

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18828

研究課題名(和文) 微細藻類ユーグレナの低酸素下バイオ燃料生産増強に向けた研究

研究課題名(英文) Research for biofuel production of *Euglena gracilis* in anaerobic and hypoxic conditions

研究代表者

中澤 昌美 (Masami, Nakazawa)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：90343417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：微細藻類ユーグレナは、低酸素・嫌気条件下で、バイオ燃料として利用可能な化合物であるワックスエステルを生産する。ワックスエステルの増産および改変を実現するために、本研究ではユーグレナにおけるワックスエステル生産のメカニズム解明を目指して研究を行った。阻害剤や遺伝子発現抑制の手法を用いることにより、ワックスエステルの合成には低酸素下でのミトコンドリア電子伝達系の機能が必須であることを見出した。「長鎖脂肪酸の合成と嫌氣的呼吸鎖の共役」は生物界で初の発見となった。また、脱共役剤によりワックスエステル生産量が倍増することを見出し、ユーグレナによるバイオ燃料増産へつなげる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成生物によるバイオ燃料生産と利用は、二酸化炭素濃度上昇に伴う地球の気候変動への対策として期待される一方で、その生産量やコストが大きな問題となり実用化には大きなハードルがある現状である。本研究で用いた生物であるユーグレナは国内で商業的な大規模培養が実施されるなどバイオ燃料生産へのポテンシャルを有する。本研究では、ユーグレナによるバイオ燃料原料「ワックスエステル」の生産について、その合成メカニズムの核をなす代謝系を発見するとともに、生産量を向上させることにも成功した。この仕組みは生物界で初の報告となり、基礎的研究としてもインパクトを有するものである。

研究成果の概要(英文)： *Euglena gracilis*, a kind of microalga, produces wax ester concomitant generation of ATP during anaerobiosis. The anaerobic production of wax esters was suppressed by mitochondrial complex I inhibitor. The ATP contents in the anaerobic cells was elevated by treatment with the inhibitor. Gene silencing experiments indicated that acyl-CoA dehydrogenase, electron transfer flavoprotein (ETF), and rhodoquinone (RQ) participate in wax ester production. These results suggest that fatty acids are synthesized in mitochondria by the reversal of beta-oxidation, where trans-2-enoyl-CoA is reduced by acyl-CoA dehydrogenase using the electrons provided by NADH via the electron transport chain complex I, RQ, and ETF, and that ATP is generated by anaerobic respiration linked to the reduction of trans-2-enoyl-CoA.

研究分野：環境農学、細胞生化学

キーワード：嫌氣的呼吸鎖 バイオ燃料 ワックスエステル ミトコンドリア電子伝達系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CO₂排出を低減した「低炭素社会」への転換が世界的課題であると同時に、石油資源枯渇や食糧危機が現実化している。これらを解決する有力な方策として、微細藻類によるバイオ燃料生産が注目されている。世界中で研究が加速しているが、本格的な利用や普及は途上である。特に、生産コストの削減や、ライフサイクル評価(LCA)を考慮したCO₂削減の実現などの課題の解決は急務である。さらに、有用微細藻類は形質転換困難な場合が多く、これらの課題解決のために必要とされる基礎的な代謝研究が遅れている。

我々の研究グループは、微細藻類ユーグレナ(ミドリムシ)がCO₂排出低減とバイオ燃料生産の両立にとって有望な形質を持つことを、世界で初めて見出してきた。その代表例として、(1)45%までの高濃度CO₂下でも光合成によりCO₂を固定する(発電所排気の直接利用が可能)、(2)貯蔵多糖β-1,3グルカン「パラミロン」を蓄積し、これを基質として嫌気発酵で脂肪酸-脂肪アルコールエステルである「ワックスエステル」を産生する、などの性質が挙げられる。ワックスエステルは容易にバイオディーゼルへの変換が可能である。炭素長14の飽和化合物が主成分であり、水素化分解などにより、低温で固化しにくいジェット燃料としても利用可能である。

