

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658289

研究課題名(和文) バイオ燃料実用化に向けた炭化水素分泌酵母の作製

研究課題名(英文) Engineering of a hydrocarbon producing yeast for biofuel production

研究代表者

鍵和田 聡 (KAGIWADA, Satoshi)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40281662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：緑藻*Botryococcus braunii*(ボトリオコッカス)はボトリオコッセンとよばれるオイルの一種を細胞外に分泌するというきわめてユニークな性質をもつ。このボトリオコッセンはバイオ燃料としての活用が期待されている。

しかし、ボトリオコッカスは成長も遅く、さらに多くのボトリオコッセンを生産するような改変をするための技術も開発されていないという欠点がある。

そこで本研究では、遺伝子工学的な改変が容易な出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*に、ボトリオコッセン合成に関係する遺伝子を組み込み、ボトリオコッセンを合成させるように改良した。

研究成果の概要(英文)：A unicellular green algae, *Botryococcus braunii*, secretes a hydrocarbon called botryococcene, which is very suitable for biofuel production, into its environment. However, *Botryococcus* do not grow fast and is not subjected to biotechnological engineering, making it difficult to improve this organism for more efficient biofuel production.

In this study, genes required for botryococcene synthesis are incorporated into the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is very suitable for biotechnological engineering, to make a yeast strain which can produce large amounts of botryococcene and secrete them.

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：バイオ燃料 緑藻 酵母 炭化水素 バイオテクノロジー 再生可能エネルギー

### 1. 研究開始当初の背景

緑藻 *Botryococcus braunii* (*B. braunii*) は乾燥重量の 80% に達するほどの大量の炭化水素 (ポトリオコッセン) を合成し細胞外に分泌する。このため合成した炭化水素を細胞体を破壊することなく回収できるという、バイオ燃料生産においてきわめて有利な性質をもつ。

しかしながら、生育の遅さや形質転換技術が使えないことなどが災いし、この藻類の最大の特長である炭化水素の“分泌”を生かして、より効率的により多くの炭化水素を生産するように改良し、バイオ燃料開発に結びつけるのが難しい状況であった。

### 2. 研究の目的

この研究では、分子生物学的技術が適用可能な単細胞真核生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (以下、酵母) に *B. braunii* のポトリオコッセン合成に関わる 3 つの遺伝子 (SSL1, 2, 3) を導入し、ポトリオコッセンを合成・分泌できる酵母株を作製することを目標とした。具体的には以下の計画を立てた。

(1) ポトリオコッセン合成に関わる 3 つの遺伝子 SSL1, 2, 3 を酵母の発現ベクターに組み込む。

(2) 酵母に発現させた SSL1, 2, 3 の細胞内での安定性・局在場所・活性を調べる。

(3) SSL1, 2, 3 を発現する酵母がポトリオコッセンを合成できるかを調べる。

(4) ポトリオコッセン合成酵母での貯蔵場所を調べる。

(5) ポトリオコッセンを分泌できるように酵母を改変する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 発現ベクターの作製

インサートあるいはベクターとして使用する DNA を PCR 増幅し、制限酵素処理した後、精製し、ライゲーションに供した。ライゲーションは、T4 DNA ligase 法または In-Fusion 法を用いて行い、得られた DNA 溶液を大腸菌の形質転換に用いた。

#### (2) スクアレン合成酵素阻害剤への耐性試験

酵母を最少液体培地で 28 終夜振盪培養した後、600 nm での吸光度の値 (O.D.600 値) が 0.5 になるように最少液体培地に植え継ぎ、28 で 3 時間振盪培養をした。細胞を滅菌水で洗浄し、O.D.600 値が 2.0 になるように調整した。この細胞液の濃度を 1 として、希釈系列 (10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍) を作製し、各細胞液を 5  $\mu$ L ずつを Zaragozaic acid A 含有最少寒天培地に添加し、26 で 3 日間培養した。

#### (3) タンパク質の発現量解析

酵母株を最少液体培地中で、28 で一晩振

とう培養した。その後、O.D. 600 値が 0.1 になるように新しい液体培地に植え継ぎ、さらに 28 で一晩振とう培養した。続いて、O.D. 600 値が 0.5 になるように新しい液体培地に植え継ぎ、28 で 3 時間振とう培養した。

