化経路の RuBisCO、および光合成に不可欠な因子であるクロロフィルの生合成に費やされる。上述で確立された同調培養系を用いて分析したところ、ユーグレナでは葉緑体の増大は明期にのみ観察され、暗期には少なくともクロロフィルのネットでの増加は起こらないことが示された。また、窒素欠乏条件下では、明期にも葉緑体の増大は起こらないことが示された。

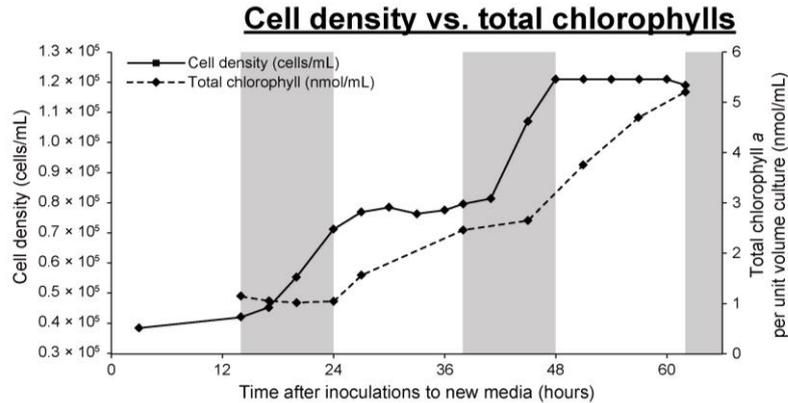


図 3.6.2. 日周期に細胞周期を同調させたユーグレナ細胞の細胞増殖とクロロフィル合成のタイミングの比較。ここで全クロロフィル量は葉緑体の体積の指標とみなされる。細胞分裂が暗期にのみ進行するのに対し、葉緑体の増大は明期に進行する。

そこで、ユーグレナのクロロフィル生合成経路でも特徴的に重要であると考えられる、いわゆるクロロフィルサイクルに関連する遺伝子の働きについて、RNAi ノックダウン実験を通して調べた。すなわち、データベース上で CAO (Chlorophyll *a* oxygenase; Chlorophyll *a* を Chlorophyll *b* に酸化する酵素) のホモログと思われる遺伝子を見つけ、RNAi ノックダウンを独立栄養培養の条件で試みたところ、Chlorophyll *a/b* 比の有意な上昇が確認され、この遺伝子の機能が確認された(図 3.6.2、図 3.6.3)。

この際、細胞の増殖率の変化や明瞭な色調、形態的な変化は認められなかったが、ユーグレナは Chlorophyll *a/b* 比が元々高い傾向にあり、Chlorophyll *b* の欠如がこの生物の生理に与える影響は比較的小さいことが分かった(図 3.6.3)。

一方、NYC1 (Chlorophyll *b* reductase; Chlorophyll *b* を Chlorophyll *a* に還元する経路の酵素の一つ) のホモログの RNAi ノックダウンを独立栄養培養の条件で試みたところ、致死のフェノタイプが得られた。この解釈には慎重を期す必要があると思われるが、葉緑体の機能の動的な維持に細胞全体の代謝サイクルが何らかの形でリンクしている可能性も考えられる。

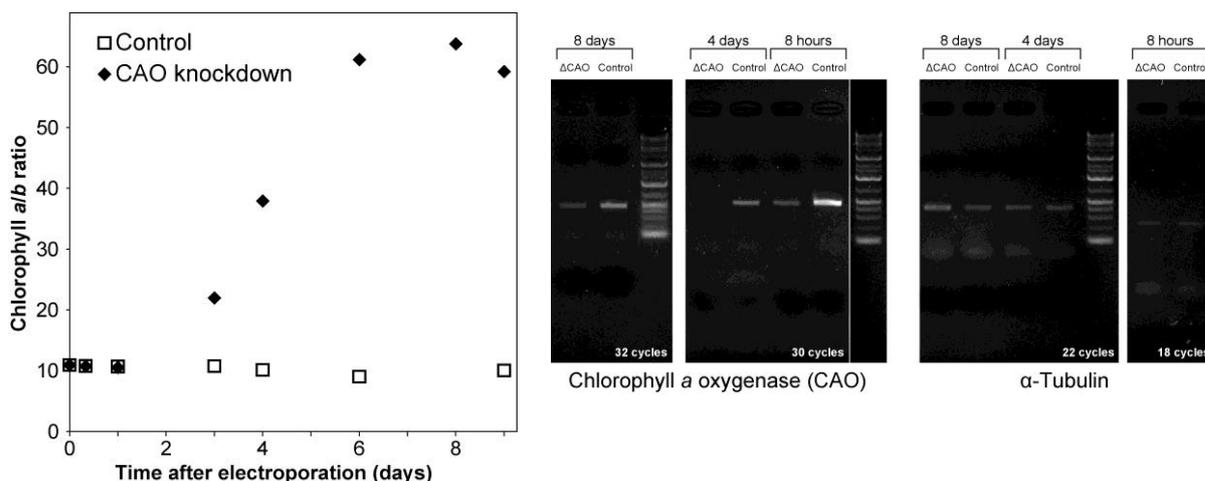


図 3.6.3. CAO の RNAi ノックダウン実験により, Chlorophyll *a/b* 比が急激に上昇し, Chlorophyll *b* の生合成の阻害が確認された。

3. 7 好気/嫌気応答時の膜脂質の動態解析 (静岡大学 栗井グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ワックスエステルは脂肪酸と脂肪アルコールがエステル結合した化合物であり、脂肪アルコールも脂肪酸から合成されることから、脂肪酸を競合利用する膜脂質の代謝を理解することはワックスエステル合成の増強に必須である。本研究では、オミクス解析と協調して好気/嫌気応答時におけるユーグレナの膜脂質組成を分析し、その動態および生合成系を明らかにすることで、ワックスエステル増産に向けた技術開発を行った。

1)ユーグレナ膜脂質解析法の確立：

近年、ユーグレナが注目を集めるにつれ、基礎的な知見の重要性も増してきている。膜脂質についても例外ではなく、その組成を LC-MS/MS などの先端分析機器を用いて解析した論文が報告されはじめた。しかし、1960 年代に報告されている「古典的」な方法による結果とは異なっていることが多く、どちらの解析結果がより真実を表しているのか疑問があった。そこで我々は、LC-MS/MS を用いた定性解析と TLC-GC による定量解析を組み合わせることで、構成脂質の同定とその定量を行った。まず、TLC で膜脂質を分離する際の条件検討を行った。既報の様々な展開溶媒を試し、利用できそうな条件を定め、組成を微調整することで最適化を行った。このようにして分離した脂質を、市販のスタンダードと共に複数の溶媒系で展開することで、脂質の同定を行った。その結果、ユーグレナ由来の膜脂質のほぼ 100% (量比) の脂質を同定することに成功した。さらに、同定した脂質を LC-MS/MS 解析に供することにより、構造上の齟齬がないかも確認している。単離した脂質は GC-FID による定量を行い、膜脂質組成と共に各脂質の脂肪酸組成の解析を行った。また、各脂質の脂肪酸についても GC-MS による解析を行い、脂肪酸種の同定を行った。

2) 嫌気応答による膜脂質代謝変化の解析：

上記1)で確立した膜脂質解析法により、構成脂質の同定とその定量を行った。その結果、ユーグレナは葉緑体糖脂質であるモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、スルフォキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) を持つことが分かった。またリン脂質では、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS) を持つことも明らかとなった。これらの脂質を合わせると、ほぼ 100% となり、主要なすべての膜脂質の同定に成功した。好気条件および嫌気条件で培養した細胞の膜脂質組成を図 3. 7. 1 に示す。これらの脂質組成は、これまで報告されているものとは構成脂質や含量がかなり異なっていたが、本研究

では近年の技術による解析(LC-MS/MS)だけではなく、古典的手法(TLC-GC)も用いて確認しているため、より正確であると言える。脂肪酸解析においては、好気/嫌気応答時における葉緑体糖脂質の脂肪酸組成を調べたところ、注目するミスチン酸含量に大きな変化が見られないことがわかった。一方、嫌気条件ではリン脂質のミスチン酸含量が、特に PC で増加が見られることが分かった。嫌気条件でワックスエステルが合成される際、パラミロンが分解され、ミトコンドリアでミスチン酸が合成されることがわかっている。PC を含むリン脂質はミトコンドリアの主成分であることから、合成された場所で膜脂質に利用されていることも考えられる。しかし、真核光合成生物全般で、膜脂質への脂肪酸の取り込みはミトコンドリア内では見られず、特にリン脂質である PC への脂肪酸の取り込みは小胞体で行われると考えられる。このことから、嫌気条件で合成されたミスチン酸は、ミトコンドリアから小胞体へと輸送され、リン脂質に取り込まれていると予想された。

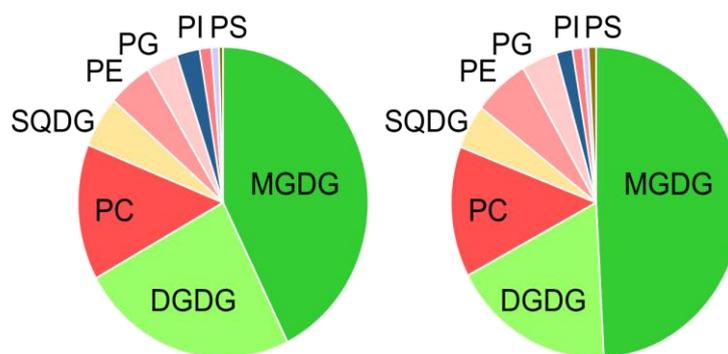


図 3. 7. 1. 好気および嫌気条件で培養したユーグレナの膜脂質組成

3. 8 ユーグレナバイオプロセスに特化した自律型 PhotoBio Reactor の開発 (東京農工大学 池袋グループ)

