

# 研究報告書

## 「微細藻におけるオイル産生代謝機構の解明」

研究タイプ: 大挑戦型(延長無/増額無)

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 伊藤 卓朗

### 1. 研究のねらい

微細藻類が産生するオイル(主にトリアシルグリセロール; TAG)は、高い生産性が期待されることから軽油やジェット燃料の代替燃料原料として有望視されています。モデル緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス)は、多くのオイル産生藻類と同様に窒素栄養欠乏下において増殖を停止する代わりに TAG を油滴として蓄積します。一方、栄養充足下での対数増殖期には油滴がほとんど観察されないため、これらの藻類を用いて TAG を生産するためには 2 段階培養が必要になります。私は、培地に抗生物質を添加することでクラミドモナスが増殖を維持しながら恒常的に油滴を形成することを確認しました。代謝改変により増殖時の TAG 蓄積量を制御出来れば、1 段階培養による簡素な TAG 生産が可能になります。本さきがけ研究では、初めに、TAG 蓄積に関与する代謝変化を俯瞰的に調査するために質量分析計を用いて一次代謝物質からグリセロ脂質まで多数の代謝物質を一斉分析するためのメタボローム解析パイプラインを構築します。また、環境を厳密に制御可能なメタボローム解析用培養装置を開発し、様々な培養環境や遺伝子導入株における増殖特性を比較します。さらに、光同調培養により均質化された細胞集団を用いてメタボローム解析を行い、タンパク質や核酸などの主要細胞構成物質や顕微鏡観察による細胞形態、細胞計数機による細胞体積、酸素濃度測定装置による二酸化炭素同化能などの変化と統合して考察し、TAG 蓄積に伴う代謝変化を推定します。この知見を元に代謝改変を行うことで、TAG 生産能の向上が期待されます。本研究により得られる TAG 蓄積制御に関する知見は、窒素栄養欠乏下で TAG を蓄積する多くの藻類に応用できると考えます。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

微細藻類の代謝物質を俯瞰的に調査するため、グリセロ脂質を含む多数の代謝物質を効率的に一斉分析するメタボローム解析パイプラインを構築し、1 度のサンプリングで得られた細胞から 300 以上の代謝物質を一斉解析することに成功しました。トレボウクシア藻類を用いて対数増殖期と窒素栄養欠乏下での代謝解析を実施し、本手法の有用性を確認するとともに、クラミドモナスとの比較データとして中性脂質が増加する一方、アミノ酸を中心に多くの代謝物質が減少していることが分かりました(図 1、論文 1)。しかし、この過程で、連続光を用いたバッチ培養では反復実験における代謝物質の変動が大きいことが分かり。培養環境を厳密に制御可能なタービドスタット光同調培養装置を開発しました(図 2)。本装置を用いてクラミドモナスの窒素栄養欠乏下における代謝物質の変化を調べたところ、中性脂質はトレボウクシア藻類と同様に増加する一方、減少するアミノ酸は限定されることが分かりました。