培養した細胞を集め、スフェロプラスト緩衝液 (22.4% ソルビトール, 40 mM リン酸水素二カリウム, 10 mM リン酸二水素カリウム, 10mM アジ化ナトリウム) で洗浄し、沈殿を zymolyase 100T (0.05 mg/mL) を含むスフェロプラスト緩衝液で懸濁して 30 で 30 分間静置した。その後、遠心して上清を除去した後、スフェロプラスト緩衝液で 2 回洗浄した。スフェロプラスト処理した細胞を Lysis 溶液 (5.6% sorbitol, 10 mM KPO4 pH7.4, 1 mM EDTA) で懸濁し氷上で 15 分間静置した。懸濁液を、4、15000 rpm で 15 分間遠心して得られた上清を S とした。沈殿をスフェロプラスト緩衝液で洗浄した後、スフェロプラスト緩衝液に再懸濁したものを P とした。

抽出したタンパク質を、SDS ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜に転写を行った。転写されたニトロセルロース膜をブロッキング後、一次抗体にはウサギ抗 GST 抗体、ウサギ抗 mCherry 抗体のいずれかを、二次抗体には HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて免疫反応を行った。反応後のニトロセルロース膜に対し、化学発光反応を行い、発光をルミノイメージアナライザーにより検出し、付属のソフトウェアで画像処理を行った。

#### (4) タンパク質の細胞内局在観察

酵母を最少液体培地中で、28 で一晩振盪培養した。その後、O.D.600 値が 0.5 になるように新しい液体培地に植え継ぎ、28 で 3 時間振盪培養した後、落射型蛍光顕微鏡装置にて観察した。画像は顕微鏡用デジタルカメラで撮影し、付属のソフトウェアで画像処理を行った。

#### (5) 脂質分析

酵母株を最少培地で生育し、遠心により回収した。回収した酵母にアセトンを加えて懸濁し、遠心後にアセトンを回収した。この操作を 4 回繰り返し、貯留したアセトン液中のアセトンをロータリーエバポレーターで蒸発させ、残った脂質をヘキサンに溶解した。溶解した脂質を薄層クロマトグラフィーでヘキサンにより展開し、展開後の薄層プレートに硫酸-エタノールを噴霧し、180 に熱して脂質スポットを検出した。

#### (6) 脂質滴観察

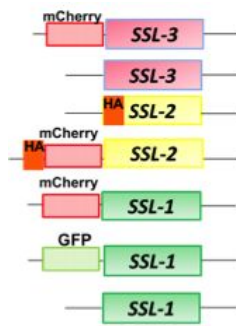
酵母を最少液体培地中で、28 で一晩振盪培養した。この酵母液に Bodipy493/503 を 1  $\mu$ g/ml になるように加え、室温で 10 分間静置した。その後、酵母を培地で洗浄し、落射型蛍光顕微鏡装置にて観察した。画像は顕微鏡用デジタルカメラで撮影し、付属のソフトウ

エアで画像処理を行った。

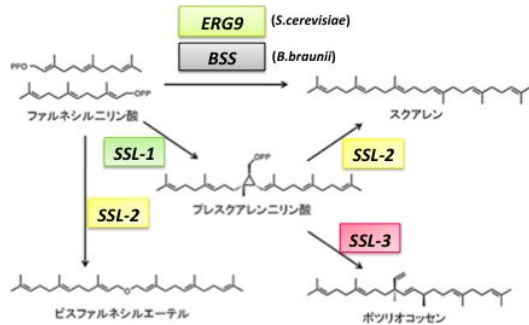
#### 4. 研究成果

(1) ポトリオコッセン合成遺伝子および関連酵母遺伝子の酵母発現ベクターの作製

ポトリオコッセン合成関連遺伝子 (SSL1, 2, 3) を酵母の発現ベクターにサブクローニングした。この際に SSL1 には GFP および mCherry タグ、SSL2 には HA および mCherry タグ、SSL3 には mCherry タグを付加したものをそれぞれ作製した (右図)