(1)研究実施内容及び成果

光独立培養条件下のユーグレナでは、細胞数、パラミロンおよびワックスエステルの収量にバッチ間でのバラつきが問題点のひとつとなっている。これには、光強度、細胞密度、炭酸ガス濃度などさまざまな要因が関与している。本項目では、藻体の培養濃度に合わせて、最適な光強度、光の波長を照射し、細胞濃度および比増殖速度を制御することで、細胞生産を最適化する連続培養を達成する PhotoBioReactor 研究開発の技術を活かし、ユーグレナにおけるパラミロン/ワックスエステル生産性最適化条件を検討し、ユーグレナバイオプロセスに特化した自律型 PhotoBioReactor を開発した。

1)野生株ユーグレナ最適化培養条件の確立：

ユーグレナは光合成による光独立栄養条件での生育の他に、有機炭素源を利用する従属栄養条件で生育可能なことが知られている。しかしこれまでにグルコースを用いた従属栄養条件におけるユーグレナの培養特性やパラミロン蓄積との相関に関する報告は少なく、ユーグレナのグルコースを用いる従属栄養条件でのパラミロン生産能力は不明であった。また実際のパラミロン生産を想定した場合には、従属栄養条件より光独立栄養的な生産が期待される。そこで、従属栄養条件、光独立栄養条件のそれぞれにおいてユーグレナの増殖およびパラミロン蓄積量の測定を行い、パラミロン生産に最適な培養条件を明らかにすることとした。

フォトバイオリアクターでの培養条件検討の前段階として、まずフラスコスケールでの培養を行い、パラミロンの蓄積量や炭素源として加えたグルコースの消費量をモニタリングした(図 3. 8. 1)。ユーグレナを光独立栄養、光混合栄養、従属栄養の各条件で本培養した結果、藻体の増殖については光混合条件下が最も良好だったが、パラミロンの蓄積については従属栄養条件下が最も高く、最大で単位菌体当たり約 850 $\mu\text{g}/10^6$ cells、培地当たり約 1, 400

$\mu\text{g/mL}$ culture に達した。

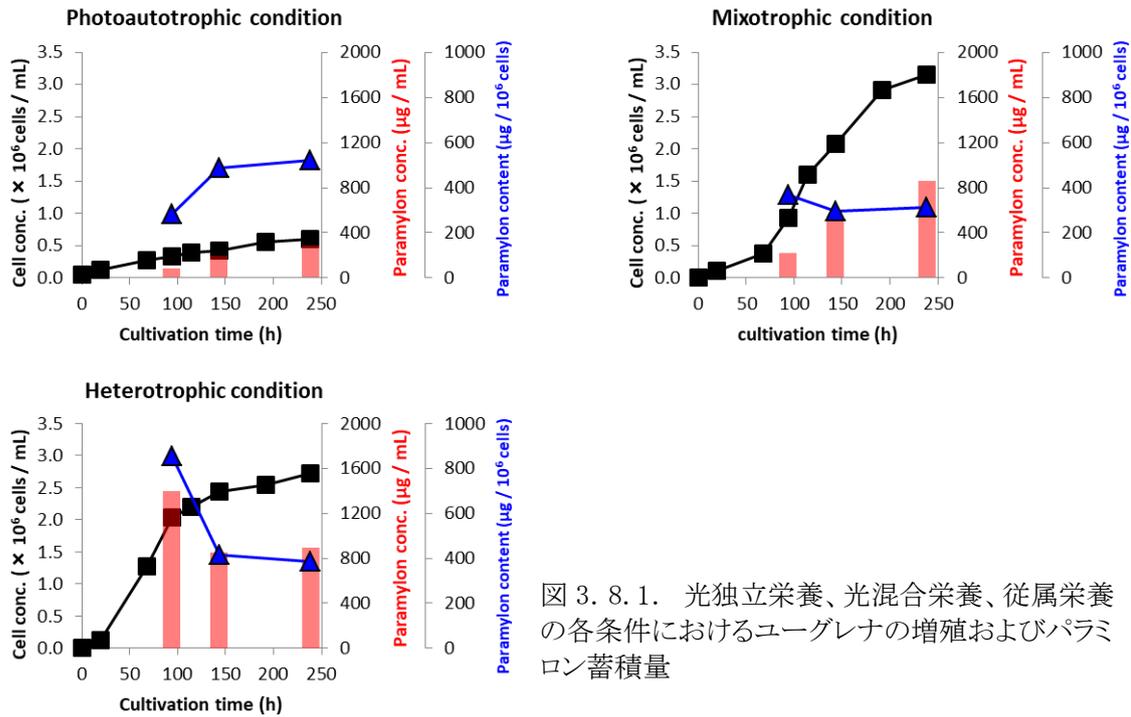


図 3. 8. 1. 光独立栄養、光混合栄養、従属栄養の各条件におけるユーグレナの増殖およびパラミロン蓄積量

また、グルコースを炭素源とした従属栄養条件下で、バイリアクターを用いてユーグレナの培養を行ったところ、フラスコでの検討時と同様、高度なパラミロンの蓄積が観察された(図 3. 8. 2)。

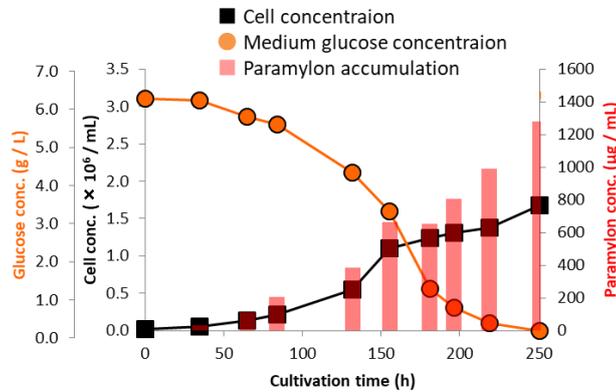


図 3. 8. 2. バイリアクターにおける、従属栄養条件下のユーグレナの増殖およびパラミロン蓄積量

しかし、光混合条件、従属栄養条件下での培養において、グルコースは対数増殖期中期～後期に枯渇していた。従属栄養条件ではそれと前後して菌体の増殖およびパラミロンの生産が止まっていることから、培養中にグルコースを添加して枯渇を防ぐことで、菌体量およびパラミロン生産量が向上する可能性が示された。

そこで次に、終濃度 6 g/L のグルコースを含む CM 培地にてユーグレナを従属栄養的に培養し、グルコースが枯渇した時点で細胞を回収、グルコースを含む新鮮な CM 培地(窒素源あり(+N)、なし(Δ N)の二種類)に移し替えて培養を継続した。その間、ユーグレナの生育とパラミロン蓄積、培地グルコース濃度のモニタリングを行なった。

単位ユーグレナ細胞あたりのパラミロン蓄積量は培養開始後 65 時間で最大となり、その後減少を続けた。一方で培地グルコースは培養開始後 65 時間以降で急速に消費され、培養開始後 120~150 時間で完全に消費された。培養後 120 時間で培地グルコースがほとんど消費されていることを確認し、ユーグレナ細胞をグルコースを含む CM 培地 (+N or ΔN) に移して培養した。窒素源を含む培地 (+N) に移したユーグレナの細胞濃度は増加し続け、培養後 220 時間で 4.5×10^6 cells に達し、同タイミングで再度培地グルコースが完全に消費された。パラミロン濃度は培地交換後で急激に増加し約 3500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ で定常となった。ユーグレナ細胞あたりのパラミロン蓄積量は培地交換後に約 1200 $\mu\text{g} / 10^6$ cells に到達し、培養の進行に伴い減少した。一方で窒素源を含まない培地 (ΔN) に移したユーグレナ細胞の濃度は培養後 160 時間で定常となった。単位ユーグレナ細胞あたりのパラミロン蓄積量は培地交換後に約 1200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ に達し、また乾燥菌体重量あたりのパラミロン蓄積量は $73.0 \pm 3.0 \%$ Dry cell weight であった。

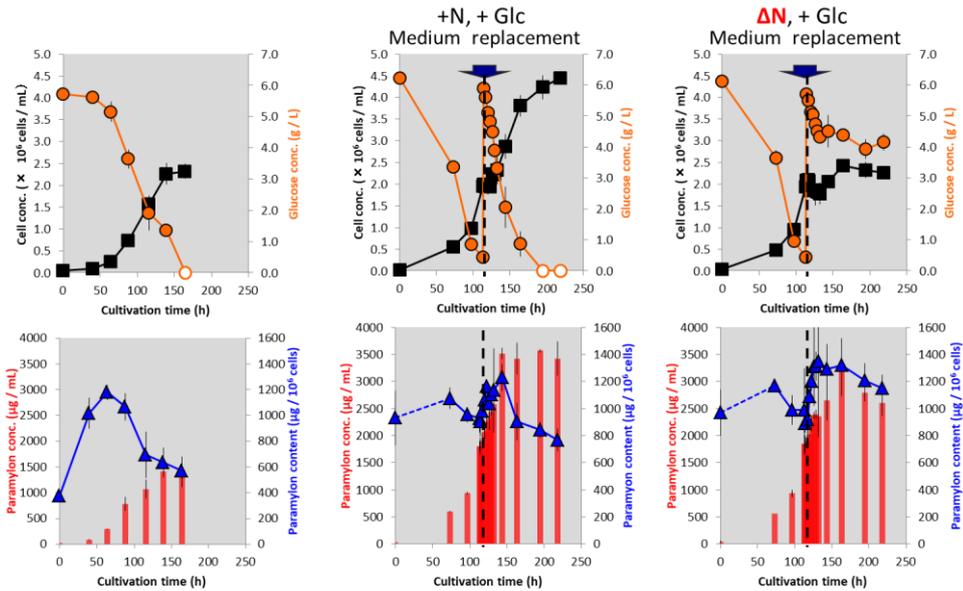


図 3. 8. 3. グルコース添加によるユーグレナの増殖、パラミロン蓄積量の変化

続いて培地中のグルコース濃度を一定に保つグルコース・スタットな培養条件でのユーグレナによるパラミロン生産を試みた。終濃度 6 g/L グルコースを含む培地にユーグレナを植菌後、逐次培地グルコース濃度をモニタリングしながら培養を継続した。さらに培地グルコース濃度が 4. 7-6 g/L に保たれるように、培地にグルコース溶液を添加することで培地グルコース濃度を制御した。同時に培地 pH をモニタリングし、随時 5N NaOH を適量添加することで 4. 5-5. 5 の範囲で pH を制御した。