抗生物質添加することでクラミドモナスのオートファジーが誘導され、僅かながら細胞増殖し

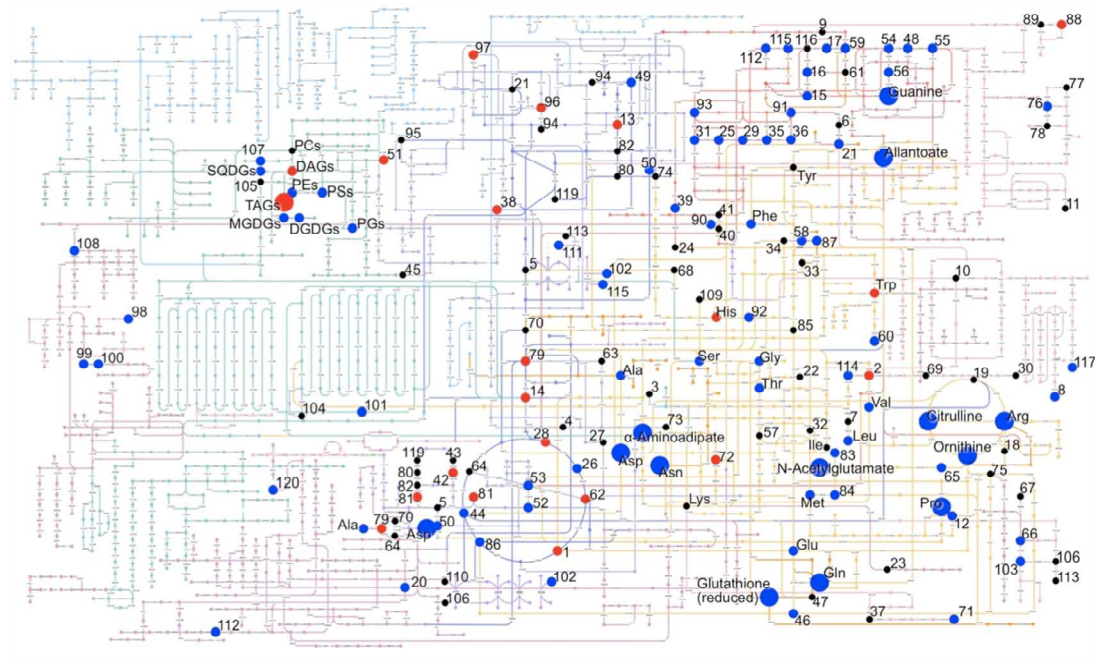
たまま油滴が形成されることを確認しており、継時的にメタボローム解析したところ、不飽和度の低いTAGが増加したのち、オートファジーが活性化すると同時に不飽和度の高いTAGが増加する事が明らかになりました。増殖速度は一定に見えるものの抗生物質の効果は継時的に変化していると推測され、増殖とオイル蓄積の恒常性については検証が必要です。一方、*γ*-グルタミルシステイン合成酵素過剰発現株(*GSH1-ox*)は、栄養充足下の対数増殖期においてデンプンを恒常的に蓄積することが知られています。本株がTAGも恒常的に蓄積している事を明らかにし、詳細なメタボロームを親株と比較し、デンプンとTAGの蓄積に関連すると推測される代謝物質の変動を確認しました。また、増殖速度と酸素発生量は減少しており、炭素貯蔵物質の生産により増殖が抑制された可能性があります。

本研究により、代謝制御の詳細は不明であるものの遺伝子導入による恒常的TAG蓄積が可能であると示すことができました。また、TAG蓄積時に共通する代謝変化が存在するため、今後、この代謝変化に挑戦する予定です。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「メタボローム解析パイプラインの構築」

微細藻類の代謝を広範に調査するため、脂質を含む多数の代謝物質を効率的に一斉分析するメタボローム解析パイプラインを構築しました。1度のサンプリングで得られた細胞から脂溶性物質と水溶性物質を抽出し、キャピラリー電気泳動-質量分析計によりアミノ酸や有機酸、糖リン酸などを、液体クロマトグラフィー-質量分析計により糖や脂肪酸、リン脂質、糖脂質、TAGなどを分析することで、300以上の代謝物質を一斉解析することに成功しました。トレボウクシア藻類を用いて対数増殖期と窒素栄養欠乏下での代謝解析を実施し、本手法の有用性を確認するとともに、研究テーマBの比較データを得ました(図1、論文1)。中性脂質が増加する一方、アミノ酸を中心に多くの代謝物質が減少していることが分かりました。



## 図 1 トレボウクシア藻類における対数増殖期と窒素栄養欠乏下における細胞あたりの代謝物質質量の変化

KEGG Atlas 代謝マップ上に Pathway Projector を用いて可視化しました。増加を赤、減少を青、2 倍以上の変化を小さな色付き点、20 倍以上の変化を大きな色付き点で表しました。各点の物質名リストは膨大なため、論文 1 を参照してください。

### 研究テーマ B 「対数増殖期と窒素栄養欠乏下での代謝解析」

研究テーマ A および本テーマを進める中で、連続光を用いたバッチ培養では反復実験において代謝物質質量の変動が大きいことが問題となりました。そこで、光条件、温度、通気、細胞濁度などの培養環境を厳密に制御可能なタービドスタット光同調培養装置を開発しました(図 2)。本装置を用いてクラミドモナスの窒素栄養欠乏下における代謝物質質量の変化を調べたところ、トレボウクシア藻類と比較して中性脂質は同様に増加する一方、減少するアミノ酸が限定されることが分かりました。

