

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15599

研究課題名（和文）微細藻類における油脂「低」蓄積変異株の育種とそのメタボローム解析

研究課題名（英文）Development of a low lipid-accumulating mutant and its metabolic analysis in microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

研究代表者

加藤 悠一 (Kato, Yuichi)

神戸大学・先端バイオ工学研究センター・特命助教

研究者番号：70791903

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）：微細藻類は窒素欠乏条件において二酸化炭素を固定して多量の油脂（グリセリド）を細胞内に蓄積する。本研究では、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* をモデルとしてランダム変異導入によって油脂低蓄積変異株を作製し、それを用いて油脂蓄積メカニズムの解析を行った。獲得された油脂低蓄積変異株の一つである LL-1 では、窒素欠乏条件において通常通り脂肪酸の合成が誘導される一方で、グリセリドの蓄積が全く増加せず、細胞内に形成される油滴もわずかであった。LL-1 のメタボローム解析により、油脂以外の有用物質生産における油脂低蓄積変異株の利用可能性についても検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微細藻類における油脂蓄積誘導の分子メカニズムは十分解明されていなかった。本研究は、ランダム変異導入によって油脂低蓄積株を作製してその原因遺伝子を特定することで、油脂蓄積誘導に関わる因子を新たに特定した。特に、本研究で獲得された変異株はグリセリドの誘導蓄積が完全に失われていたことから、今後本変異株の解析をさらに進めることによって微細緑藻のグリセリド合成誘導に寄与する分子メカニズムを明らかにすることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Microalgae accumulate lipids (glycerolipids) under nitrogen deficient conditions by fixing atmospheric CO₂. By using the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as a model, this study developed low lipid-accumulating mutants via random mutagenesis, and analyzed the lipid accumulation mechanism in microalgae. In LL-1, one of the low lipid-accumulating mutants, fatty acid synthesis was induced by nitrogen deficiency as usual, while glycerolipid content did not increase and few lipid droplets were formed in the cells. Availability of low lipid-accumulating mutants in producing valuable compounds other than lipids was also examined by metabolic analysis of the LL-1.

研究分野：代謝工学

キーワード：微細藻類 クラミドモナス バイオ燃料 グリセリド メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

微細藻類は、光合成により二酸化炭素を固定して持続可能なバイオマス生産を行うことが可能であり、バイオ燃料原料である油脂(グリセリドとして細胞内に蓄積)やカロテノイド、バイオプラスチック原料等の生産宿主として有望である。一方、光合成によって固定される二酸化炭素由来の炭素は、多くが油脂・デンプンといったエネルギー貯蔵物質として蓄積し、細胞内空間の大部分を占有することになる。油脂以外を目的物質とする場合、この状態は目的物質の蓄積する空間的余地を圧迫し、大部分の炭素が目的外に利用されることから望ましくない。油脂・デンプンとして蓄積する炭素を何らかの方法で目的物質の合成に利用できれば、その生産性の向上が期待できる。その方法のひとつとして、デンプン・油脂の生合成低下などを介してこれらの蓄積量が減少した「低」蓄積変異株を遺伝子組換えの宿主として利用する生産戦略が考えられる。

微細藻類における主要な貯蔵物質のうち、デンプンの低蓄積変異株に関してはこれまでにある程度の知見が得られている。我々は海洋性の微細緑藻 *Chlamydomonas* sp. JSC4⁽¹⁾ を親株としてランダム変異導入を行い、様々な変異株を獲得してきた^(2,3)。その中で、独自に育種したデンプン枝切り酵素遺伝子破壊株(デンプン低蓄積変異株)において、3-ホスホグリセリン酸、グリセロール 3-リン酸、ピルビン酸、1-デオキシ-D-キシロース-5-リン酸など、油脂・デンプン・カロテノイドの合成における様々な中間代謝物が細胞内に蓄積する現象を見出していた⁽⁴⁾。一方、デンプンと同じく主要な貯蔵物質である油脂に関しては、バイオ燃料生産者として直接的な有用性がある油脂「高」蓄積変異株について多くの研究が報告されているものの、油脂「低」蓄積変異株についての報告はほとんどされていなかった。