培養 130 時間で細胞濃度は 3×10^6 cells / mL に達した後に定常となった(図 3. 8. 4)。単位培養体積あたりのパラミロンは培養後 130 時間でおおよそ 4000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ に達し定常となった。単位ユーグレナ細胞あたりのパラミロン蓄積量は培養 90 時間でおおよそ 1400 $\mu\text{g} / 10^6$ cells に達し、かつ同蓄積量が

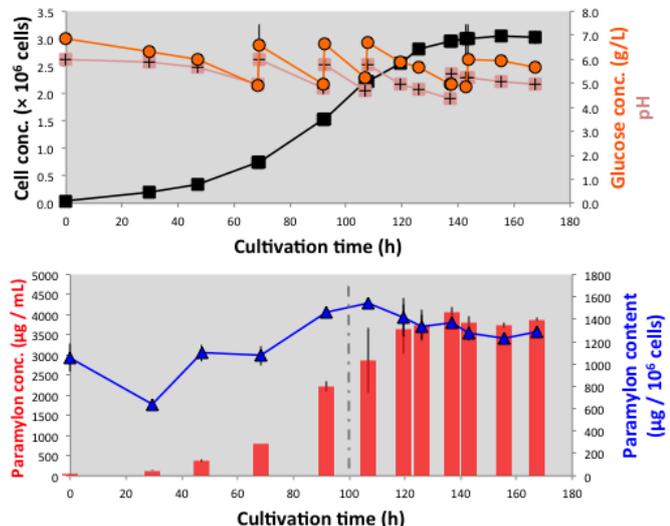


図 3. 8. 4. グルコース・スタット培養条件でのユーグレナ増殖とパラミロン蓄積量

培養を通して維持された。培養後 170 時間における乾燥藻体重量あたりのパラミロン蓄積量は $71.1 \pm 0.9 \%$ Dry cell weight であった。

以上の結果から、今後グルコース・スタットを駆使した培養方法により、最大量までパラミロンを蓄積したユーグレナ細胞の連続生産系が構築できると期待される。

一方、前記のフラスコにおける培養実験では、光独立栄養条件では菌体の増殖が遅く、培養開始 250 時間後の培地当たりのパラミロン蓄積量も、従属栄養条件下の $1/3 \sim 1/2$ 程度にとどまった(図 3. 8. 1)。そこで次に、光独立栄養での培養条件の検討を行った。

まず、フォトバイオリアクターを用いた光独立栄養条件でのユーグレナの培養を試みた。光独立栄養的に前培養したユーグレナを CM 培地に植菌し、 $100 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ の赤色光照射条件で培養した。培養を通して OD730、パラミロンの他に、光透過性をモニタリングした。光透過性評価では、植菌する前におけるフォトバイオリアクター光照射面から逆面への透過光強度を、光量子計を用いて測定し 100 %とした。

その結果、培養開始後 220 時間でユーグレナの生育は静止期に移行し、かつ透過光はほとんど観察されなくなった。この結果より、光独立栄養条件においては光の供給が制限因子となっ

ていることが示唆された。また培養を通し最大比増殖速度は 0.023 h^{-1} 、最大パラミロン生産量は $170 \mu\text{g/mL}$ 、単位ユーグレナ細胞あたり $300 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ のパラミロンが生産されていた(図 3. 8. 5)。

次に、光独立栄養条件においてユーグレナの単位細胞あたりのパラミロン蓄積量を向上させることを目的として、窒素欠乏培地を用いるパラミロン生産を試みた。パラミロンはユーグレナにおける余剰炭素源の蓄積形態であり、窒素源が枯渇し生育できない条件では光合成によって獲得された炭素源が余剰となりパラミロンに変換されると期待した。そこで光独立栄養的に培養したユーグレナを遠心分離によって集菌し、窒素源を含まない CM 培地に移し替え培養を継続した。

窒素源を含まない培地に移し替えた 24 時間後から単位ユーグレナ細胞あたりのパラミロン蓄積量は増加しはじめ、培養開始後 180 時間でおおよそ $1200 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ にまで到達した。

一方で窒素源を含む培地に移し替えたユーグレナにおいては、単位ユーグレナ細胞あたりのパラミロン蓄積レベルは $200 - 400 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ を維持していた。一方で、窒素欠乏条件のユーグレナ培養液あたりのパラミロン生産量は $500 \mu\text{g/mL}$ 程度であり、従属栄養培養で達成された値の 7 分の 1 であった。(図 3. 8. 6)

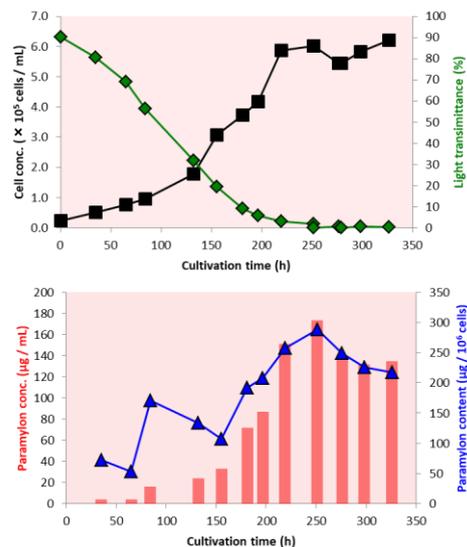


図 3. 8. 5 光独立栄養条件下におけるユーグレナの増殖とパラミロン蓄積量

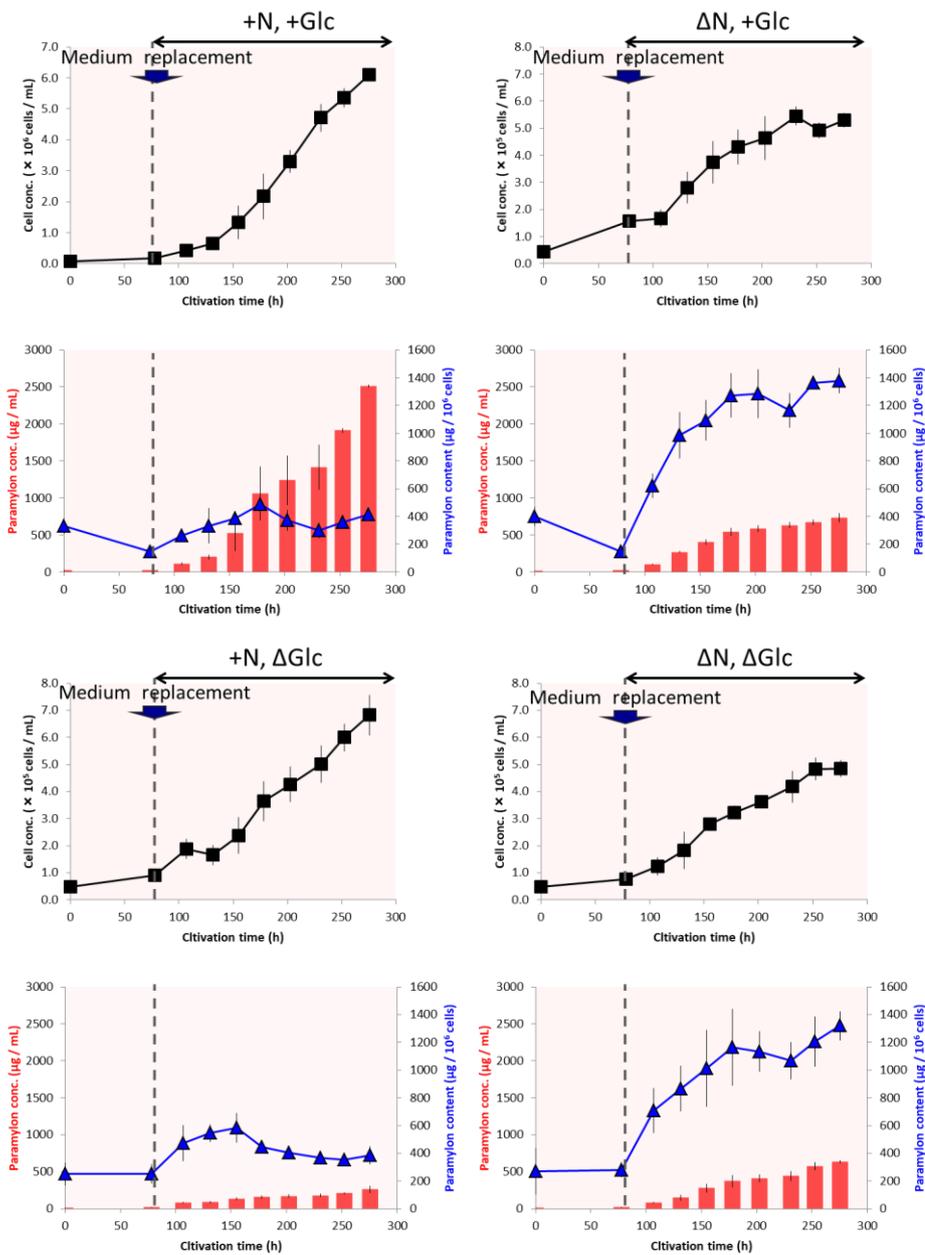


図 3. 8. 6 光独立栄養条件下で生育したユーグレナの、炭素源・窒素源存在下/非存在下での増殖とパラミロン蓄積量

このことから、光独立栄養条件において、窒素欠乏培地に移すことで従属栄養条件と同様のレベルまでパラミロンを蓄積可能である一方、培養体積あたりのパラミロン生産量は依然として少なく、光独立栄養条件におけるユーグレナ生育を改善するには光条件の最適化が必要であることが示された。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国際(欧文)誌14件)

