

「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」

H27 年度  
実績報告書

平成24年度採択研究代表者

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
  - ・新規ベ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)「鈴木」グループ

- ① 主たる共同研究者:鈴木 健吾 (株式会社ユーグレナ研究開発部、部長)
- ② 研究項目

- ・ランダム変異株および新奇ユーグレナ株の最適培養条件の確立、パラミロン及び脂質生産能力の評価
- ・火力発電所における排気ガスを用いた最適培養条件の検討
- ・形質転換ユーグレナのワックスエステル発酵生産に適した培養条件の確立

(4)「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<sup>+</sup>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

## § 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 ( $\beta$ -1,3-グルカン) 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、ユーグレナワックスエステル生産性増大のための基盤技術の確立を目指し、ワックスエステル生産実用化への道筋を付けることを目的としている。プロジェクト 4 年目となる平成 27 年度は以下の研究を実施し、成果を得た。

ユーグレナのトランスクリプトーム解析を実施し、好気から嫌気条件にシフトした際の発現遺伝子を調べた結果、ユーグレナの発現遺伝子約 28,000 のうち、2 倍以上の発現変動を示したのは 88 遺伝子のみであった<sup>1)</sup>。これらにワックスエステル代謝関連遺伝子は含まれておらず、嫌気応答時のワックスエステル代謝は、遺伝子レベルでは制御を受けないことが示唆された。さらに包括的プロテオーム解析の結果、ワックスエステル代謝関連酵素は、嫌気に対しタンパク質レベルでも顕著な発現変動を示さなかった。一方、タンパク質キナーゼ阻害剤は、嫌気応答時のワックスエステル蓄積を効果的に抑制したことから、好気/嫌気に応答したワックスエステル代謝は、リン酸化による翻訳後修飾を介して調節されることが強く示唆された。

また昨年度に引続き、ラン藻由来のカルビン酸回路構成酵素 FBP/SBPase 遺伝子導入ユーグレナ株 (EpFS 株) について解析を進め、光合成機能強化がユーグレナのパラミロンを含めたバイオマス生産性向上 (培地 1L 当たりのパラミロン量で約 2 倍に増加) にも有用であることを示すとともに<sup>2)</sup>、光合成機能強化および糖代謝改変のための新たなターゲットとして、カルビン回路の律速因子であり、細胞質ではパラミロン合成とワックスエステル合成の分岐点に位置する FBPase に着目し機能解析を進めた。その結果、葉緑体および細胞質でそれぞれ機能する FBPase を同定したことに加え<sup>3)</sup>、遺伝子サイレンシング実験により特に細胞質型 FBPase 発現抑制株において、細胞数、バイオマス量が増加する傾向が認められ (表 1)、今後代謝改変によるバイオマス増産のための新たなターゲットとなり得ることを示した。

また、細胞質型 FBPase 発現抑制株を用いた解析により、ユーグレナでは一般的なトリオースリン酸以外の形態でも葉緑体から細胞質へ輸送されることが示唆された。

昨年までに、チューブ型のバイオリクター (700L 容量) を利用し、火力発電所からの排気ガスによって光合成を促進し、効率的なユーグレナ細胞の増殖を誘導することができたが、一方で排気熱や亜硫酸ガスによる生育抑制が問題点として挙げられた。そこで、問題解決の一案として重イオンビーム照射による熱および亜硫酸ガス耐性株取得を試みた。その結果、野生株に比べ 32°C で有意に増殖可能な高温耐性株および 100  $\mu$ g/ml 濃度のピロ亜硫酸に対して耐性を示す亜硫酸耐性株を獲得した。

表 1 ユーグレナにおけるバイオマス生産に及ぼす細胞質型 FBPase 抑制の影響

	細胞密度 ( $\times 10^5$ cells ml <sup>-1</sup> )	バイオマス量 (mg DW L <sup>-1</sup> )	パラミロン量 (% of DW)
100 $\mu$ mol photons/m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> , 0.04% CO <sub>2</sub>			
-dsRNA	5.7 $\pm$ 0.5	457.7 $\pm$ 27.2	3.1 $\pm$ 0.4
KD-EgFBPaseIII	6.2 $\pm$ 0.6*	491.7 $\pm$ 25.7**	3.2 $\pm$ 0.3
250 $\mu$ mol photons/m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> , 0.3% CO <sub>2</sub>			
-dsRNA	7.1 $\pm$ 0.7	802.0 $\pm$ 77.8	11.1 $\pm$ 1.6
KD-EgFBPaseIII	7.2 $\pm$ 0.6	826.3 $\pm$ 59.4	10.3 $\pm$ 2.4

\*p<0.05, \*\*p<0.01

【主要論文】

- 1) Yoshida Y., et al. (2016) De novo assembly and comparative transcriptome analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic conditions. BMC Genomics, 17:182
- 2) Ogawa T., et al. (2015) Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. Biotechnol. Biofuel., 8:80
- 3) Ogawa, T., et al. (2015) Characterization and physiological role of two types of chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatases in *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys., 575: 61-68