2. 研究の目的

微細藻類の油脂「低」蓄積変異株を有用物質生産の宿主として利用する上で、どのような遺伝子変異が油脂蓄積の低下を引き起こすのか、また油脂蓄積の低下がどのような代謝変化を引き起こすのか、についての知見を得る必要があった。このような基礎的知見は微細藻類を用いたバイオ燃料生産においても、油脂生産の制御および高生産化の観点から重要であると考えられる。そこで本研究は、油脂低蓄積変異株の作製を介して油脂蓄積に寄与する遺伝子を同定し、油脂蓄積の低下によって引き起こされる代謝現象を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、微細緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* CC-400 を親株として油脂低蓄積変異株の作製を行った。抗生物質耐性遺伝子(*aphVIII*)カセットを CC-400 に対してエレクトロポレーションで導入し、*aphVIII* カセットがゲノム中のランダムな部位に挿入された形質転換体約 8×10^4 種類を含む変異体ライブラリを作製した。一次スクリーニングとして、この変異体ライブラリを窒素欠乏条件で培養した後、油滴を蛍光色素 BODIPY で染色し、蛍光活性セルソーターで BODIPY 蛍光の弱い細胞を分取した。目的とする油脂低蓄積細胞を濃縮するために培養と分取の工程を 5 回繰り返し実施した結果、一次スクリーニング開始時よりも BODIPY 蛍光の弱い細胞集団が得られた(図1)。二次スクリーニングとして、一次スクリーニングで獲得した候補クローンを窒素欠乏条件で個別に培養し、ガスクロマトグラフ質量分析によって細胞に含まれる全脂肪酸の含有率を測定した。これにより、窒素欠乏条件において油脂含有率が低下した変異株 LL-1 を獲得した。LL-1 における *aphVIII* カセットの導入部位はインバース PCR とサンガーシーケンシングによって特定した。また、LL-1 における油脂蓄積の特徴を解明するため、全脂肪酸(分析サンプルの調製においてグリセリドと遊離脂肪酸をメチル化)の含有率、およびグリセリド(分析サンプルの調製においてグリセリドのみをメチル化)の含有率をそれぞれガスクロマトグラフ質量分析で測定した。透過型電子顕微鏡解析によって細胞構造の変化を解明するとともに、炭水化物と色素(クロロフィル、カロテノイド)の含有率についても高速液体クロマトグラフによって測定した。LL-1 における遺伝子発現の変化を網羅的に解明するため、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。油脂蓄積の低下が代謝に及ぼす影響を解明するため、キャピラリー電気泳動質量分析によるメタボローム解析を行った。

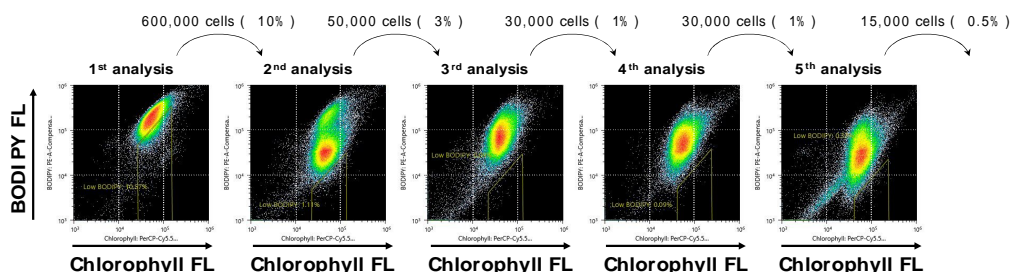


図1 蛍光活性セルソーターによる油脂低蓄積細胞の分取

4. 研究成果

上記のスクリーニング実験によって獲得した油脂低蓄積株 LL-1 について、培地交換によって窒素欠乏条件にした後の挙動を詳しく解析した。電子顕微鏡解析により、LL-1 がデンプン粒を問題なく形成している一方、窒素欠乏条件において本来形成される油滴をほとんど形成していないことが明らかになった(図2)。これは、一次スクリーニングにおいて蛍光染色された油滴量を指標として分取を行ったことと一致している。