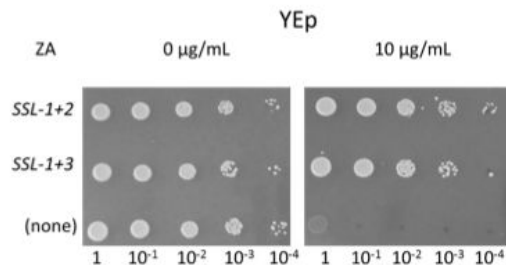


SSL1 はファルネシルニリン酸からプレスクアレンニリン酸を、SSL2 はプレスクアレンニリン酸からスクアレンを、SSL3 はプレスクアレンニリン酸からポトリオコッセンを作る経路を触媒する (下図)。



(2) ポトリオコッセン合成酵素の酵母での機能評価

SSL1, 2, 3 が酵母で機能するかを調べるために、スクアレン合成遺伝子阻害剤 Zaragozic acid A (ZA) 耐性試験を行った。ZA はスクアレン合成酵素を阻害するために、酵母の成長を阻害する。もしも SSL1, 2, 3 が酵母内で正常に機能する場合にはこれらの遺伝子を発現する ZA に対する耐性が増すはずである。

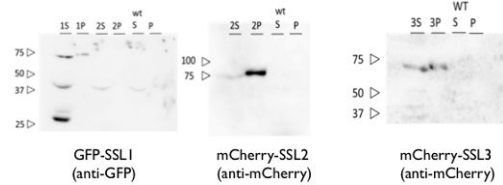


SSL1, 3 を発現させた酵母および SSL1, 2 を共発現させた酵母で、ZA に対する耐性を獲得した (上図)。この結果から、これらの遺伝子産物が酵母内で正常にはたらいてスクアレンを合成できることを明らかに出来た。

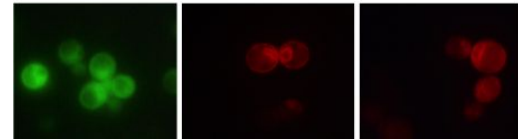
(3) ポトリオコッセン合成酵素の酵母での発現量および局在

SSL1, 2, 3 に対するウエスタンブロッティング法および SSL1, 2, 3 に付加した蛍光タンパク質の局在観察、酵母に発現させた SSL1, 2, 3 の発現量と局在を調べた。

その結果、これらのタンパク質はいずれも安定して発現できることを確認した。また局在場所としては酵母の SSL1 は細胞質、SSL2 は小胞体、SSL3 は小胞体および細胞質の両方であることがわかった。(下図)



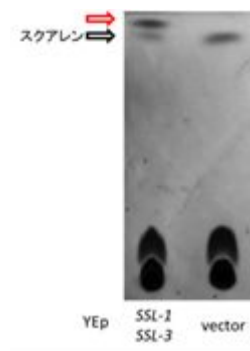
GFP-SSL1 (anti-GFP)      mCherry-SSL2 (anti-mCherry)      mCherry-SSL3 (anti-mCherry)



SSL3 は膜に局在するための疎水性領域を持たないにも関わらず小胞体膜に局在できたことは、小胞体上に SSL3 の受容体となるタンパクが存在し、しかもそれが酵母のような異種のタンパク質でも結合可能であることを示す。この発見は、SSL3 受容体の同定や、膜との結合のオンオフ調節を解明することで、より高効率で脂質を生産できる酵母の改良の可能性につながるため、大変意義深い。

(4) ポトリオコッセン合成酵素発現酵母の中性脂質組成

(2) で示したように SSL1, 3 を酵母に共発現した場合に ZA 感受性を改善させられる。さらには *B. braunii* の性質からこれらの酵素が協同してポトリオコッセンを合成していると予想される。そこで SSL1, 3 を共発現させた酵母から中性脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで分離したところ、予想通りポトリオコッセンに相当する位置に SSL1, 3 発現酵母特異的な脂質を検出できることがわかった (右図赤矢印)。