ユーグレナ由来バイオ燃料の製造過程におけるCO₂排出量は、現状のワックスエステル生産能(乾燥重の30%)でのCO₂排出削減量の2倍に達すると試算されており、CO₂排出低減に向けては改善が必要である。そこで研究代表者は「ユーグレナのワックスエステル生産を倍増させて、カーボンニュートラルなバイオ燃料生産工場を創出する」ことを構想した。実用化済みであるワックスエステル抽出残渣の飼料化等と組み合わせると利用価値は飛躍的に高まる。

本構想達成への課題は、細胞あたりワックスエステル産生量の向上、代謝基質からの変換効率向上、ワックスエステル産生速度向上、に大別できる。加えて実用化に向けては、バイオ燃料の質=組成の制御が望まれる。研究代表者は、科研費研究(平成26~27年)の成果として、RNAiによる代謝酵素の発現抑制によりワックスエステル生産の律速候補遺伝子を見出した(に寄与)。また、ワックスエステルの短鎖化に成功し、低温で固化しにくいユーグレナ由来バイオディーゼル燃料を生産するシステムを開発することができた(に寄与)。

2. 研究の目的

ユーグレナによるワックスエステル生産能力を強化し、カーボンニュートラルなバイオ燃料を開発することが研究代表者の目標である。

研究代表者は、予備的な検討により「嫌気・低酸素環境におけるワックスエステル合成とミトコンドリア電子伝達系」に重要な関連がある可能性を見出した。これを受け、本研究ではワックスエステル生産量向上に向けて、電子伝達系阻害・脱共役が、低酸素(=ワックスエステル産生条件)下の代謝に及ぼす影響について調べ、嫌氣的なミトコンドリア電子伝達系の機能がワックスエステル合成において持つ役割について明らかにすることを目的とした。さらに、電子伝達系と脂質合成系を直接つなぐ因子は明らかとなっていなかったため、この2つの代謝系をつなぐ酵素を同定することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 阻害剤・脱共役剤を用いたユーグレナ低酸素下代謝の解析

ミトコンドリア電子伝達の阻害剤として、複合体Iの阻害剤ロテノン、脱共役剤CCCPを用いた。本実験では、光合成による代謝への影響を排除し、ミトコンドリアでの脂質代謝の解析を容易にするために、葉緑体欠損株の細胞を従属栄養環境で生育させて用いた。まず好気状態で対数増殖後期まで生育させ、細胞内に十分量の貯蔵多糖パラミロンを蓄積させた細胞を調製し、アルゴンガスを1分間通すことにより細胞を低酸素状態にした。同時にメタノールに溶解した薬剤を添加し、密閉した後、緩やかに旋回した。24時間後に低酸素処理細胞を回収し、細胞内のATP/ADP比(ルシフェラーゼを用いた発光法)、パラミロン量(フェノール硫酸法)、ワックスエステル量(GC-FID)について調べた。

(2) mRNA発現抑制によるユーグレナ低酸素下ミトコンドリア電子伝達系の同定と解析

ミトコンドリア電子伝達系がユーグレナの低酸素下ワックスエステル合成に寄与している可能性が示唆されたため、この両者をつなぐ具体的な代謝経路・代謝酵素を同定するために、二重鎖RNAを用いたRNAi法により推定代謝酵素のmRNA発現抑制を行い、経路の同定を目指した。塩基配列情報はRNA-seqデータベース(島根大学により構築)を用い、好氣的なミトコンドリア電子伝達系および推定電子伝達体キノンの合成酵素に着目し、検討した。発現抑制細胞を用いて、ワックスエステル合成の変化の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) 阻害剤・脱共役剤を用いたユーグレナ低酸素下代謝の解析

ロテノンを用いた細胞では、低酸素下での ATP/ADP 比が大きく低下し、ワックスエステル合成量も大きく低下していた。この時、貯蔵多糖パラミロンの分解はコントロール細胞と同等に行われていたことから、複合体 I の機能が低下した際には、パラミロン分解により生じた炭素がワックスエステル合成に振り分けられる比率が大きく低下していることが示唆された。一方、CCCP を作用させた細胞では、脱共役剤の機能から明らかなように低酸素下での ATP/ADP 比が著しく低下していた。このとき、ワックスエステル合成量が約 2 倍に上昇していることを新たに見出した。貯蔵多糖からワックスエステルへの炭素変換効率はほとんど変化しなかったことから、パラミロンの分解亢進がワックスエステル合成上昇につながっていることが示唆された。

