「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礎技術の創出」
平成22年度採択研究代表者

H24 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

(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)単独による、2 通りの生合成経路が存在する。前年度に引き続き、これらの酵素の発現がどの様に制御されているかを調べた。SSl-1,2 および 3 に対する抗体を作成し、藻体ホモジネート中におけるこれら 3 種のトリテルペン合成酵素の検出が可能になった。その結果、botryococcene およびスクアレンの合成は、転写レベル以外の調節を受けている可能性が示唆された。また、SSl-1～3 遺伝子の転写調節領域につき、塩基配列情報の取得を継続している。

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 による大量のトリテルペン生産を支えている前駆体供給経路、メチルエリスリトールリン酸 (MEP)経路の解析を、昨年度に引き続き行った。MEP 経路を構成する 7 種の酵素の内、他酵素とは異なる遺伝子発現パターンを示した 2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (IspD)につき、そのリコンビナントタンパク質の酵素学的性状を調べた。その結果、*B. braunii* のリコンビナント IspD は、高等植物シロイヌナズナや大腸菌の IspD に較べ、より高い触媒能を有する事が明らかになった。 IspD の遺伝子発現パターンが他酵素とは異なっていたことから、今後は MEP 経路における各酵素遺伝子の発現調節と炭化水素生産との関連を明らかにしていく。

Botryococcus braunii のトリテルペン代謝メカニズムの解明

B. braunii の B 品種が生産するトリテルペンには、botryococcene とスクアレンの 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、スクアレン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。そこで本藻におけるスクアレン代謝を理解するため、Showa 株からスクアレンエポキシダーゼ様遺伝子を探索した。その結果、他生物由来のスクアレンエポキシダーゼと相同性を示す全長 cDNA が単離され、その機能解析を酵母の変異株を用いて行った。

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、SSL2 と SSL3 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、昨年度に引き続き、①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、ようやく結晶化に成功することができた。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。一方、②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わ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、その側鎖のわずかな大きさあるいは極性の違いによって 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。次に、③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 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。その結果、SSL-1 遺伝子配列中にアミノ酸置換が認められる2つの SSL-1 変異酵素 LY4 および LY8 を取得した。アミノ酸配列を比較したところ、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。両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* における酵素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。

Botryococcus braunii の炭化水素分泌メカニズムの解明

B. braunii は、脂質生産で注目されている微細藻類で唯一細胞外に多量の炭化水素を蓄積する。それ故に電子顕微鏡試料作製が難しく、関連する報告は全くない。H23 年度に高圧急速凍結固定による *B. braunii* B 品種の電子顕微鏡試料作成法を確立し、ナイルレッド染色による蛍光顕微鏡法と併用して、リピッドボディの細胞周期を通し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。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. 細胞内リピッド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. リピッドボディが増大する時期に Botryococcene の初期反応（MEP 経路）の場と

推定される葉緑体とリピッドボディを繋ぐ小胞体が存在し、リピッドボディの消失期にリピッド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。今後、超高圧電子顕微鏡により、厚い切片を用いて葉緑体、リピッドボディ、小胞体の三次元立体構築を行い、葉緑体→(小胞体)→リピッドボディ→(小胞体)→細胞膜への輸送経路を明らかにする。
Botryococcene 合成の化学反応経路が明らかになり、次の研究課題は各反応部位である。MEP 経路に関与する酵素タンパク質群は葉緑体移行シグナルを持つが、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。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、モノクローナル抗体を再度作製し、炭化水素生成の各反応部位を確定していく。

Botryococcus braunii の形質転換技術の開発

Showa 株 (B 品種)を細胞毒性が無く高い水溶性の化合物 18 種に曝すことにより単細胞の調製を試みた。4 種の化合物で、コロニー中の細胞の約 70%以上が単細胞として放出されることを突き止め、またそのメカニズムについても仮説を提出した。また得られた単細胞を密集させて培養することで 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 株の単細胞からコロニーを再生させるには到らなかった為、形質転換体の宿主とするには至っていない。一方 UTEX 572 株(A 品種)の場合、超音波処理によって得られた単細胞からコロニーを再形成させることに成功した。また得られた単細胞を、酵素混合液で処理することにより完全なプロトプラストを約 5%の率で調製することができた。得られたプロトプラストの電気的細胞融合により、ごく少数ではあるが 2 核を持つ融合細胞の作成にも成功した。Showa 株については、オイル等の含量が少ない小さなコロニーを宿主として用いたパーティクルガン法による形質転換を継続して行う。また UTEX 572 株から得られた単細胞を宿主とする形質転換も試みる。

金粒子が DNA の担体として、パーティクルガン法に用いられてきたが、多孔性の金属酸化物である TiO_2 を用いて単細胞緑藻のクラミドモナスを形質転換することに成功した(Hou et al. 2013)[1)]。このことにより、TiO_2 の微細な孔に低分子化合物やタンパクを浸漬させて、細胞内に導入させることが可能であることを示した(PCT/JP2012/51884)。

§3. 成果発表等

(3－1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Liyuan Hou, Pengyu Wang, Fantao Kong, Hyunsun Park, Kazuya Kobiro and Takeshi Ohama, "Mesoporous TiO2 nanoparticles: A new material for biolistic

bombardment", Phycological Research, vol. 61, No. 1, pp, 58-60, 2013 (DOI:10.1111/j.1440-1835.2012.00671.x)