

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25450308

研究課題名(和文) 微細藻類の屋外光環境受容と細胞応答の解析

研究課題名(英文) Photosensing of microalgae under natural environments and their photoresponses

研究代表者

篠村 知子 (SHINOMURA, Tomoko)

帝京大学・理工学部・教授

研究者番号：80579235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ燃料原料としての有用性が期待されている微細藻類ユーグレナを屋外で効率よく培養生産するためには、実際のバイオマス生産性を下げる環境要因としての太陽光の強光ストレスが課題である。本研究では、強光照射時のユーグレナ細胞の応答を、細胞増殖やカロテノイド蓄積などの測定値を指標に解析し、強光下での増殖阻害や、カロテノイド分子種の組成変化を明らかにした。ユーグレナのカロテノイド合成遺伝子であるフィトエン合成酵素遺伝子(EgcrB)などを新たに単離し、RNAiによりその遺伝子発現を抑制した細胞を解析することで、カロテノイド合成と強光ストレスとの強い相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Euglena gracilis, a unicellular phytoflagellate, has been attracting much attention as a potential feedstock for renewal energy. In outdoor open-pond cultivation, the productivity of this alga decreases under the direct solar radiation. Here we identified carotenoid biosynthetic genes such as phytoene synthase gene (EgcrB) from *E. gracilis* and found that they are actually functional genes. This study indicated that excess light-stress increased the expression of EgcrB, which codes for the enzyme catalyzing the first carotenoid specific step, and caused an accumulation of carotenoids in the cells of *E. gracilis*. Our results also indicated that suppression of EgcrB caused a significant decrease in carotenoid and chlorophyll contents in *E. gracilis* accompanied by changes in intracellular structures, suggesting that carotenoids contribute to photoprotection of this alga during the long-term acclimation to light-induced stress.

研究分野：植物生理学

キーワード：微細藻類 Euglena カロテノイド合成 強光ストレス フィトエン合成酵素 RNAi

## 1. 研究開始当初の背景

微細藻類は環境に対する細胞応答解析のモデル系として優れているばかりでなく、近年はバイオ燃料の次世代原料としての重要性も再認識され、国際的な研究・開発競争が活発になっている。ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は進化系統上特異な分類群に属する真核微細藻類であり、脂質生合成においても緑藻類や高等植物を含む緑色植物とは異なる特徴をもつ。すなわち、ワックスエステル発酵とよばれる特有の代謝系により、ユーグレナは嫌気的条件下で迅速に同化貯蔵多糖であるパラミロン (デンプンに類似するが -1,3-グルカンである) を分解して脂肪酸と脂肪アルコールからなるワックスエステルを合成することが知られている。このワックスエステルはミリスチン酸とミリスチルアルコールが主な成分であることから、ジェット燃料原料としての潜在的な有用性が指摘されている。ユーグレナをバイオジェット燃料の原料として利用するには、ワックスエステル発酵に持ち込むための藻体バイオマスを効率よく培養生産する必要がある。

微細藻類を産業規模で大量生産するには、採算性からもライフサイクルアセスメントの観点からも屋外オープンポンドでの光独立栄養による培養が必要とされている。しかし現状では、実験室での理想的な人工環境下での最大増殖速度が屋外での培養で再現されることはまれであり、ユーグレナもその例外ではない。この問題を解決するひとつの糸口を得るため、これまでに我々は光環境に注目した培養条件の予備検討を行い、ユーグレナを、光強度  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  以上かつ水温  $20$  以下の条件 (以降、「強光・低温条件」と呼ぶ) で培養すると、細胞増殖速度が著しく抑制され、細胞中にカロテノイドを蓄積する結果を得ていた。この光強度や水温条件は、ユーグレナの培養に好適な光強度と温度の組み合わせ (例えば光強度約  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  かつ水温約  $25$ ) に比べれば強光かつ低温ではあるが、屋外の自然環境としては特別な組み合わせではなく、例えば栃木県宇都宮市では、年間の日照時間の約  $1/2$  以上がユーグレナの強光・低温条件に該当する。すなわち、屋外オープンポンド培養では、ユーグレナは強光・低温による増殖を阻害され易い環境にあることが推測される。

我々は最終的には屋外の強光環境下でも高効率で増殖するようなユーグレナ細胞の分子育種を目指し、本研究の期間内には、強光阻害や UV 光応答に関するユーグレナ細胞応答の分子機構の理解を目指すこととした。

