

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04547

研究課題名(和文) 燃料生産を目指した微細藻由来直鎖炭化水素の生合成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on biosynthesis of linear hydrocarbons by microalgae from the viewpoint of biofuel productions

研究代表者

岡田 茂 (Okada, Shigeru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：00224014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：緑藻や珪藻等の微細藻類は、脂肪酸を前駆体とする直鎖状炭化水素を、少量ではあるが生産する。また、緑藻*Botryococcus braunii*は、分子の末端に二重結合を有する特異な直鎖アルケンを大量に蓄積する。本研究では、これらの直鎖状炭化水素の生合成に関与する酵素遺伝子の特定を試みた。その中で、ある種の微細緑藻から最近発見されたfatty acid photodecarboxylase (FAP) 遺伝子が、*B. braunii*においても発現している事、また、当該FAPは他藻種由来のFAP同様に、パルミチン酸およびオレイン酸から脱炭酸反応により、直鎖状炭化水素を生産できる事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Microalgae such as green algae or diatoms are known to produce small amounts of linear hydrocarbons derived from fatty acids. The microalga, *Botryococcus braunii* also accumulates large amounts of unique linear alkenes that have a terminal double in their molecules. In this study, identification of genes concerned with biosynthesis of linear hydrocarbons in microalgae was tried. Genes coding for fatty acid photodecarboxylase (FAP), a new enzyme recently discovered from green microalgae were also expressed in *B. braunii*. FAP proteins of *B. braunii* could produce linear hydrocarbons from fatty acids such as palmitic acid or oleic acid.

研究分野：水産化学

キーワード：微細藻類 バイオ燃料 直鎖アルカン 直鎖アルケン 脂肪酸 生合成酵素 炭化水素 *Botryococcus braunii*

1. 研究開始当初の背景

近年、石油に代表される化石燃料の燃焼に伴う二酸化炭素の排出により、地球規模での環境悪化が懸念されていることから、再生産可能なバイオ燃料が注目を浴びている。そのような状況下、生産の場を巡って食用農作物と競合しないことや、単位日照面積当たりの炭酸固定速度が大きいことから、微細藻類が生産・蓄積する脂質を、バイオ燃料として利用する試みがなされている。多くの微細藻類が、著料蓄積する脂質はトリグリセリドであり、脂肪酸メチルエステルへと変換することで、ディーゼル系燃料としての利用が可能である。しかしながら脂肪酸由来の燃料は、分子内に酸素原子を含んでいるため、単位重量当たりの燃焼熱が比較的小さいという難点がある。これに対し、炭素原子と水素原子のみからなる炭化水素は、単位重量当たりの燃焼熱が大きいことから、航空燃料としての用途が考えられている。微細藻類の多くは、トリグリセリドに加えて、炭化水素を生産することが知られている。例えば緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii* や海産珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* には、奇数個の炭素鎖からなる *n*-ヘプタデカン等の直鎖状炭化水素が存在する。しかしながら、それらの含量は通常、藻体乾燥重量の1%以下であり、燃料としての利用は難しい。例外的に大量の炭化水素を生産・蓄積する微細藻類として、トレボクシア藻綱の *Botryococcus braunii* がある。本藻種には、奇数個の炭素鎖からなる直鎖状炭化水素を生産するA品種、トリテルペン系炭化水素を生産するB品種およびテトラテルペン系炭化水素を生産するL品種の3品種がある。これらの内、BおよびL品種が生産するテルペン系炭化水素は、スクアレン合成酵素に類似した酵素により合成されることが明らかになってきたが、A品種が生産する直鎖状炭化水素の生合成機構については、過去に断片的な知見が得られているのみで、生合成に関わる酵素の特定はされていなかった。これに対し、微細藻類以外の生物では、脂肪酸から派生する直鎖炭化水素の生合成に関与する酵素が、同定されつつあった。例えば、高等植物の葉の表面等に存在する直鎖炭化水素は、超長鎖脂肪酸をアルデヒドに還元する脂肪酸還元酵素 (CER3) および当該アルデヒドを炭化水素に変換するアルデヒドデカルボニラーゼ (CER1) により生成することが示された。また、シアノバクテリアに見られる直鎖アルケン、I型ポリケタイド合成酵素と同一性のあるタンパク質により、生合成されることも明らかになった。この様に、他種生物における脂肪酸由来の直鎖炭化水素の生合成に関与する酵素に関する情報が、入手可能になったことのみならず、モデル微細藻類である *C. reinhardtii* や *P. tricornutum* 等の遺伝子情報に加え、*B. braunii* の3品種についても、米国 Texas A&M 大学との連携により、ラン

