

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「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」  
研究課題「微細緑藻 *Botryococcus braunii* の炭化  
水素生産・分泌機構の解明と制御」

## 研究終了報告書

研究期間 平成23年4月～平成28年3月

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)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

*Botryococcus braunii* が「なぜ」、「どの様」に炭化水素を生合成し、「どの様」に細胞外へと分泌するかを明らかにすることにより、本藻種由来のテルペン系炭化水素の実用化を可能にすべく、本藻種に関する基礎科学的知見を得ることを目的とした。また、上記目的の達成、および炭化水素生産の高効率化に向けた新藻株の作出を可能にする、*B. braunii* への遺伝子導入法の確立を目指した。まず、「なぜ」本藻種がトリテルペン系炭化水素を生産するのかを明らかにするために、テルペンの生合成、および代謝に関与する酵素遺伝子類の同定、およびそれらの遺伝子の特定条件下における発現解析を行うとともに、生産する化合物につき解析を行った。本藻種のトリテルペン系炭化水素である botryococcene は、squalene synthase-like protein (SSL)-1 および SSL-3 という 2 種類の酵素の組合せにより生成する。SSL-1 および SSL-3 について、転写あるいは翻訳レベルでの動態が、藻体の生理状態等により、どの様に変化するかをモニタリングする方法を確立した。また、本藻種による大量のトリテルペン生産が、どの様に支えられているかを明らかにすべく、テルペン前駆体供給経路である、methylerythritol phosphate (MEP) 経路における全酵素の cDNA クローニングを行い、それらの諸性状を明らかにした。さらに、トリテルペン系炭化水素生合成の直接の基質である、ファルネシル二リン酸の代替生合成経路に関する知見を得た。これに加え、本藻種には炭化水素の構成成分であるスクアレンにエポキシ基を導入し、酸化的に代謝する酵素が複数存在する事を明らかにした(岡田グループ)。本藻種が「どの様」に炭化水素を生産するかを明らかにすべく、結晶構造解析に基づく反応メカニズムの解明を試みた。また、酵素機能改変を目的として、ホモロジーモデルに基づく部位特異的変異に加え、進化分子工学の手法を用いた各種ランダム変異酵素を作製し、これら変異酵素の精密機能解析を行うことで、炭化水素生成反応に必要なアミノ酸残基の特定を行った(阿部グループ)。本藻種は炭化水素、および炭化水素関連化合物を細胞外に分泌するという、他藻類には見られない特徴を有する。「どの様」に分泌するかを明らかにするため、オイルボディの消長に関する蛍光顕微鏡による観察、および本藻種の特性に適した固定法により調製した試料を用いた電子顕微鏡観察により、細胞周期における炭化水素生産・分泌の時期と、それに伴う細胞内微小構造の変化に関する新知見を得た。また、本藻種の群体の外周に存在する、コロニーシースと呼ばれる繊維状の構造体の生成と、細胞分裂および炭化水素分泌との関連を明らかにした(野口グループ)。外来遺伝子の導入を行う際、本藻種は群体を形成している細胞外マトリクスや、そこに蓄積される大量の炭化水素が障壁となっている可能性が考えられた。そこで、外来遺伝子の導入を可能にするため、本藻種から単細胞およびプロトプラストを調製する方法を開発した。さらに、本藻種に特異的、かつ強力な内在性プロモーターを取得し、パーティクルガン法を始めとする種々の手法により、外来遺伝子の導入法を検討した。また、培養の容易な他種微細藻へ本藻種の炭化水素生合成遺伝子の導入を行い、トリテルペン系炭化水素合成酵素遺伝子を発現する形質転換体を得た(大濱グループ)。

### (2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

#### 1.

概要: 本藻種の炭化水素前駆体の生合成経路である、MEP 経路酵素における全酵素の cDNA クローニングを行い、それらの発現解析を行った。その結果、本藻種の MEP 経路は、他の単細胞性微細藻類では1種しか存在しない 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) のアイソザイムが3種も存在し、同時に発現する等、他生物には見られないユニークなものであることを明らかにした。本成果の一部は *Plant Science* 誌(発表原著論文1)に掲載された。

高等植物等において、DXS はテルペン類の最終収量を左右する鍵酵素であるとの知見がある。したがって将来的に *B. braunii* への遺伝子導入が可能になった場合、3種 DXS 遺伝子の発現レベルをチューニングする事により、炭化水素生産と増殖速度を制御した、効率の良い

本藻種の培養が可能になると考えられる。

## 2.

概要: 電子顕微鏡による本藻種の炭化水素分泌の詳細な観察は、多量の炭化水素に阻まれ困難であったが、高圧急速凍結固定法を用いることで、本藻種の A, B 品種共に、脂質合成は葉緑体で開始され、小胞体・オイルボディを経て、細胞分裂後の娘細胞壁形成後・母細胞壁崩壊前に細胞側底部から脂質を分泌・蓄積することを明らかにすることができた。本成果の一部は *Eukaryotic Cell* 誌(発表原著論文3)および *PLOS ONE* 誌(発表原著論文4)に掲載された。

本藻種の炭化水素分泌メカニズムが、分子レベルで明らかになれば、遺伝子工学的手法を用いることで、細胞内に有用な脂溶性物質を蓄積する多種藻類に対しても、同様の分泌機能を付与し得る可能性がある。本成果により、炭化水素生合成酵素の局在箇所や、分泌に関与する遺伝子の発現時期を特定するための情報を得る事ができた。

## 3.

概要: *Botryococcus braunii* B 品種の群体表面は、コロニーシースと呼ばれる繊維状構造物に覆われており、それが主として多糖で構成され、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という形成過程を、電子顕微鏡観察により明らかにすることが出来た。本成果の一部は *Algal Research* 誌(発表原著論文8)に掲載された。

本藻種は他の単細胞性微細藻類と異なり、細胞外マトリクスにより個々の細胞が繋ぎ止められ、群体を形成するという特徴がある。この特徴のため、本藻種への外来遺伝子の導入が難しくなっているものと考えられる。本成果により群体の詳細構造に関する知見が得られたことで、形質転換を行う際の戦略の選択肢を広げる事ができた。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

## 1.

概要: 本藻種の個々の細胞は細胞外マトリクスと呼ばれる炭化水素に富んだポリマーに埋もれて群体を形成しており、それが外来遺伝子の導入を阻んでいると考えられる。単細胞化およびプロトプラスト化技術の取得や、選択マーカーの選定等、本藻種への遺伝子導入に必要な基盤技術を確認した。また、従来よりも低いガス圧の加速で、微細藻類への遺伝子導入を可能にするチタン製のパーティクルガン用担体の開発も行った。これらの成果は本藻のみならず、他微細藻への外来遺伝子の導入にも資する知見であり、その一部は *Phycological Research* 誌(発表原著論文2)、および *Protoplasma* 誌(発表原著論文5)に掲載され、国際特許を2件(PCT/JP2012/51884 および PCT/JP2012/53300)出願した。

微細藻へ外来遺伝子を導入する際は、細胞へのダメージを低減することが好ましい。例えば同じトレボクシア藻綱に属する *Pseudochoricystis ellipsoidea* では、より粒径の小さなパーティクルガン用担体の使用が、形質転換効率を高めたとの報告がある。したがって本成果により、低いガス圧での遺伝子導入を可能にする担体の開発、および細胞内へ外来遺伝子を導入し易くする単細胞化、プロトプラスト化技術が開発されたことで、本藻種の形質転換の可能性を高めたと考えられる。

## 2.

概要: Botryococcene およびスクアレン両者の生合成に関与する squalene synthase-like protein 1 (SSL-1) につき、結晶構造が明らかになっているヒト由来スクアレン合成酵素のホモロジーモデルとの比較や、error prone PCR (EP-PCR) 法等により、酵素反応に重要なアミノ酸残基を特定することが出来た。本成果は *B. braunii* の炭化水素生合成メカニズムの解明のみならず、スクアレン合成酵素様タンパク質に関する普遍的な知見として、新規医薬品開発等にも重要である。

本 CREST 課題の目標の一つである、燃料としてより使いやすい炭化水素を生産する酵素の

開発には、反応に関与する重要なアミノ酸残基の特定は欠かせない。その意味で本成果は、結晶構造の得られていないSSL-1タンパク質の反応機構を理解する上で、非常に大きな進歩であった。しかし誠に残念なことに、ほぼ同様の研究成果を米国ケンタッキー大学 Chappell 教授グループにより発表されてしまった (*Biochemistry*, **53**, 7570-7581, 2014)。そのため論文発表については、X 線結晶構造解析による、より詳細な反応機構に関するデータを待つて行う事とした。

### 3.

概要: *Botryococcus braunii* が他の微細藻類とは異なり、スクアレンエポキシダーゼのアイソザイム遺伝子が複数有することを世界に先駆けて明らかにした。これらの内の 2 種の酵素遺伝子を、酵母のスクアレンモノオキシゲナーゼ欠損酵母変異株へと導入したところ、同変異株のステロール要求性を解除したことから、当該遺伝子がスクアレンモノオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしていることが示された。本成果の一部は *PLOS ONE* 誌(発表原著論文9)に掲載された。

本藻種においてスクアレンは、エポキシ化により燃料としては使いにくい種々の化合物へと代謝されてしまう。将来的に本藻種における遺伝子発現レベルを調節する事が可能になれば、スクアレンエポキシダーゼの働きを抑える事により、燃料として使える炭化水素の収量増加が期待出来るため、当該酵素遺伝子の特定は基礎科学のみならず、応用面でも意義深いと考えられる。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ①「岡田 茂」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
岡田 茂	東京大学大学院農学生命科学研究科	准教授	H23.4～
松永 茂樹	同上	教授	H23.4～
高田 健太郎	同上	助教	H23.4～
Holger Jenke-Kodama	沖縄科学技術大学院大学	准教授	H23.4～
内田 英伸	東京大学大学院農学生命科学研究科	特任准教授	H23.4～
福永 有佑	同上	大学院生 (M2)	H23.4～H24.3
住本 惟光	同上	大学院生 (D2)	H24.4～H26.1
岡田 峻	同上	大学院生 (M2)	H23.4～H25.3
三村 桂詩	同上	大学院生 (M2)	H25.4～H27.3
柳沼 諒子	同上	研究補助員	H23.10～H24.3 H26.3～
方波見 彰仁	同上	博士研究員	H26.10～
沖 友香	同上	研究補助員	H26.4～H27.3
鄒 仲堯	同上	大学院生 (D2)	H26.4～
David Adrianus Tanzil	同上	大学院生 (M2)	H26.4～
中村浩正	同上	大学院生 (M1)	H27.4～

##### 研究項目

- ・異なる成長段階の藻体における炭化水素生合成系遺伝子の発現および体構成成分変化のモニタリング
- ・環境条件の変化が炭化水素生合成関連遺伝子へ与える影響のモニタリング
- ・環境依存性の炭化水素生合成関連遺伝子の発現メカニズム解明
- ・遺伝子発現および物質生産状況から見た最適培養条件の確立
- ・*Botryococcus* への外来遺伝子導入法の検討(平成 26 年度より)

#### ②「阿部郁朗」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
阿部 郁朗	東京大学大学院薬学系研究科	教授	H23.4～
脇本 敏幸	北海道大学大学院薬学系研究院	教授	H23.4～
岡田 正弘	東京大学大学院薬学系研究科	准教授	H27.4～
森田 洋行	富山大学和漢薬研究所	教授	H23.4～
淡川 孝義	東京大学大学院薬学系研究科	助教	H23.4～
楊 登峰	同上	D3	H25.4～

Xu Tao	同上	M2	H24.2～H24.6
森 貴裕	同上	助教	H23.4～
孫 潔胤	同上	D3	H23.4～H24.9
木村 篤人	同上	M2	H23.4～H25.3
陳 菡菁	同上	M2	H24.10～
Jon Freeman	同上	研究員	H24.1～H24.8
秦 斌	同上	研究員	H25.10～H26.3
江上 蓉子	北海道大学大学院薬学系研究院	助教	H23.4～
李 暢	東京大学大学院薬学系研究科	特任研究員	H27.4～
松田 侑大	同上	助教	H24.10～
塚原 文乃	同上	研究補助員	H23.4～H24.3
馬場 友華子	同上	研究補助員	H24.4～

#### 研究項目

- ・Botryococcene 合成酵素、スクアレン合成酵素のX線結晶構造解析
- ・結晶構造に基づく酵素構造機能相関と炭化水素生産機構の解明
- ・結晶構造に基づく合理的な酵素触媒機能の制御
- ・高効率テルペン生産系の構築
- ・ランダム変異導入による SSL 酵素の分子進化

#### ③「野口哲子」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
野口 哲子	奈良女子大学理学部生物学科	教授	H23.4～
鍵和田 聡	同上	准教授	H23.4～
西井 一郎	同上	准教授	H23.4～
鈴木 玲子	同上	研究員	H24.4～
森田 佳代子	同上	研究補助員	H24.5～H26.3
宇野 由紀	奈良女子大学大学院人間文化研究科	M2	H24.7～H26.9
三井 菜々香	同上	M2	H25.4～H27.3

#### 研究項目

- ・炭化水素合成開始部位: Botryococcene 合成酵素存在部位の同定
- ・炭化水素輸送経路: *Botryococcus* B 品種の電子顕微鏡による微細構造の解析
- ・炭化水素分泌部位: 炭化水素生成の誘導系を用いた原形質膜上の脂質トランスポーターの細胞学的特徴づけ

#### ④「大濱 武」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
大濱 武	高知工科大学環境理工学群	教授	H23.4～H 26.3
山崎 朋人	同上	助教	H23.8～H26.3
朴 炫宣	同上	助教	H23.5～H24.3

Hou Liyuan	同上	D3	H23.10～H 26.3
Kong Fantao	同上	D3	H23.10～H 26.3
正岡 祥吾	同上	M2	H23.4～H 24.3
田村 友紀	同上	M2	H23.4～H 24.3
土居巧弥	同上	M2	H23.4～H 24.3
Resnanti Handayani	同上	D1	H24.10～H 26.3
高橋英之	同上	助教	H25.3～H 26.3
別所義隆	理研 SPring-8 総合研究 センター	チームリーダー	H23.4～H 24.3