## 2. 研究の目的

ジェット燃料原料としての潜在的な有用性が期待されている微細藻類ユーグレナを屋外で効率よく培養生産するためには、実際のバイオマス生産性を下げる環境要因としての光強度や UV 光などの光環境に対するユー

グレナの細胞応答の知見を蓄積し、培養設備の設計に反映させる必要がある。本研究では、実験室での人工的環境下での培養実験と屋外での培養実験とを対応させつつ、強光などの照射時のユーグレナ細胞の応答を、細胞増殖やカロテノイド蓄積やジャスモン酸蓄積などの測定値を指標にすることで、微細藻類バイオマスの高効率生産に役立てることを目指した。さらに、強光などの光照射により引き起こされるユーグレナ細胞応答に関わる遺伝子の探索を行い、将来の微細藻類分子育種の方針を設定するための基盤的情報を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究は次に示す順序および内容で進めた。

### (1) 強光照射時の細胞応答の解析

我々の行った予備的な実験結果から、強光・低温条件によりユーグレナの細胞増殖が著しく阻害され、かつ細胞内にカロテノイド類を蓄積することがわかっていたので、強光照射による細胞増殖阻害およびカロテノイド蓄積の分子機構を明らかにする一歩として、強光・低温条件においてユーグレナの増殖やカロテノイド蓄積がどのような影響を受けるかを調べた。カロテノイドは光合成に関与するものだけでも約  $150$  種類は存在しており、ユーグレナの主要カロテノイドが、培養条件によってどの分子種が蓄積するのかわかる HPLC による解析で明らかにすることを目指した。

### (2) 強光応答に関わる遺伝子の探索

強光照射とカロテノイド合成との関連を分子レベルで明らかにすることを目指し、カロテノイド合成のキーエンザイムであるフィトエン合成酵素やその下流の一連のカロテノイド合成酵素遺伝子を、ユーグレナの EST データベースでオーソログやホモログ配列を探索し、cDNA クローニングにより遺伝子を得ることを目指した。

### (3) カロテノイド合成遺伝子の強光応答における機能の解析

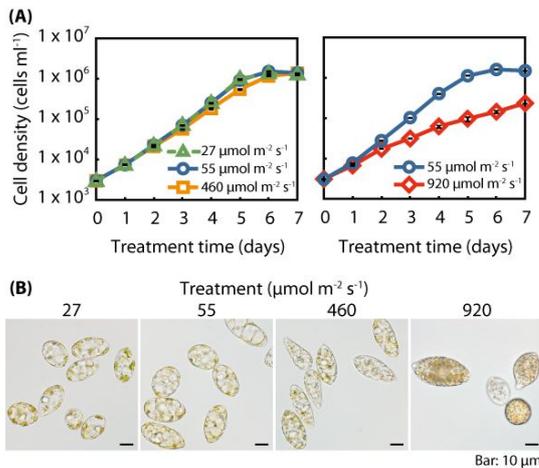
クローニングしたカロテノイド合成遺伝子の発現が強光・低温条件で誘導もしくは抑制されるかどうか、あるいは遺伝子発現抑制株を作成して生理応答を確認するなどの実験を計画した。

## 4. 研究成果

### (1) 強光照射時の細胞応答の解析

ユーグレナ細胞を本研究室の「標準的な培養光条件」 ( $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 及び細胞増殖が著しく阻害されかつ細胞内に赤褐色の色素を蓄積する「強光条件」 ( $920 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) など、さまざまな強度の光照射下にて培養し、それらの細胞に蓄積する色素がカロテノイドであることを確認した (図 1、雑誌論文 (1))。

その分子種の組成比について、HPLC を用いて測定した。その結果、ユーグレナ細胞中の主要なカロテノイドとして カロテン、ネオキサンチン、ジアジノキサンチン、ジアトキサンチンが検出された(図2、雑誌論文(1))。これらの4種類のカロテノイドの中で、ジアジノキサンチンが約80%を占めていた(図2、雑誌論文(1))。また、低温・強光ストレスによってこれらのカロテノイドの存在割合が変化することが明らかになった(論文投稿



中)。

図1. 様々な光強度下で培養したユーグレナ細胞の増殖と、細胞の顕微鏡観察画像(雑誌論文(2)Fig.5より引用)