スクリプトームデータベースが拡充されたことから、今まで詳細が不明だった微細藻類、特に *B. braunii* の直鎖状炭化水素の生合成に関与する酵素の特定を進める好機が来たものと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 微細藻類からの CER1 および CER3 類似酵素遺伝子の単離および機能同定

多様な微細藻類において存在が認められている直鎖状炭化水素は、高等植物が生産する炭化水素と化学構造が似ていることから、微細藻類においても CER1 および CER3 と同一性のあるタンパク質が、直鎖状炭化水素の生合成に関与している可能性が考えられた。そこで、*C. reinhardtii* や *P. tricornutum* 等のゲノムおよびトランスクリプトームデータベースから、CER1 および CER3 と同一性を示す遺伝子を探索し、それらの機能を異種生物発現系を用いて、同定することを目的とした。

(2) CER1 および CER3 の遺伝子発現メカニズムの解明

微細藻類における直鎖状炭化水素の生理機能は不明である。そこで(1)において CER1 および CER3 様遺伝子が取得できた場合、それらの発現調節領域をゲノム配列から取得し、その下流に緑色蛍光タンパク質等のレポーター遺伝子を融合させたキメラ遺伝子を作製する。このキメラ遺伝子で形質転換した当該微細藻種を、様々な環境下で培養し、その遺伝子発現レベルを解析することで、炭化水素生合成が、如何なる外的シグナルを受けて制御されているかを調べる。これにより、微細藻類における直鎖状炭化水素の生理的存在意義を明らかにすることを目的とした。

(3) CER1 および CER3 過剰発現株における炭化水素生産能の評価

(1) により CER1 および CER3 が得られた藻種につき、強力な内在性プロモーターによりこれらの遺伝子を過剰発現する藻株を作製し、それらの炭化水素生産能を評価することを目的とした。

(4) *B. braunii* A 品種における直鎖状炭化水素生合成酵素活性検出法の確立

B. braunii の A 品種の細胞ホモジネートにおいて、比較的炭素鎖が短い脂肪族アルデヒドを直鎖アルカンに変換する活性は検出されているが、実際に藻体中に見られる、炭素数が 23 以上の奇数で、分子の末端に二重結合を有する直鎖アルケンの生合成活性は検出されていない。*B. braunii* の A 品種に見られる直鎖アルケンは、他種微細藻類に見られる直鎖アルカン、および直鎖アルケンとは構造が異なる事から、CER1 等の既知酵素とは異なる酵素により生成する可能性も考えられる。そこで、新規酵素の探索を容易にするため、*B. braunii* の A 品種における炭化水素生合成酵素活性の *in vitro* 検出法の確立を目的とした。

(5) *B. braunii* A 品種における直鎖アルケン生合成関連酵素遺伝子の探索および機能同定

上記の様に、*B. braunii* A 品種では、他の微細藻類とは異なる酵素により直鎖アルケンが生合成されている可能性がある。そこで他生物種において見つかっている、*CER1* および *CER3* 様遺伝子とは異なるタイプの直鎖状炭化生合成関連酵素遺伝子ホモログを、トランスクリプトームデータベースから探索する。候補遺伝子が見つかった場合は、異種生物発現系を用いて、その機能同定を試みることを目的とした。