#### 研究項目

- ・*Botryococcus* の核ゲノムおよび葉緑体ゲノムへの遺伝子導入法の確立
- ・RNAi 系による発現抑制技術の開発と効果の検証
- ・*Chlamydomonas* 等を利用した *B. braunii* 遺伝子の機能推定

#### (2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

平成 25 年度国際化強化支援等を通じて米国 Texas A&M 大学の Devarenne 博士の研究グループと、*Botryococcus braunii* L 品種の炭化水素合成メカニズムの解明や、本藻種の群体構造の形成に関する共同研究を継続中。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻芋生憲司教授グループと、*B. braunii* からの炭化水素回収技術の開発研究を通じ、本藻種の群体構造に関する共同研究を展開。

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 *B. 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 (東京大学大学院農学生命科学研究科 岡田グループ)

##### 3.1.1 *Botryococcus braunii* のトリテルペン合成酵素遺伝子の発現モニタリング

###### (1) 研究実施内容及び成果

*B. braunii* が生産するトリテルペン系炭化水素の内、botryococcene は squalene synthase-like protein (SSL)-1 と SSL-3 の組合せにより生成するのに対し、squalene は SSL-1 と SSL-2 の組合せ、あるいは *Botryococcus squalene synthase* (BSS) 単体による 2 通りの生成経路により生成する (図1)。

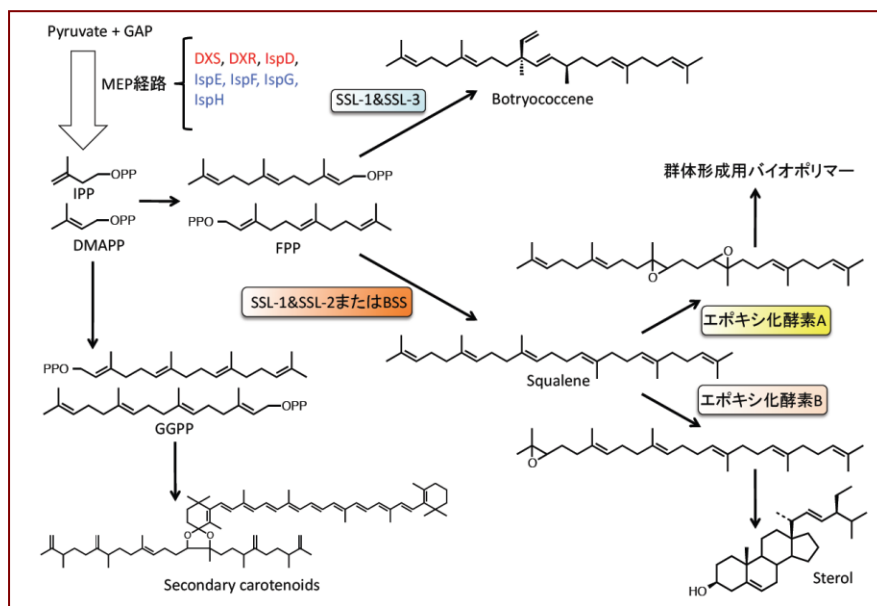


図1. *B. braunii* B 品種における炭化水素関連化合物の生合成および代謝

まず、これらのトリテルペン系炭化水素の生合成に関わる酵素遺伝子の発現が、どの様に制御されているかを知るために、それぞれに特異的なプライマーを設計し、定量的リアルタイム PCR により、増殖段階の異なる藻体について mRNA の蓄積量を調べた。その結果、SSL-1、2 および 3 遺伝子ともに、活発に細胞分裂を行っている時期の藻体において mRNA の蓄積レベルが高く、botryococcene 合成活性が高い時期と一致していることが分かった。一方 BSS は培養期間を通じて一定レベルの mRNA が蓄積していた。また、タンパク質レベルでのトリテルペン系炭化水素生合成の制御状況を調べるため、SSL-1~3 それぞれに特異的な抗体を作製した。これらの抗体を用いて、増殖段階の異なる藻体について各タンパク質の存在量を調べたところ、SSL-1~3 のいずれにおいても、mRNA の蓄積レベルがさほど高く無い時期の藻体でも、比較的高レベルのタンパク質の蓄積が認められた。したがって、本藻種におけるトリテルペンの生合成は転写のみでは無く、翻訳あるいは翻訳後調節により、制御されている可能性がある事が明らかになった。

一般に、本藻種の増殖速度と炭化水素含量との間には、トレードオフの関係があると言われている。したがって、どのような外部シグナル情報により、SSL-1~3 遺伝子の転写調節が行われているかを知ることは、培養条件の工夫により、本藻種の増殖および炭化水素生合成の両者を制御し、それにより効率の良い炭化水素生産への道を拓く可能性がある。そのためには SSL-1~3 遺伝子の転写調節領域を取得し、それらをレポーター遺伝子と共に本藻種に導入することで、外部シグ



ナルに対する応答を観察することが必要である。現時点では本藻種での外来遺伝子発現法は確立されていないが、それに先んじて SSL-1~3 遺伝子の転写調節領域の取得を試みた。まず、米国 Joint Genome Institute にて行われた、本藻種 Showa 株のゲノム DNA 解析により得られたデータにつき、Newbler を用いてアセンブリングを行った。得られたゲノムドラフト配列中、SSL-1~3 の上流域に相当する部位の塩基配列情報を基に特異的プライマーを作製し、当該領域を PCR により増幅することを試みた。その結果、SSL-2 および 3 については、予想されたものと同サイズ（それぞれ 1.9kb および 1.8kb）の PCR 産物が得られたが、SSL-1 については予想されたサイズの PCR 産物の増幅が見られなかった。これは本藻種のゲノムには繰り返し配列等が多くあるため、Newbler によるアセンブリングに問題があったものと考えられる。そこで SSL-1 については Restriction Enzyme Site-Directed Amplification (RESDA)-PCR により、上流域の取得を試みた。その結果、SSL-1 についても、翻訳開始点から 853 残基遡った領域まで取得することができた。各 SSL 遺伝子につき、更に上流域が取得できる様、米国 Clemson 大学に委託し、本藻種 Showa 株のフォスミドライブラリーを作製した。これにより十分な長さを有する転写調節領域を、取得していく予定である。

トリグリセリドを蓄積する他種微細藻類では、培地中の窒素欠乏等により増殖が阻害されると、脂質の蓄積を開始することが知られている。一方、*B. braunii* が生産するトリテルペン系炭化水素の内、主要成分である botryococcene 類は、細胞が活発に増殖している時に生産され、窒素欠乏状態では生産が抑制されることが、既往研究から知られている。上記リアルタイム PCR による SSL-1 および 3 の mRNA 蓄積量も、その事を支持している。今までに *B. braunii* の増殖を劇的に早め、結果として炭化水素の生産性を高める培養条件としては、炭酸ガスの通気培養が知られているのみである。そこで botryococcene 生合成を活性化させる、新たな環境要因の探索を、SSL-1 および 3 遺伝子の発現レベルを指標にして行った。一例として、乾燥ストレスが botryococcene の生合成にどの様に影響を及ぼすかを調べた。その結果、寒天培地上における乾燥ストレス条件下において、SSL-1 および SSL-3 の mRNA 蓄積量は、液体培地を用いた対象区に比べて低下する傾向が見られた。

この各種環境条件が本藻種の炭化水素生産に及ぼす影響を検討していく過程で、高等植物に対し成長ホルモン様活性を示すある化合物が、*B. braunii* の藻体バイオマス、およびカロテノイド含量を増加させることが観察された。この現象に着目し、詳細な解析を行った。本化合物は、静置培養時には藻体を培地表面に浮上させ、藻体バイオマス収量を高めたが、通気攪拌培養条件下では、その影響は無添加の対象区と比較して顕著では無くなった。このことから、当該化合物による藻体バイオマスの増加は、浮上による受光量の増加、あるいは空気中の炭酸ガスへの曝露量の増加に由来するものと考えられた。当該化合物がなぜ本藻種を浮上させるか、そのメカニズムについては検討中である。一方、炭化水素含量は、当該化合物の添加により若干低下した。しかしながら、いかなる培養条件下においても本化合物は、細胞外二次カロテノイド含量を顕著に増加させた。したがって本化合物は、*B. braunii* におけるイソプレノ単位を、トリテルペン生合成から、テトラテルペン生合成に振り分けている可能性がある。ただし、当該化合物の添加により増加する細胞外二次カロテノイド類には、エキネノン等の C<sub>40</sub> カロテノイドのみならず、テトラメチルスクアレンエポキシドを部分構造として有している、botryoxanthin や braunioxanthin も含まれていることから、トリテルペン類の生合成自体にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後、本化合物の存在下における、トランスクリプトーム解析により、テルペン生合成関連遺伝子群の網羅的発現解析を計画している。

一連の研究により、*B. braunii* B 品種における、トリテルペン系炭化水素生合成の制御に関わる基礎的知見を得ることが出来た。得られた知見の大部分は、すぐさま本藻種の大量培養による燃料油生産に結びつく物では無いが、将来的に本藻種の分子育種を進めていく上で、非常に有益なものであると考えられる。

### 3. 1. 2 *Botryococcus braunii* のテルペン生合成前駆体供給メカニズムの解明

#### (1) 研究実施内容及び成果

*B. braunii* が生産するトリテルペン類の直接の前駆体であるファルネシル二リン酸は、全テルペ

ン共通の前駆体であるイソペンテニル二リン酸 (IPP)、およびジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) から生合成される。この 2 種の全テルペン共通の前駆体は、本藻種ではメバロン酸経路では無く、メチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路のみにより供給される。従って本藻種の MEP 経路は、大量のトリテルペン生産を支え得るユニークなものであることが予測された。また、将来的に本藻種の MEP 経路の機能を人為的に制御できる様になれば、燃料油としてのトリテルペン類生産を制御し得る可能性も考えられた。そこで *B. braunii* B 品種の MEP 経路の特徴を明らかにすべく、本経路における全酵素の cDNA クローンを取得した。その内、MEP 経路の初発反応を触媒する酵素である、1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) は、高等植物では複数のアイソザイムが存在し、それらの発現部位や発現時期が異なることが知られている。一方、ゲノム情報が得られている全ての微細藻類において、DXS はただ一種しか存在しないことが知られている。それに対し、*B. braunii* の B 品種では、単細胞性微細藻であるにも関わらず、DXS のアイソザイムが 3 種類存在することを明らかにした (発表原著論文1)。この事は複数の DXS の存在が、本藻種における大量のトリテルペン生産を支えている可能性を示している。また、大腸菌で生産した、これら 3 種 DXS のリコンビナントタンパク質の諸性状を調べたところ、互いに良く似ていたが、温度感受性については差が認められた (図2)。すなわち、DXS-1 タンパク質が高温域で速やかに活性を失うのに対し、DXS-3 は 50°C でも比較的高い活性を保持していた。本藻種はミジンコの培養タンクや、温室のユリの水耕栽培タンクから、新しい株が単離されたこともあり、川や湖から隔離された、微小な環境でも生育出来ることが知られている。それらの微小環境では、夏期等に水温が急変する可能性があり、厳しい温度条件下においてもテルペン類の生産を可能にし続けるために、温度感受性の異なる 3 種の DXS を有している可能性が考えられた。また 3 種 DXS 遺伝子の mRNA 蓄積量は、SSL-1~3 同様、細胞分裂が活発で botryococcene 合成活性の高い時期に高くなっていた。

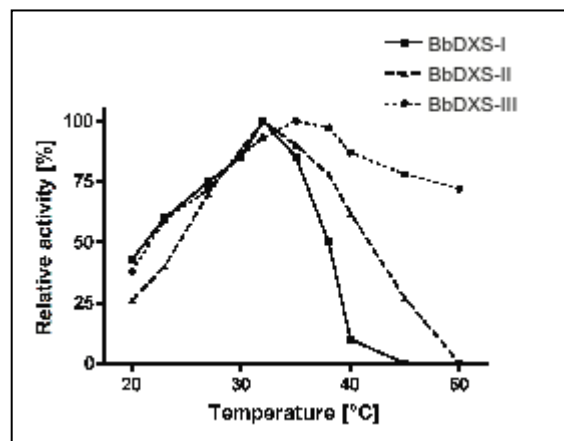


図2. *B. braunii* 由来3種 DXS リコンビナントタンパク質の温度感受性

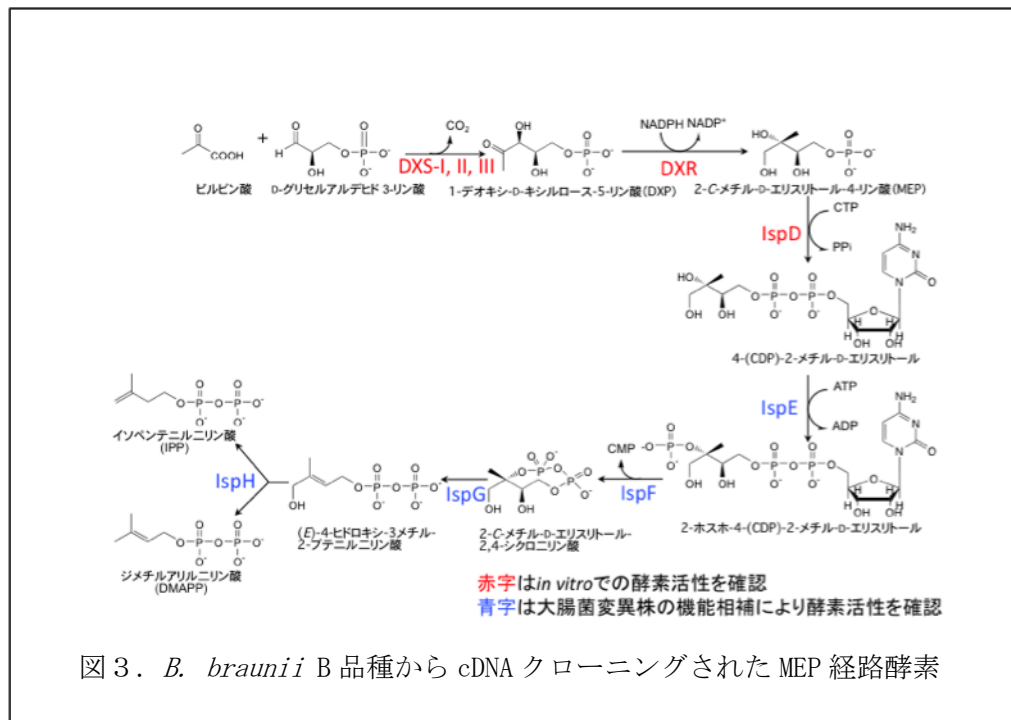
高等植物等においては、MEP 経路の 2 段階目の反応を触媒する、1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) が、各種テルペン類の収量を制御する鍵酵素と考えられている。本藻種の DXR は DXS とは異なり、1 種類しか存在が確認されなかった。当該酵素につき大腸菌で生産したリコンビナントタンパク質を用いて、酵素学的諸性状を明らかにした。