(2) ミトコンドリア電子伝達系のワックスエステル合成経路への具体的な寄与の解明

低酸素状態のユーグレナにおいて、パラミロンは解糖系でピルビン酸に分解された後、アセチル-CoA に変換される。アセチル-CoA はミトコンドリアにおける β -酸化逆行反応により、脂肪酸アシル-CoA となった後、ミクロソームにおいてワックスエステル合成に用いられる。この β -酸化逆行反応の最終段階であるエノイル-CoA からアシル-CoA への反応は従来、エノイル-CoA レダクターゼ (TER) が担っていると考えられてきた。しかし近年、TER はワックスエステル合成に必須ではないことが明らかになった。そこで、好気状態の β -酸化反応においてアシル-CoA からエノイル-CoA への反応を担うアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (ACD) が、低酸素状態の β -酸化逆行反応においてエノイル-CoA からアシル-CoA への反応も担っている可能性を考えた。一般的な β -酸化反応では、アシル-CoA の酸化に伴い生じた電子は ACD を経て電子伝達タンパク質 (ETF)、ETF 酸化還元酵素 (ETFOR)、ユビキノンの順に伝達された後、複合体 III やシトクロム c、複合体 IV を経由し、酸素の還元反応に利用される。低酸素状態ユーグレナの β -酸化逆行反応ではこの逆反応、すなわち複合体 I で生じた電子がキノンから ETFOR、ETF、ACD を経てエノイル-CoA からのアシル-CoA 合成反応に利用されているのではないかという仮説を立てた。そこで ETFOR、ETF および ACD のワックスエステル生産への寄与の解明を目指した。

まず ACD に着目した。ユーグレナ EST データベースから 7 つの ACD 候補遺伝子のうち発現量の高い ACD1 と ACD2 を選択し、RNAi 法による遺伝子発現抑制を行った。その結果、ACD1 と ACD2 を同時にノックダウンした細胞においてワックスエステル量がコントロール細胞の 30% 程度まで減少したことから、ACD がワックスエステル合成に寄与していることが示唆された。また ACD1 および ACD2 を単独でノックダウンした細胞では、いずれもワックスエステル量がコントロール細胞の 70% 程度まで減少していた。これらのことから、ユーグレナが有する ACD1 と ACD2 の 2 つの酵素はどちらもワックスエステル合成におけるアシル-CoA 還元反応を触媒している可能性が示された。

次に電子伝達鎖に着目した。ETFOR および ETF ノックダウン細胞においてワックスエステル量がコントロール細胞の 20% 程度まで減少した。また低酸素状態での ATP 量はコントロール細胞と比較して有意に減少していた。これらの結果から、ETFOR および ETF は嫌氣的呼吸鎖と共役したワックスエステル合成に大きく寄与していることが示唆された。さらに、複合体 I と ETF をつなぐ電子伝達体キノンに関する検討を進めた。ユーグレナには、ユビキノンと比べて酸化還元電位が低い「ロドキノン」が存在し、嫌氣的な代謝において機能していることが示唆されてきたが、ワックスエステル合成との関与は不明であった。そこで、ユーグレナにおけるロドキノン合成系に存在することが予想された *rquA* 遺伝子オルソログ候補をデータベースから選定し、発現抑制実験を行った。その結果、細胞内のロドキノン含量がコントロールの 2% 程度まで低下した細胞を作出することに成功した。これは、真核生物での *rquA* オルソログの機能確認の初めての事例となった。さらに *rquA* 発現抑制細胞ではワックスエステル合成量がコントロール細胞の約 3 分の 1 量にまで低下しており、ロドキノンが低酸素状態でのワックスエステル合成への電子伝達の主要な構成因子となっていることが示唆された。