1. Tamaki, S., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., Ishikawa, T. "Biochemical and physiological analyses of NADPH-dependent thioredoxin reductase isozymes in *Euglena gracilis*." *Plant Science*, 236: 29-36, 2015 (DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.03.016.)
2. Ogawa, T., Kimura, A., Sakuyama, H., Tamoi, M., Ishikawa, T., Shigeoka, S. "Characterization and physiological role of two types of chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatases in *Euglena gracilis*." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 575: 61-68, 2015 (DOI: 10.1016/j.abb.2015.04.002.)
3. Suzuki, K., Mitra, S., Iwata, O., Ishikawa, T., Kato, S., Yamada, K. "Selection and characterization of *Euglena anabaena* var. minor as a new candidate *Euglena* species for industrial application." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79: 1730-1736, 2015 (DOI: 10.1080/09168451.2015.1045828.)
4. Ogawa, T., Tamoi, M., Kimura, A., Mine, A., Sakuyama, H., Yoshida, E., Maruta, T., Suzuki, K., Ishikawa, T., Shigeoka, S. "Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production." *Biotchnology for Biofuels*, 8:80, 2015 (DOI: 10.1186/s13068-015-0264-5.)
5. Takeda, T., Nakano, Y., Takahashi, M., Konno, N., Sakamoto, Y., Arashida, R., Marukawa, Y., Yoshida, Y., Ishikawa, T., Suzuki, K. "Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Euglena gracilis*." *Phytochemistry*, 116: 21-27, 2015 (DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.05.010.)
6. Ogawa, T., Kimura, A., Sakuyama, H., Tamoi, M., Ishikawa, T., Shigeoka, S. "Identification and characterization of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in *Euglena gracilis*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(12): 1957-1964, 2015 (DOI: 10.1080/09168451.2015.1069694.)
7. Yoshida, Y., Tomiyama, T., Maruta, T., Tomita, M., Ishikawa, T., Arakawa, K. "De novo assembly and comparative transcriptome analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic conditions." *BMC Genomics*, 17:182, 2016 (DOI: 10.1186/s12864-016-2540-6)
8. Yamada, K., Kazama, Y., Mitra, S., Marukawa, Y., Arashida, R., Abe, T., Ishikawa, T., Suzuki, K. "Production of a thermal stress resistant mutant *Euglena gracilis* strain using Fe-ion beam irradiation." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80: 1650-1656, 2016 (DOI: 10.1080/09168451.2016.1171702)
9. Ozasa, K., Won, J., Song, S., Tamaki, S., Ishikawa, T., Maeda, M. "Temporal change of photophobic step-up responses of *Euglena gracilis* investigated through motion analysis." *PLoS One*, 12: e0172813, 2017 (DOI: 10.1371/journal.pone.0172813)
10. Tanaka, Y., Ogawa, T., Maruta, T., Yoshida, Y., Arakawa, K., Ishikawa, T. "Glucan Synthase-Like 2 is indispensable for paramylon synthesis in *Euglena gracilis*." *FEBS Lett.*, 591: 1360-1370, 2017 (DOI: 10.1016/j.febslet.2017.05.010.)

10. 1002/1873-3468. 12659)
11. Nakazawa, M., Hayashi, R., Takenaka, S., Inui, H., Ishikawa, T., Ueda, M., Sakamoto, T., Nakano, Y., Miyatake, K. "Physiological functions of pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase and 2-oxoglutarate decarboxylase in *Euglena gracilis* under aerobic and anaerobic conditions." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81: 1386-1393, 2017 (DOI: 10.1080/09168451.2017.1318696)
 12. Tomiyama, T., Kurihara, K., Ogawa, T., Maruta, T., Ogawa, T., Ohta, D., Sawa, Y., Ishikawa, T. "Wax ester synthase/diacylglycerol acyltransferase isoenzymes play a pivotal role in wax ester biosynthesis in *Euglena gracilis*." *Sci. Rep.*, 7: 13504, 2017 (DOI: 10.1038/s41598-017-14077-6)
 13. Kimura, M., Ishikawa, T. "Suppression of DYRK orthologs expression affects wax ester fermentation in *Euglena gracilis*." *J. Appl. Phycol.*, 30: 367-373, 2018 (DOI: 10.1007/s10811-017-1235-y)
 14. Shibata, S., Arimura, S. I., Ishikawa, T., Awai, K. "Alterations of membrane lipid content correlated with chloroplasts and mitochondria development in *Euglena gracilis*." *Front. Plant Sci.*, 9: 370, 2018 (doi: 10.3389/fpls.2018.00370)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 石川孝博、田茂井政宏、鈴木健吾、重岡 成, "ユーグレナによるバイオ燃料生産基盤技術の開発", 藻類オイル開発研究の最前線, pp93-105, 2013 (ISBN978-4-86469-085-0)
2. 鈴木健吾、石川孝博, "微細藻類ユーグレナのバイオ燃料生産の可能性" 酵素工学ニュース, 72号, pp26-28, 2014
3. 小川貴央、石川孝博, "微細藻類ユーグレナによるバイオ燃料生産の可能性", バイオマスエネルギーの技術と市場. シーエムシー出版, 東京, pp1-11, 2016
4. Inui, H., Ishikawa, T. and Tamoi, M. "Wax ester fermentation and its application for biofuel production." In: *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*, edited by Shigeru Shigeoka and Steven D. Schwartzbach., Springer, pp269-283, 2017
5. Ishikawa, T., Tamaki, S., Maruta, T. and Shigeoka, S "Biochemistry and physiology of reactive oxygen species in *Euglena*." In: *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*, edited by Shigeru Shigeoka and Steven D. Schwartzbach., Springer, pp47-64, 2017
6. Nakazawa, M. "C2 metabolism in *Euglena*." In: *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*, edited by Shigeru Shigeoka and Steven D. Schwartzbach., Springer, pp39-45, 2017
7. Apdila, E.T., Awai, K. "Configuration of the sugar head of glycolipids in thylakoid membranes." *Genes Genet. Syst.* 92: 235-242, 2017 (DOI: 10.1266/ggs.17-00047)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 28 件、国際会議 6 件)

1. 鈴木健吾 "微細藻類ユーグレナの可能性について" 日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学 2013 年 3 月 26 日
2. 田茂井政宏、鈴木健吾、石川孝博、重岡 成, "ユーグレナによるバイオ燃料生産基盤技術の開発", 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会、沖縄県市町村自治会館、2013 年 6 月 1 日
3. 鈴木健吾, "藻類バイオマスの産業利用の可能性について", 化学工学会関西支部、

大阪科学技術センター、2013年6月28日

4. Takahiro Ishikawa, “Basic technology development for biofuel production from *Euglena*”, The 1st Korea-Japan Microalgae Symposium, Daejeon, Korea, 2013年10月11日
5. 鈴木健吾, “微細藻類による産業的な有用物質生産の可能性”, バイオ産業研究会、大阪市立工業研究所、2013年11月6日
6. 鈴木健吾, “微細藻類の生物由来資源としての利用可能性について”, 無機マテリアル学会、工学院大学、2013年12月13日
7. 鈴木健吾, “微細藻類ユーグレナを用いたビジネスモデルとその将来”, バイオマイクロナノテク研究会、東京大学生産技術研究所、2013年12月17日
8. 鈴木健吾, “微細藻類由来物質のバイオマテリアルとしての活用の可能性について”, 高分子学会 エコマテリアル研究会、東京大学生産技術研究所、2014年2月28日
9. 鈴木健吾, “微細藻類の産業利用における可能性について”, 日本農芸化学会 2014年度大会、明治大学生田キャンパス、2014年3月30日
10. Kengo Suzuki, “Development of Materials and Its Derivatives Produced from *Euglena*”, The 8th International Symposium on the Frontiers of Industrial and Environmental Biotechnology, (Osaka), 2014年3月31日
11. 鈴木健吾, “微細藻類ユーグレナによる有用物質の現状と将来”, 日本微生物資源学会大会シンポジウム、東京農業大学世田谷キャンパス(東京)、2014年9月3日
12. 鈴木健吾, “ミドリムシを活用した新産業の可能性について”, JEITA 環境フォーラム、幕張メッセ国際会議場(千葉)、2014年10月8日
13. 石川孝博, “緑藻ユーグレナによるバイオ燃料実用化の可能性”, 中国四国農林水産・食品先進技術研究会、松江テルサ(松江市)、2014年10月31日
14. 鈴木健吾, “ミドリムシがもたらす未来”, 社会イノベーション/Smart City Week 2014、パシフィコ横浜(横浜市)、2014年10月31日
15. 石川孝博, “ユーグレナの遺伝子解析と形質転換による機能改変”, 第30回ユーグレナ研究会ミニシンポジウム、東大寺総合文化センター(奈良市)、2014年11月8日
16. Takahiro Ishikawa, “Basic technology development for biofuel production from *Euglena*”, The 3rd Asia Oceania Algae Innovation Summit, Daejeon (Korea), 2014年11月19日
17. 吉田勇太、荒川和晴、富山拓也、富田勝、石川孝博, “様々な培養条件における *Euglena gracilis* の網羅的遺伝子発現解析”, 第37回日本分子生物学会年会ワークショップ 生命の起源・進化・本質、パシフィコ横浜(横浜市)、2014年11月25日
18. 石川孝博, “微細藻類ユーグレナによるバイオ燃料生産基盤技術の開発”, 発酵と代謝研究会、アルコール・バイオマス研究会、新資源生物変換研究会合同シンポジウム、東京大学弥生講堂一条ホール(東京)、2014年12月12日
19. 鈴木健吾, “株式会社ユーグレナのミドリムシに関する研究開発と事業戦略”, 兵庫県バイオ技術研究会、兵庫県立工業技術センター(神戸市)、2015年2月27日
20. Masahiro Tamoi, “Improvement of photosynthesis and productivity of crop plants and microalgae by genetic engineering of the Calvin cycle”, International Symposium on Dynamics and Regulation of Photosynthesis, (Nara), 2015年10月31日
21. 石川孝博, “ミドリムシが燃料になる!? –ミドリムシのバイオ燃料としての可能性について–”, 日本農芸化学会中四国支部、サンポートホール高松(高松市)、2015年11月28日
22. 鈴木健吾, “ミドリムシの利用と将来の可能性について”, 日本農芸化学会中四国支部、サンポートホール高松(高松市)、2015年11月28日