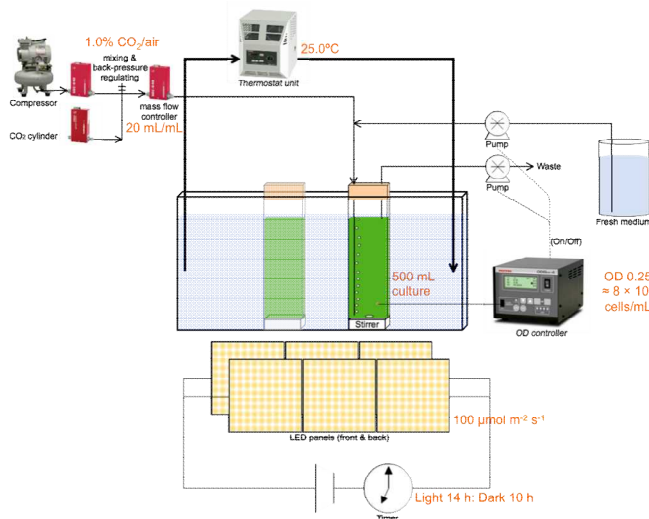


図 2 メタボローム解析用タービドスタット光同調培養装置

メタボローム解析に必要な細胞を対数増殖期において連続的に採集できる 500 mL 培養とし、光量子束密度、明暗周期、通気量、二酸化炭素濃度、温度、細胞濁度を厳密に制御可能です。

### 研究テーマ C 「抗生物質添加時の代謝解析」

抗生物質添加によりクラミドモナスのオートファジーを誘導することで、僅かながら細胞増殖したまま油滴が形成されます。継時的にメタボローム解析したところ、TAG 含有量の増加が確認されました。また、不飽和度の低い TAG が増加したのち、オートファジーが活性化すると同調して不飽和度の高い TAG が増加する事が明らかになりました。比較的一定の速度で増殖しているものの抗生物質の効果は継時的に変化しており、増殖とオイル蓄積の向上性については、さらなる検証が必要です。

#### 研究テーマD「恒常的油産生株の代謝解析」

γ-グルタミルシステイン合成酵素過剰発現株 (*GSH1-ox*) は、栄養充足下の対数増殖期においてデンプンを恒常的に蓄積します。本株が TAG も恒常的に蓄積している事を明らかにし、詳細なメタボロームを親株と比較し、デンプン代謝に関わる糖類、TCA 回路上の有機酸などの含有量が増加している事を明らかにしました。これらは、デンプンとTAGの蓄積に関連すると推測されます。一方、増殖速度と酸素発生量は減少しており、デンプンやTAGといった炭素貯蔵物質の生産により増殖が抑制された可能性があります。

#### 研究テーマE「代謝モデルをもとにした油産生制御株の作出」

研究テーマAからCの代謝解析結果を踏まえて、遺伝子工学によりTAG蓄積量を制御することが大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目であったと考えます。しかしながら、培養が不安定であった抗生物質添加と遺伝子導入株に対して反復精度の高い培養環境を整備する事と、グリセロ脂質の網羅的解析の分子予測精度を高める事に想定を大きく超える時間を要したため、代謝予測をもとにした遺伝子改変による高TAG産生株の作出には至りませんでした。しかし、研究テーマDにおいて、代謝制御の詳細は不明であるものの遺伝子導入による恒常的TAG蓄積が可能であると示すことができました。また、TAG蓄積時に共通する代謝変化が存在するため、今後、この代謝改変に挑戦する予定です。

### 3. 今後の展開

本研究では、油産生藻類のTAG蓄積時の代謝物質質量変化を俯瞰的に解析することに成功しました。これにより、恒常的TAG蓄積時は光合成により固定された炭素が優先的に貯蔵物質への向かうことが示唆されました。また、*GSH1-ox* の解析から遺伝子導入により恒常的TAG蓄積を実現できることが明らかとなりました。しかし、*GSH1-ox* は光量子束密度が上がると細胞が壊れやすいため、今後は、本研究により明らかになったTAG蓄積と連動する代謝物質質量変化を手掛かりに、増殖とTAG蓄積の割合を安定して制御する技術を開発し、栄養欠乏を伴わない野外培養において高効率に油を産生可能な株の作出を目指します。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究ではメタボローム解析などを用いて油産生藻類の代謝を俯瞰的に解析してTAG蓄積に関連する代謝経路を予測し、遺伝子導入によりTAG生産性の向上を目指した。特に、通常の増殖を停止するTAG蓄積とは異なり、増殖を維持した恒常的なTAG蓄積株の作出を目的とした。予期せぬ形で恒常的TAG蓄積株を得ため、本株を用いて代謝改変によるさらなるTAG蓄積量の拡大を目指したが、本株は培養が非常に難しく、安定した培養をするためのタービドスタット光同調培養装置の開発に時間を要した。これにより、飛躍的に精度の高い結果を得ることが可能になりTAG蓄積に関わる代謝の理解が進んだが、新たな遺伝子の導入には至らなかった。