これらの結果から、ミトコンドリア電子伝達系は、嫌氣的呼吸鎖と共役した β -酸化の完全逆行反応によるワックスエステル合成において非常に重要な役割を担うことが示唆された。長鎖の脂肪酸合成が嫌氣的呼吸鎖と共役しているという事例は、生物界で初めての報告となった。またミトコンドリア電子伝達系および ACD のノックダウン細胞でワックスエステル生産量が大幅に減少したことから、今後これらはワックスエステル生産向上に向けた代謝改変ターゲットとなり得ると結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakazawa Masami, Ando Hiroko, Nishimoto Ayusa, Ohta Tsuyoshi, Sakamoto Kimitoshi, Ishikawa Takahiro, Ueda Mitsuhiro, Sakamoto Tatsuji, Nakano Yoshihisa, Miyatake Kazutaka, Inui Hiroshi | 4. 巻 592 |
| 2. 論文標題 Anaerobic respiration coupled with mitochondrial fatty acid synthesis in wax ester fermentation by <i>Euglena gracilis</i> | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Letters | 6. 最初と最後の頁 4020 ~ 4027 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13276 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakazawa Masami, Hayashi Ryuta, Takenaka Shigeo, Inui Hiroshi, Ishikawa Takahiro, Ueda Mitsuhiro, Sakamoto Tatsuji, Nakano Yoshihisa, Miyatake Kazutaka | 4. 巻 81 |
| 2. 論文標題 Physiological functions of pyruvate:NADP+ oxidoreductase and 2-oxoglutarate decarboxylase in <i>Euglena gracilis</i> under aerobic and anaerobic conditions | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 1386 ~ 1393 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1318696 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中澤 昌美 |
| 2. 発表標題 ユーグレナの嫌氣的呼吸鎖に共役したワックスエステル生産 |
| 3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会（岡山）シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西本 歩紗, 中澤 昌美, 乾 博, 上田 光宏, 阪本 龍司 |
| 2. 発表標題 ユーグレナ低酸素下ワックスエステル合成におけるミトコンドリア電子伝達系の機能解明 |
| 3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会（岡山） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 中澤 昌美 |
| 2. 発表標題 ユーグレナのワックスエステル発酵と嫌気呼吸 |
| 3. 学会等名 ユーグレナ研究会第35回研究集会（大阪）（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西本 歩紗, 中澤 昌美, 乾 博, 上田 光宏, 阪本 龍司 |
| 2. 発表標題 ユーグレナ低酸素下ワックスエステル合成におけるミトコンドリア電子伝達系の機能解明 |
| 3. 学会等名 ユーグレナ研究会第35回研究集会（大阪） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中澤 昌美、安藤 博子、上田 光宏、阪本 龍司、石川 孝博、乾 博、中野 長久、宮武 和孝 |
| 2. 発表標題 ユーグレナの有する2種のピルビン酸酸化的脱炭酸酵素の生理的役割について |
| 3. 学会等名 日本ビタミン学会第70回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西本 歩紗、中澤 昌美、石川 孝博、乾 博、上田 光宏、阪本 龍司 |
| 2. 発表標題 ユーグレナ低酸素下ワックスエステル合成におけるミトコンドリア電子伝達系の機能解明 |
| 3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会（2018） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中澤 昌美、西本 歩紗、乾 博、石川 孝博、中野 長久、宮武 和孝、上田 光宏、阪本 龍司 |
| 2. 発表標題 ユーグレナ低酸素下ワックスエステル合成におけるミトコンドリア電子伝達系の機能解明 |
| 3. 学会等名 ユーグレナ研究会第34回研究集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|--------------------------------|
| 1. 著者名 Schwartzbach, Steven, Shigeoka, Shigeru (Eds.), Masami Nakazawa (Chapter 3) | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 Springer | 5. 総ページ数 303 (第3章の7ページ分を担当) |
| 3. 書名 Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 大阪府立大学生物資源循環工学研究グループ http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/BE/ |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|-----------------------------|-----------------------|-------|
| 研究協力者 | 安藤 博子 (Andoh Hiroko) | | 技術補助員 |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|------|
| 研究協力者 | 西本 歩紗 (Nishimoto Ayusa) | | 大学院生 |
| 研究協力者 | 柏山 祐一郎 (Kashiyama Yuichiro) (00611782) | 福井工業大学・環境情報学部・教授 (33401) | |
| 研究協力者 | 蓮沼 誠久 (Hasunuma Tomohisa) (20529606) | 神戸大学・先端バイオ工学研究センター・教授 (14501) | |
| 研究協力者 | 坂元 君年 (Sakamoto Kimitoshi) (50361465) | 弘前大学・農学生命科学部・准教授 (11101) | |