

# 研究報告書

## 「微細藻類ユーグレナの新規形質転換法の開発と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 中澤 昌美

### 1. 研究のねらい

微細藻類であるユーグレナは、45%までの高濃度二酸化炭素下においても光合成により良好に生育する。ユーグレナは光合成や外部の炭素源から得た余剰の炭素を貯蔵多糖である $\beta$ -1,3グルカン、パラミロンとして細胞内に蓄積する。細胞が低酸素状態にさらされると、パラミロンを速やかに分解し、脂肪酸-脂肪アルコールエステルであるワックスエステルを生産する。ユーグレナが生産するワックスエステルは二重結合を持たず、酸化安定性が高いという特徴がある。主成分はミリスチン酸ミリスチル(C14:0-C14:0Alc)である。この化合物から調製したバイオディーゼルは、比較的軽質であるためジェット燃料への活用が期待されているが、実用に向けては収量の向上およびさらなる組成の改質が望まれている。そのためには、代謝改変の基盤技術を確立するとともに、未解明な点の多いワックスエステル合成経路の酵素を同定することおよび代謝メカニズムを理解することが必須である。

本研究では代謝改変によるユーグレナワックスエステルの増産および改良に向けて、ユーグレナ核ゲノム形質転換法を開発し代謝改変ユーグレナ獲得のための基盤技術を創成すること、さらにワックスエステル合成機構を解明し、代謝改変ターゲットを選定することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ユーグレナが生産するバイオ燃料、ワックスエステルを増産・改良するために、ユーグレナ核ゲノム形質転換法の開発による代謝改変基盤技術の開発、および、ワックスエステル合成経路の同定及び代謝メカニズムの理解、を目指した研究を行った。

形質転換法の開発においては、遺伝子導入法の最適化(エレクトロポレーションおよびアグロバクテリウム法(特許出願中)の利用)、導入遺伝子エレメントの新規開発、薬剤選択の最適化によって導入遺伝子由来 mRNA を安定に転写する系を開発した。

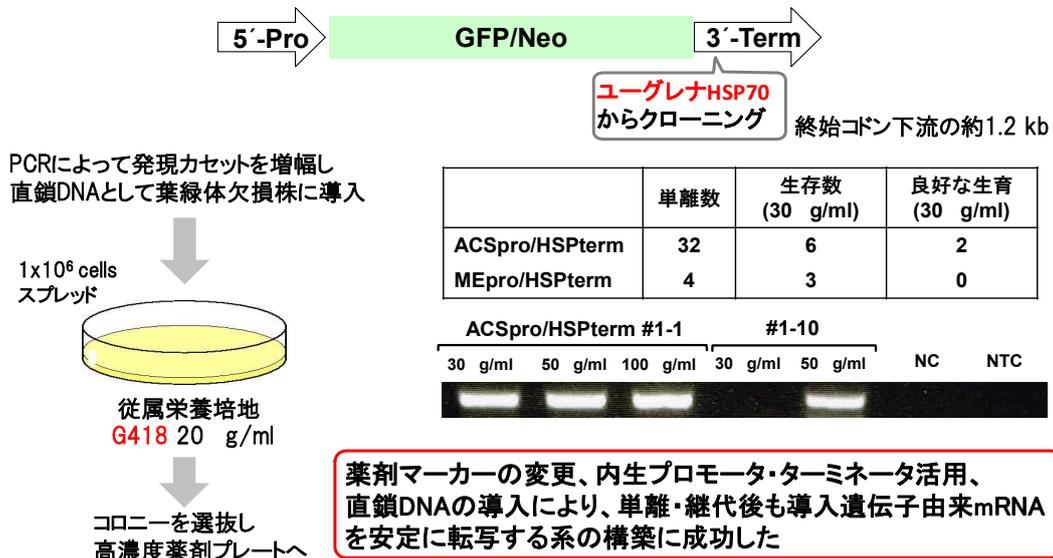
ワックスエステル合成機構の解明においては、RNAi による遺伝子ノックダウン技術をユーグレナに適用し、ワックスエステル合成の律速段階となりうる因子を 2 種同定した。さらに、遺伝子サイレンシングによって、ワックスエステルの組成を改変し、バイオ燃料としての性質を向上させることに世界で初めて成功した。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A 「ユーグレナ核ゲノム形質転換法の開発による代謝改変基盤技術の開発」