23. 石川孝博、“微細藻類ユーグレナによるバイオ燃料生産基盤技術の開発”、中国地域バイオマス利用研究会、広島大学東千田キャンパス、2016年3月10日
24. 柏山祐一郎、“クロロフィルを制する者が光環境を征したークロロフィルの分解代謝と二次植物の進化”、日本進化学会第18回東京大会、東京工業大学、2016年8月27日
25. Yuichiro Kashiyama、“Managing the phototoxicity of chlorophylls: a basic study: On a key metabolism responsible for the mass culture crush”, 11th International Marine Biotechnology Conference, Baltimore, USA, 2016年8月30日
26. 柏山祐一郎、“真核生物に広く共有されるクロロフィル無毒化代謝機構とその藻類進化との関わり”、日本植物学会第80回沖縄大会、沖縄コンベンションセンター、2016年9月18日
27. 柏山祐一郎、“真核生物の繁栄を可能たらしめたクロロフィルの無毒化代謝”、第49回日本原生生物学会岡山大会 原生生物若手の会、岡山大学、2016年10月8日
28. 柏山祐一郎、“光毒性物質クロロフィル類の代謝分解から考える水圏微生物の生態と進化”、遺伝研研究会「水圏微生物のエネルギー利用戦略とその相互作用に関する研究会」、国立遺伝学研究所、2016年11月3日
29. 田中優史、“オミクス解析を利用した微細藻類ユーグレナのパラミロン合成・分解関連酵素遺伝子の探索”、日本農芸化学会中四国支部第47回講演会、島根大学(松江市)、2017年1月28日
30. 石川孝博、“オミクス解析によるユーグレナワックスエステル代謝調節機構の解明”、ユーグレナ研究会第33回研究集会シンポジウム「藻類バイオインダストリーの進展」、とちぎプラザ(帯広)、2017年8月26日
31. 小林滉宜、栗井光一郎、“オルガネラ?細胞小器官?:光合成を担うチラコイド”、環境微生物系学会合同大会2017、東北大学、2017年8月31日
32. Shiori Shibata, Takahiro Ishikawa, Koichiro Awai, “Chromatography on Lipid Analysis: From Traditional Methods to Advanced Technologies”, Ma Chung International Conference on Chromatography, Malang, Indonesia, 2017年10月10日
33. Shiori Shibata, Takahiro Ishikawa, Koichiro Awai, “Euglena: a green engine for sustainable energy”, Mathematics, Science and Computer Science Education International Seminar, Bandung, Indonesia, 2017年10月14日
34. 栗井 光一郎、“ヘテロシストのバリアを作る糖脂質の合成と制御”、藍藻の分子生物学2017、かずさアカデミアホール(木更津)、2017年12月1日

② 口頭発表 (国内会議 32 件、国際会議 9 件)

1. 吉田勇太、丸田隆典、田茂井政宏、重岡 成、石川孝博、“RNA-Seq による *Euglena gracilis* の遺伝子発現解析”、第28回ユーグレナ研究会、石川県立大学(石川県野々市)、2012年11月10日
2. 玉木 峻、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博、“*Euglena* ペルオキシレドキシニアイソフォームの機能解析”、第28回ユーグレナ研究会、石川県立大学(石川県野々市)、2012年11月10日
3. 山口由貴、西川 仁、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博、“青色光による *Euglena* アスコルビン酸合成調節機構の検討”、第28回ユーグレナ研究会、石川県立大学(石川県野々市)、2012年11月10日
4. 吉田勇太、丸田隆典、田茂井政宏、重岡 成、石川孝博、“RNA-Seq によるユーグレナ遺伝子の発現解析”、日本農芸化学会2013年度大会、東北大学、2013年3月25日
5. 三根彩佳、作山治美、杉崎円香、西川綾香、加藤貴大、吉田絵梨子、鈴木健吾、丸

- 田隆典、石川孝博、田茂井政宏、重岡 成、“藻類バイオ燃料増産を目指したユーグレナ形質転換技術の確立と光合成機能強化”、日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学、2013 年 3 月 26 日
6. 富山拓矢、玉木 峻、山口由貴、羅軍、吉田勇太、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博、“ユーグレナ *trans*-2-エノイル-CoA レダクターゼの機能解析”、ユーグレナ研究会第29回研究集会、筑波大学、2013 年11月9日
 7. 富山拓矢、玉木 峻、山口由貴、羅軍、吉田勇太、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博、“緑藻 *Euglena gracilis* における *trans*-2-エノイル-CoA レダクターゼの同定と機能解析”、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 28 日
 8. 富山拓矢、吉田勇太、丸田隆典、澤 嘉弘、荒川和晴、石川孝博、“ワックスエステル生産に関わる緑藻ユーグレナの RNA-Seq 解析”、日本農芸化学会 2015 年度岡山大会、岡山大学津島キャンパス、2015 年 3 月 29 日
 9. 木村彩子、小川貴央、作山治美、丸田隆典、鈴木健吾、石川孝博、田茂井政宏、重岡 成、“ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入によるユーグレナのバイオ燃料生産性の向上”、日本農芸化学会 2015 年度岡山大会、岡山大学津島キャンパス、2015 年 3 月 29 日
 10. 富山拓矢、丸田隆典、澤 嘉弘、石川孝博、“微細藻類 *Euglena gracilis* のワックスエステル合成酵素の同定と機能解析”、ユーグレナ研究会 第 31 回研究集会、Kiten ビルコンベンションホール (宮崎市)、2015 年 11 月 7 日
 11. Yuichiro Kashiya, Jun Kawahara, Masami Nakazawa, Takahiro Ishikawa, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, Hitoshi Tamiaki, “Inhibiting growth of contaminated phycophagous protists in algal cultures by controlling the phototoxicity of chlorophylls”, The international chemical congress of pacific basin societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, 2015 年 12 月 18 日
 12. Hafiz Md Hafizur Rahman, Shun Tamaki, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa, “Functional analysis of two thiol-metabolic enzymes, glutathione and trypanothione reductases, in the phytoflagellated protozoan, *Euglena gracilis*”、日本農芸化学会中四国支部 第44回講演会、岡山県立大学、2016 年 1 月 23 日
 13. 柏山祐一郎、川原 純、丸山 萌、中澤昌美、石川 孝博、民秋 均、洲崎敏伸、“二次植物ユーグレナが色素体を処分するとき”、日本藻類学会第 40 回大会、日本歯科大学生命歯学部、(東京)、2016 年 3 月 20 日
 14. Yuichiro Kashiya, “An evolutionary transition of chloroplast degradation in euglenoids: heterotrophic digestion to secondary plastid senescence”, Annual meeting of the International Society of Protistologists, Moscow, Russia, 2016 年 6 月 8 日
 15. Takahiro Yanagi, Koichiro Awai, “Evolutionary origin of plant type MGDG synthase”, 22nd International Symposium on Plant Lipids, Goettingen, Germany, 2016 年 7 月 4 日
 16. Shouhei Takamatsu, Saori Fuse, Mitsuharu Nakajima, Katsuhiko Kojima, Yukako Hihara, Kyoko Fujita, Nobufumi Nakamura and Koji Sode, “Continuous operation of bioprocess using photobioreactor employing Cyanofactory concept”, 11th International Marine Biotechnology Conference (IMBC2016), Hyatt Regency Inner Harbor, Baltimore, Maryland, USA, 2016 年 8 月 31 日
 17. 栗原佳恵子、“微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル合成酵素の機能解析”、日本農芸化学会 2016 年度中四国支部大会、高知大学、2016 年 9 月 16 日
 18. 田茂井政宏、“トランスエノイル CoA 還元酵素を強化したユーグレナにおけるワックスエステル合成能の評価”、日本農芸化学会平成 28 年度関西支部大会、滋賀県立大

- 学、2016年9月17日
19. 木村光宏、“リン酸化プロテオミクスによるワックスエステル代謝調節因子の探索”、ユーグレナ研究会第32回研究集会、東京大学、2016年11月5日
 20. 松本玉恵、栗井光一郎、“シアノバクテリアのリゾホスファチジン酸合成経路”、第29回植物脂質シンポジウム、大阪大学、2016年11月26日
 21. 木下、柏山ほか、“8-ビニル-13(2), 17(3)-シクロフェオフォルバイド-aの合成とその電子吸収スペクトル”、日本化学会第97春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2017年3月16日
 22. 栗原佳恵子、“*Euglena gracilis*におけるSDPI相同遺伝子は好気条件下でのワックスエステル分解に重要である”、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島大学郡元キャンパス、2017年3月18日
 23. 高松祥平、Amr Badary, Peter Lindblad、早出広司、“Glycogen production using marine cyanobacterial strain, *Synechococcus* sp. NKBG15041c”、日本化学会第97春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス2017年3月18日
 24. 永田まどか、伊藤彰子、中村まゆみ、阿部公一、小嶋勝博、早出広司、中島満晴、“Engineering of the pilus gene regulation system of *Synechocystis* sp. PCC6803”、日本化学会第97春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2017年3月18日
 25. 石川孝博、“微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル分解酵素の同定”、日本農芸化学会2017年度大会、京都女子大学、2017年3月19日
 26. 木村光宏、“リン酸化プロテオーム解析を用いたワックスエステル代謝制御機構の解明”、日本農芸化学会2017年度大会、京都女子大学、2017年3月19日
 27. 田茂井政宏、“ユーグレナへのトランスエノイル CoA還元酵素遺伝子導入によるバイオ燃料生産性の向上”、日本農芸化学会2017年度大会、京都女子大学、2017年3月19日
 28. 柏山祐一郎、“外洋域におけるピコシアノバクテリア捕食性プロティストとそれらのクロロフィル代謝”、日本藻類学会第41回大会、高知大学、2017年3月24日
 29. 丸山、柏山ほか、“混合栄養性ユーグレノイド *Rapaza viridis* による *Tetraselmis* 葉緑体の“分割”利用”、日本藻類学会第41回大会、高知大学、2017年3月24日
 30. Mitsuhiro Kimura, Takahisa Ogawa, Takanori Maruta, Kazuharu Arakawa, Masaru Mori, Takahiro Ishikawa, “Comprehensive omics analysis reveals regulation mechanism of wax ester production in *Euglena gracilis* under anaerobic condition”、The 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2017, Honolulu, Hawaii, 2017年5月23日
 31. Shouhei Takamatsu, Katsuhiko Kojima, Takahiro Ishikawa, Koji Sode, “Paramylon production by *Euglena gracilis* under glucose regulated cultivation condition”, 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC) 2017, Hawaii Imin International Conference Center, Hawaii, USA, 2017年5月23日
 32. Dwi Ariyanti, Koji Sode, “Complementary chromatic acclimation in marine cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7335”, 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC) 2017, Hawaii Imin International Conference Center, Hawaii, USA, 2017年5月23日
 33. 高松祥平、小嶋勝博、石川孝博、早出広司、“グルコース制御条件下における *Euglena gracilis* によるパラミロン生産”、第19回マリンバイオテクノロジー学会大会、東北大学青葉山キャンパス、2017年6月3日
 34. 塩谷幸弓、山田晃世、小関良宏、浅野竜太郎、早出広司、“耐ストレス性遺伝子が導入された *Synechocystis* sp. PCC 6803 の構築と異種タンパク質の組み換え生産への

