

「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

H28 年度
実績報告書

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

- ・包括的プロテオミクス解析
- ・脂肪酸の代謝プロファイリング解析
- ・単離有用遺伝子の機能解析
- ・有用遺伝子導入ユーグレナの機能評価

(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

- ・新規バクターの構築およびユーグレナ内在性プロモーターの形質転換系への利用と機能評価
- ・遺伝子導入によるユーグレナの光合成機能強化
- ・FBP/SBPase 導入ユーグレナにおけるワックスエステル高生産条件の検討
- ・有用遺伝子導入ユーグレナの作製と生理機能評価
- ・ワックスエステル生合成系に関わる酵素タンパク質の同定

(3)「中澤」グループ

① 主たる共同研究者:中澤 昌美 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科、助教)

② 研究項目

- ・NADP+依存型ピルビン酸オキシドレダクターゼの酸化還元調節機能の解明とその応用
- ・ワックス生産性向上に関わるミトコンドリア電子伝達系の役割解明

(4)「柏山」グループ

- ① 主たる共同研究者: 柏山 祐一郎 (福井工業大学環境情報学部、教授)
- ② 研究項目
 - ・パラミロン蓄積が亢進する窒素欠乏条件下の細胞内窒素フラックスの解明
 - ・C/N バランスに着目したユーグレナの細胞リズムの解析と制御因子の解明

(5)「粟井」グループ

- ① 主たる共同研究者: 粟井 光一郎 (静岡大学大学院理学領域、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ユーグレナ膜脂質解析法の確立
 - ・嫌気応答による膜脂質代謝変化の解析

(6)「早出」グループ

- ① 主たる共同研究者: 早出 広司 (東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門、教授)
- ② 研究項目
 - ・野生株ユーグレナ最適化培養条件の確立
 - ・形質転換ユーグレナの最適化培養条件の検討

§ 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)を生産する能力を持つ。本研究では、パラミロンおよびワックスエステル代謝の分子機構解明とその効率的な生産系の構築を目的としている。プロジェクト 5 年目となる平成 28 年度は主に以下のような成果を得た。

これまでに実施したトランスクリプトーム解析データより、今年度はパラミロンおよびワックスエステル代謝関連酵素を同定し、機能解析を進めた。パラミロンはユーグレナ独自の貯蔵多糖であり、ス約 700 個のグルコースが β -1,3-結合して形成された糖鎖のらせん構造による強固な顆粒状構造を有している。BlastX サーチにより植物のカロース合成酵素相同遺伝子 (EgGSL2) を見出し、EgGSL2 遺伝子サイレンシング細胞ではパラミロンの蓄積が顕著抑制されること、および UDP-グルコース取込み活性とパラミロン顆粒の *in vitro* 生成実験から、EgGSL2 がパラミロン合成酵素として機能していることを明らかにした(原著論文3)。

ワックスエステル生合成調節機構に関して、タンパク質キナーゼ阻害剤処理により嫌気応答後のワックスエステル蓄積が顕著に抑制され

ることから、リン酸化修飾が代謝調節の鍵になっていることを明らかにし、リン酸化プロテオーム解析より、そのリン酸化制御の候補となるプロテインキナーゼを複数個取得に成功し、嫌気応答時の代謝制御機構解明の足掛かりを得た。またユーグレナに対してFeイオンビームを照射することで、熱ストレス耐性ユーグレナ変異株の取得にも成功している。同変異株は野生株の生育が著しく低下する 32 度においても良好な生育を示すため、工場排気ガス通気培養による熱ストレス障害の解決が期待される(原著論文1)。他にもトランスクリプトーム解析データ情報に基づき、レドックス関連遺伝子とユーグレナの光応答性の関連を遺伝子サイレンシングにより検証した(原著論文2)。ユーグレナにおいて非常にユニークであり、ワックスエステル合成と好気代謝の分岐点となっている 2-ケト酸の好気・嫌気状態での代謝を理解するために、遺伝子サイレンシングの手法を用いてピルビン酸および 2-ケトグルタル酸の代謝酵素の機能分担を検証した。その結果、好気状態・グルコース炭素源下でのユーグレナの生育に、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体および 2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼが必須であること、酸素感受性酵素 NADP⁺依存型ピルビン酸オキシドレダクターゼは、好気状態でのピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体を代替できないこと、嫌気状態での

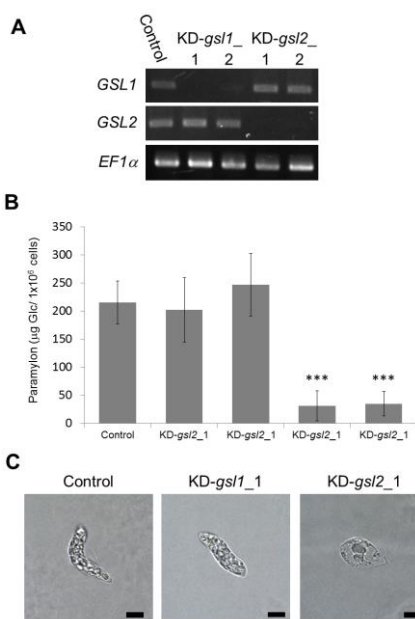


図. パラミロン合成酵素の同定. 二本鎖 RNA 導入により GSL2 遺伝子の発現を抑制した細胞(A)では、細胞内パラミロン量(B)とパラミロン顆粒の顕著な減少が観察される。

ワックスエステル合成には酸素感受性酵素 NADP⁺依存型ピルビン酸オキシドレダクターゼが必須であること、を明らかにした。

【主要論文】

1. Yamada, K., Kazama, Y., Mitra, S., Marukawa, Y., Arashida, R., Abe, T., Ishikawa, T., Suzuki, K. Production of a thermal stress resistant mutant *Euglena gracilis* strain using Fe-ion beam irradiation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80(8): 1650-1656, 2016
2. Ozasa, K., Won, J., Song, S., Tamaki, S., Ishikawa, T., Maeda, M. Temporal change of photophobic step-up responses of *Euglena gracilis* investigated through motion analysis. *PLoS One*, 12(2): e0172813, 2017
3. Tanaka, Y., Ogawa, T., Maruta, T., Yoshida, Y., Arakawa, K., Ishikawa, T. Glucan Synthase-Like 2 is indispensable for paramylon synthesis in *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.*, 2017