

微細藻類ユーグレナにおける バイオ燃料合成増強因子の探索

中澤 昌美^{1),2)}・石川 智也¹⁾・水谷 陽子¹⁾・上田 光宏¹⁾・
乾 博^{1),3)}・中野 長久^{1),4)}・宮武 和孝^{1),5)}

- 1) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 応用生命科学専攻 生物機能化学分野、2) 科学技術振興機構 さきがけ、3) 大阪府立大学大学院総合リハビリテーション学研究科 栄養療法学専攻、
4) 大阪女子短期大学、5) 帝塚山学院大学 人間科学部 食物栄養学科

〒599-8531 堺市中区学園町 1-1 E-mail: mami@biochem.osakafu-u.ac.jp

Home Page: <http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/BE/>

微細藻類ユーグレナは、40%の高濃度 CO₂ 下でも活発に光合成を行い生育する。光合成や外部炭素源から得た余剰の炭素は、好気状態では貯蔵多糖である β -1,3-グルカン、パラミロンとして蓄積される。非常にユニークなことに、パラミロンを蓄積した細胞を嫌気状態にさらすと、発酵により脂肪酸-脂肪アルコールエステル（ワックスエステル、主成分 C14:0-C14:0_{Alc}）を産生することを我々は見出してきた。ワックスエステル蓄積量は乾燥重量当たり約 30%にも上るが、カーボンニュートラルな「バイオ燃料生産工場」として実用化するには、さらなる生産向上と均質化が必要である。そこで、従来未開発であったユーグレナ形質転換技術の研究を進め、これにより、CO₂ 削減と高バイオ燃料生産を両立した機能強化ユーグレナを開発することを目的としている。本研究では代謝改変ターゲットを効果的に得るために、RNAi 法によるノックダウンによって、貯蔵多糖およびワックスエステルの量や組成を変動させる因子を探索した。

1. はじめに

近年、低炭素社会への転換が世界的な課題となっており、CO₂ 削減に関する研究が大きく注目されている。同時に、石油資源の枯渇や食糧価格高騰、食糧危機等の問題が現実化しつつある。このような社会的背景のもとで、「CO₂ を吸収して、光合成を行う」とともに、「バイオ燃料を作り出すことが出来る」さらには「食糧と競合しない」特徴を持つ微細藻類の利用が大きく注目されている。しかし、微細藻類資源の本格的利用や普及は世界でも未だ途上である。

我々は微細藻類ユーグレナの生化学的解析を長年にわたって行ってきた。その成果として、ユーグレナが CO₂ の低減とバイオ燃料産生にとって有望な形質を持つことを見出してきた（図 1）。その具体例として、
○ 大気濃度の CO₂（約 0.038%）下だけではなく、40%もの高 CO₂ 濃度下でも光合成により CO₂ を吸収して生育できる。（火力発電所の排気ガスを直接利用できる）
○ 貯蔵多糖として β -1,3 グルカンであるパラミロンを蓄積する。これを原料として、嫌気発酵によって脂

肪酸-脂肪族アルコールエステルであるワックスエステルを合成する[1]。（バイオ燃料を合成・蓄積できる）
○ 淡水性でありながら海水の 3 分の 1 の濃度の汽水においても生育できる。（限られた水資源の有効活用）
などが挙げられる。

現状でのユーグレナのワックスエステル産生能力は乾燥重量あたり約 30%である。国内他グループの試算によると、現在のワックスエステル産生能力では、培養・製造段階で放出する CO₂ 量が、バイオディーゼルでの化石燃料代替および炭酸固定による CO₂ 削減量の 2 倍に達すると見込まれている。そこで、ワックスエステル産生能力を倍増させることで、ライフサイクルアセスメント（LCA）の観点からもカーボンニュートラルなバイオ燃料工場を達成することを目的にした研究を着想した。我々は従来未開発であったユーグレナ形質転換技術の研究を独自に進めており、これを用いて、生化学的解析に基づいた予測のもと代謝改変を行う研究を進めている。本発表では、代謝改変ターゲットを効率的に得るために、RNAi 法によるノックダウンによ