応用”、第19回マリンバイオテクノロジー学会大会、東北大学青葉山キャンパス、2017年6月3日

35. Moe Maruyama, Goro Tanifuji, Yuki Yazaki, Koichiro Awai, Toshinobu Suzaki, Yuichiro Kashiya: An obligate kleptoplastic phototrophy of a euglenoid *Rapaza viridis*. 15th International Congress of Protistology, Prague, Czech, 2017年8月1日
36. 富山拓矢、小川貴央、小川拓水、丸田隆典、太田大策、石川孝博、“微細藻類 *Euglena gracilis* におけるワックスエステル合成酵素の同定と機能解析”、日本植物学会第81回大会、東京理科大学、2017年9月8日
37. 後藤 京、田中優史、西野耕平、小川貴央、丸田隆典、石川孝博、“微細藻類ユーグレナにおけるパラミロン会合タンパク質の包括的解析”、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会、大阪府立大学、2017年9月22日
38. 石井侑樹、木村光宏、丸田隆典、小川貴央、森 大、石川孝博、“リン酸化による微細藻類ユーグレナのワックスエステル代謝調節機構の解明”、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会、大阪府立大学、2017年9月22日
39. 田茂井政宏、岡村桃子、作山治美、小川貴央、石川孝博、重岡 成、“バイオ燃料生産性の向上を目指した光合成能およびワックスエステル生合成能強化ユーグレナの分子育種”、日本農芸化学会2018年度大会、名城大学、2018年3月17日
40. 後藤 京、田中優史、西野耕平、小川貴央、丸田隆典、石川孝博、“比較プロテオーム解析による微細藻類ユーグレナのパラミロン代謝酵素の探索”、日本農芸化学会2018年度大会、名城大学、2018年3月17日
41. 木村光宏、石井侑樹、小川貴央、丸田隆典、森 大、石川孝博、“微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル代謝調節機構の解明”、日本農芸化学会2018年度大会、名城大学、2018年3月17日

③ ポスター発表 (国内会議 69 件、国際会議 20 件)

1. 玉木 峻、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博、“ユーグレナペルオキシレドキシンの機能解析”、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月12日
2. 玉木 俊、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博、“*Euglena* ペルオキシレドキシニアソザイムの機能解析”、第54回日本植物生理学会、岡山大学、2013年3月23日
3. 石川孝博、丸田隆典、田茂井政宏、重岡成、“次世代シーケンサーを用いた *Euglena gracilis* の遺伝子発現解析”、第15回マリンバイオテクノロジー学会大会、沖縄県市町村自治会館、2013年6月1日
4. 吉田勇太、荒川和晴、富田勝、石川孝博、“RNA-Seq データを用いた *Euglena gracilis* 遺伝子の *de novo* アセンブリー”、第10回クラミドモナス研究会、基礎生物学研究所、2013年11月29日
5. 山口由貴、玉木峻、羅軍、富山拓矢、丸田隆典、重岡成、石川孝博、“微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル発酵関連酵素遺伝子の発現解析”、第36回日本分子生物学会、神戸国際会議場、2013年12月5日
6. 小川貴央、三根彩佳、作山治美、吉田絵梨子、鈴木健吾、丸田隆典、石川孝博、田茂井政宏、重岡成、“バイオ燃料増産を目指したユーグレナ形質転換技術の確立”、第55回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス(富山県富山市)、2014年3月20日
7. 富山拓矢、玉木峻、山口由貴、羅軍、吉田勇太、丸田隆典、澤嘉弘、重岡成、石川孝博、“緑藻 *Euglena gracilis* における *trans*-2-エノイル-CoA レダクターゼの同定と機能解析”、日本農芸化学会2014年度大会、明治大学生田キャンパス、2014年3月28日

8. 小川貴央、木村彩子、作山治美、吉田絵梨子、鈴木健吾、丸田隆典、石川孝博、田茂井政宏、重岡 成、“ユーグレナ形質転換技術によるバイオ燃料増産”、第6回日本光合成学会、近畿大学農学部、2014年5月22日
9. 富山拓矢、吉田勇太、丸田隆典、澤 嘉弘、荒川和晴、石川孝博、“高濃度CO₂に対するユーグレナ発現遺伝子の包括的解析”、ユーグレナ研究会第30回記念大会、東大寺総合文化センター（奈良市）、2014年11月8日
10. 玉木 峻、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博、“ユーグレナチオレドキシニンシステムの生理機能解明”、ユーグレナ研究会第30回記念大会、東大寺総合文化センター（奈良市）、2014年11月8日
11. 木村彩子、小川貴央、作山治美、丸田隆典、鈴木健吾、石川孝博、田茂井政宏、重岡成、“形質転換技術によるユーグレナのバイオ燃料生産性の向上”、ユーグレナ研究会第30回記念大会、東大寺総合文化センター（奈良市）、2014年11月8日
12. 小川貴央、雲川和幸、篠原康佑、木村彩子、作山治美、丸田隆典、石川孝博、田茂井政宏、重岡 成、“ユーグレナにおけるフルクトース1,6-ビスホスファターゼの同定と機能解析”、ユーグレナ研究会第30回記念大会、東大寺総合文化センター（奈良市）、2014年11月8日
13. 富山拓矢、吉田勇太、丸田隆典、澤 嘉弘、荒川和晴、石川孝博、“Comprehensive gene expression analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic and high CO₂ treatment”、第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015年3月16日
14. 小川貴央、雲川和幸、篠原康佑、木村彩子、作山治美、丸田隆典、石川孝博、田茂井政宏、重岡 成、“*Euglena gracilis* 由来フルクトース1,6-ビスホスファターゼの同定と機能解析”、第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015年3月18日
15. 木村彩子、小川貴央、作山治美、丸田隆典、鈴木健吾、石川孝博、田茂井政宏、重岡成、“ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入によるユーグレナのバイオ燃料生産性の向上”、日本農芸化学会2015年度産学官学術交流委員会フォーラム、岡山大学津島キャンパス、2015年3月28日
16. Yuichiro Kashiya, Jun Kawahara, Moe Maruyama, Toshinobu Suzaki, Masami Nakazawa, Takahiro Ishikawa, Aika Yamaguchi, Akinori Yabuki, Akihiro Uzuka, Shinya Miyagishima, Takashi Shiratori, Akane Kawaguchi, Akiko Yokoyama, Hitoshi Tamiaki, “The chlorophyll catabolism generating cyclophorbide enols by autotrophic and heterotrophic euglenozoans: comparative studies”, VII European Congress of Protistology, Seville, Spain, 2015年9月9日
17. Hafiz. MD. Hafizur Rahman, 玉木 峻、重岡 成、石川孝博、“ユーグレナにおけるグルタチオンおよびトリパノチオン還元酵素の機能解析”、ユーグレナ研究会 第31回研究集会、Kiten ビルコンベンションホール（宮崎市）、2015年11月7日
18. 小川貴央、作山治美、丸田隆典、鈴木健吾、石川孝博、田茂井政宏、重岡 成、“ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入によるユーグレナのワックスエステル生産性の向上”、ユーグレナ研究会 第31回研究集会、Kiten ビルコンベンションホール（宮崎市）、2015年11月7日
19. 小川貴央、田茂井政宏、作山治美、石川孝博、重岡 成、“ユーグレナの光合成炭素代謝における3種のフルクトース1,6-ビスホスファターゼの役割”、ユーグレナ研究会 第31回研究集会、Kiten ビルコンベンションホール（宮崎市）、2015年11月7日
20. 鈴木健吾、山田康嗣、丸川祐佳、石川孝博、竹田 匠、“パラミロン分解酵素 endo-1,3-β-glucanase の同定と酵素学的機能解析”、ユーグレナ研究会 第31回研究集会、Kiten ビルコンベンションホール（宮崎市）、2015年11月7日
21. 田中優史、後藤 京、石川孝博、“オミクス解析によるパラミロン合成・分解関連酵素