次に MEP 経路における 7 段階の各反応を司る酵素遺伝子につき、リアルタイム PCR により培養期間中の発現解析を行った。その結果、MEP 経路の 3 段階目の反応を司る 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (IspD) のみが、他の酵素と異なる発現パターンを示した。本酵素は他生物において、テルペン類の収量を制御する鍵酵素であるとの報告例は無いが、本藻種において IspD は、他の MEP 経路酵素とは異なる発現調節を受けている可能性が考えられたため、その酵素学的特徴を明らかにすることとした。本藻種において IspD も DXR 同様に、1 種類のみが存在が確認された。大腸菌で生産したリコンビナントタンパク質を用いて、酵素活性の測定を行ったところ、当該遺伝子は活性を有する IspD をコードしていることが明ら

かになった。

MEP 経路の最終段階において、全てのテルペン類共通の前駆体である、IPP と DMAPP を生成する (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate reductase (IspH) も、テルペン類の収量を左右し得る鍵酵素である可能性があるため、本藻種由来の IspH の特徴を調べた。本酵素は嫌気性の酵素で、酸素存在下で速やかに失活するため、*in vitro*での機能同定が難しい。そこで、大腸菌の IspH 遺伝子欠損変異株に導入することで、機能相補するかどうかを調べた。その結果、得られた cDNA クローンは、当該大腸菌 *ispH* 欠損株の生育を回復したことから、得られた cDNA クローンは、本藻種における IspH 遺伝子であることが示された。また、前述の本藻種ゲノム DNA のフォスミドライブラリーを用いて、当該 *ispH* 遺伝子のゲノミッククローンを単離し、そのエクソン-イントロン構造を明らかにすることができた。

本プロジェクトにおいて cDNA クローニングが終了した、MEP 経路の 7 段階の反応に関与する酵素遺伝子の内、4-diphosphocytidyl-2-*C*-methyl-D-erythritol kinase (IspE)、2-*C*-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF)、および 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate synthase (IspG) についても、大腸菌の当該遺伝子欠損株に本藻種由来の遺伝子を導入し、選択培地上で生育するかにより、その酵素活性の確認を行った。



本藻種が生産するトリテルペン系炭化水素である、botryococcene および squalene 生合成の直接的な基質は、farnesyl pyrophosphate (FPP) である。通常 FPP は、FPP synthase (FPPS) により生合成されていることが知られている。一方、高等植物では farnesol を順次リン酸化することで、最終的に FPP を生成する farnesol kinase による、代替 FPP 生合成経路の存在が知られている (図 4)。本藻種でも farnesol を培地に添加することで、farnesol 由来の botryococcene および squalene が生成することが、放射性同位体等を用いた既往研究から知られており、高等植物同様に、FPPS に依存しない代替 FPP 生合成経路が存在する事が予測された。そこで、この代替 FPP 生合成に関与する酵素遺伝子の取得を試みた。当該酵素の候補として、phytol kinase と相同性を示すタンパク質の全長 cDNA 配列を PCR により取得した。当該 cDNA は 314 残基のアミノ酸をコードしており、N 末端側には葉緑体移行シグナルペプチドと推定されるアミノ酸配列が存在していた。現在、当該リコンビナントタンパク質を用いて、その機能解析を行っている。

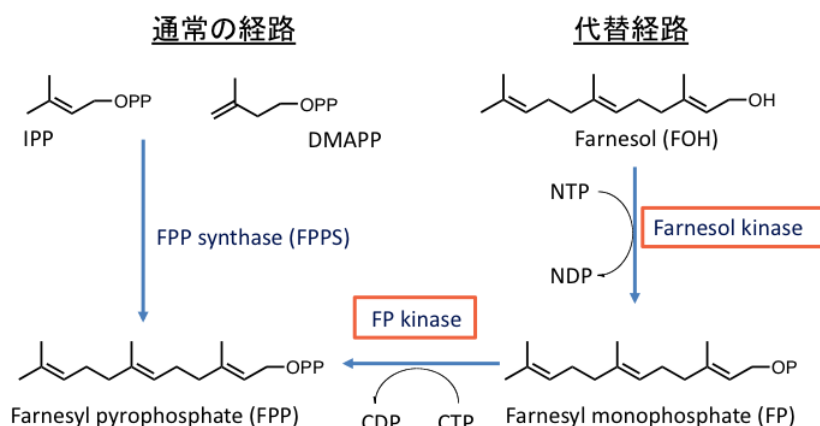


図4. *B. braunii* B 品種における2種類のFPP合成経路

### 3. 1. 3 *Botryococcus braunii* のトリテルペン代謝メカニズムの解明

#### (1) 研究実施内容及び成果

*B. braunii* のB 品種が生産するトリテルペンには、botryococcene と squalene の2種類がある。Botryococcene が遊離の炭化水素として大量に蓄積されるのに対し、squalene は炭化水素としては微量成分に留まり、むしろエポキシ化されてステロールの他、様々な二次代謝産物へと変換されるという違いがある。また、squalene 分子へのエポキシ基の導入部位にも2通りが存在し、ステロール等の一次代謝物の生成時には、squalene 分子の2, 3位の炭素にエポキシ基が導入されるのに対し、二次代謝産物の生成時には、10, 11位がエポキシ化されるという違いも見られる。そこで本藻における squalene 代謝を理解するため、Showa 株から squalene epoxidase-like protein (SEL) 遺伝子を探索した。その結果、本藻種には4種の SEL 遺伝子が発現していることが、トランスクリプトーム解析から明らかになった。これら4種の SEL アイソザイム遺伝子の内、2つ (*BbSQE-I* および *II*) が、酵母のスクアレンエポキシダーゼ欠損変異株における、エルゴステロール要求性を解除したことから、当該遺伝子がコードする酵素は、スクアレンの2, 3位をエポキシ化することが明らかになった(図5、発表原著論文9)。また、*SQE-I* の転写レベルは、培養期間を通じてほぼ一定であるのに対し、*SQE-III* は培養期間の後期、すなわち定常期になると転写レベルが上昇した(図6)。

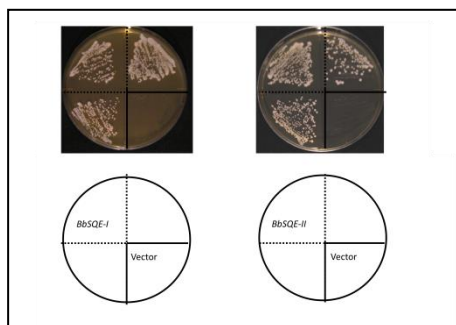


図5. *BbSQE-I* および *II* による酵母の機能相補

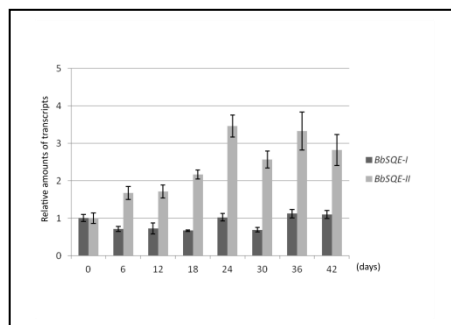


図6. *BbSQE-I* および *II* の培養期間中の発現

このことから、両スクアレンエポキシダーゼは、本藻種において異なる機能を有している可能性が示された。本成果は、微細藻において活性を有するスクアレン2, 3エポキシダーゼが、複数存在することを示した初めての例である。本藻種において発現している残り2種の SEL 遺伝子が、スクアレンの10, 11位のエポキシ化に関与する酵素をコードしている可能性があり、引き続き検証を行っ

ている。これに関連し、SEL タンパク質の機能同定を *in vitro* のアッセイ系で行う際に必要な、NADPH-P450 還元酵素遺伝子の cDNA クローニングを終了し、活性を有するリコンビナントタンパク質を取得している。また、botryococcene あるいは squalene を過剰蓄積する酵母の変異株が、奈良女子大野口グループの鍵和田、および東京大学阿部グループの淡川らにより作製されている。これらを用いての *in vivo* アッセイによる、上記 SEL タンパク質の機能同定も進行中である。

*B. braunii* は光合成で固定した炭素の大部分を、炭化水素およびバイオポリマーからなる不溶性画分へと変換することが既往研究により知られている。この不溶性画分には、10, 11位がエポキシ化された squalene が構成成分として含まれている。したがって、10, 11位エポキシ化酵素遺伝子を同定し、その発現を抑制することができれば、燃料油として利用可能な遊離の squalene の回収量を高めることが期待できる。

### 3. 1. 4 *Botryococcus braunii* L 品種におけるテトラテルペン生合成メカニズムの解明

#### (1) 研究実施内容及び成果

米国 Texas A&M 大学の Devarenne 博士の研究グループと、*Botryococcus braunii* L 品種の炭化水素生合成メカニズムの解明に関する共同研究を行った。その結果、L 品種が生産する炭素数 40 の炭化水素である lycopadiene は、従来考えられていた様に、フィチルニリン酸 (phytyl pyrophosphate) が 2 分子縮合して直接生成するのでは無く、リコパオクタエン (lycopaoctaene) 合成酵素により、ゲラニルゲラニルニリン酸 (geranylgeranyl pyrophosphate=GGPP) が 2 分子縮合することで、リコパオクタエン (lycopaoctaene) という中間体がまず生成し、それが順次還元されて最終的に、lycopadiene へと変換されることを明らかにすることができた(図7、発表原著論文11)。また、lycopaoctaene 合成酵素は、炭素数 20 の GGPP のみならず、炭素数 15 のプレニルニリン酸である FPP を基質として用いる事も可能であり、実際に L 品種藻体内において、GGPP と FPP が 1 分子ずつ縮合した、炭素数 35 のハイブリッド型の炭化水素も生合成されていることが明らかになった。

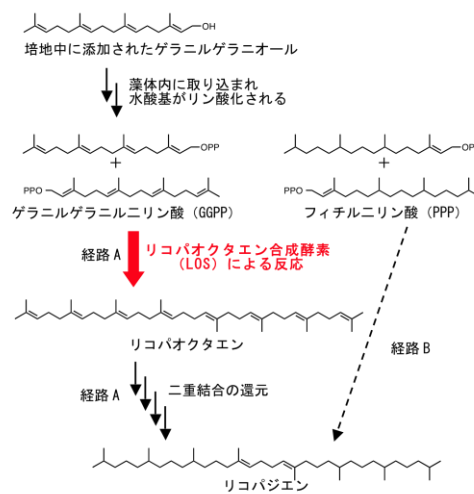


図 7. Lycopadiene の生合成メカニズム

なお、平成 25 年に行われた中間評価により、本藻種への外来遺伝子導入法の開発は、高知工科大学グループによる独立した研究課題では無く、上記の炭化水素生合成・代謝関連酵素遺伝の過剰発現・発現抑制藻株を入手するための技術要素として、岡田グループが引き継ぐ事となった。培養条件の工夫により遺伝子導入操作を行った Showa 株は、ネガティブコントロールに比べて、有為に多数の群体の生育が確認できており、真の形質転換体であるかの確認を行っている。

### 3. 2 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 (東京大学大学院薬学系研究科 阿部グループ)

#### 3. 2. 1 Botryococcene 合成酵素及び関連酵素のX線結晶構造解析

##### (1) 研究実施内容及び成果

*B. braunii* のトリテルペン類生産に関与する酵素 SSL-1~3 の内、SSL-1 は 2 分子の farnesyl pyrophosphate (FPP) から、presqualene pyrophosphate (PSPP) への変換を触媒し、SSL-2 と SSL-3 が、NADPH 存在下、PSPP から各々 squalene と botryococcene への変換を触媒する(図8)。

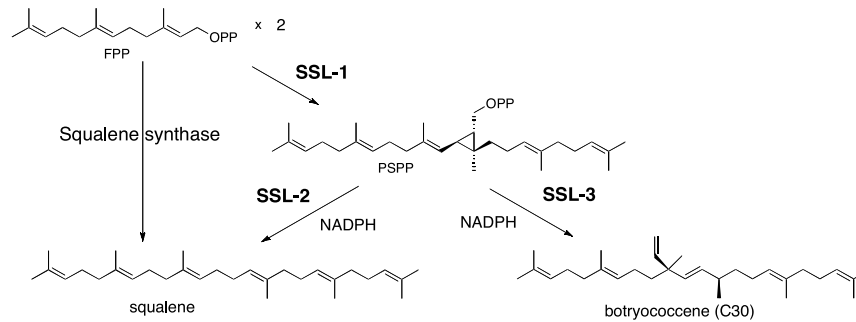


図8 SSL 酵素の触媒する反応

本酵素群の結晶構造を解析し、その反応機構を明らかにすることで、基質特異性や生成物特異性を制御することができれば、より発熱量に優れた炭化水素の酵素合成法の確立が可能になる。まずは、各タンパク質の結晶化の条件を検討した。遺伝子のコドン改変およびタンパク質発現大腸菌の株の選択により、結晶化に必要な量の組換えタンパク質が得られる系を確立し、ようやく結晶化に成功した。しかしながら、十分なX線の反射が得られず構造解析には至っていない。現在、X線結晶構造解析に適した良質な結晶の取得をめざし、様々な条件下で結晶化を検討している。その一例として大腸菌に加えて、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いてのタンパク質発現を試みた。しかしながら、やはりタンパク質回収量や安定性の低さが問題となった。これらを解決するため、SSL-1、SSL-2、SSL-3 各酵素の N 末、C 末に存在する、二次構造を形成していないアミノ酸配列を除去することを検討した。その結果、それぞれの酵素につき、N末端側の約 30 残基、C末端側の約 10 残基を欠損させたトランケート変異体を作成したところ、酵素活性が維持されていることが確認できた。これにより、各酵素の可溶性、安定性は向上し、精製時により多くのタンパク質を得る事に成功した。さらに SSL-1~3 のタンパク質表面には、多数のグルタミン酸、アルギニン、リジンが存在しており、各部位において電荷が偏っていることが予測された。タンパク質を結晶化させる際に、タンパク質の表面電荷を制御することで、結晶化能を向上させる手法が良く用いられている。そこで SSL-1~3 における、それらのアミノ酸残基を中性アミノ酸に変異させ、表面電荷の偏りの解消を試みることにした。現在、12 種類の変異体の作成が完了しており、それらについて結晶化を試みている所である。