(6) *B. braunii* A 品種における直鎖アルケン生合成関連酵素遺伝子の発現解析

(5) により *B. braunii* A 品種における直鎖アルケン生合成関連酵素遺伝子が特定された場合、異なる培養条件下で *B. braunii* の A 品種を培養し、当該遺伝子の発現解析を行うことで、本藻種における直鎖状炭化水素の生物学的存在意義に関する知見を蓄積する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種高等植物に分布する *CER1* および *CER3* につき、塩基配列および演繹アミノ酸配列情報を、データベース上から網羅的に取得した。これらを探索子として、*C. reinhardtii*、*P. tricornutum* および *B. braunii* 3 品種のトランスクリプトームデータベースから、相同性のある遺伝子のスクリーニングを行った。また、各種高等植物の *CER1* および *CER3* の演繹アミノ酸配列につき多重整列を行い、種間を越えて良く保存されている領域のアミノ酸配列を参考に、縮重プライマーを作製した。研究代表者が保持している *B. braunii* の A および B 品種の cDNA ライブラリーを鋳型とし、当該縮重プライマーを用いて PCR により当該遺伝子の増幅を試みた。

(2) *B. braunii* の A 品種である Yamanaka 株を、改変 Chu13 培地を用いて通気培養した。定期的に一定量の藻体懸濁液を抜き取り、予め恒量を求めたガラスフィルター上に、藻体を吸引する過により回収した。得られた藻体を純水で洗浄後、フィルターごと凍結乾燥し、藻体の乾燥重量を求めた。これと並行して、得られた藻体における炭化水素含量を測定することで、活発に炭化水素生産を行っている時期を特定した。この炭化水素生合成が活発な時期の藻体につき、細胞ホモジネートを調製し、放射性同位体で標識した各種基質とインキュベートした。反応生成物を *n*-ヘキサンにより抽出し、薄層クロマトグラフィーで展開した後、炭化水素画分における放射能を測定することで、炭化水素生合成活性の検出を試みた。

(3) *B. braunii* の A 品種が生産する、分子の末端に二重結合を有する直鎖アルケンは、既往研究から *CER1* および *CER3* とは異なる酵素により生成している可能性も考えられた。

そこで、*B. braunii* のトランスクリプトームデータベースから、*CER1* および *CER3* 以外の、直鎖状炭化水素生産に関与する酵素と相同性のあるタンパク質をコードしている可能性のある遺伝子の探索を行った。得られた遺伝子につき、大腸菌あるいは酵母において異種生物発現を行い、それらの脂溶性成分につき GC-MS 分析を行うことで、当該酵素遺伝子の機能の特定を試みた。

4. 研究成果

(1) 微細藻類からの *CER1* および *CER3* 遺伝子取得の試み

高等植物における直鎖状炭化水素の生成が、*CER3* タンパク質による超長鎖脂肪酸のアルデヒドへの還元、および *CER1* タンパク質による当該アルデヒドからの脱炭酸反応によるものであることから、微細藻類、特に高等植物と同じ緑色植物に属する *C. reinhardtii* や *B. braunii* が生産する直鎖状炭化水素も、同様の機構により生成するものと推定し、微細藻類からの *CER1* および *CER3* 遺伝子の取得を試みた。データベース上で取得した各種高等植物由来の *CER1* および *CER3* の演繹アミノ酸配列の多重配列を行ったところ、単子葉植物、双子葉植物に共通して、非常によく保存されている領域が存在した。そこで高等植物由来 *CER1* および *CER3* の演繹アミノ酸配列を探索子として、*C. reinhardtii* や *B. braunii* のトランスクリプトームデータベースから、相同性を示す遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、低いながらも相同性を示す遺伝子を見出すことはできたものの、それらの演繹アミノ酸配列中には、高等植物において種間を越えて保存されている領域が見つからなかったことから、得られた配列は、機能を有する *CER1* および *CER3* をコードしていないものと考えられた。次に各種高等植物由来 *CER* において保存されているアミノ酸配列を基にした、数組の縮重プライマーを用い、各種微細藻類由来のゲノム DNA あるいは cDNA を鋳型として、PCR による当該遺伝子の増幅を試みた。プライマー特異的な PCR 産物が得られる事もあったが、それらの演繹アミノ酸配列には、高等植物由来 *CER* で保存されている領域は含まれていなかった。これらのことから、微細藻類に見られる直鎖状炭化水素は、高等植物同様に *CER1* および *CER3* の働きにより生成するものではないと考え、別の機構による炭化水素生合成の可能性を検証することとした。