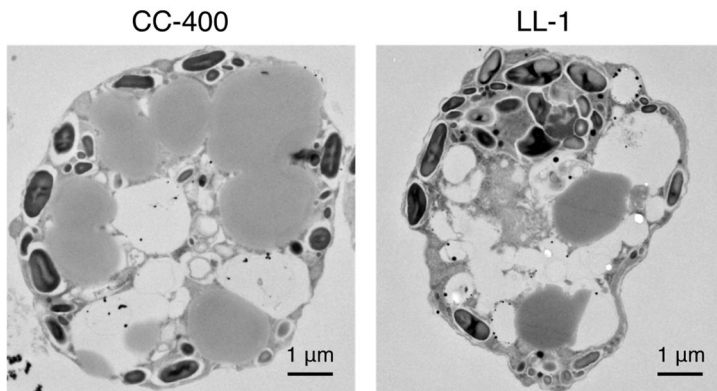


図2 LL-1の透過型電子顕微鏡写真

LL-1 における油脂蓄積の特徴を詳しく理解するため、細胞に含まれるすべての脂肪酸の含有率(総脂肪酸含有率)とグリセリドとして含まれる脂肪酸の含有率(グリセリド含有率)をそれぞれ測定した。総脂肪酸については、窒素充足時の含有率に変化はなく(約 15%)、一方で窒素欠乏後に誘導される含有率増加が LL-1 において顕著に低下していることが確認された(図3)。培養8日目における総脂肪酸含有率は、CC-400 が 43.3%であったのに対して LL-1 は 23.4%であった。さらにグリセリドに関して、窒素充足時の含有率にはやはり変化はなかったが(約 15%)、窒素欠乏条件下で起きるグリセリド蓄積の誘導が LL-1 では完全に失われていることが明らかになった。培養8日目におけるグリセリド含有率は、CC-400 が 41.7%であったのに対して LL-1 は窒素欠乏直後から増加しておらず 12.7%であった。LL-1 においても総脂肪酸含有率の増加は見られていることから、窒素欠乏条件下での脂肪酸合成の活性化は行われており、一部はグリセリドではなく遊離脂肪酸等

として細胞内に存在しているものと思われた。また LL-1 においても一定のグリセリド蓄積が見られたことから、LL-1 はグリセリド合成能を完全に失ったのではなく、窒素欠乏に応答して行われるグリセリド蓄積の誘導

がなくなっているものと思われた。

グリセリド蓄積の欠損が代謝に及ぼす影響を明らかにするため、窒素欠乏条件において LL-1 のメタボローム解析を行った。その結果、多くの代謝物について、CC-400 と LL-1 の細胞内量に大きな違いは見られなかった。しかし、LL-1 の大きな特徴としてグリセリド合成に使用されるグリセロール 3-リン酸の細胞内蓄積が窒素欠乏後顕著に増加していくことが明らかになった(図4)。LL-1 においても通常通り窒素欠乏に反応した油脂蓄積のための脂肪酸合成やグリセロール 3-リン酸の合成強化が行われており、その後のグリセリド形成が行われないことでこれが細胞内に蓄積しているものと思われた。

以上の結果より、本研究はランダムな遺伝子破壊アプローチによって油脂低蓄積株の作製に取り組み、

窒素欠乏によって誘導されるグリセリド蓄積を完全に欠損した LL-1 株を獲得した。グリセリド蓄積欠損の結果として、グリセリド合成の基質となる遊離脂肪酸やグリセロール 3-リン酸が細胞内に蓄積している可能性を見出した。LL-1 のゲノムにおいて *aphVIII* カセットが挿入された遺伝子についても特定しており、グリセリド蓄積誘導の欠損が当該遺伝子の機能不全によって引き起こされたものであるかを相補試験によって現在検証している(2023年7月論文投稿予定)。微細藻類において窒素欠乏条件下でのグリセリド蓄積誘導の完全欠損はこれまでに報告がなかった表現型であり、LL-1 の解析をさらに進めることでグリセリド蓄積誘導の分子メカニズムを明らかにすることが期待できる。有用物質生産の宿主としての油脂低蓄積変異株の利用