これまで未開発であったユーグレナの核ゲノム形質転換法を開発するために、選択薬剤および導入方法の検討、ユーグレナに適した新たな導入 DNA の構築を行い、形質転換体を単離・

継代後も導入遺伝子由来 mRNA を安定に転写する系の構築に成功した。図中ではエレクトロポレーション法での導入について記載した。また、アグロバクテリウム法によるユーグレナへの遺伝子導入にも取り組み、形質転換法に関する特許を取得した[成果リスト特許 1]。



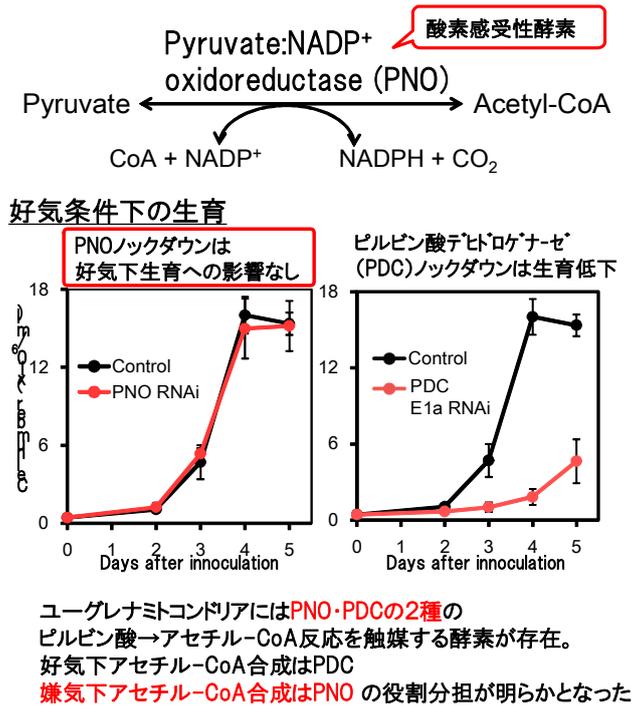
図：ユーグレナ形質転換系の開発

### 研究テーマB「ワックスエステル合成経路の同定及び代謝メカニズムの理解」

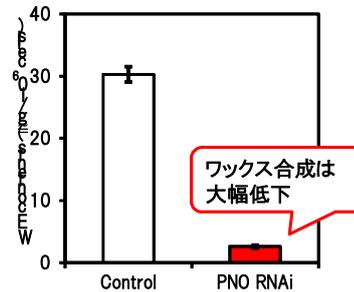
ユーグレナが低酸素状態でのワックスエステルを合成する経路として、貯蔵多糖パラミロンの分解、解糖での ATP 産生、ミトコンドリアでのアシル-CoA 合成、小胞体でのエステル化反応によるワックスエステル合成という過程が予想されてきた。しかし、経路を構成する酵素の分子情報は、ほとんど不明であった。ワックスエステルを増産するためには、どの経路が律速となっているかを解明することが重要である。従来の生化学的な情報を総合すると、ユーグレナにはパラミロン分解から解糖系への能力は充分あるが、ピルビン酸以下の代謝物の利用速度が律速となり能力が発揮できていないことが予想された。そこで、本研究ではワックスエステル合成経路の律速段階を明らかにし、生産量の向上に資する知見を得るため、ピルビン酸からアシル-CoA 合成過程の酵素を発現抑制することにより、律速過程の推定を行った。

#### 1) ピルビン酸からアセチル-CoA への変換反応

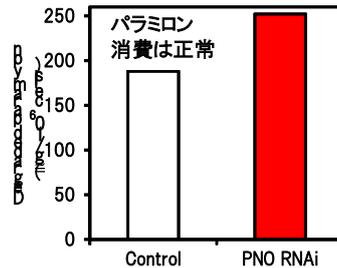
ユーグレナのミトコンドリアには、ピルビン酸からアセチル-CoA への変換を触媒する酵素として、一般的な生物が有するピルビン酸デヒドロゲナーゼ多酵素複合体(PDC)に加え、ピルビン酸:NADP<sup>+</sup>酸化還元酵素(PNO)の存在が知られている。PNO は、ワックスエステル合成過程で機能すると考えられてきたが、詳細は不明であった。本研究において、RNAi により遺伝子発現を抑制することによって両者の機能を調べた結果、好気下でのアセチル-CoA 合成はPDC、嫌気・低酸素下でのアセチル-CoA 合成はPNOという役割分担をしていることが明らかとなった。さらに、PNO のノックダウンではパラミロンの消費は正常であったが、ワックス合成が大幅に低下しており、PNO がワックスエステル合成経路における律速段階のひとつである可能性が示唆された。