(2) *B. braunii* の A 品種における直鎖長鎖アルケン生合成活性検出の試み

既往研究において、*B. braunii* の A 品種の培養藻体に、放射性同位体で標識したオレイン酸を添加すると、放射能を有する直鎖長鎖アルケンが蓄積することが確認されている。また、この長鎖アルケン生合成活性は、炭素鎖伸長反応の阻害剤であるトリクロロ酢酸や、脱炭酸反応の阻害剤であるジチオエリス

リトールの添加により阻害されることも判っている。しかしながら、藻体ホモジネートを用いた *in vitro* のアッセイ系において、この長鎖アルケンの生合成活性が確認されたことは無かった。これに対し、*B. braunii* の A 品種の藻体ホモジネートを、放射性同位体で標識したステアリン酸、あるいはオクタデカナルとともにインキュベートすると、放射能を有する *n*-ヘプタデカンが生成することが報告されている。そこで藻体ホモジネートを用いた *in vitro* のアッセイ系において、上記直鎖アルケンの生合成活性の検出を可能にすべく、種々条件検討を行った。*B. braunii* の藻体ホモジネートを調製する際には、通常、湿藻体を液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒を用いて細胞を破碎する。しかし、活発に炭化水素を生合成していると考えられる時期の Yamanaka 株から、この方法により調製した細胞ホモジネートを用いて、上記直鎖状炭化水素の生合成活性の検出を試みたが、明瞭な活性は検出できなかった。これは細胞の破碎が十分で無いことに由来する可能性が考えられた。*B. braunii* の個々の細胞は、「細胞外マトリクス」と呼ばれる藻体自身が生産する、弾性を有するポリマーにより繋ぎ止められて群体を形成しており、この細胞外マトリクスが緩衝剤となって、細胞の破碎を妨げている可能性がある。既往研究において、*in vitro* での *n*-ヘプタデカンの生合成活性が検出された株は、群体形成能が乏しく、細胞外マトリクスも脆弱であった。そこで、細胞破碎率の向上を求め、ガラスビーズ法等の種々の破碎法を試みたところ、フレンチプレス法により、容易に細胞の破碎を行うことができた。しかしながら、同法により調製した細胞ホモジネートと、乳鉢・乳棒により調製したホモジネートについて、スクアレン合成酵素活性を比較したところ、前者で比活性が大幅に下がっていたことから、細胞破碎過程における酵素タンパク質の変性、失活が生じていることが疑われた。したがってミクロソーム画分の酵素活性を保持しつつ、効率良く細胞を破碎する手法の開発が必要であることが示唆された。

(3) *CER1* および *CER3* とは異なる *B. braunii* A 品種由来直鎖アルケン生合成関連酵素遺伝子の探索

(1) で述べた様に、微細藻類から *CER* 様遺伝子を単離する事ができなかったことから、他の機構により直鎖状炭化水素を生成する酵素遺伝子の探索を行った。既往研究から、*B. braunii* の A 品種が生産する、分子の末端に二重結合を有する直鎖アルケンの生成には、オレイン酸あるいはオレイル CoA を基質として、 C_2 単位で炭素鎖が伸長することが必要なことから、脂肪酸合成酵素に類似した酵素が、反応に関与している可能性が考えられた。そこで、*B. braunii* のトランスクリプトームデータベースにつき、脂肪酸合成酵素遺伝子に類似したものを探索したところ、植物

細胞に普遍的に見られる型脂肪酸合成酵素遺伝子に加え、ユニークな脂肪酸合成酵素様遺伝子が複数見つかった。当該遺伝子の 1 つを、Yamanaka 株の cDNA ライブラリーから単離し、その塩基配列を解析したところ、2277 アミノ酸残基をコードしており、脂肪酸鎖の伸長に必要な機能ドメインを複数有していた。そこで当該遺伝子を酵母発現系ベクターに導入し、酵母内で異種細胞発現を行った。当該酵母細胞から脂溶性成分を抽出し、GC-MS 分析に付したが、ベクターのみを導入したネガティブコントロールと比べて、顕著な組成の差は見られず、当該遺伝子特異的な長鎖脂肪酸族化合物の蓄積は認められなかった。今後は大腸菌での当該リコンビナントタンパク質の作製を行い、*in vitro* での酵素活性の検出を試みる予定である。

