

「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24年度採択研究代表者

H25 年度 実績報告

石川 孝博

島根大学生物資源科学部
教授

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

§ 1. 研究実施体制

(1)「石川」グループ

- ① 研究代表者:石川 孝博 (島根大学生物資源科学部、教授)
- ② 研究項目
 - ・RNA-Seq によるユーグレナ発現遺伝子解析
 - ・包括的プロテオミクス解析
 - ・発現遺伝子情報によるユーグレナ有用遺伝子および内在性プロモーターの単離

(2)「田茂井」グループ

- ① 主たる共同研究者:田茂井 政宏 (近畿大学農学部、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ユーグレナ形質転換法の改善
 - ・光合成能強化ユーグレナの作出および解析

(2)「鈴木」グループ

- ① 主たる共同研究者:鈴木 健吾 (株式会社ユーグレナ、研究本部長)
- ② 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

§ 2. 研究実施の概要

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ディーゼル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) 生産能を持つ。本研究では、ユーグレナ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、生産コストに見合った有効なワックスエステル生産実用化への道筋を付けることを目的としている。プロジェクト 2 年目となる平成 25 年度は以下の研究を実施した。

オミクス解析による有用遺伝子の探索と機能解析に関して、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を進め、アッセンブルデータよりワックスエステル代謝に関連する酵素遺伝子情報を得た。このうち、嫌気条件下で脂肪酸合成に関与する *trans*-2-エノイル CoA 還元酵素やワックス合成酵素などいくつかの酵素遺伝子について、合成二本鎖 RNA 導入によるサイレンシング法により嫌気応答時の脂肪酸代謝との関連を評価した。さらに、嫌気条件の初期応答に関与する遺伝子情報を得るために、RNA-Seq データに基づき嫌気条件移行後 3 時間までの発現レベルを比較したところ、シグナル伝達や環状ヌクレオチドを含む核酸代謝に関連した遺伝子群が数多く発現応答していることが見出された。また嫌気応答時の脂肪酸代謝の場となるミトコンドリアに着目し、嫌気応答時の発現タンパク質情報も得るために、nanoLC-MS/MS によるプロテオミクス解析の予備実験を行った。

ユーグレナに形質転換した外来遺伝子をさらに安定的かつ高発現させるため、ユーグレナ内在性プロモーターの単離を試みた。RNA-Seq による遺伝子発現解析の結果を踏まえ、ユーグレナで恒常的に高発現しているグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素および β -チューブリン遺伝子のプロモーター領域の単離を行い、それぞれ開始コドンから上流の約 1.5~2.0 kbp の配列を明らかにすることが出来た。現在、これらのユーグレナ内在性プロモーターを用いた遺伝子導入プラスミドの構築が進行中である。また形質転換に関連して、ゲノムサイズの違いが形質転換効率にどのような影響を与えるか検討するため、(株)ユーグレナが保有する複数のユーグレナ株のゲノムサイズを測定した。その結果、現在使用している *Euglena gracilis* Z 株は 1.61Gb であり、その他の株では 0.63~8.88Gb の範囲でゲノムサイズに変動のあることが確認された。現在、形質転換の向上および脂質生産に適した株の選定を進めている。

前年度に引き続き、植物においてバイオマス増産に実績のあるラン藻由来 FBP/SBPase 遺伝子を、CaMV35S プロモーター制御下で導入したユーグレナ株 (EpFS 株) を新たに複数作出した。ゲノム DNA を用いた PCR およびウエスタンブロッティングにより FBP/SBPase 遺伝子の導入と FBP/SBPase タンパク質の発現を確認した。また、最も FBP/SBPase 活性の高かった EpFS4 株から葉緑体を単離し、組換え体 FBP/SBPase は葉緑体画分に発現していることを確認した。EpFS 株は、野生株と比較して細胞体積の増加が認められた。さらに EpFS4 株においては、光合成活性およびパラミロン量の増加傾向が認められた。

排気ガスを利用した高密度培養方法を検討するため、500L 以上の培養槽を用いてユーグレナの培養を行い、石炭火力発電所の排気ガスで実際に生育可能であることが確認できた。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)