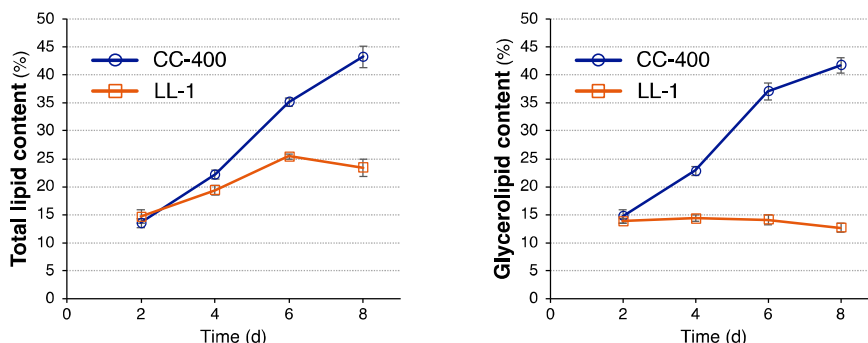


図3 窒素欠乏条件におけるLL-1の総脂肪酸含有率とグリセリド含有率

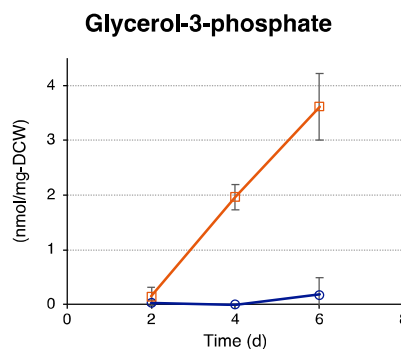


図4 LL-1の細胞内グリセロール3-リン酸量

可能性に関して、本研究で得られた油脂低蓄積株 LL-1 では固定した二酸化炭素が変わらず脂肪酸合成に利用されているようであり、また既報のデンプン低蓄積変異株とは異なり様々な中間代謝物が細胞内に蓄積する現象も見られなかった。しかし、LL-1 において油滴による細胞内空間の占有を回避できていることから、今後、デンプン低蓄積との併用や代謝フラックスの改変などの検討を行うことで、油脂低蓄積株が有用物質生産に貢献することを期待している。

< 引用文献 >

- (1) Shih-Hsin Ho, Akihito Nakanishi, Yuichi Kato, Hiroaki Yamasaki, Jo-Shu Chang, Naomi Misawa, Yuu Hirose, Jun Minagawa, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo. Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4. Scientific Reports 7, 45471 (2017)
- (2) Tomoki Oyama, Yuichi Kato, Ryota Hidese, Mami Matsuda, Minenosuke Matsutani, Satoru Watanabe, Akihiko Kondo, Tomohisa Hasunuma. Development of a stable semi-continuous lipid production system of an oleaginous *Chlamydomonas* sp. mutant using multi-omics profiling. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts 15, 95 (2022)
- (3) Yuichi Kato, Kosuke Inabe, Ryota Hidese, Akihiko Kondo, Tomohisa Hasunuma. Metabolomics-based engineering for biofuel and bio-based chemical production in microalgae and cyanobacteria: A review. Bioresource Technology 344, 126196 (2022)
- (4) Yuichi Kato, Tomoki Oyama, Kentaro Inokuma, Christopher J Vavricka, Mami Matsuda, Ryota Hidese, Katsuya Satoh, Yutaka Oono, Jo-Shu Chang, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo. Enhancing carbohydrate repartitioning into lipid and carotenoid by disruption of microalgae starch debranching enzyme. Communications Biology 4, 450 (2021)

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 2件）

1. 著者名 Kato Yuichi, Inabe Kosuke, Hidese Ryota, Kondo Akihiko, Hasunuma Tomohisa	4. 巻 344
2. 論文標題 Metabolomics-based engineering for biofuel and bio-based chemical production in microalgae and cyanobacteria: A review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 126196 ~ 126196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biortech.2021.126196	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 Oyama Tomoki, Kato Yuichi, Hidese Ryota, Matsuda Mami, Matsutani Minenosuke, Watanabe Satoru, Kondo Akihiko, Hasunuma Tomohisa	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of a stable semi-continuous lipid production system of an oleaginous Chlamydomonas sp. mutant using multi-omics profiling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biotechnology for Biofuels and Bioproducts	6. 最初と最後の頁 95-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13068-022-02196-w	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤悠一、蓮沼誠久
2. 発表標題 メタボローム解析で定量的に読み解く微細藻類・ラン藻のリソース分配
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------