(4) *B. braunii* からの *fatty acid photodecarboxylase* 遺伝子の単離と機能解析

本研究課題の進行中の 2017 年に、*C. reinhardtii* や *Chlorella variabilis* 等の緑藻において、脂肪酸を基質とし、光エネルギーを利用して直鎖状炭化水素を生産する新規酵素「*fatty acid photodecarboxylase* (以下 FAP と略)」の存在が報告された (Sorigue *et al.*, *Science*, **357**, 903-907, 2017)。当該酵素のホモログは緑藻のみならず、他の分類群の微細藻類にも存在することが明らかとなった。そこで *B. braunii* の A 品種である Yamanaka 株、B 品種である Showa 株、および L 品種である Songkla Nakarin 株のトランスクリプトームデータベースを探索したところ、直鎖アルケンを生成する A 品種のみならず、テルペン系炭化水素を生産する B および L 品種にも、FAP のホモログ遺伝子が発現していた。そこで *B. braunii* の A および B 品種由来の FAP 様遺伝子 *BbFAP-A* および *BbFAP-B* につき、全長 cDNA クローニングを行った。*BbFAP-A* は 643 アミノ酸残基を、*BbFAP-B* は 641 アミノ酸残基をコードしており、両者とも N 末端側には *C. reinhardtii* や *C. variabilis* 由来の FAP と同様に、葉緑体への移行シグナルペプチドをコードしていると推定される配列を有していた。そこで、葉緑体移行シグナルペプチドをコードしている領域を除去し、大腸菌発現用にコドン改変した *BbFAP-A* および *B* を pET32 に挿入し、タンパク質発現用プラスミド (pET32-*BbFAP-A* および pET32-*BbFAP-B*) を作製した。当該プラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し、IPTG により発現誘導を行った。ネガティブコントロールとして pET32b のみを導入した大腸菌を用いた。誘導開始 2.5 時間後に回収した菌体の粗ホモジネート、および遠心分離後の上清画分について SDS-PAGE 解析を行った。その結果、*BbFAP-A* および *BbFAP-B* は、分子量約 77kDa のチオレドキシシン融合タンパク質として発現し、その一部は可溶性画分に存在すること

が確認された。

そこで上記の誘導処理後の各大腸菌を、白色光下で 12 時間インキュベートした後、細胞内の脂溶性成分を、アセトンおよび *n*-ヘキサンを用いて抽出し、GC-MS 分析に付した。ネガティブコントロールである pET32b のみを導入した大腸菌の脂溶性成分では、パルミチン酸およびオレイン酸が主成分として検出されたものの、著量の炭化水素は検出されなかった(図 1)。

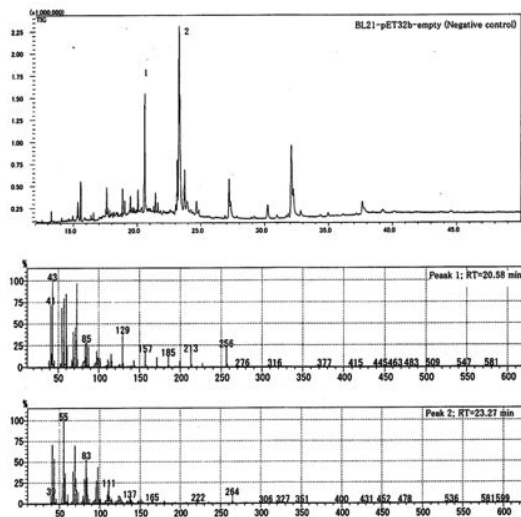


図 1 .pET32b で形質転換した大腸菌の脂溶性成分の GC-MS 分析結果
クロマトグラム中のピーク 1 がパルミチン酸、ピーク 2 がオレイン酸

これに対し、BbFAP-A および BbFAP-B を生産している大腸菌のアセトン抽出物では、*n*-ペンタデカンと 8-ヘプタデセンが主成分として検出された(図 2 および図 3)。