一方、すでに結晶構造が明らかになっているヒト squalene synthase (SS) を鋳型として SSL-1~3 のホモロジーモデルを作成した結果、活性中心キャビティを構成する Phe76 および Ser207 残基が、各酵素の基質特異性と生成物特異性の制御に重要な役割を演じている可能性が示された。そこで SSL-1~3 における当該アミノ酸残基をグリシンやアラニン、セリンなどに置換した点変異体を各々設計し、これらの変異が酵素活性に及ぼす影響について検討したところ、いずれの変異酵素においても活性の低下が認められた。続いて、基質特異性の拡大を期待して、FPP より炭素鎖長の長い GGPP を用いて酵素活性を測定したところ、いずれの変異酵素においても生成物は検出されなかった。以上の結果より、Phe76 および Ser207 の両アミノ酸残基は、SSL-1 酵素反応において、基質の分子認識に関与することが示唆された。また、*in vitro* 酵素反応の結果から、これら 2 つのアミノ酸残基は、その側鎖の大きさあるいは極性のわずかな違いによって SSL-1 酵素反応を制御して

いる可能性が示唆された。従って、基質の結合や特異性を決定するアミノ酸残基の同定には、今後、これら2つのアミノ酸残基に加え、その周辺残基についても同様に部位特異的変異導入を行うことが必要であるものと考えられる。

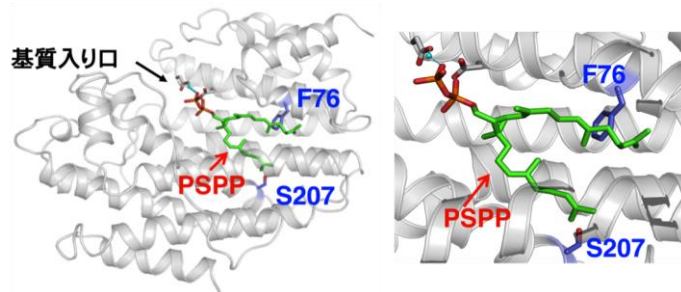


図9 SSL-1 酵素のホモロジーモデル

### 3. 2. 2 進化分子工学によるランダム変異酵素ライブラリーを用いた酵素機能の評価

#### (1) 研究実施内容及び成果

上述した立体構造に基づいた解析からは、予測が困難である活性アミノ酸残基が多数存在すると予想されることから、これらの網羅的な探索を行うために、進化分子工学の手法を用いたランダム変異の導入を試みた。まず PCR によってランダムに遺伝子に変異を導入する Error prone PCR (EP-PCR)法により、SSL-1 のランダム変異導入プラスミドライブラリーの構築を行い、次に、そのライブラリーから高い触媒活性を有した変異酵素を選抜することを目的として、酵素の基質消費能に基づいたスクリーニングを行った。具体的には、黄色カロテノイド生産に関わる CrtM、CrtN の発現大腸菌株に変異酵素ライブラリーを導入し、FPP 消費能が上昇した変異酵素を持ち、黄色色素生産が減退した大腸菌をターゲットとした。本手法は、千葉大学工学部の梅野太輔准教授と共同実験で構築を行った。その結果、黄色色素生産が減退したコロニーから、SSL-1 遺伝子配列中にアミノ酸置換が認められる SSL-1 変異酵素 LY1、LY4、LY8 遺伝子の取得に成功した。アミノ酸配列を比較したところ、L1、L4 に関しては C 末におけるアミノ酸変異が共通して見られることがわかった。また、L4、L8 変異酵素について酵素活性を精査した結果、いずれも *in vitro* における PSPP 合成活性には大きな変化はみられなかったものの、いずれも C 末領域へのアミノ酸変異の導入によって *in vivo* における酵素の安定性が向上したものと推察された。現在、変異酵素 LY1 の *in vitro* での活性試験、および詳細な酵素速度論解析を進めている。

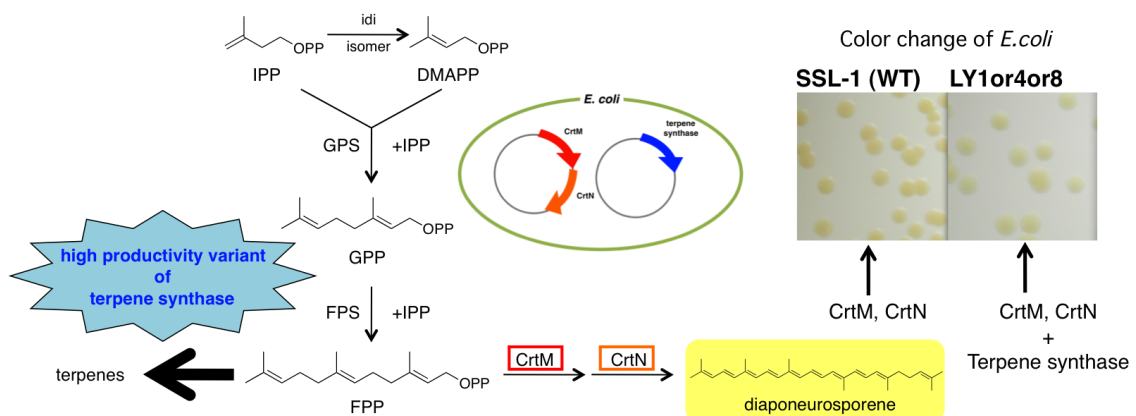
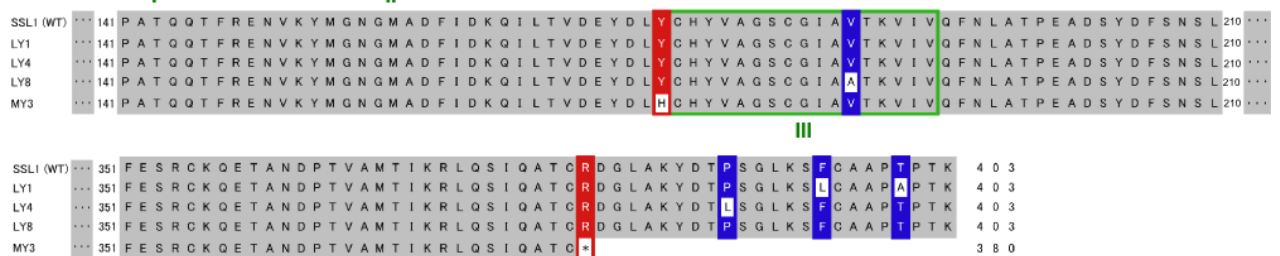


図10 カラースクリーニングによる L1、L4、L8 変異酵素の選別

また、同様の手法を用いて黄色色素生産が増強した大腸菌コロニーを取得することに成功した。このコロニーから変異酵素遺伝子を MY3 と命名した。遺伝子配列のシーケンスの結果、この遺伝子は Y175H のアミノ酸変異を持ち 380 番目のアミノ酸で終止コドンとなり、C 末が短くなっていること

が明らかとなった。この変異酵素の His-tag 付き組換えタンパク質を大腸菌にて発現した所、野生型と異なり、バッファー中で可溶化せず、封入体となることが明らかとなった。そこで、SSL1 酵素の安定性に MY3 中の変異点が寄与することが推測される。



・ Red boxes: Mutations in the more yellow colony    ・ Blue boxes: Mutations in less yellow colonies  
 ・ Green boxes: Highly conserved domains among squalene synthases

図11 L1、L4、L8、MY3 変異酵素と野生型酵素とのアミノ酸配列のアラインメント

一方、同様の ER-PCR 法を用いて作製した SSL-1 変異酵素ライブラリーをスクアレン合成酵素遺伝子欠損株である *Saccharomyces cerevisiae* Derg9 株に導入することで、スクアレン合成型に変異点が入った、SSL-1 遺伝子の取得を試みている(図12)。この研究の達成の暁には、SSL 酵素群だけでなく、スクアレン合成酵素に普遍的な価値の高い知見を得ることができる。同様の手法を用いて、SSL-1 と、変異型 SSL-3 を用いて、宿主のスクアレン合成能を相補することで、スクアレン合成型 SSL-3 遺伝子の取得を計画中である。

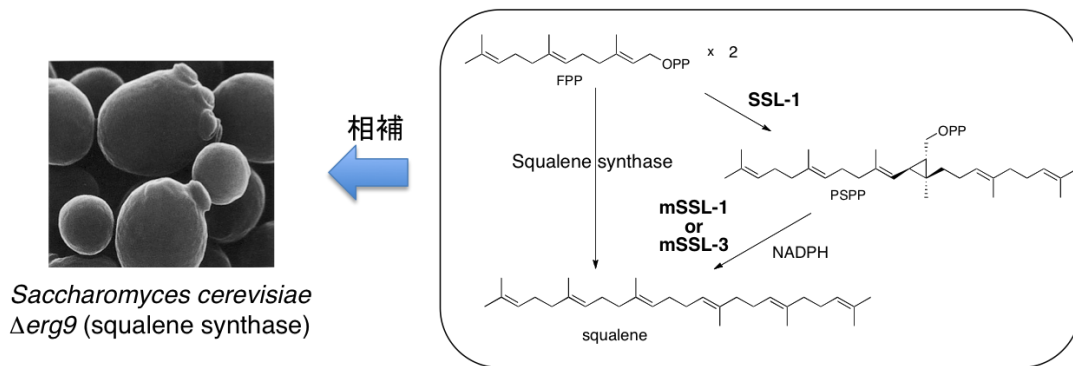


図12 変異型 SSL-1 又は SSL-3 を用いた *S. cerevisiae* Derg9 株におけるスクアレン合成能の相補

### 3.3 Botryococcus braunii の炭化水素および関連物質の細胞内移行・分泌メカニズムの解明 (奈良女子大学理学部 野口グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

*B. braunii* は生産した炭化水素を細胞外に分泌するという、他藻類には例を見ない特徴を持ち、バイオ燃料としての炭化水素の回収プロセスの点からその優位性が指摘されている。この分泌メカニズムに関する知見は本藻種のみならず、他の脂質生産藻類の有効利用にも資することが期待できる。まず、直鎖状炭化水素を生産する A 品種につき、アミノウラシルを用いて細胞周期の同調化を行い、ニュートラルレッドによる液胞の特異的染色で同調を確認できた試料につき(図13A)、細胞周期の各時期におけるアイトープでラベルした酢酸の炭化水素への取り込み量を測定した。その結果、炭化水素生成は細胞質分裂直後に最大であるが、細胞周期を通して起こっていること



を明らかにした(図13B)。

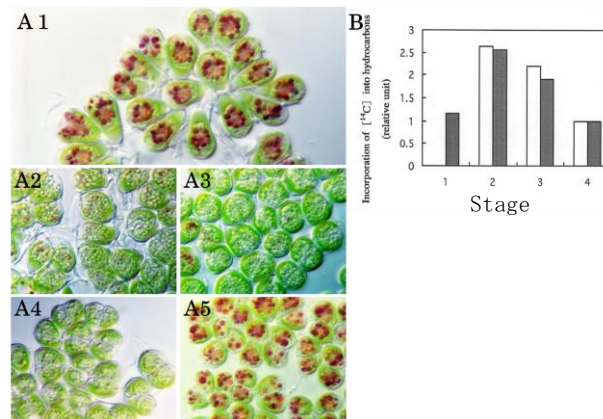


図13. 同調培養した *B. braunii* A 品種の光学顕微鏡写真(A)および直鎖状炭化水素生成活性(B)

次に同様の藻体につき、高圧急速凍結固定による電子顕微鏡試料作製法を確立した。*B. braunii* の細胞は、大量の炭化水素を含んだ細胞外マトリクスに埋もれた状態で存在するため、通常の電子顕微鏡観察時に用いられる試料調製法では、鮮明な像を得ることができない。そこで液体プロパン急速凍結(-190°C)又は高圧急速凍結(2100 bar)による固定法を行った。ナイルレッド染色を用いた蛍光顕微鏡法および透過型電子顕微鏡により得られたデータを併用して、オイルボディの細胞周期を通じた動態と炭化水素および関連物質の細胞内移行経路について解析した。その結果、1. 脂質の分泌は細胞分裂後・母細胞壁崩壊前に細胞側底部で起こること、2. 細胞内オイルボディは脂質の分泌前に数と内容物を増大し、脂質の分泌に伴って消失すること、3. オイルボディが増大する時期に炭化水素生成の初期反応(MEP 経路)の場と推定される葉緑体とオイルボディを繋ぐ小胞体が存在し(図14)、オイルボディの消失期にオイルボディを取り囲む小胞体が存在することを電子顕微鏡の超薄切片法で明らかにした。本成果は *Eukaryotic Cell* 誌(発表原著論文3)に掲載された(図15)。

