

「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

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

・ *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

(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)「奈良女子大文学部」グループ

① 主たる共同研究者: 野口哲子 (奈良女子大文学部生物学科、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

(4)「高知工科大学環境工学群」グループ

① 主たる共同研究者: 大濱 武 (高知工科大学環境理工学群、教授)

② 研究項目

・ *Botryococcus* への外来遺伝子導入あるいは *Botryococcus* 遺伝子の他藻類への導入発現系の確立

§ 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)

Botryococcus braunii のトリテルペン生合成酵素遺伝子の発現モニタリング

B. braunii が生産するトリテルペン類の内、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、スクアレンは SSL-1 と SSL-2 の組合せ、あるいは *Botryococcus squalene synthase* (BSS) による 2 通りの生成経路が存在する。これらの遺伝子発現がどのように制御されているかの知見を得るために、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細胞において mRNA の蓄積量が最大となり、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量の mRNA が蓄積していた。また、SSL-1-3 それぞれに特異的な抗体を作成した。今後は翻訳レベルでの酵素活性発現の制御を調べるとともに、各酵素遺伝子の転写調節領域の詳細な解析を進める。

Botryococcus braunii のテルペン生合成前駆体供給メカニズムの解明

B. braunii が生産するトリテルペン類の前駆体であるイソペンテニル二リン酸、およびジメチルアリル二リン酸は、メチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路により供給される。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可能性がある。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、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、部位や時期により発現が異なることが知られているのに対し、ゲノム情報が得られている微細藻類では 1 種の DXS の存在しか知られていない。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。大腸菌で発現させたこれら 3 種のリコンビナント DXS の諸性状を調べたところ、温度感受性以外は互いに良く似ていた。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 合成酵素活性の高い時期に多くなっていた。今後は MEP 経路の他酵素についても詳細な性状の検討を進め、それらの発現が炭化水素生産とどのように関わっているかを明らかにしていく。

Botryococcus braunii のトリテルペン生合成酵素の構造および機能解析

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。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。本年度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の得られる系を確立した。現在、様々な条件下で結晶化を行っている。これに関連し、SSL-1〜3の機能改変に取り組む上でのモデルシステムとして、同じ植物由来二次代謝酵素であるポリケチド合成酵素の構造解析および機能改変を行い、その活性中心における基質鎖長の認識特異性等を検討した²⁻⁴⁾。また、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、SS の 72 番目および 288 番目のフェニルアラニン、204 番目のアラニンに相当する SSL-1〜3 の活性中心キャビティ構成アミノ酸残基が、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。そこで活性中心キャビティの形状や容積を変化させることを目的とし、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精査を進めている。

Botryococcus braunii の炭化水素分泌メカニズムの解明

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つ。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。本年度は高圧急速凍結固定による電子顕微鏡観察により、*B. braunii* B 品種の細胞内微細構造を観察する条件検討を行った。直鎖状炭化水素を生産する A 品種と異なり、B 品種では細胞間マトリクスに存在する脂溶性物質が多いため、オスミウム酸によりコントラストを上げることが難しかった。またナイルレッド染色による蛍光顕微鏡解析と電子顕微鏡観察の併用により、細胞周期を通したリピッドボディと液胞の動態・微細構造変化、及び、炭化水素の細胞外への分泌の時期・部位・様式を明らかにした。さらに分裂をしていない細胞に炭化水素生成を誘導させる条件の検討を行った。今後は SSL-1〜3 の特異的抗体を用いた免疫染色による、細胞内での炭化水素生産の場を明らかにしていく。

Botryococcus braunii の形質転換技術の開発

B. braunii における炭化水素生産・分泌の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。本藻種は zeocin に対して感受性であることを明らかにし、zeocin 耐性を賦与する遺伝子 ble を本藻由来の rbcS2 (Rubisco 小サブユニット)、スクアレン合成酵素のプロモーター下流に配置した DNA construct を作製した。これをパーティクルガンにより、様々なガス圧 (800-1600 psi) で対数増殖期の *B. braunii* 群体に導入することを試みたが、形質転換体は得られなかった。この原因として、炭化水素関連化合物と多糖からな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 が粒子から脱離している可能性が高いと考えた。そこで *B. braunii* 群体から、単細胞を高効率で分離する方法を模索した結果、既報のグリ

セリンの他、いくつかの細胞毒性の無い試薬処理により可能であることが解った。今後はこの単細胞 *B. braunii* を宿主とし、パーティクルガン法による遺伝子導入を試みる。また、本藻種のプロトプラスト化も試み、エレクトロポレーション法による遺伝子導入も実施する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

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*, vol. 185-186, pp.309-320, 2012 (DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.01.002)
2. Ikuro Abe, “Novel applications of plant polyketide synthases”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 16, 2012 (DOI:10.1016/j.cbpa.2011.12.016)
3. Yoshihiko Shimokawa, Hiroyuki Morita and Ikuro Abe, “Benzalacetone synthase”, *Front. Plant. Sci.*, vol. 3, Article 57, 2012 (DOI: 10.3389/fpls.2012.00057)
4. Ikuro Abe, “Biosynthesis: An HR-PKS Stereo Surprise”, *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, No. 4, pp.322-323, 2012 (DOI: 10.1038/nchembio.924)