

「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」

H26 年度
実績報告書

平成 22 年度採択研究代表者

岡田 茂

東京大学大学院農学生命科学研究科
准教授

微細緑藻 *Botryococcus braunii* の炭化水素生産・分泌機構の解明と制御

§ 1. 研究実施体制

(1)「東京大学大学院農学生命科学研究科」グループ

- ① 研究代表者: 岡田 茂 (東京大学大学院農学生命科学研究科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・*Botryococcus braunii* の遺伝子発現および物質生産の環境応答モニタリングシステムの確立

(2)「東京大学大学院薬学系研究科」グループ

- ① 主たる共同研究者: 阿部郁朗 (東京大学大学院薬学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・*Botryococcene* 合成酵素の機能解析およびその分子遺伝学的手法による合理的機能改変

(3)「奈良女子大学理学部」グループ

- ① 主たる共同研究者: 野口哲子 (奈良女子大学理学部生物学科、教授)
- ② 研究項目
 - ・*B. braunii* の炭化水素および関連物質の細胞内移行および分泌メカニズムの解明

§ 2. 研究実施の概要

微細藻 *Botryococcus braunii* は、バイオ燃料として有望な炭化水素を生産し、それらを細胞外に分泌・蓄積するという他藻類には見られない特徴をもつ。本藻種には生産する炭化水素のタイプが異なる A、B および L の 3 品種が存在する。この内 B 品種は、botryococcene およびスクアレンというテルペン系の炭化水素を生産する。Botryococcene は squalene synthase-like protein (SSL)-1 および SSL-3 という 2 つの酵素の組合せにより、またスクアレンは SSL-1 と SSL-2 の組合せ、あるいは *Botryococcus squalene synthase* (BSS) という単一の酵素の働きにより生合成される。本藻種がなぜ炭化水素を生産するのかを理解するため、これらテルペン系炭化水素の生合成酵素遺伝子の発現に影響を及ぼす環境要因の特定を試みた。また、大量の炭化水素生産を支えている、前駆体供給に関与する酵素類の特定を行い、それらの機能を明らかにした。一方、本藻種により生産されるスクアレンは、燃料として使用可能な液状炭化水素として存在するだけでなく、エポキシ化されることにより、細胞膜の構成成分であるステロールへと代謝される他、細胞間を繋ぎ止めているバイオポリマー等の二次代謝産物へも変換される。したがって、スクアレンのエポキシ化は、本藻種からの燃料油の収量に影響を及ぼし得る、重要なステップであると考えられる。そこで、スクアレンのエポキシ化に関与する酵素遺伝子の取得を試みたところ、本藻種には酵素活性を有する複数種のスクアレンのエポキシ化酵素が存在するという、他藻類には見られないユニークな性質を有している事が初めて明らかになった (Uchida *et al.*, 2015)。

ところで、SSL-1 および SSL-3 により生成する botryococcene は、そのままでは重油相当の油であり、内燃機関に使用するには軽質化が必要とされる。また、上記酵素による反応は比較的効率が悪い。そこで X 線結晶構造解析により、SSL-1 および SSL-3 の構造を明らかにし、その酵素反応の理解に基づいて触媒機能を改良することが望まれる。上記酵素の X 線結晶構造解析を行うために必要な、良質の結晶の作製法を種々検討した。その結果、SSL-1~3 の N 末端および C 末端にあるアミノ酸残基をある程度欠失させることで、酵素活性を保有しつつも、可溶性および安定性が向上したリコンビナントタンパク質を生産することに成功した。これにより従来に比べて大量のリコンビナントタンパク質を精製することが可能になった。また、上記タンパク質表面に存在するアミノ酸残基に由来する電荷の偏在が、結晶化を困難にしていることが予測されたことから、当該アミノ酸を電氣的に中性なアミノ酸に置換した変異リコンビナントタンパク質を作製し、結晶化を試みている。

B. braunii が細胞内のどこで炭化水素合成を開始し、合成した炭化水素をどのように細胞表面まで輸送し、どこから分泌するのか、また、この現象が細胞周期のどの時期に起こるのか、さらには細胞外に分泌された炭化水素が *B. braunii* にとってどのような役割をもっているのかを明らかにすることは、基礎科学上のみならず、バイオ燃料としての炭化水素を、効率良く回収する方法を確立する上でも重要である。本藻種では細胞内リポッドボディの消長と細胞外炭化水素の蓄積が連動していることから、陸上高等植物におけるクチクラワックス分泌経路(葉緑体→小胞体(ER) →細胞膜)とは異なり、葉緑体で合成された前駆体が成熟しながら ER→リポッドボディ→ER→細胞膜の経路で輸送・分泌されるものと推定した。この分泌経路を明らかにするため、本年度は、厚さ 80nm の連続切片(約 100 枚/細胞)による細胞内の立体構築を開始した。現在までに、分裂していない

細胞、脂質蓄積期、細胞分裂後のリピッドボディ増大期の細胞の連続切片を写真撮影し、小胞体を中心とした細胞内オルガネラの立体構築を進めている。また、細胞内のどこで *botryococcene* が生産されているかを明らかにするために、昨年度作製した SSL-3 のモノクローナル抗体を精製し、免疫電子顕微鏡法での抗原抗体反応条件を検討している。一方、本藻種の個々の細胞は、細胞頭頂部を外側に向けて群体を形成している。その細胞頭頂部は外界に露出しているのでは無く、コロニーシースと呼ばれる繊維構造物に覆われていることが近年明らかになった。そこでこの部位につき詳細な解析を行ったところ、このコロニーシースは細胞頭頂部から伸びる繊維群で構成され、各繊維は銀メテナミン反応に陽性であり、多糖を含むことが判った。更に、コロニーシースの形成過程、及び、コロニーシースを構成する多糖は、細胞側底部からの脂質分泌に同調して細胞頭頂から分泌されることを明らかにした (Uno *et al.*, 2015)。

【主要論文】

- H. Uchida, K. Sumimoto, V. M. E. Ferriols, K. Imou, K. Saga, K. Furuhashi, S. Matsunaga, S. Okada, “Isolation and characterization of two squalene epoxidase genes from *Botryococcus braunii*, race B.”, *PLOS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0122649 (2015).
- Y. Uno, I. Nishii, S. Kagiwada, T. Noguchi, “Colony sheath formation is accompanied by shell formation and release in the green alga *Botryococcus braunii* (race B).”, *Algal Research*, **8**, 214-223 (2015).