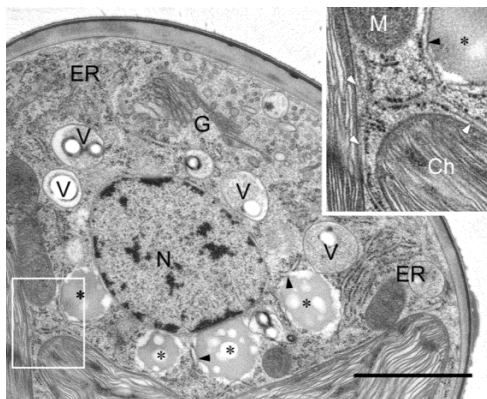


図 1 4

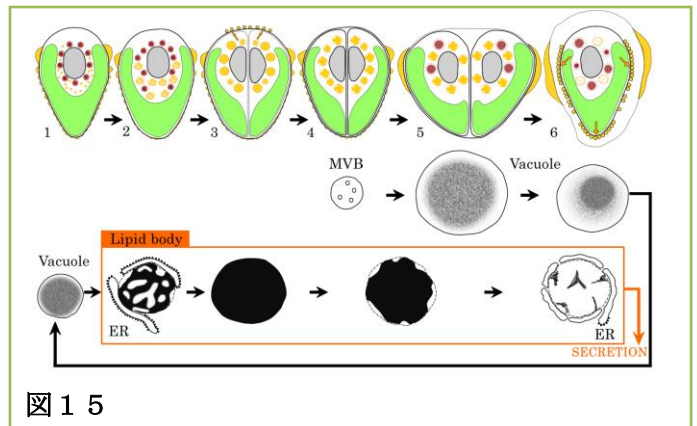
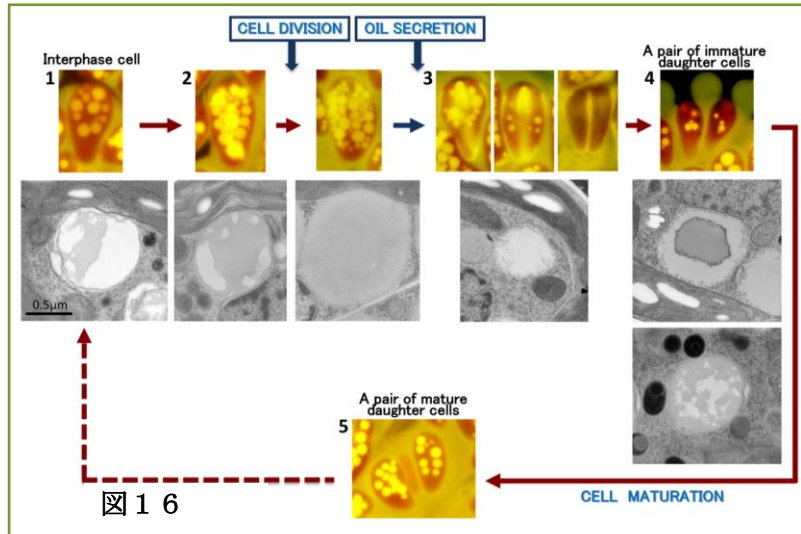


図 1 5

また、B 品種では A 品種と異なり、細胞間マトリクスに存在する脂溶性物質が多いため、電子顕微鏡試料の作製において、オスミウム酸によりコントラストを上げること、包埋樹脂の細胞内浸透などが難しかったが、同様の手法を改良して用いる事で、非常に鮮明な細胞内微細構造の観察に成功した。その結果、B 品種においても A 品種と同様に、炭化水素前駆体の合成は葉緑体で開始され、小胞体・オイルボディを経て、細胞分裂後の娘細胞壁形成後・母細胞壁崩壊前に細胞側底部から炭化水素を分泌・蓄積する可能性を示した。ただし、A 品種においては細胞内にオイルボディが観察される時期が限られていたのに対し、B 品種では細胞周期全体を通じてオイルボディが観察されるという大きな違いがあった(図16)。本成果は *PLoS ONE* 誌に掲載された(発表原著論文4)。



*B. braunii* は、脂質生産で注目されている微細藻類では唯一細胞外に多量の炭化水素を蓄積する。細胞内オイルボディア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、陸上植物の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・分泌されると推定した。更に、ER は葉緑体、リポッドボディ、細胞膜の各々に接する面ではリボソームを欠き、ER と各構造間での脂質の授受が示唆された(Hirose *et al.*, 2013, Suzuki *et al.*, 2013)。そこで、葉緑体、オイルボディと小胞体の立体関係を明らかにするために、新に厚さ80nmの連続切片(約100枚/細胞)による細胞内の立体構築を行った。細胞周期の5つの主要なステージ:分裂していない時期、オイルボディ増大期、細胞分裂後のオイル分泌期、細胞成熟に伴うオイルボディ再出現期、オイル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行った(図17)。

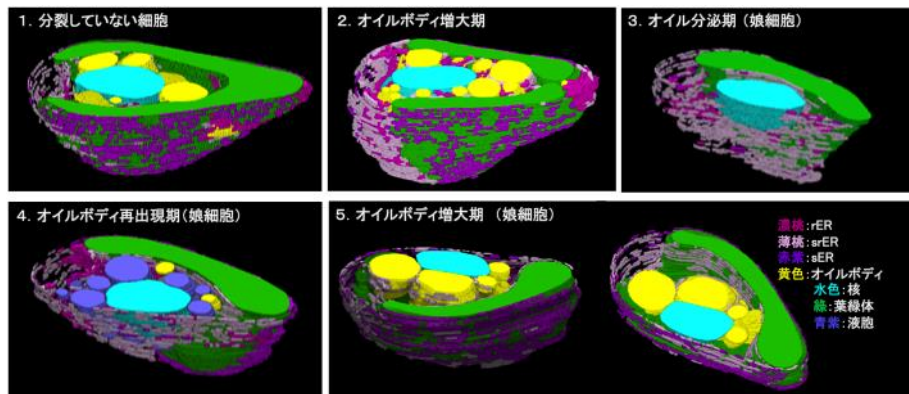


図17. *Botryococcus braunii* 細胞の三次元像(小胞体・葉緑体・オイルボディアの立体関係)

二度のオイルボディ増大期とも(図17; 2, 5)、葉緑体表面にシート状小胞体が顕著であり、葉緑体に接する面のみリボソームを欠いていた。細胞周期を通して、細胞周辺にはチューブ状の小胞体が顕著であり、オイル分泌期以外では両面ともリボソームを欠いた滑面小胞体であった。

また、電子顕微鏡観察を通して、本藻は特異な細胞外蓄積物によって独特のコロニーを成立させていることが判った(図18)。細胞外炭化水素層が細胞同士を連結し(図18B1, 2)、細胞頂端部と炭化水素層の外表面を覆う繊維状のコロニーシース(2012年 Weiss *et al.*)がコロニー全体を取り囲み(図18A1, 2)、その結果、水を弾いてコロニーに強い浮力を与えていると考えられた。更に、コロニーシースが、細胞側底部での脂質の分泌・蓄積と連動して頭頂部から分泌される多糖によって形成される過程を明らかにした(図19)。本成果は Algal Research 誌(発表原著論文8)に掲載さ

れた。

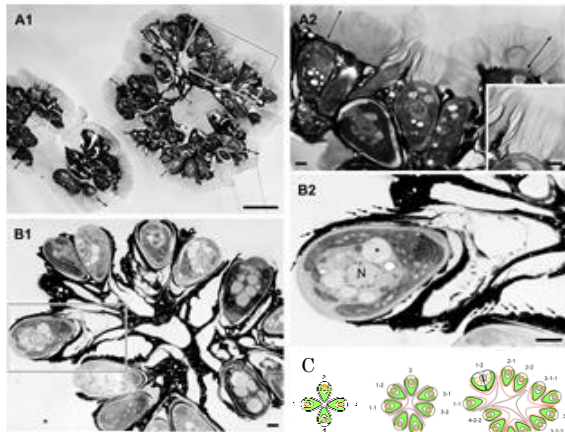


図18

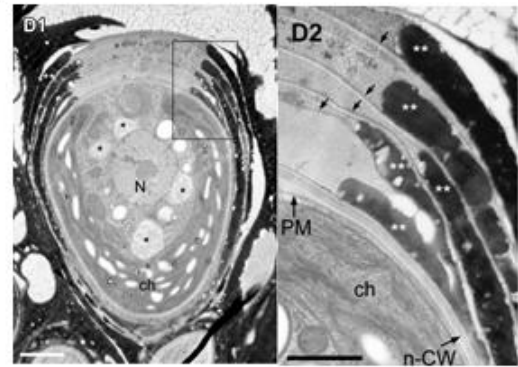


図19 細胞側底部で5層の脂質層を形成している一方、細胞頂端部で多糖を蓄積し始めている。(D2はD1内の四角領域を拡大)

Botryococcene 生合成に関与する酵素群が明らかになり、それらの酵素反応が細胞内のどこで行われるかを調べる事が可能となった。Botryococcene をはじめとするテルペン類共通の前駆体を供給する MEP 経路における酵素タンパク質群は、全て葉緑体移行シグナルを持つが、B 品種のトリテルペン系炭化水素生合成に関与する SSL-1~3 は葉緑体移行シグナルを持たない。SSL-1~3 が関与する最終反応が上の経路の何処で起こるのか、又は、細胞外で起こるのかを免疫電子顕微鏡法で明らかにするため、SSL-1~3 に対するペプチド抗体を作製した。しかし作製抗体はウェスタンブロッティングには有効であったが、免疫電子顕微鏡法には不適であったため、SSL-1 および3に対する特異性のより高いモノクローナル抗体を再度作製した。これらを用いて炭化水素生成の各反応部位の解明を試みている。

また、本藻種の炭化水素分泌メカニズムの解明と関連し、炭化水素の効率的な抽出・回収技術の開発研究を行っている、東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻芋生憲司教授グループと、本藻種の群体構造に関する共同研究を行った。塩分を含む培地で培養することにより、乾燥せずともヘキサンの低極性溶媒と接触させるだけで炭化水素の殆どを抽出することができる生理状態になった藻体では、群体表面に存在するコロニーシースと呼ばれる構造体が、通常の条件下で培養した藻体より少なくなっていることを、電子顕微鏡観察により明らかにした。また、加熱処理により、同様に炭化水素の回収が容易になった状態の藻体においても、上記コロニーシースが減少していることが分かった(図20)。

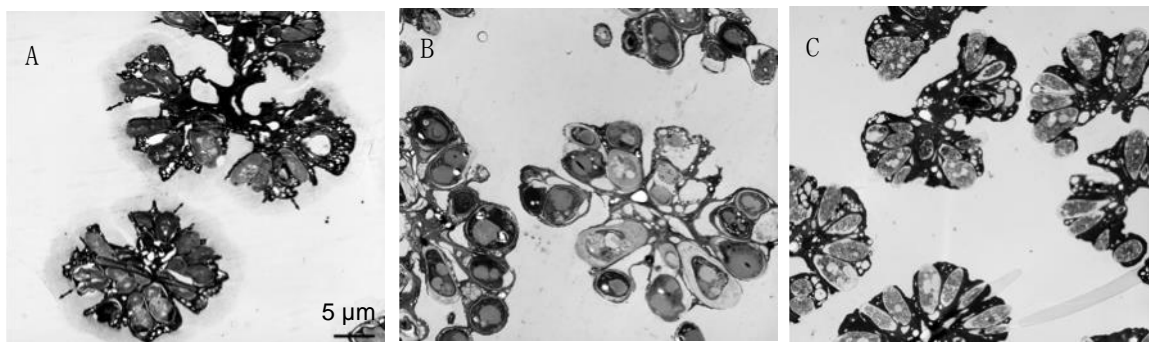


図20. 通常培養の藻体 (A), 塩水培養した藻体 (B), 加熱処理後の藻体 (C) A においてのみ明瞭なコロニーシース (両矢印部) が見られる。

これらの知見は、コロニーシースが炭化水素を外界から隔離する機能を有していることを示しており、将来的に本藻種の遺伝子改変が可能になった場合、コロニーシースを持たないか、あるいは少ない藻株を作出できれば、より小さなエネルギー投入量で、炭化水素を効率的に藻体から回収する技術を確立できる可能性を示している。当該成果は Algal Research 誌(発表原著論文10)に

掲載された。

論文を作成するに当たり、*Botryococcus braunii*の多量な炭化水素生成は既に30年以上前から藻類学者に注目され、細胞学的研究が行われたが、電子顕微鏡的研究に関しては1978年～1984年(オイルショック期)に4報の論文が発表されたのみである事が判った。その原因として、*B. braunii*が多量の炭化水素を細胞外に蓄積しているため、鮮明な電子顕微鏡像を得られず、細胞内微細構造の解析が止まっていたことが推測される。我々は、従来の化学固定法ではなく、急速凍結法で電子顕微鏡試料を作製して鮮明な像を得、格段の成果を挙げた。*B. braunii*以外の脂質生産の研究対象になっている微細藻類は全て細胞内に脂質を蓄積している。脂質を細胞外に蓄積するからこそ、*B. braunii*の蓄積量が他の微細藻に比較して多いと考えられる。植物細胞でも脂質分泌は表皮細胞のクチクラワックスと、ムラサキのシコンン分泌しか知られておらず、脂質分泌機構に関しては未解決課題が多く、炭化水素の分泌・蓄積時期を特定できた*B. braunii*は脂質分泌機構を解明する最適な研究材料になった。

### 3.4 *B. braunii*への外来遺伝子導入あるいは内在性遺伝子の他藻類への導入発現系の確立(高知工科大学・大濱グループ)

#### 3.4.1 *B. braunii*への外来遺伝子導入法の検討

##### (1)研究実施内容及び成果

*B. braunii*における炭化水素生産・分泌メカニズムの解明を円滑に行うためには、本藻種への外来遺伝子導入、あるいは内在性遺伝子発現抑制技術の確立が喫緊の課題である。まず、本藻種の外来遺伝子導入を行う際に必要な、薬剤耐性選択マーカーの探索を行った。本藻種を様々な抗生物質を含む培地中で培養したところ、150  $\mu\text{g/ml}$ 以上のstreptomycin、20  $\mu\text{g/ml}$ 以上のhygromycin、10  $\mu\text{g/ml}$ 以上のparomomycin、および5  $\mu\text{g/ml}$ 以上のzeocinに対して感受性を示した。一方、spectinomycinについては強い耐性(500  $\mu\text{g/ml}$ )を示した。本藻種のA品種であるUTEX572株、及びB品種であるShowa株ともに、zeocinに対して感受性があることが明らかになったことから、まずzeocinを薬剤耐性マーカーとして用いることにした。Zeocin耐性を賦与する遺伝子である*ble*を、本藻由来のRbcS(Rubisco小サブユニット)、Hsp70Aあるいはsqualene synthase遺伝子のプロモーター下流に配置したDNA constructを作製した(図21)。