- 遺伝子の探索”、ユーグレナ研究会 第31回研究集会、Kiten ビルコンベンションホール (宮崎市)、2015年11月7日
22. 栗原佳恵子、玉木 峻、丸田隆典、澤 嘉弘、石川孝博、“好気/嫌気条件における微細藻類ユーグレナのオルガネラプロテオーム解析”、第38回 日本分子生物学会年会、第89回 日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイランド神戸国際展示場、2015年12月2日
 23. 富山拓矢、丸田隆典、澤 嘉弘、石川孝博、“微細藻類 *Euglena gracilis* のワックスエステル合成酵素遺伝子の同定と機能解析”、第38回 日本分子生物学会年会、第89回 日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイランド神戸国際展示場、2015年12月2日
 24. Jun Kawahara, Moe Maruyama, Yuichiro Kashiya, Toshinobu Suzaki, Akiko Yokoyama, Masami Nakazawa, Takahiro Ishikawa, Hitoshi Tamiaki, “Detoxification catabolism of chlorophylls among a secondary plant Euglenophyceae: Physiology and biochemical processes”, The international chemical congress of pacific basin societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, 2015年12月18日
 25. 栗原佳恵子、玉木 峻、丸田隆典、澤 嘉弘、石川孝博、“好気/嫌気条件に応答した微細藻類ユーグレナの比較プロテオーム解析”、第57回日本植物生理学会、岩手大学上田キャンパス (盛岡市)、2016年3月18日
 26. 後藤 京、田中優史、丸田隆典、澤 嘉弘、石川孝博、“微細藻類ユーグレナの好気/嫌気条件下におけるパラミロン合成/分解関連酵素の探索”、第57回日本植物生理学会、岩手大学上田キャンパス (盛岡市)、2016年3月18日
 27. 田中優史、後藤 京、石川孝博、“オミクス解析を利用した微細藻類ユーグレナのパラミロン合成・分解関連酵素遺伝子の探索”、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月29日
 28. 中澤昌美、太田剛志、井上凌太、石川孝博、上田光宏、坂本龍司、乾 博、中野長久、宮武和孝、“ユーグレナによる低酸素下ワックスエステル合成における呼吸鎖電子伝達系の役割解明”、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月30日
 29. 小川貴央、作山治美、田茂井政宏、石川孝博、重岡 成、“ユーグレナのバイオ燃料生産性に及ぼすラン藻 FBP/SB_Pase 導入による光合成機能強化の影響”、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月30日
 30. 土橋柚美、津野裕美、中澤昌美、阪本龍司、石川孝博、谷 修治、炭谷順一、川口剛司、“*Euglena gracilis* Z 由来ラミナリビオースホスホリラーゼのクローニングと大腸菌での異種発現”、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月30日
 31. 四本木、柏山ほか、“ピコプランクトン *Prochlorococcus marinus* のプロテオームによる「被食」指標としての 3,8-divinyl-13(2),17(3)-cyclophorbide a enol”、第7回日本光合成学会及び公開シンポジウム、東京理科大学、2016年5月27日
 32. Maruyama M., Kashiya Y., et al., “Chloroplast division of *Tetraselmis* sp. in the food vacuole of mixotrophic algae *Rapaza viridis*”, Annual meeting of the International Society of Protistologists (The MOSCOW FORUM “PROTIST-2016”), Moscow, Russia, 2016年6月7日
 33. Shihongi A., Kashiya Y., et al., “Pelagic protists feeding on pico-cyanobacteria and their chlorophyll catabolisms”, Annual meeting of the International Society of Protistologists (The MOSCOW FORUM “PROTIST-2016”), Moscow, Russia, 2016年6月7日
 34. Yuichiro Kashiya, “Roles of the metabolism producing cyclophorbide enols in Euglenozoa: an evolution from phycophagic heterotrophs to the

- secondary plants”, 国際研究集会 第12回「化学的にプログラムされた合成色素類の超分子ナノ科学」、立命館大学、2016年6月18日
35. Masahiro Tamoi, “Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by genetic engineering of the Calvin cycle leads to increases in biomass and wax ester production”, 17th International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas, Kyoto International Conference Center, 2016年6月28日
 36. Takahisa Ogawa, “Identification and characterization of chloroplastic and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatases from *Euglena gracilis*”, 17th International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas, Kyoto International Conference Center, 2016年6月28日
 37. Kaeko Kurihara, “Identification of genes encoding enzymes involved in wax ester metabolism in *Euglena gracilis*”, 17th International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas, Kyoto International Conference Center, 2016年6月28日
 38. Yuji Tanaka, “Identification of paramylon synthase using transcriptome analysis in *Euglena gracilis*”, 17th International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas, Kyoto International Conference Center, 2016年6月28日
 39. Takahiro Yanagi, Koichiro Awai, “Lipid accumulation was enhanced by oxygen content in heterocyst cells of filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120”, 22nd International Symposium on Plant Lipids, Goettingen, Germany, 2016年7月5日
 40. Yuichiro Kashiya, “Roles of the metabolism producing cyclophosphoramide enols in Euglenozoa: an evolution from phycophagous heterotrophs to the secondary plants, Tetrapyrroles”, Chemistry & Biology of Gordon Research Conference, Newport, USA, 2016年7月18日
 41. Dwi Ariyanti, Koji Sode, “Complementary chromatic acclimation (CCA) in marine cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7335 (ATCC 24903)”, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers’ Community, Miyazaki SEAGAIA Resort, Miyazaki, Japan, 2016年10月28日
 42. Madoka Nagata, Amr M. Badary, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Koji Sode, “Development of systems for homologous recombination in marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG15041c”, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers’ Community, Miyazaki SEAGAIA Resort, Miyazaki, Japan, 2016年10月28日
 43. Saori Fuse, Koichi Abe, Matthias Roegner, Koji Sode, “Green-light-regulated gene expression in a *Synechocystis* Olive strain, a cyanobacterial strain with reduced light-harvesting antenna”, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers’ Community, Miyazaki SEAGAIA Resort, Miyazaki, Japan, 2016年10月28日
 44. 野志昌弘, “Trans-2-enoyl-CoA reductase 遺伝子導入によるユーグレナのワックスエステル生合成能の強化”, ユーグレナ研究会第32回研究集会、東京大学、2016年11月5日
 45. 林 龍太, “ユーグレナのメチルマロニル-CoA 経路の同定と機能解析”, ユーグレナ研究会第32回研究集会、東京大学、2016年11月5日
 46. 奥野, 柏山ほか, “海産ユーグレノイドにおける pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase の同定と機能解析”, ユーグレナ研究会第32回研究集会、東京大学、2016年11月5日

47. 後藤 京、“微細藻類 *Euglena gracilis* における嫌気特異的パラミロン分解機構の解明”、ユーグレナ研究会第 32 回研究集会、東京大学、2016 年 11 月 5 日
48. 栗原佳恵子、“微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル合成酵素の探索”、ユーグレナ研究会第 32 回研究集会、東京大学、2016 年 11 月 5 日
49. 田中優史、“ユーグレナのパラミロン合成酵素遺伝子の機能解析”、ユーグレナ研究会第 32 回研究集会、東京大学、2016 年 11 月 5 日
50. 石井侑樹、“トランスクリプトームおよびプロテオーム解析によるユーグレナ高濃度 CO₂ 応答機構の解明”、ユーグレナ研究会第 32 回研究集会、東京大学、2016 年 11 月 5 日
51. 高松祥平、布施早織、中島満晴、小嶋勝博、日原由香子、早出広司、“シアノファクトリTMに基づくバイオプロセスのフォトバイオリクターを用いた連続的制御”、ユーグレナ研究会 第 32 回研究集会、東京大学農学部弥生キャンパス、2016 年 11 月 5 日
52. Yuichiro Kashiya, “A phagocytosis-associated pan-eukaryotic chlorophyll degradation metabolism preserved in a secondary plant chlorarachniophytes”, The 9th Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology (APCAB 2016), Bangkok, Thailand, 2016 年 11 月 17 日
53. Motoki Kayama, Kashiya Y., et al., “Isolation of plastid-free white cells of *Euglena gracilis* and their characterization”, The 9th Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology (APCAB 2016), Bangkok, Thailand, 2016 年 11 月 17 日
54. 栗原佳恵子、“微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル合成/分解酵素の同定”、第 29 回植物脂質シンポジウム、大阪大学、2016 年 11 月 26 日
55. 小林滉宜、栗井光一郎、“*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた窒素源制御によるチラコイド膜再構築過程の解析”、第 29 回植物脂質シンポジウム、大阪大学、2016 年 11 月 26 日
56. 中西正紀、栗井光一郎、“二機能性の植物型 MGDG 合成酵素によるシアノバクテリア型 MGDG 合成経路の転換”、第 29 回植物脂質シンポジウム、大阪大学、2016 年 11 月 26 日
57. 木村光宏、“ユーグレナにおける DYRK オーソログの同定および機能解析”、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016 年 12 月 2 日
58. 栗原佳恵子、“微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル代謝関連酵素の同定と機能解析”、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016 年 12 月 2 日
59. 後藤 京、“微細藻類ユーグレナにおける嫌気条件に応答したパラミロン分解機構の解明”、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016 年 12 月 2 日
60. 藤澤弥生、栗井光一郎、“シアノバクテリア特異的糖脂質異性化酵素の機能解析”、第 18 回静岡ライフサイエンスシンポジウム、静岡大学、2017 年 3 月 5 日
61. 柴田栞里、栗井光一郎、“第三世代バイオ燃料生産藻類ユーグレナの膜脂質組成解析”、第 18 回静岡ライフサイエンスシンポジウム、静岡大学、2017 年 3 月 5 日
62. 水戸貴之、栗井光一郎、“シアノバクテリア型から植物型へ：光合成膜糖脂質合成経路変遷過程の解析”、第 18 回静岡ライフサイエンスシンポジウム、静岡大学、2017 年 3 月 5 日
63. 安藤圭祐、栗井光一郎、“シアノバクテリア特異的阻害剤の開発を目指した高活性糖脂質合成酵素の選抜”、第 18 回静岡ライフサイエンスシンポジウム、静岡大学、2017 年 3 月 5 日
64. 後藤 京、“微細藻類ユーグレナにおける嫌気応答時のパラミロン分解機構の解明”、第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島大学、2017 年 3 月 18 日
65. 高松 祥平、“Glycogen production using marine cyanobacterial strain, *Synechococcus* sp. NKBG15041c”、日本化学会 第 97 春季年会、慶應義塾大学 日

