

「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」
平成22年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

白岩 善博

筑波大学生命環境系・教授

海洋ハプト藻類のアルケノン合成経路の解明と基盤技術の開発

§ 1. 研究実施体制

(1) 筑波大グループ

- ① 研究代表者: 白岩善博 (筑波大学 生命環境系、教授)
- ② 研究項目
 - a: 代謝改変のための基礎研究および基盤技術の開発
 - b: 比較メタボローム・トランスクリプトームによるアルケノン合成経路の解明
 - c: 培養条件及びアルケノン生産条件の最適化

(2) 「北海道大学」グループ

- ① 主たる共同研究者: 沢田 健 (北海道大学大学院理学研究院、講師)
- ② 研究項目
 - b: 比較メタボローム・トランスクリプトームによるアルケノン合成経路の解明
 - c: 培養条件及びアルケノン生産条件の最適化

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

a. 代謝改変のための基礎研究および基盤技術の開発【筑波大グループ】

ハプト藻によるアルケノンの合成量を増強するためには、貯蔵多糖(可溶性 β -グルカン)への炭素代謝フラックスを脂質アルケノン合成に振り分けることが効果的である。円石藻 *Emiliana huxleyi* のゲノムデータベース上に、 β -グルカン合成に関与すると推測される遺伝子を複数見出

した。次に、 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を光合成基質として用いて β -グルカン新規合成速度を定量する手法を開発し、本研究でその方法を確立した。

新規に開発した本方法を用いれば、 ^{14}C を用いた代謝フラックス解析が容易になり、炭素フラックス解析(光合成産物分析)により、代謝経路の解析が可能となった。これによって明らかにされた代謝フラックスに基づき、 β -グルカン合成酵素の候補遺伝子の発現解析を行い、多糖合成に関与すると考えられる候補遺伝子の同定・単離を行う予定である。

円石藻に特有の光合成炭酸固定経路の *In vitro* 酵素学的解析を行い、当該経路のボトルネック部位を明らかにすることが重要である。平成 23 年度は光合成 CO_2 固定の律速段階が Rubisco 反応段階であり、さらに、葉緑体に局在するピルビン酸カルボキシラーゼ(PYC)による β -カルボキシレーション反応による CO_2 固定も重要であることを明らかにした¹⁾。さらに、放線菌を用いた新たなリコンビナントタンパク質の発現技術を確立し、得られたリコンビナント PYC の酵素学的性質から、PYC は葉緑体におけるアミノ酸生産に大きく寄与することを証明した。

アルケノンの合成能を増強するためには、不飽和化を含め、その合成・調節に関わる酵素を同定する必要がある。H23 年度は、従来の「3 不飽和中間前駆体からの新規合成による」との知見を否定し、 $\text{C}_{37:2}$ が不飽和化され $\text{C}_{37:3}$ が合成されることを証明した。さらに、*E. huxleyi* のゲノムデータベースから脂質の不飽和化酵素を探索し、これらの発現解析を行い低温下で発現が上昇する遺伝子を選抜することに成功した。H24 年度は、アルケノン不飽和化酵素の同定を試みる。

超長鎖脂肪酸合成に注目して様々な阻害剤を用いた阻害実験を行い、未だ脂肪酸からアルケノンに至るまでの合成経路(炭素鎖の伸長のメカニズム)を解析する予定である。*E. huxleyi* のゲノムデータベースからは陸上植物のものと相同性がある超長鎖脂肪酸合成に関わる遺伝子が見出されており、これらの発現解析や阻害実験からアルケノン合成経路を絞り込むことで、アルケノン合成系の全体像を明らかにすることが可能となる。

b. 比較メタボローム・トランスクリプトームによるアルケノン合成経路の解明【筑波大グループ】

計 42 種の円石藻株を入手し、アルケノン含有の有無や脂質分子の種類を分析した。H23 年度は、アルケノン合成株では、アルケノンの種類や蓄積量が株によって多様であることを見出した。

比較メタボを行い、アルケノン合成に関与する中間代謝産物を明らかにするため、H23 年度は LC/CE-MS 機器の導入を行い、アルケノン脂質合成のメタボローム解析の技術的な基盤整備を行った。ゲノム情報が利用可能な CCMP2090 株でライブラリー作製及びシーケンスを終了し、今後のデータ解析に供する。

更に 200 種以上の代謝物の定量を可能とする技術の確立を目指し、CE/MS により、*E. huxleyi* の解糖系、カルビン回路、TCA サイクル、アミノ酸生合成経路の 55 代謝物の定性的な分析・測定に成功した。この成果は、H24 年度の LC/MS により脂質・アルケノン生合成経路上の代謝物の網羅的解析を可能とするものであり、その基盤構築が実現できた。代謝中間体の回転率が観

測できれば代謝律速点を知ることができ、代謝物濃度・代謝フラックス分布などの情報を統合的に解析し、合理的な代謝改変戦略を立案するための技術基盤の開発を技術的に可能にした。

c. 培養条件及びアルケン生産条件の最適化【筑波大および北大グループ】

円石藻は海洋で頻繁にブルームと呼ばれる大増殖を起こす生物であるがその成因は未解明である。実験室内での高密度の集積培養を可能とするための基礎的知見を蓄積するため、培養実験によって高い増殖速度を維持する培養条件を最適化し、大量培養技術の開発へ応用するための研究が不可欠である。また、中東アラブ諸国の原油は中生代白亜紀の円石藻大増殖を起源とすることが分かっており、コアサンプルにおけるアルケン分子の特性や存在量、分子種の解析は、現在におけるアルケン合成と代謝の研究にも有用な知見を与えるものであり、それらの情報を参考に、研究を進めることにも意味がある。

H23年度は、複数の円石藻株について、異なる温度条件下でのアルケン蓄積量の評価を行った。最適増殖温度は株によらず 17°C~20°C付近であったが、北極海やベーリング海など水温の低い高緯度海域で採取された株から低温耐性株を得ることに成功した。

アルケンはバイオマス燃料・原料としてのポテンシャルが高く、アルケンの代謝系との関連が考えられることからアルケンの定量分析・構造決定に着手した。アルケン生産株から C₃₁、C₃₃、C₃₇、C₃₈ アルケンを検出した。本研究では *Emiliana* と *Gephyrocapsa* 株から、C₂₉ アルケン（ノナコサジエンの二重結合位置異性体 3 種）を新規に検出した。

細胞内アルケン組成は株間で顕著に異なり、多くの株で C₃₁、C₃₃ アルケンが主であるが、C₃₇ と C₃₈ アルケンをかなりの割合で含む株もある。C₃₇、C₃₈ アルケンの二重結合はアルケノンと同じトランス型であり、アルケノンと極めて密接な関係にある。新規に検出した C₂₉ アルケン保有株は、得意な長鎖アルキル脂質組成を持つ株として、トランスクリプトーム解析の候補となる。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Tsuji, Y., Suzuki, I., Shiraiwa, Y., “Enzymological Evidence for the Function of a Plastid-located Pyruvate Carboxylase in the Haptophyte alga *Emiliana huxleyi*: a Novel Pathway for the Production of C₄ Compounds”, *Plant Cell Physiology* (DOI 10.1093/pcp/pcs045) (in press)