**WE合成量(低酸素24 h)**



**パラミロン減少量(低酸素24 h)**

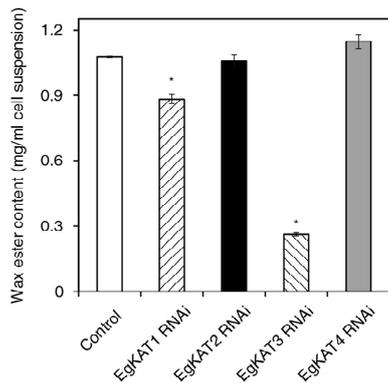


図： PNO ノックダウンはワックスエステル合成を低下させる

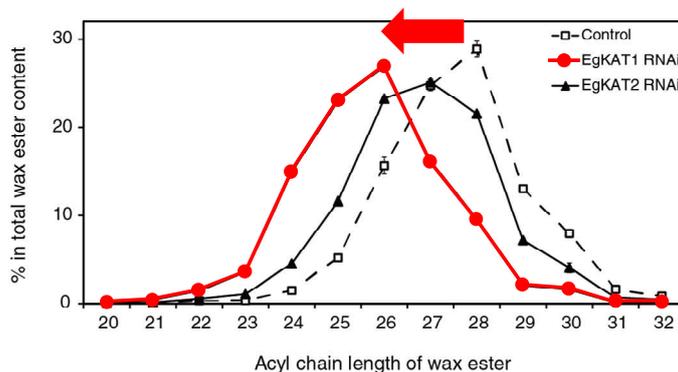
## 2) ミトコンドリアにおけるアシル鎖伸長反応 [成果リスト 3]

ワックスエステルは、ミトコンドリアで ATP を必要としない *de novo* 脂肪酸経路を経て合成される。この反応は脂肪酸β酸化の逆反応であることが知られていたが、関連する酵素の分子情報は全く不明であった。本研究では、アセチル-CoAによるアシル鎖伸長反応を触媒する3-ケトアシル-CoA チオラーゼ(EgKAT)に着目した。データベース情報から、ユーグレナが 6 種類の EgKAT アイソザイムを持つことを見出し、それぞれを RNAi によって発現抑制することで、機能の解析を行った。その結果、ワックスエステル総量を大幅に低下させるアイソザイム EgKAT3 を見出した。本酵素の触媒する短鎖アシル CoA の伸長反応がワックスエステル合成における律速段階である可能性が示唆された。

さらに、EgKAT1 および 2 のノックダウン細胞は、通常よりも短いワックスエステルを作ることを見出した。ワックスエステル総量の変化に及ぼす影響は小さかった。短縮化したワックスエステルの構成成分をもとに、市販の脂肪酸メチルエステルおよび脂肪アルコールを混合したモデル燃料を調製し、熱測定を行った結果、凝固点が 8°C、融点が 12°C 低下することが明らかとなった。世界で初めて代謝改変によってワックスエステルの組成を、目的に沿って改変することに成功した。