図21. パーティクルガンによる*B. braunii*への形質転換操作と形質転換体の選択条件

これらにつきパーティクルガンを用いて、様々なガス圧(800-1600 psi)で対数増殖期の*B. braunii*群体へ導入することを試みたところ、形質転換体の出現は認められなかった。この原因として、A、B両品種とも炭化水素関連化合物と多糖から成る、細胞外マトリクス構造を金属粒子が通過する段階で、DNAが金属粒子から脱離してしまっている可能性が考えられた。そこでDNA撃ち込み時の障壁が、より低い状態の藻体細胞を取得するため、*B. braunii*群体から、脂等で覆われていない単細胞を高効率で分離する方法を模索した。既往研究により、グリセリンが本藻種の群体から単細胞を放出させることが知られていた。そ

ここでグリセリンに類似した化学構造を有し、かつ、細胞に対する毒性が少ないと考えられる水溶性化合物 18 種を選び、これらに *B. braunii* の群体を曝すことにより単細胞の調製を試みた (図 2 2)。その結果、グリセリンに加え、さらに 4 種の化合物により、群体を構成している細胞の約 70%以上を単細胞として放出させることが出来た (発表原著論文 5、PCT/JP2012/52200)。



図 2 2. 薬剤処理により放出される単細胞 a:明視野、b:Brighteners によるセルロースの染色、c:Nile Red による脂溶性成分の染色

また UTEX572 株では、得られた単細胞を密集させて培養することにより、2 週間後の生存率を 50%程度にまで改善させられることを示した。しかし Showa 株の場合、本法により単細胞化は可能であるものの、単細胞から群体を再生させるには到らなかった。一方 UTEX 572 株では、超音波処理によっても群体から単細胞を遊離させることが可能であり、この様に調製した単細胞から群体を再形成させることに成功した。

Showa 株については如何なる化学処理によっても単細胞化することができなかつたため、5-20 個の細胞からなる小さなコロニーのみを分離して遺伝子導入用試料として用いた。この様に調製した UTEX572 株あるいは Showa 株につき、パーティクルガンにより遺伝子導入を行った。なお、藻体細胞内への薬剤の浸透効率を高めるため、zeocin を添加したソフトアガー (寒天濃度 0.8%) の中に細胞を埋め込み、形質転換体を選抜する方法を採用した。これらの薬剤を含む寒天プレート表面に本藻種を接種した場合、多くの擬薬剤耐性コロニーが生じた。その結果、5  $\mu$ g/ml の zeocin 含有ソフトアガーを用いた場合、培養開始 3 ヶ月後に、1 プレート当たり 30~50 個のコロニーの形成が、ソフトアガー中に認められた。しかし、これらの細胞を新しい zeocin 含有寒天上に移植した場合、生育できる細胞は現れなかつた。この事は、zeocin 耐性遺伝子が一過的に発現し、zeocin 分解酵素の働きにより細胞周辺の zeocin 濃度が低下することで細胞の生育が可能となり、コロニーが生じた可能性を示唆している。この一過的な外来遺伝子の発現の有無については、緑色蛍光タンパク質 (GFP) や  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) を持つ DNA コンストラクトを導入することで、確認が可能であると考えられた。*B. braunii* と同じトレボキシア藻綱に属する *Pseudochoricystis ellipsoidea* では、パーティクルガン法により形質転換体を得られている。その際、より粒子径の小さな金属粒を用いる事で、より高い形質転換効率が認められた。そこで生細胞に対し、より障害の少ないパーティクルガン法での遺伝子導入を検討した。その一例として、新規なパーティクルガン用の DNA 担体の開発を試みた。多孔質の金属酸化物粒子である  $\text{TiO}_2$  を、パーティクルガン法の DNA 担体として用い、通常より低いガス圧でクラミドモナスの形質転換体を得る事に成功した (発表原著論文 2)。脆弱な細胞壁を持つような藻に対する、パーティクルガン法での担体としての利用が期待できるので、PCT 特許申請を行なった (PCT/JP2012/51884)。上記 *P. ellipsoidea* の例では、G418 耐性をマーカーとし、6 種類の内在性遺伝子のプロモーターと、3 種類のターミネーターを組み合わせたコンストラクトのうち、形質転換体を得られたのは Tubulin プロモーターと、Actin ターミネーターの組み合わせのみであった。この事から本藻種においても、より多くのプロモーター/ターミネーターの組み合わせを試すことが必要と考えられた。そこで DNA コンストラクトとして、新たに 3 種の内在性プロモーター (Actin プロモーター、Lhc プロモーター、PsaD プロモーター) が、ble-GFP 融合タンパク質のオープンリーディングフレームを駆動する形式の物を追加して検討を行った。しかしながら現在までのところ、安定的に zeocin 耐性を示す形質転換体は得られていない。

藻種によってはパーティクルガン法では無く、エレクトロポレーション法の方が形質転換に適している場合がある。そこで上記各種 DNA コンストラクトを使用し、BTX ECM600 および Neppa 21 Type 2 という異なるタイプのエレクトロポレーション装置を用いて、形質転換体の取得を試みたが、Showa 株、UTEX572 株ともに zeocin 耐性を付与することは出来なかった。

核ゲノムへの遺伝子導入と併行して、葉緑体ゲノムへの遺伝子導入も試みた。葉緑体ゲノム配列の2カ所を相同組み換えの標的配列とし、パロモマイシン耐性遺伝子 aphVIII をマーカーとするコンストラクトを、A 品種である UTEX572 にパーティクルガンで撃ち込んだ。処理後の藻体を、濃度 20 µg/ml の paromomycin を含む 0.8%ソフトアガー中に埋め込んで培養を行ったが、3ヶ月が経過してもソフトアガー中にコロニーの形成は認められなかった。

### 3. 4. 2. *Botryococcus* 由来遺伝子の *Chlamydomonas* 内での発現

#### (1)研究実施内容及び成果

*B. braunii* の炭化水素生産能を持ち、かつ *B. braunii* より培養が容易な独立栄養微細藻を得るため、*Chlamydomonas reinhardtii* への botryococcene 生合成関連遺伝子の導入を試みた。当該遺伝子として squalene synthase (SQS)、SSL-1 あるいは SSL-3 の導入を試みた。その際、*C. reinhardtii* は *B. braunii* と異なり、大量のテルペン類を生産することは知られていないため、*C. reinhardtii* 内で著量の squalene や botryococcene の生産を可能にするためには、テルペン類の前駆体の供給量を上げる必要があるものと考えられた。そこで、*Chlamydomonas reinhardtii* においてもテルペン前駆体生合成酵素遺伝子である、MEP 経路の DXS および DXR の過剰発現株の取得も試みた。Botryococcene の生合成に関与する SSL-1、および SSL-3 のオープンリーディングフレーム (ORF) と、薬剤耐性マーカーである ble の ORF を、自己切断型ペプチド・リンカーで繋いだ融合 ORF を構築した。また、各 SSL 遺伝子の N-末端および C-末端には、タグペプチドを付加し、モノクローナル抗体による検出が可能なタンパク質として発現する様にした。初めに最も頻繁に用いられる *C. reinhardtii* の野生型株である CC-124 を宿主として、DXS、DXR、SQS、SSL-1、SSL-3 の ORF を、従来型プロモーターを用いて過剰発現させた。SQS を強く発現する株は容易に得られたのに対して、DXR、DXS、SSL-1、SSL-3 酵素を蓄積している株は、それぞれ 200 を超える形質転換体を Western 法で解析したが、DXS の 1 株を除いて得られなかった (図23、発表原著論文6)。

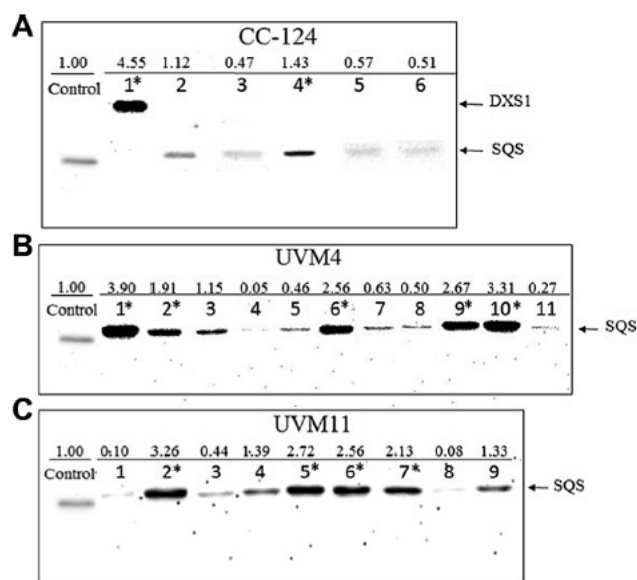


図23. *C. reinhardtii* における *B. braunii* 由来遺伝子の強制発現

次に外来遺伝子に対する転写抑制系が欠損していると考えられている、*C. reinhardtii* 突然変異

株(UVM4 および UVM11)を用いて形質転換をおこなったところ、SQS に加えて DXS の高発現株が容易に得られた。しかし、DXR, SSL-1, SSL-3 の高発現株は依然として得られなかった。そこでより強力な遺伝子発現を可能にするため、マーカー遺伝子の ORF と、SSL-1 または SSL-3 の ORF を自己切断型ペプチド配列(2A)を介して融合させた ORF を、4つのエンハンサー活性を持つ新規複合プロモーターHsp70A/rbcS2/intron(×4)の下流に繋いだ DNA コンストラクトを使用した(発表原著論文7)。その結果 *C. reinhardtii* において、自己切断ペプチド配列内で切断された分子量を有する、SSL-1 や SSL-3 が強く検出される株を得ることに初めて成功した(図24)。さらにこれらの株を掛け合わせることで、SSL-1 と SSL-3 の両方を高発現している *C. reinhardtii* 株を複数得た。しかしながら、これらの株における botryococcene の生成を確認したところ、検出出来なかった。これは *C. reinhardtii* 内で SSL-1 タンパク質が、直接の基質であるファルネシルニリン酸を受け取ることが出来ないためか、あるいは SSL-1 タンパク質と SSL-3 タンパク質のフォールディングが、正しく行われていないためと考えられた。

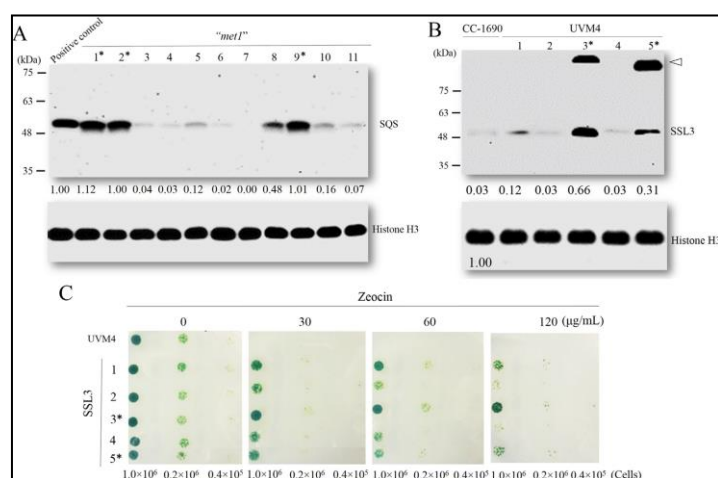


図24. *C. reinhardtii* における *B. braunii* 由来 SSL3 遺伝子の強制発現

## § 4 成果発表等

### (1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 11件)

1. Daisuke Matsushima, Holger Jenke-Kodama, Yohei Sato, Yusuke Fukunaga, Koremitsu Sumimoto, Tomohisa Kuzuyama, Shigeki Matsunaga and Shigeru Okada, “The single cellular green microalga *Botryococcus braunii*, race B possesses three distinct 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases”, *Plant Science*, **185-186**, 309-320, 2012 (DOI:10.1016/j.plantsci.2012.01.002)

2. Liyuan Hou, Pengyu Wang, Fantao Kong, Hyunsun Park, Kazuya Kobiro and Takeshi Ohama, “Mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles: A new material for biolistic bombardment”, *Phycological Research*, **61**, No. 1, pp, 58-60, 2013 (DOI:10.1111/j.1440-1835.2012.00671.x)

3. Mana Hirose, Fukiko Mukaida, Shigeru Okada, Tetsuko Noguchi, “Active Hydrocarbon Biosynthesis and Accumulation in a Green Alga, *Botryococcus braunii* (Race A)”, *Eukaryotic Cell*, **12**, No.8, pp.1132-1141, 2013 (DOI: 10.1128/EC.00088-13)

4. Reiko Suzuki, Naoko Ito, Yuki Uno, Ichiro Nishii, Satoshi Kagiwada, Shigeru Okada, Tetsuko Noguchi, “Transformation of Lipid Bodies Related to Hydrocarbon Accumulation in a Green Alga, *Botryococcus braunii* (Race B)”, *PLOS ONE*, **8**, No.12, e81626, 2013 (DOI: 10.1371/journal.pone.0081626)

5. Liyuan Hou, Hyunsun Park, Shigeru Okada, Takeshi Ohama, “Release of single cells from the colonial oil-producing alga *Botryococcus braunii* by chemical treatments”, *Protoplasma*, **251**, No.1, pp.191-199, 2014 (DOI: 10.1007/s00709-013-0537-4)

6. Fantao Kong, Tomohito Yamasaki, Takeshi Ohama, “Expression levels of domestic cDNA cassettes integrated in the nuclear genomes of various *Chlamydomonas reinhardtii* strains”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **117**, No. 5, pp.613-616, 2014 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.025>)

7. Fantao Kong, Tomohito Yamasaki, Sari Dewi Kurniasih, Liyuan Hou, Xiaobo Li, Nina Ivanova, Shigeru Okada, Takeshi Ohama, “Robust expression of heterologous genes by selection marker fusion system in improved *Chlamydomonas* strains”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **120**, No.3, pp.239-245, 2015 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.005>)