研究実施体制は、メタボローム解析が膨大なデータ処理を必要とすることから2名の研究補助者を採用し、培養の条件検討などに2名の学生が参加した。研究費は、細胞計数機(シ

スメックス)、蛍光顕微鏡(オリンパス)、UPLC(アジレント)、酸素濃度測定装置(ハンザテック)を備品として購入し、本さがけ研究に必要な成果を得た。また、消耗品、人件費などは計画通り執行された。

本研究の成果は、これまで2段階の複雑な培養が必要だった多くの藻類に、1段階の簡素な培養によるTAG生産を提供できる可能性がある。これにより、生産現場では培養制御が容易になるほか、同じ培養槽から連続的に安定生産できるようになり、培養コストの大幅な削減に資すると考える。また、本領域の研究者とは、互いの技術を生かした共同研究を進めており、今後も、本さがけ研究テーマを発展させていきたい。

大挑戦型研究として、近年開発されたメタボローム解析による膨大なデータを基にした代謝改変技術の実現に挑戦したが、培養の安定性に難があったため新たな遺伝子導入まで進むことができなかった。しかし、培養を自在に制御できるようになり、代謝解析の精度が飛躍的に向上したため、TAG蓄積に関係する代謝経路の解析は格段に進み、現在は代謝改変による高TAG生産株の作出に集中している。培養不均質性は新しい手法に挑戦したからこそ見えた課題であり、時間はかかったものの、これを克服することにより再現性の高いデータを得ることができるようにあった。今後、これを基に研究を発展させたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

本研究は最新のメタボローム解析技術を用いて代謝モデルを構築し、遺伝子導入によりTAG生産量を向上させる事を目的とした研究であり、精力的にメタボローム解析や炭素代謝の推定に必要なタンパク質や核酸、二酸化炭素固定量などの測定を進めたが、藻類培養の再現性担保が難しく、遺伝子導入による代謝制御によるTAG生産量の向上には至らなかった。しかし、共同研究をより得た株の解析により、代謝制御の原理解明には至っていないものの遺伝子導入により恒常的TAG生産が可能であることを示した。また、培養装置の改良の結果、培養の再現性が飛躍的に向上し、代謝解析の精度が向上した。

大挑戦型の研究としては、精力的に研究を進めたものの、藻類培養の再現性担保が難しく、タービドスタット光同調培養の開発に時間がかかり計画が遅れたため、研究者より大挑戦辞退の申し出があり、延長や増額は行わなかった。しかし、培養装置の開発により精度の高い解析が可能になったことから、今後の進展に期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. ITO Takuro, TANAKA Miho, SHINKAWA Haruka, NAKADA Takashi, ANO Yoshitaka, KURANO Norihide, SOGA Tomoyoshi, TOMITA Masaru. Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxioephycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics*. 2013, 9, 178-187,

(2) 特許出願



研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Takuro Ito. “Technical expertise of the time-resolved metabolomics using stable isotope feeding”, 2nd International Joint Meeting of Alkenone Biosynthesis and Geoscience, 2014年2月, つくば市(招待講演)

Takuro Ito, Masanobu Nishikawa, Kenji Nakahigashi, Ken'ichi Ogawa, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. “Metabolome Analysis of the gamma-glutamylcysteine synthetase over-expressor *Chlamydomonas reinhardtii* Under High- and Low-Light Conditions.”, 10th International Phycological Congress, 2013年8月 Orlando, USA

Takuro Ito, Kazuya Igarashi, Tsukasa Murakami, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. “Metabolome Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* Under High- and Low-Light Conditions”, 15th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, 2012年6月 Potsdam, Germany