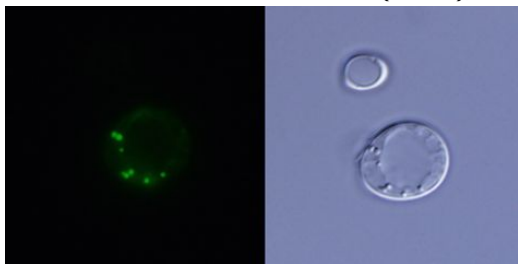


その後の分析で、酵母で作られるポトリオコッセンは、*B. braunii* が作るものと異なり、メチル化などの修飾を受けていない、C30 のポトリオコッセン単一標品であることがわかった。この性質により、今後この脂質を純化する際の有用なポトリオコッセン供給源としてこの株を利用でき、大きな成果といえる。

(5) ボトリオコッセン合成酵素発現酵母が作る脂質貯蔵箇所

酵母にボトリオコッセンを合成させることが出来たので、次にこれらを分泌させるための準備として、合成されたボトリオコッセンがどこに蓄積するかを調べた。しかし、酵母には脂質貯蔵箇所として天然の脂質滴が存在し、それらがボトリオコッセンに由来するのか、酵母の内在性酵素が作るトリアシルグリセロールに由来するのかを区別するのは難しい。

そこで酵母のトリアシルグリセロールに関わる遺伝子(*ARE2*, *DGA1*, *LRO1*)をあらかじめ破壊した上で、*SSL1, 3*を導入し、その酵母が作る脂質滴の局在を観察した。その結果、*SSL1, 3*共発現酵母では、液胞の近傍に数個の脂質滴を作ることがわかった(下図)。



これらの発見を生かして、今後、合成したボトリオコッセンを脂質滴形成に使わずに分泌を行う酵母を作製していく予定である。

#### 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 2件)

Kajiwara, K., Ikeda, A., Aguilera-Romero, A., Castillon, G. A., Kagiwada, S., Hanada, K., Riezman, H., Muñoz, M., Funato, K. (2014) Osh proteins regulate COPII-mediated vesicular transport of ceramide from the endoplasmic reticulum in budding yeast. *Journal of Cell Science* 15:127:376-387. 査読有  
doi: 10.1242/jcs.132001

Suzuki, R., Ito, N., Uno, Y., Nishii, I., Kagiwada, S., Okada, S. and Noguchi, T. (2013) Transformation of lipid bodies related to hydrocarbon accumulation in a green alga, *Botryococcus braunii* (Race B). *PLoS One* 8:e81626. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0081626

[学会発表](計 7件)

三井菜々香、野口哲子、鍵和田聡 緑藻 *Botryococcus braunii* のトリテルペン合成酵素群の出芽酵母での発現と細胞内局在 日本植物学会第 77 回大会 2013 年 9 月 14 日、札幌

Suzuki, R., Uno, Y., Nishii, I., Kagiwada,

S. and Noguchi, T. Biosynthesis and accumulation of hydrocarbons and polysaccharides in a colonial green alga, *Botryococcus braunii* race B. 10th International Phycological Congress Annual Meeting, Aug. 8th, 2013, Orlando, USA

Uno, Y., Suzuki, R., Ito, N., Kagiwada, S., Nishii, I. and Noguchi, T. Biosynthesis and accumulation of lipids and polysaccharides in a colonial green alga, *Botryococcus braunii* race B, 第 54 回日本植物生理学会年会 2013 年 3 月 23 日、岡山

Miyake, N., Nakamichi, S. and Kagiwada, S. Multi-layered ER induced by ALS8-type Scs2p can be dissolved by modulating phospholipid metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 13 日、福岡

Oshima, A., Yokoi, R., Masuda, M. and Kagiwada, S. Abundance of the Opi1p transcriptional factor involved in the transcriptional regulation of phospholipid biosynthetic genes is regulated by its binding to membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 13 日、福岡

鈴木玲子、宇野由紀、鍵和田聡、西井一郎、野口哲子 緑藻 *Botryococcus braunii* B 品種における脂質の分泌に伴うオイルボデーの動態、日本植物学会第 76 回大会 2012 年 9 月 15 日、姫路

Hirose, M., Nishii, I., Kagiwada, S. and Noguchi, T. Hydrocarbon biosynthesis and secretion in a green alga, *Botryococcus braunii*. The 2nd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, Jun. 12th, 2012, San Diego, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.nara-wu.ac.jp/rigaku/2014/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍵和田 聡 (KAGIWADA, Satoshi)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40281662