8. Yuki Uno, Ichiro Nishii, Satoshi Kagiwada, Tetsuko Noguchi, “Colony sheath formation is accompanied by shell formation and release in the green alga *Botryococcus braunii* (race B)”, *Algal Research*, **8**, pp.214-233, 2015 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.015>)

9. Hidenobu Uchida, Koremitsu Sumimoto, Victor Marco Emmanuel Ferriols, Kenji Imou, Kiyotaka Saga, Kenichi Furuhashi, Shigeki Matsunaga, Shigeru Okada, “Isolation and characterization of two squalene epoxidase genes from *Botryococcus braunii*, race B”, *PLOS ONE*, **10**, No.4, e0122649, 2015 (DOI: 10.1371/journal.pone.0122649)

10. Kenichi Furuhashi, Tetsuko Noguchi, Shigeru Okada, Fumio Hasegawa, Yutaka Kaizu, Kenji Imou, “The surface structure of *Botryococcus braunii* colony prevents the entry of



extraction solvents into the colony interior”, *Algal Research*, **16**, pp.160–166, 2016 (DOI:10.1016/j.algal.2016.02.021)

11. Hem R. Thapa, Mandar T. Naik, Shigeru Okada, Kentaro Takada, Istvan Molnar, Yuquan Xu, Timothy P. Devarenne, “A squalene synthase-like enzyme initiates production of tetraterpenoid hydrocarbons in *Botryococcus braunii* Race L”, *Nature Communications*, (DOI: 10.1038/ncomms11198)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 岡田 茂, バイオ燃料として期待される微細藻類の炭化水素生合成酵素, 化学と生物, **50**, 93–102 (2012)
2. 岡田 茂, 代替石油として期待される微細藻のトリテルペン生合成メカニズム, バイオサイエンスとインダストリー, **70** (2012)
3. 岡田 茂, ボツリオコッカスの炭化水素生合成経路の解明, 微細藻類によるエネルギー生産と事業展望(竹山春子監修), シーエムシー出版, 東京, 2012
4. Ikuro Abe, Enzymatic synthesis of unnatural cyclic triterpenes, *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*, Chapter 27, pp. 393–403, Springer, 2012
5. 野口 哲子, 加圧凍結をはじめ急速凍結法で可能になった細胞微細構造の解析, *Plant Morphology*, **25**, 21–27 (2013)
6. Ikuro Abe, The oxidosqualene cyclases: one substrate, diverse products, *Natural Products: Discourse, Diversity and Design*, Chapter 16, pp. 296–316, Wiley, 2014
7. Tetsuko Noguchi, Endoplasmic reticulum in the green alga *Botryococcus braunii*, Tetsuko Noguchi (Editor in chief), *Atlas of Plant Cell Structure*, Chapter 4, pp. 74–75, Springer, 2014
8. Tetsuko Noguchi, Golgi bodies and the trans-Golgi networks in *Botryococcus braunii*, Tetsuko Noguchi (Editor in chief), *Atlas of Plant Cell Structure*, Chapter 4, pp.82–83, Springer, 2014
9. Tetsuko Noguchi, Clathrin-coated buds and vesicles in *Botryococcus braunii*, Tetsuko Noguchi (Editor in chief), *Atlas of Plant Cell Structure*, Chapter 4, pp. 84–85, Springer, 2014
10. Reiko Suzuki and Tetsuko Noguchi, Lipid accumulation in the green alga *Botryococcus braunii*, Tetsuko Noguchi (Editor in chief), *Atlas of Plant Cell Structure*, Chapter 5, pp.102–103, Springer, 2014

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 10件、国際会議 18件)

1. 岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科), Tom D. Niehaus (University of Kentucky), Timothy P. Devarenne (Texas A&M University), David S. Watt, Vitaliy Sviripa,

Joe Chappell (University of Kentucky)、微細藻 *Botryococcus braunii* のトリテルペン類生合成機構、第9回クラミドモナス・ワークショップ、岡崎コンファレンスセンター、2011年11月26日発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

2. 野口哲子(奈良女子大学理学部) 加圧凍結法で可能になった三重の葉緑体包膜の再考と多量の炭化水素を細胞外に蓄積する *Botryococcus* の微細構造の解析. 日本植物学会第76回大会、シンポジウム、兵庫県立大学、2012年9月15日

3. 野口哲子(奈良女子大学理学部)、微細緑藻 *Botryococcus braunii* の炭化水素生産・分泌・蓄積、藻類談話会、奈良、2013年11月9日

4. 野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* の脂質・多糖の生産と蓄積、2014年度(第3回)近畿植物学会講演会、大阪市立大学理学部附属植物園、2014年4月19日

5. 岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、バイオ燃料生産を目指した微細藻類の炭化水素生合成に関する研究、第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学生物資源学部、2014年6月1日

6. 岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、バイオ燃料として期待される微細藻 *Botryococcus braunii* のトリテルペン系炭化水素の生合成・代謝、東京大学生物生産工学研究センターシンポジウム、東京大学弥生講堂、2014年12月8日

7. 阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、複雑骨格天然物の生合成マシナリーの解明と制御、東京大学生物生産工学研究センターシンポジウム、東京大学弥生講堂、2014年12月8日

8. 阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、複雑骨格天然物の生合成マシナリーの解明、化学会第95春期年会 イブニングセッション、船橋、2015年3月26日

9. 野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* の脂質・多糖の生産と蓄積、近畿植物学会、大阪市立大学理学部附属植物園、2015年4月19日

10. 岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、バイオ燃料として有望な微細緑藻 *Botryococcus braunii* によるトリテルペン炭化水素の生合成・代謝、2016年度日本農芸化学会大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月29日

11. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Expanding the Catalytic Repertoires of Biosynthetic Enzymes, Directing Biosynthesis III, Nottingham, United Kingdom, 2012年9月19-21日

12. Shigeru Okada(東京大学大学院農学生命科学研究科)、Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Tetsuko Noguchi(奈良女子大学理学部)、Takeshi Ohama(高知工科大学環境理工学群)、Characterization of hydrocarbon biosynthesis and secretion mechanisms by the green microalga, *Botryococcus braunii* to control biofuel production, International symposium on biotechnology for green growth, Kobe, Japan 2012年10月26日

13. Shigeru Okada(東京大学大学院農学生命科学研究科)、Early biosynthetic steps of triterpene biosynthesis in the microalga *Botryococcus braunii*, race B, TERPNET2013、

Kolymvari, Crete, Greece, 2013 年 6 月 3 日

14. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Structure-based Engineering of Enzymes、Enzyme Engineering XXII: An ECI Conference Series、Toyama, Japan、2013 年 9 月 23 日

15. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Structure-based Engineering of Enzymes、International Conference on Medicinal Chemistry, Jakarta, Indonesia、2013 年 10 月 30 日

16. Ohama Takeshi(高知工科大学環境理工学群). "Biofuel production using micro green algae"、International Seminar on Tropical Bio-resources for Sustainable Bio-industry、Bandung, Indonesia、2013 年 10 月 31 日

17. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, Poland, 2014 年 5 月 28 日

18. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, 97th Canadian Chemistry Conference and Exhibition, Canada, 2014 年 6 月 1 日

19. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, International Symposium on Marine Biotechnology and Ocean Conservation, Jakarta, Indonesia, 2014 年 9 月 15 日

20. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, 2014 Fall Annual Convention of Pharmaceutical Society of Korea, Gyeongju, Korea, 2014 年 10 月 23 日

21. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, China-Japan-Korea joint International Symposium, Shenyang, China, 2014 年 10 月 31 日

22. Shigeru Okada(東京大学大学院農学生命科学研究科)、Biosynthesis and metabolism of triterpene hydrocarbons produced by the green microalga considered as a potential source of biofuel, *Botryococcus braunii*, The fifth JSPS-MSF, The University of Florida, Gainesville, USA, 2014 年 11 月 7 日.

23. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, INTERNATIONAL CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS 2015, Johor Bahru, Malaysia, 2015 年 3 月 24 日

24. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, the Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, Tokushima, 2015 年 8 月 30 日

25. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, BEILSTEIN Symposium on Natural Products, Germany, 2015 年 9 月 30 日

26. Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科)、Engineered Biosynthesis of Natural Products, 7th AASP Conference, Taipei, 2015 年 10 月 31 日

27. Ikuro Abe (東京大学大学院薬学系研究科), Engineered Biosynthesis of Natural Products, 14th FAOBMB Congress 2015, Tokushima, 2015年11月27日

28. Ikuro Abe (東京大学大学院薬学系研究科), Engineered Biosynthesis of Natural Products, PACIFICHEM 2015, Hawaii, 2015年12月18日

② 口頭発表 (国内会議 12件、国際会議 6件)

1. 内田英伸、福永有佑、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレン合成酵素様遺伝子の発現パターンの解析、平成 24 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学(品川キャンパス)、2012年3月29日

2. 木村篤人、森 貴裕、森田洋行(東京大学大学院薬学系研究科)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、*Botryococcene* 合成酵素の炭化水素生産の向上を指向した変異酵素の設計、日本薬学会第132年会、北海道大学(札幌キャンパス)、2012年3月30日

3. 内田英伸、住本惟光、福永有佑、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子の単離と機能解析、平成 24 年度日本水産学会秋季大会、下関、2012年9月15日

4. 木村篤人、森 貴裕、Jon Freeman、森田洋行(東京大学大学院薬学系研究科)、方波見彰仁、梅野太輔(千葉大学工学部)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、*Botryococcene* 合成酵素の機能解析、第16回生体触媒化学シンポジウム、富山、2012年11月30日

5. 野口哲子、鈴木玲子、宇野由紀(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* のコロニー形成、近畿植物学会、奈良、2013年12月7日

6. 内田英伸、福永有佑、住本惟光、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子群の単離、平成 26 年度日本水産学会春季大会、北海道大学函館キャンパス、2014年3月28日

7. 内田英伸、福永有佑、住本惟光、Victor Marco Emmanuel Ferriols<sup>1</sup>、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子群の単離と発現解析、日本植物学会第78回大会、明治大学生田キャンパス、2014年9月12日

8. 内田 英伸、住本 惟光、沖 友香(東京大学大学院農学生命科学研究科)、西井 一郎(奈良女子大学理学部)、松永 茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* Race B 品種における 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate reductase 遺伝子の単離と機能解析、第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015年3月17日

9. Tsou Chung Yau, Shigeki Matsunaga, Shigeru Okada(東京大学大学院農学生命科学研究科), cDNA cloning and functional characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from the microalga *Botryococcus braunii*, race B、平成 27 年度

日本水産学会春季大会、東京、2015年3月28日

10. Adrianus David Tanzil, Victor Marco Emmanuel N. Ferriols, Shigeki Matsunaga, Shigeru Okada (東京大学大学院農学生命科学研究科), cDNA cloning and characterization of a farnesol kinase-like protein from the microalga *Botryococcus braunii*, race B、平成27年度日本水産学会春季大会、東京、2015年3月28日

11. 内田英伸、住本惟光、沖 友香(東京大学大学院農学生命科学研究科)、西井一郎(奈良女子大学理学部)、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種における 4-hydroxy-3-methylbu-2-enyl-diphosphate reductase 遺伝子のゲノミッククローンの単離とその構造解析、平成27年度日本水産学会春季大会、東京、2015年3月28日

12. Adrianus David Tanzil, Victor Marco Emmanuel N. Ferriols, Kentaro Takada, Shigeki Matsunaga, Shigeru Okada (東京大学大学院農学生命科学研究科)、Characterization of a bifunctional farnesol kinase-like protein from the green microalga *Botryococcus braunii* race B、平成28年度日本水産学会春季大会、東京、2016年3月27日

13. Hiroyuki Morita, Ikuro Abe(東京大学大学院薬学系研究科), Crystal structure analysis of the type III polyketide synthase that produces curcuminoid、50th Anniversary Meeting, PSNA 2011、Hawaii, USA, 2011年12月12日

14. Liyuan Hou, Hyunsun Park, Tomohito Yamasaki, Takeshi Ohama(高知工科大学環境理工学群), Preparation of single cells from the colonial oil-producing green alga *Botryococcus braunii*、9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 2012年6月14日.

15. Fantao Kong, Tomohito Yamasaki, Hyunsun Park, Takeshi Ohama(高知工科大学環境理工学群), Genetic manipulation of methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway for the over production of isoprenoids in *Chlamydomonas reinhardtii*、9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012, Kochi, Japan, 2012年6月14日.