EgKAT3 RNAiで  
ワックスエステル総量大きく低下



EgKAT1, 2のRNAiで鎖長短縮

= EgKAT1と2は  
長鎖アシル-CoA伸長に機能

ワックスエステルの改質に成功

図：EgKAT アイソザイムノックダウンはワックスエステルの量・質を変化させる

### 3. 今後の展開

本研究により、ユーグレナ核ゲノム形質転換法の基盤情報が得られたとともに、ユーグレナがワックスエステルを生産するメカニズムの一端が明らかとなった。ワックスエステル合成における律速段階候補を明らかにしたことで、今後は代謝の強化によるワックスエステル生産の向上を達成することを目指す。また、現在は非公開の成果であるが、他の代謝調節方法によりワックスエステル合成を向上させることにすでに成功している。今後、メカニズムを詳細に解析することによりワックスエステルの生産向上への基盤を構築し、実用化レベルへの展開を目指す。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究は、ユーグレナが生産するバイオ燃料、ワックスエステル生産量を倍増させる、という目標のもと、ユーグレナ核ゲノム形質転換系の開発およびワックスエステル合成機構の解明を目指した研究を進めてきた。今回開発を進めた核ゲノム形質転換系は、今後のユーグレナ研究における基盤技術となりうる。実際の代謝改変に用いるため、さらに改良を進める必要がある。ワックスエステル合成機構の解明については、律速過程となりうる反応をはじめて見出すことに成功したとともに、ワックスエステル組成を代謝工学的に改良することに成功した。さらに、非公開成果であるが、代謝の調節によってワックスエステル生産量を倍増させることにより、当初の数値目標を達成することができた。これは、ユーグレナによるバイオ燃料の実用化に向けて、重要な成果であると考えている。

研究進展として、形質転換系の開発に多くの時間を要したため、研究成果の論文発表が遅れていることを大きな課題として、さきがけによって得た成果を早急に論文発表する。研究を進める中で、研究期間の最後の半年にワックスエステル合成機構の解明におけるブレークスルーを得ることができた。目の前の現象に真摯に向き合って、そこから可能な限りの情報を獲得し、共同研究者と徹底的に議論する、という「科学者として当たり前のこと」の重要性を改めて気付くことのできたさきがけの3年半だった。今後、さきがけ「PRESTO」=少し急いで、の気持ちを持ち続け、研究を進めて行きたい。

(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)

ワックスエステル合成を向上させるという目標に向けて、形質転換法の開発と、代謝メカニズム解明に取り組んだ。代謝メカニズム解明の観点からワックスエステル合成向上を達成したという点は評価できる。論文成果の発表が少し遅れているが、早期に成果をまとめることが期待される。今後はCREST石川孝博教授グループに参画することで、ユーグレナによるバイオ燃料生産メカニズム解明という基礎的な知見からの成果創出をさらに加速させるとともに、実用化への展開が期待される。また、領域内外の研究者や領域アドバイザーとの研究交流を積極的に行っており、その成果が徐々に形になりつつある。今後の研鑽によってユーグレナ研究の中核となる人物となることを期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takumi OGAWA, Takeshi FURUHASHI, Atsushi OKAZAWA, Rai NAKAI, Masami NAKAZAWA, Tobias KIND, Oliver FIEHN, Shigehiko KANAYA, Masanori ARITA, Daisaku OHTA, "Exploration of Polar Lipid Accumulation Profiles in *Euglena gracilis* Using LipidBlast, an *in silico* Constructed MS/MS Spectral Library" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78(1) 14-18 (2014).
2. Takeshi Furuhashi, Takumi Ogawa, Rai Nakai, Masami Nakazawa, Atsushi Okazawa, Adchara Padermschoke, Kazuki Nishio, Masami Yokota Hirai, Masanori Arita, Daisaku Ohta, "Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography-mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia" *Metabolomics* 11 175-183 (2015).
3. Masami Nakazawa, Hiroko Andoh, Keiichiro Koyama, Yomi Watanabe, Takeo Nakai, Mitsuhiro Ueda, Tatsuji Sakamoto, Hiroshi Inui, Yoshihisa Nakano, Kazutaka Miyatake, "Alteration of wax ester content and composition in *Euglena gracilis* with gene silencing of 3-ketoacyl-CoA thiolase isozymes" *Lipids in press*.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 中澤 昌美、春口 大樹、上田 光宏、宮武 和孝

発明の名称: 形質転換ユーグレナ及びその製造方法

出 願 人: 公立大学法人大阪府立大学、株式会社ユーグレナ

出 願 日: 2013/12/25

出 願 番 号: PCT/JP2013/084618

(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)

Masami Nakazawa, Mitsuhiro Ueda, Hiroshi Inui, Yoshihisa Nakano, Kazutaka Miyatake  
“Biofuel production in CO<sub>2</sub>-absorbing microalgae *Euglena gracilis*” JST さきがけ研究  
領域合同国際シンポジウム「持続する社会を先導する光科学：環境・エネルギー・機  
能材料」2012 年 3 月