吉キャンパス、2017年3月18日

66. 永田 まどか、“Engineering of the pilus gene regulation system of *Synechocystis* sp. PCC6803”、日本化学会 第97春季年会、慶應義塾大学 日吉キャンパス、2017年3月18日
67. 加山・柏山、“微細藻類食 *Paracercomonas* sp. KM0002 株のクロロフィル分解代謝に関する研究”、日本藻類学会第41回大会、高知大学、2017年3月24日
68. 松田、柏山ほか、“シアノバクテリア食 *Heterolobosea* アメーバの研究”、日本藻類学会第41回大会、高知大学、2017年3月24日
69. 横山知穂、栗原佳恵子、石井侑樹、丸田隆典、小川貴央、石川孝博、“ユーグレナワックスエステル分解酵素の同定と機能解析”、ユーグレナ研究会第33回研究集会、とちぎプラザ 帯広、2017年8月26日
70. 田中優史、後藤 京、丸田隆典、小川貴央、石川孝博、“データベースを利用したパラミロン代謝に関わるグルカナーゼの探索”、ユーグレナ研究会第33回研究集会、とちぎプラザ 帯広、2017年8月26日
71. 後藤 京、田中優史、丸田隆典、小川貴央、石川孝博、“ファンクショナルプロテオミクスによるパラミロン会合タンパク質の解析”、ユーグレナ研究会第33回研究集会、とちぎプラザ 帯広、2017年8月26日
72. 石井侑樹、木村光宏、丸田隆典、小川貴央、森 大、石川孝博、“リン酸化修飾はユーグレナのワックスエステル代謝制御に重要である”、ユーグレナ研究会第33回研究集会、とちぎプラザ 帯広、2017年8月26日
73. 高松祥平、小嶋勝博、石川孝博、早出広司、“グルコース・スタット培養条件下における *Euglena gracilis* によるパラミロン生産”、ユーグレナ研究会第33回研究集会、とちぎプラザ 帯広、2017年8月26日
74. 高松祥平、小嶋勝博、石川孝博、早出広司、“グルコース・スタット培養条件下における *Euglena gracilis* によるパラミロン生産”、ユーグレナ研究会第33回研究集会、とちぎプラザ(帯広)、2017年8月26日
75. 田茂井政宏、“光合成能およびワックスエステル生合成能を強化したユーグレナの分子育種” ユーグレナ研究会第33回研究集会、とちぎプラザ 帯広、2017年8月26日
76. 小林俊一、中島満晴、早出広司、“改良光センサタンパク質を用いたシアノバクテリアにおける新規光制御型遺伝子発現ツールの開発”、第11回バイオ関連化学シンポジウム、東京大学弥生キャンパス、2017年9月8日
77. 富山拓矢、小川貴央、小川拓水、丸田隆典、太田大策、石川孝博、“WSD オルソログは微細藻類 *Euglena gracilis* のワックスエステル合成の主要酵素として機能している”、第30回植物脂質シンポジウム、お茶の水大学、2017年9月10日
78. 高松祥平、小嶋勝博、石川孝博、早出広司、“グルコース・スタット培養条件下における *Euglena gracilis* によるパラミロン生産”、酵素工学研究会第78回講演会、カレッジプラザ(秋田)、2017年10月6日
79. 小林俊一、中島満晴、阿部公一、早出広司、“改良型光センサタンパク質を応用した光制御型シアノバクテリアバイオプロセスの開発”、酵素工学研究会第78回講演会、カレッジプラザ(秋田)、2017年10月6日
80. Egi Tritya Apdila, Koichiro Awai, “Cyanobacterial galactolipid synthetic pathways can be replaced with plant-type pathways in *Synechococcus elongatus* PCC 7942”, 2nd International Symposium on Medical Engineering, 東京工業大学, 2017年11月9-10日
81. Kohji Nishimura, Koichiro Awai, “Characterization of lipid binding activity of EPSIN N-TERMINAL HOMOLOG (ENTH) domain of Arabidopsis MODIFIED TRANSPORT TO THE VACUOLE1 (MTV1)”, 7th Asian Symposium on Plant Lipid, Academia Sinica, Taiwan, 2017年11月29日-12月1日
82. Keisuke Ando, Koichiro Awai, “Strategy to survive in extreme habitats: Galactolipid

synthesis in thermophilic cyanobacteria”, 7th Asian Symposium on Plant Lipid, Academia Sinica, Taiwan, 2017年11月29日-12月1日

83. Egi Tritya Apdila, Koichiro Awai, “Cyanobacterial galactolipid synthetic pathways can be replaced with plant-type pathways in *Synechococcus elongatus* PCC 7942”, 7th Asian Symposium on Plant Lipid, Academia Sinica, Taiwan, 2017年11月29日-12月1日
84. 後藤 京、田中優史、西野耕平、小川貴央、丸田隆典、石川孝博、“プロテオミクスによる微細藻類 *Euglena gracilis* のパラミロン代謝関連酵素の同定”、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸国際展示場、2017年12月7日
85. 土澤優里、吉田祐貴、石井侑樹、富田 勝、石川孝博、荒川和晴、“*Euglena gracilis* の葉緑体欠損変異株の遺伝子発現変動解析”、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸国際展示場、2017年12月7日
86. 内野大輝、栗井光一郎、“窒素固定シアノバクテリアにおける酸素応答機構の解析”、第19回静岡ライフサイエンスシンポジウム、静岡大学、2018年3月4日
87. 藤澤弥生、栗井光一郎、“シアノバクテリア特異的糖脂質異性化酵素の機能解析”、第59回日本植物生理学会、札幌コンベンションセンター、2018年3月28日-30日
88. 田中優史、後藤 京、西野耕平、丸田隆典、小川貴央、石川孝博、“微細藻類ユーグレナのパラミロン分解に関わるホスホリラーゼの解析”、第59回日本植物生理学会、札幌コンベンションセンター、2018年3月28日-30日
89. 木村光宏、石井侑樹、小川貴央、丸田隆典、森 大、石川孝博、“嫌気条件に応答した *Euglena gracilis* のワックスエステル代謝調節機構の解明”、第59回日本植物生理学会、札幌コンベンションセンター、2018年3月28日-30日

(4)知財出願

①国内出願 (2件)

1. 発明の名称:ユーグレナ及びその培養方法並びにパラミロン及びその製造方法、発明者:山田康嗣、鈴木健吾、岩田修、ミトラシャルバニー、加藤季夫、石川孝博、出願人:株式会社ユーグレナ、国立大学法人島根大学、出願日:2015/8/13、出願番号:特願 2015-159955(特開 2017-35060)
2. 発明の名称:ユーグレナのパラミロン含有量を増加させる方法、発明者:田中優史、小川貴央、丸田隆典、石川孝博、荒川和晴、鈴木健吾、出願人:株式会社ユーグレナ、国立大学法人島根大学、学校法人慶應義塾大学 出願日:2017/5/1、出願番号:特願 2017-091320、特許 6242525

②海外出願 (1件)

1. 発明の名称:ユーグレナへの遺伝子導入方法及びその形質転換体、発明者:重岡成、田茂井政宏、鈴木健吾、吉田絵梨子、出願人:株式会社ユーグレナ、学校法人近畿大学、出願日:2014年2月28日、出願番号 PCT/JP2014/055161 (US20160010070)、出願国: 米国

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 日本農芸化学会 2015年度大会トピックス賞、木村彩子、小川貴央、作山治美、丸田隆典、鈴木健吾、石川孝博、田茂井政宏、重岡 成、“ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入によるユーグレナのバイオ燃料生産性の向上” 2015年3月29日
2. 日本農芸化学会 2016年度大会トピックス賞、田中優史、後藤 京、石川孝博、“オミクス解析を利用した微細藻類ユーグレナのパラミロン合成・分解関連酵素遺伝子の探索” 2016年4月6日

3. ユーグレナ研究会若手優秀発表賞、後藤 京、田中優史、丸田隆典、小川貴央、澤嘉弘、石川孝博、“微細藻類 *Euglena gracilis* における嫌気特異的パラミロン分解機構の解明” 2016年11月5日
4. 日本分子生物学会優秀ポスター賞 栗原佳恵子、富山拓矢、小川貴央、丸田隆典、澤嘉弘、石川孝博、“微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル代謝関連酵素の同定と機能解析” 2016年12月2日

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. フジサンケイビジネス、バイオ燃料で期待されるミドリムシ、2013年1月16日
2. 八重山毎日新聞、夢拓くユーグレナ、2015年6月4日
3. NHK 教育テレビ、サイエンス・ゼロ、2016年4月10日
4. NHK WORLD TV、Science View、2017年9月6日

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・解析したユーグレナ遺伝子の配列情報について、研究室のHP(URL; <http://shimane-univ-biochemistry.jp/>)にて公開中。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2015年12月4日	CREST 成果報告会公開シンポジウム	新宿 NS ビル 30 階 スカイカンファレンス	150名	成果発表
2016年3月15日	細胞工学研究会	島根大学生物資源科学部	40名	学術交流

§ 6 最後に

微細藻類ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は、好気条件で貯蔵多糖パラミロン (β -1,3-グルカン) を、嫌気条件ではパラミロンからバイオケロシンとして有望な C14 ミリスチン酸を主成分とするワックスエステルを生産するうえ、20%もの高濃度炭酸ガス耐性能を有するなど、生物学的に基礎研究の対象としてたいへん興味深い特徴を有するとともに、バイオ燃料実用化に有望な特性を備えた極めて魅力的な生物資源である。本研究では、ユーグレナにおけるこれら有用物質の代謝調節機構について遺伝子レベルでの理解を進めるとともに、これらの生産性を実用化レベルまで高めるための基盤技術の構築を目指して研究を進めてきた。

好気/嫌気に応答したパラミロンとワックスエステルの代謝制御機構については、まだ完全な理解には至っていないものの、トランスクリプトーム、(リン酸化)プロテオーム解析を駆使することでパラミロンおよびワックスエステルの全代謝酵素遺伝子の同定に初めて成功するとともに、代謝調節の鍵因子 WSRK の同定に成功するなど、インパクトのある成果を挙げる事ができた。特にパラミロン合成酵素やワックスエステル合成酵素の同定は、有用物質生産系開発に繋がる可能性を秘めている。

また、ユーグレナ形質転換技術による光合成機能強化は、パラミロンを含めたバイオマス生産性向

上に有効であることを示した。フォトバイオリクターによる培養条件の最適化を図ることで、独立条件の細胞においても従属条件並みにパラミロンレベルの向上が可能であることが示されたことから、今後、光合成機能強化細胞 EpFS 株や、パラミロンレベルが亢進した SDP1 サイレンシング細胞による検討を継続することで、当初の計画目標達成も可能であると期待している。

またさらに、培養効率など解決すべき課題が多々あるものの、工場排気ガスによる大量培養についても一定の成果を示せたことから、排気ガスを炭素源としたユーグレナによるバイオ燃料生産のための将来の道筋を付けることができたと確信している。これまで得られた知見を結集し、今後もユーグレナによる持続可能なバイオ燃料生産について成果を挙げていく所存である。

最後に、本研究の実施にあたり、ご支援とご指導を賜りました研究総括の松永 是先生をはじめ領域アドバイザーの先生方、ならびにお世話を戴きました JST 関係者の皆様に心より感謝申し上げます。