16. Fantao Kong, Tomohito Yamasaki, Takeshi Ohama(高知工科大学環境理工学群), Expression of a randomly integrated domestic SQS cDNA cassette in *Chlamydomonas reinhardtii* strains, The 4th International Symposium on Frontier Technology, Shenyang, China, 2013年7月26日

17. Resnanti U. Handayani, Liyuan Hou, Takeshi Ohama(高知工科大学環境理工学群), Protoplasts preparation from *Botryococcus braunii*, an oil-producing colonial green microalgae, The 4th International Symposium on Frontier Technology, Shenyang, China, 2013年7月27日

18. Liyuan Hou, Takeshi Ohama(高知工科大学環境理工学群), Single cells prepared from the colonial oil-producing green alga *Botryococcus braunii*、The 4th International Symposium on Frontier Technology, Shenyang, China, 2013年7月27日

③ポスター発表 (国内会議 30件、国際会議 11件)

1. 木村篤人、森 貴裕、森田洋行(東京大学大学院薬学系研究科)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、Botryococcene 合成酵素の炭化水素生産の向上を指向した変異酵素の設計、第46回天然物化学談話会、静岡、2011年7月8日
2. 伊藤奈央子、宇野由紀、西井一郎、鍵和田聡、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* B 品種における炭化水素生産について、日本植物形態学会第23回大会、東京、2011年9月16日
3. 伊藤 奈央子、宇野 由紀、渋谷 枝里香、西井 一郎、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* B品種の炭化水素生成・分泌・蓄積、日本植物学会第75回大会、東京、2011年9月19日
4. 木村篤人、森 貴裕、森田洋行(東京大学大学院薬学系研究科)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、Botryococcene 合成酵素の炭化水素生産の向上を指向した変異酵素の設計、酵素工学会第66回講演会、東京、2011年9月29日
5. 内田英伸、福永有佑、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種のスクアレン合成酵素様遺伝子の発現解析、第9回クラミドモナス・ワークショップ、岡崎コンファレンスセンター、2011年11月25日
6. 木村篤人、森 貴裕、森田洋行(東京大学大学院薬学系研究科)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、Botryococcene 合成酵素の炭化水素生産の向上を指向した変異酵素の設計、第15回生体触媒シンポジウム、東京、2011年12月22日
7. 内田英伸、福永有佑、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種のスクアレン合成酵素様タンパク質遺伝子の発現解析、第53回日本植物生理学会年会、京都産業大学、2012年3月16日
8. 宇野由紀、渋谷枝里香、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* の細胞外蓄積物質について日本植物形態学会第24回大会、姫路、2012年9月14日
9. 鈴木玲子、宇野由紀、鍵和田聡(奈良女子大学理学部)、西井一郎(シンガポール Temasek 生命科学研究所)、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* B 品種における脂質の分泌に伴うオイルボディの動態、日本植物学会第76回大会、姫路、2012年9月15日
10. 木村篤人(東京大学大学院薬学系研究科)、Botryococcene 合成酵素の機能解析、酵素工学会第68回講演会、東京、日本、2012年10月5日
11. Yuki Uno, Reiko Suzuki, Naoko Ito, Satoshi Kagiwada(奈良女子大学理学部), Ichiro Nishii(シンガポール Temasek 生命科学研究所), Tetsuko Noguchi(奈良女子大学理学部), Biosynthesis and accumulation of lipids and polysaccharides in a colonial green alga, *Botryococcus braunii* race B、第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月23日

12. 岡田 峻、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、微細藻 *Botryococcus braunii* B 品種における methylerythritol phosphate (MEP)経路の性状、平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京、2013 年 3 月 27 日
13. Jon Freeman、Dengfeng Yanng、木村篤人、森田洋行(東京大学大学院薬学系研究科)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、アミノ酸変異導入による Botryococcene 合成酵素の触媒機能の解明、日本薬学会第 113 年会、横浜、2013 年 3 月 29 日
14. 亘真智子、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* における ER・ゴルジ体・TGN の動態 - B 品種と A 品種の比較 - 日本植物形態学会第 25 回大会、札幌、2013 年 9 月 12 日
15. 宇野由紀、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* のコロニー形成について 日本植物形態学会第 25 回大会、札幌、2013 年 9 月 12 日
16. 三井菜々香、野口哲子、鍵和田 聡(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* のトリテルペン合成酵素群の出芽酵母での発現と細胞内局在、日本植物学会第 77 回大会、札幌、2013 年 9 月 14 日
17. 佐橋周作、木村篤人、淡川孝義、森田洋行(東京大学大学院薬学系研究科)、方波見 彰仁、梅野太輔(千葉大学工学部)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、ランダム変異導入による Botryococcene 合成酵素の分子進化、酵素工学会 第 70 回講演会、東京、2013 年 10 月 25 日
18. 内田英伸、住本惟光、福永有佑、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子の単離と機能解析、第 29 回ユージュレナ研究集会、筑波大学、2013 年 11 月 9 日
19. 内田英伸、住本惟光、福永有佑、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子の単離と機能解析、微細藻類バイオマス利用国際シンポジウム、中央大学駿河台記念館、2013 年 11 月 21 日
20. 内田英伸、住本惟光、福永有佑、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子の単離と機能解析、第 10 回クラミドモナス研究会、岡崎コンファレンスセンター、2013 年 11 月 30 日
21. 内田英伸、住本惟光、福永有佑、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子の単離と機能解析、第 55 回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス、2014 年 3 月 18 日
22. 宇野由紀、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* B 品種のコロニーースと細胞壁の細胞化学的解析、日本植物形態学会第 26 回大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 9 月 11 日

23. 鈴木玲子、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* におけるリピッドボディの消長に伴う小胞体の構造・分布の解析、日本植物学会第 78 回大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 9 月 13 日
24. 三井菜々香(奈良女子大学理学部)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、野口哲子、鍵和田聡(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus* 由来炭化水素(Botryococcene)生産酵母での細胞内脂質蓄積部位の形態、日本植物学会第 78 回大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 9 月 14 日
25. 三橋隆章、松田侑大、淡川孝義、阿部郁朗(東京大学大学院薬学系研究科)、セスタテルペン合成酵素の探索、第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014、東京、2014 年 10 月 15 日
26. 宇野由紀、鈴木玲子、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* のコロニーシースの構築と役割、日本植物形態学会第27回大会、新潟、2015 年 9 月 5 日
27. 宇野由紀、鈴木玲子、野口哲子(奈良女子大学理学部)、緑藻 *Botryococcus braunii* のコロニーシースの構築、日本植物学会第79回大会、新潟、2015 年 9 月 8 日
28. 中村浩正、高田健太郎、松永茂樹(東京大学大学院農学生命科学研究科)、河岸洋和(静岡大学大学院農学研究科)、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、植物ホルモン様化合物が微細藻類 *Botryococcus braunii* Showa 株のテルペン生合成に及ぼす作用に関する研究、ユージェレナ研究会第 31 回研究集会、2015 年 11 月 7 日
29. Tsou Chung Yau、内田英伸、福永有佑、Victor Marco Emmanuel Ferriols(東京大学大学院農学生命科学研究科)、鍵和田 聡(奈良女子大学理学部)、松永茂樹、岡田茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、*Botryococcus braunii* B 品種におけるスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子群の単離と機能解析、第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学、2016 年 3 月 20 日
30. 中村浩正、高田健太郎、松永茂樹、岡田 茂(東京大学大学院農学生命科学研究科)、河岸洋和(静岡大学大学院農学研究科)、植物ホルモン様化合物が微細藻類 *Botryococcus braunii* Showa 株のテルペン生合成に及ぼす作用に関する研究、平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 29 日
31. Mana Hirose, Satoshi Kagiwada(奈良女子大学理学部)、Ichiro Nishii(シンガポール Temasek 生命科学研究所)、Tetsuko Noguchi(奈良女子大学理学部)、Hydrocarbon biosynthesis and secretion in a green alga, *Botryococcus braunii*, The 2nd International Conference on Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts, San Diego, USA, 2012 年 6 月 11 日
32. Jon O Freeman(東京大学大学院薬学系研究科)、Structural Engineering of Template Assembled Synthetic Proteins, The International Conference of Natural Product Biosynthesis, Hyogo, Japan, 2012 年 6 月 17 日
33. Reiko Suzuki, Yuki Uno(奈良女子大学理学部)、Ichiro Nishii(シンガポール Temasek 生命科学研究所)、Satoshi Kagiwada, Tetsuko Noguchi(奈良女子大学理学部)、Biosynthesis and accumulation of hydrocarbons and polysaccharides in a colonial green alga, *Botryococcus braunii*, Race B, 10th International Phycological Congress, Orlando (USA), 2013 年 8 月 8 日



34. Takahiro Mori, Lihan Zhang, Takayoshi Awakawa, Tatsuya Ito, Yoshinori Asakawa, Ikuro Abe (東京大学大学院薬学系研究科)、Functional analysis of prenyltransferase TleC、1st European Conference on Natural Products、Frankfurt、Germany、2013年9月23日
35. Shusaku Sahashi, Atsuto Kimura, Takayoshi Awakawa, Hiroyuki Morita (東京大学大学院薬学系研究科)、Akinori Katabami, Daisuke Umeno (千葉大学工学部)、Shigeru Okada (東京大学大学院農学生命科学研究科)、Ikuro Abe (東京大学大学院薬学系研究科)、Directed evolution of botryococcene synthetic enzymes using random mutation、International Conference on Medicinal Chemistry & Timmerman Award 2013、Indonesia、2013年9月28日
36. Takahiro Mori, Lihan Zhang, Takayoshi Awakawa, Hiroyuki Morita, Ikuro Abe (東京大学大学院薬学系研究科)、“Function analyses of prenyltransferases TleC and MpnD、Gordon Research Conference - Marine Natural Products、Ventura、CA、USA、2014年3月3日.
37. Atsuto Kimura, Takahiro Mori, Hiroyuki Morita (東京大学大学院薬学系研究科)、Shigeru Okada (東京大学大学院農学生命科学研究科)、Ikuro Abe (東京大学大学院薬学系研究科)、Structure-Function Analysis of Botryococcene Synthase、National Symposium on Natural Products Chemistry XIX、Samarinda、Indonesia、2014年10月11日
38. Atsuto Kimura, Takahiro Mori, Hiroyuki Morita (東京大学大学院薬学系研究科)、Shigeru Okada (東京大学大学院農学生命科学研究科)、Ikuro Abe (東京大学大学院薬学系研究科)、Structure-Function Analysis of Botryococcene Synthase、AIMECS 11、Tokyo、Japan、2014年12月1日
39. Katabami Akinori, Shun Okada, Kentaro Takada, Shigeki Matsunaga, Shigeru Okada (東京大学大学院農学生命科学研究科)、Cloning and characterization of MEP pathway genes in the microalga *Botryococcus braunii*, race B、TERPNET2015、Vancouver、Canada、2015年6月2日
40. Hidenobu Uchida, Victor Marco Emmanuel Ferriols, Koremitsu Sumimoto, Shigeki Matsunaga, Shigeru Okada (東京大学大学院農学生命科学研究科)、Isolation and characterization of two squalene epoxidase genes from *Botryococcus braunii*, race B、TERPNET2015、Vancouver、Canada、2015年6月2日
41. Reiko Suzuki, Ichiro Nishii, Tetsuko Noguchi (奈良女子大学理学部)、A 3D analysis of the endoplasmic reticulum structural transformation related to hydrocarbon secretion in a green alga *Botryococcus braunii*. The 2nd East-Asia Microscopy Conference (EAMC2)、Himeji、Japan、2015年11月25日

#### (4)知財出願

##### ①海外出願 (2件)

1. 名称:球状多孔質酸化チタンナノ粒子の合成方法、該合成方法により製造される球状多孔質酸化チタンナノ粒子、及び該球状多孔質酸化チタンナノ粒子からなる遺伝子銃用担体  
発明者:小広和哉, 王鵬宇, 大濱 武

出願人: 公立大学法人高知工科大学  
 出願日: 2012/1/27  
 出願番号: PCT/JP2012/51884  
 出願国: 総ての指定国

2. ボツリオコッカスブラウニーの単細胞単離方法及び単細胞培養方法  
 発明者: 大濱 武, 山崎 朋人, 朴 炫宣, 俣 利園, 孔 凡涛  
 出願人: 公立大学法人高知工科大学  
 出願日: 2012/2/13  
 出願番号: PCT/JP2012/53300  
 出願国: 総ての指定国

(5) 受賞・報道等

① 受賞

マリンバイオテクノロジー学会賞、岡田 茂、平成 26 年 5 月 31 日

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011 年 6 月 25 日	チーム内ミーティング (非公開)	東京大学	14人	研究進捗報告のためのミーティング
2012 年 3 月 9 日	チーム内ミーティング (非公開)	東京大学	16人	研究進捗報告のためのミーティング
2012 年 9 月 27 日～28 日	チーム内ミーティング (非公開)	高知工科大学	13人	研究進捗報告のためのミーティング
2012 年 10 月 27 日～11 月 1 日	チーム内ミーティング (非公開)	東京大学	3 人	研究推進のための打合せ (米国ケンタッキー大学 Joe Chappell 教授の招聘)
2013 年 1 月 15 日	チーム内ミーティング (非公開)	東京大学	14人	研究進捗報告のためのミーティング
2011 年 11 月 26 日	女子中高生のための関西科学塾	奈良女子大学	6 名 (高校生 5 名 + 保護者 1 名)	「世界が注目！油をたくさん分解する微細藻類 -電子顕微鏡で観察しよう-」とのテーマで、野口・鍵和田が実験を担当した。
2013 年 3 月 16, 17 日	女子中高生のための関西科学塾	奈良女子大学	6 名 (高校生)	「世界が注目！油をたくさん分解する微細藻類 -電子顕微鏡で観察しよう-」とのテーマで、野口が実験を担当した。
2013 年 7 月 19 日	チーム内ミーティング (非公開)	東京大学	12 人	研究進捗報告のためのミーティング

2013年8月24日	四天王寺高校大学訪問	奈良女子大学	15名(高校生)	「細胞小器官の構造」とのテーマで、Botryococcus の顕微鏡観察実験を鍵和田が担当した。
2013年10月7日	チーム内ミーティング(非公開)	東京大学	4人	研究進捗報告のためのミーティング
2014年3月12日	特別講演	東京大学中島董一郎記念ホール	25人	学術交流
2014年3月19日	特別講演	東京大学中島董一郎記念ホール	22人	学術交流
2014年8月9日	チーム内ミーティング(非公開)	東京大学農学部	11人	研究進捗報告のためのミーティング
2015年4月28日	チーム内ミーティング(非公開)	奈良女子大学理学部	6人	研究進捗報告のためのミーティング

## §6 最後に

炭化水素を大量に生産し、かつ細胞外に分泌するという、非常にユニークな性質を持つ *Botryococcus braunii* の魅力に惹かれて四半世紀以上過ごしてきた研究代表者としては、本藻種について明らかにしたい事が山程もある。それ故にやりたい事を詰め込みすぎて、今にして思えば、少し「欲張った」内容の研究プロジェクト提案であったかもしれないとの反省はある。しかし、当プロジェクトで挙げた個別の課題は、どれも本藻種を理解し、有効利用を進めていく上で、不可欠なものであるとの思いには変わりがない。本藻種は他生物と比べて遙かに増殖速度が遅い故、研究の進行速度もそれに左右されると言うのは言い訳に過ぎないが、新しい事が分かれば分かるほど、次の疑問点が現れる点で、*B. braunii* はやはり面白い。得られた成果は現時点では基礎科学的知見ではあるが、形質転換技術が確立すれば、応用へ直結できる内容も含んでいる。本 CREST により「Botryococcus 学」の進展に少しは貢献することができた様に考えている。領域総括、アドバイザーおよび JST 関係各位に心より感謝申し上げます。