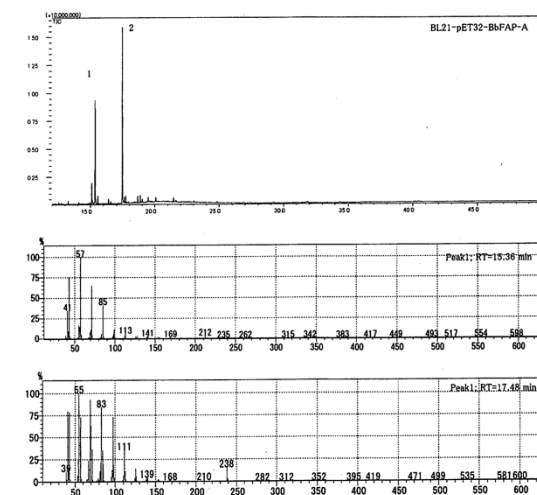


図 2 .pET32-BbFAP-A で形質転換した大腸菌の脂溶性成分の GC-MS 分析結果
クロマトグラムのピーク 1 が *n*-ペンタデカン、ピーク 2 が 8-ヘプタデセン

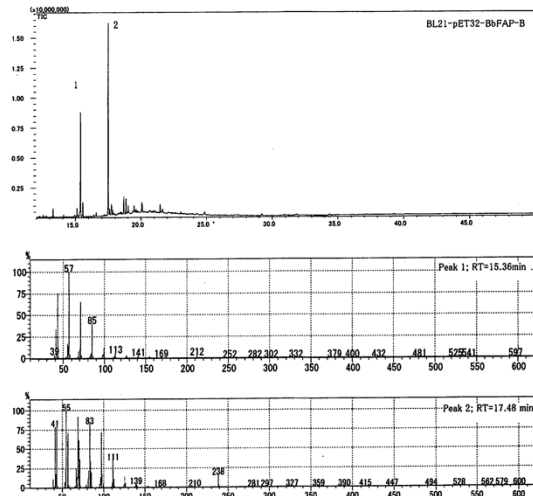


図 3 .pET32-BbFAP-B で形質転換した大腸菌の脂溶性成分の GC-MS 分析結果
クロマトグラムのピーク 1 が *n*-ペンタデカン、ピーク 2 が 8-ヘプタデセン

これらのことから、BbFAP-A および BbFAP-B は、*C. reinhardtii* や *C. variabilis* 由来の FAP と同様に、大腸菌の内在性脂肪酸であるパルミチン酸およびオレイン酸から、脱炭酸反応により、炭素数が 1 つ少ない直鎖状炭化水素を生成する機能を有していることが判った。一方、*B. braunii* の炭化水素画分からは、*n*-ペンタデカンや 8-ヘプタデカンは、通常検出できないことを考えると、同藻において FAP 遺伝子が発現していることの生物学的意義は未だ不明である。また、BbFAP により大腸菌内で生成した直鎖アルケンが、1-ヘプタデセンでは無く、8-ヘプタデセンであったことから、BbFAP-A および BbFAP-B は、炭化水素骨格に新たな二重結合を導入することは無く、元来 9 位に二重結合を有していたオレイン酸から、直鎖アルケンを生成しているものと考えられた。これに対し、*B. braunii* の A 品種が生産・蓄積する直鎖アルケンの分子末端には、二重結合が存在することから、今回得られた BbFAP-A および BbFAP-B による直鎖炭化水素の生成機構とは異なる機構により、生産されることが示唆された。しかしながら、*B. braunii* の A 品種由来の FAP が、他の緑藻由来の同酵素とは異なり、 $C_{14} \sim C_{18}$ の脂肪酸に加えて、 C_{32} 等の超長鎖脂肪酸をも基質として直鎖状炭化水素を生成することができるのであれば、その炭化水素の分子の末端に、*B. braunii* が有する別の未知酵素が不飽和結合を導入することで、*B. braunii* の A 品種に特異的な炭化水素が生成する可能性も、完全には排除できないことから、引き続き *B. braunii* 由来 FAP の性状解明をすることの必要性が考えられた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 茂 (OKADA SHIGERU)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号：00224014

(2) 研究分担者

松永 茂樹 (MATSUNAGA SHIGEKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
教授
研究者番号：60183951