って貯蔵多糖およびワックスエステル産生を変動させる因子を探索した。

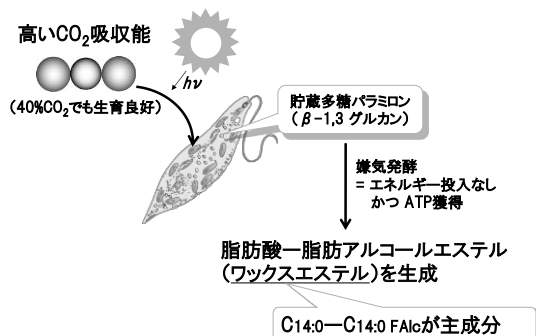


図1. 我々の見出した「ユーグレナによるCO₂低減とバイオ燃料生産の両立」

2. 方法

(1) 代謝改変ターゲットの選定と RNAi

中心炭素代謝およびミトコンドリア脂質代謝を主なターゲットとした。EST 情報およびクローニングにより獲得した塩基配列情報をもとに 400~600 塩基程度の領域を選定し、長鎖二本鎖 RNA (dsRNA) を合成した。ユーグレナへの dsRNA 導入はエレクトロポレーションにより行った。コントロール細胞としては、dsRNA のかわりに TE buffer を用いてエレクトロポレーション処理を行った細胞を用いた。ノックダウンの効果は半定量 RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR により検証した。

(2) バイオ燃料関連物質の定量

貯蔵多糖パラミロンは、アセトン抽出および除タンパクを行った後、フェノール硫酸法にて全糖量として測定した。ワックスエステルは、ガスクロマトグラフィーにより測定した。

3. 結果と考察

(1) ノックダウン細胞の表現型

各酵素のノックダウンによる表現型は大きく分けて① 生育の遅れが生じる、② 生育にはほとんど影響がないが、細胞内多糖が大幅に減少する、③ 生育にはほとんど影響がないが、嫌気状態移行時のワックスエステル産生が大幅に減少する、という形で現れた。明確な表現型に現れないものも存在した。従来の代謝解析では、貯蔵多糖パラミロンはワックスエステルの合成材料であると予測されている[1,2]。好気状態でのパラミロン量の制御は、嫌気状態移行時のワックスエステル産生の制御にも重要であると考えられる。そこで、②の表現型を示したクエン酸合成酵素 (CS) のノックダウン細胞について、さらに詳しく調べた。

(2) クエン酸合成酵素 (CS) ノックダウン細胞の解析

CS ノックダウン細胞では、好気培養 2 日目までコン

トロール細胞と有意な CS 比活性の差はなかったが、3 日目以降に CS 比活性が急激に低下した。培養 6 日間の増殖はコントロール細胞と同等であった。しかし、培養 3 日目以降 CS ノックダウン細胞において、細胞内の貯蔵多糖由来の顆粒構造が徐々に消失していった (図 2)。フェノール硫酸法で細胞内パラミロン量を測定したところ、培養 6 日目でコントロール細胞の 5~10%程度にまで減少していた。さらに、好気培養 6 日目の細胞を 12 時間静置することで嫌気状態においた後、ワックスエステル量を測定した。その結果、CS ノックダウン細胞での含量は、コントロール細胞の 10%以下であった。これらのことから、ユーグレナにおいてパラミロン蓄積量とワックスエステル量の相関が非常に高いことも示され、従来の代謝予測が正しいことが明らかとなった。

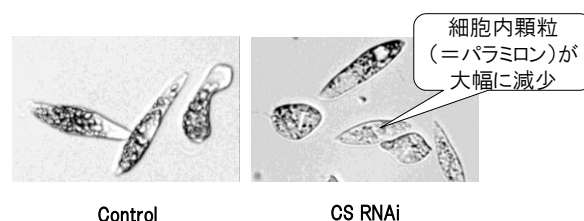


図2. 好気状態で生育させた細胞の様子 (6 日目)

4. 今後の展望

本発表では主に CS のノックダウンによる効果に焦点を当てて述べた。CS をノックダウンしたことによる最大の効果はミトコンドリア内でのアセチル-CoA 濃度の上昇だと予想される。アセチル-CoA は好気状態において TCA 回路の入口にあたるとともに、嫌気状態でのワックスエステル発酵においても重要な代謝中間産物である。今後詳細に代謝産物変動を解析することで、本生物のパラミロン、ワックスエステル代謝への理解を深め、より効率よくワックスエステルを蓄積する代謝改変ユーグレナを創出することを目指す。現在、CS ノックダウン細胞におけるプロテオーム変動についても調査を進めている。

参考文献

- [1] Inui H., *et al.*: FEBS Lett., 150, 89-93 (1982)
- [2] Tucci S., *et al.*: J. Eukaryot. Microbiol., 57, 63-69 (2010)

謝辞

本研究は、H23 年度 JST さきがけ採択研究「微細藻類ユーグレナの新規形質転換法の開発と応用」および H23 年度 JST A-STEP 探索タイプ「微細藻類ユーグレナにおけるバイオ燃料合成増強因子の探索」の一部として実施したものである。