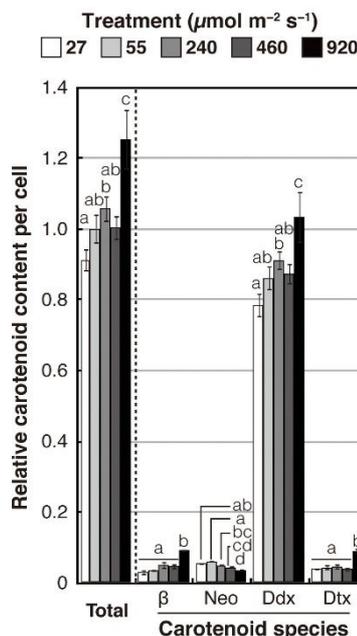


図2. 様々な光強度下で培養したユーグレナ細胞に蓄積するカロテノイド分子種の存在比(雑誌論文(1)Fig.3より引用)

## (2) ユーグレナのカロテノイド合成系遺伝子の単離・同定と発現解析

ユーグレナにおけるカロテノイド合成経路は明らかになっていなかったため、まず、高等植物の既知のカロテノイド合成酵素のアミノ酸配列を用い、ユーグレナの EST デー

タに対するアミノ酸配列のホモロジー検索 (tblastn 解析) を行った。トウガラシ (*Capsicum annuum*) の PSY1 と 36.8% の同一配列 (51.6% の類似) を示す EST 配列を見出した。この配列を含む mRNA がユーグレナ細胞において実際に発現していることを RT-PCR 法により確認した。

同様に、カロテノイド合成経路の遺伝子群の単離と機能解析を進めた。その結果、カロテノイド合成経路の初期段階であるゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) 合成酵素 (CrtE) やフィトエン合成酵素 (CrtB)、フィトエン不飽和化酵素 (CrtP)、 $\beta$ -カロテン不飽和化酵素 (CrtQ) のオルソログ遺伝子と推察される EST を見出した。これらの遺伝子の cDNA を単離し、大腸菌を宿主とする異種タンパク質発現系を用いた相補実験を行い、機能を確認した。好気性細菌 *Pantoea ananatis* の *crtE* 遺伝子とともにユーグレナの *crtB* (*EgcrB*) を発現させた大腸菌がフィトエンを合成したことから、*EgcrB* がフィトエン合成酵素遺伝子であることが示された。

さらに、これらの遺伝子が強光条件下でどのような発現制御を受けるのかを解析した。実験室での培養実験の結果、ユーグレナを  $25^{\circ}\text{C}$ ・光強度  $920 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  で培養した場合に、*EgcrB* の発現量が 1.3 倍に上昇し(図3、雑誌論文(2))、細胞内にカロテノイドを蓄積することが明らかになった(図1、雑誌論文(1))。

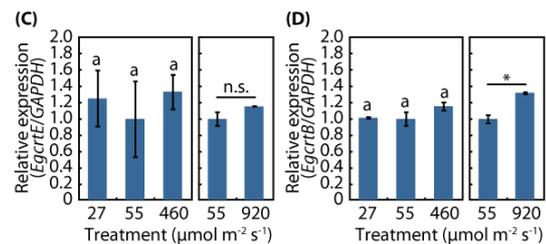


図3. 様々な光強度下で培養したユーグレナ細胞におけるカロテノイド合成遺伝子の発現レベルの解析(雑誌論文(2)Fig.5より引用)(C): *EgcrE*, (D): *EgcrB*

## (3) カロテノイド合成遺伝子の強光応答における機能の解析

ユーグレナが強光傷害回避のためにカロテノイドを利用していることが考えられたので、カロテノイド合成遺伝子の発現量を変化させて表現型を解析することを目指し、まずは発現量を減少させた場合の影響を観察するための RNAi によるノックダウン株を作成するための一連の実験環境の整備と条件検討を行った。*EgcrB* 遺伝子を RNAi により発現抑制した細胞を作成した。その結果、*EgcrB* の dsRNA を導入した細胞における *EgcrB* の発現量は、培養3日後には対照実験区と比べて著しく減少し、培養7日後でも発現量の減少は持続した(図4、雑誌論文(1))。

*EgcrTB*の発現を抑制すると、主要な総カロテノイドの総量は対照区の10%に減少し、ジアジノキササンチンに対するジアトキササンチン比が増加し、1細胞当たりのクロロフィルa量、クロロフィルb量およびクロロフィルa/b比いずれも有意な減少を示した(雑誌論文(1))。これらの細胞は培養3日後以降に細胞増殖が抑制され、細胞が白色化した(図4、雑誌論文(1))。透過型電子顕微鏡観察の結果、これらの細胞では葉緑体の数が著しく減少して細胞内にパラミロン顆粒が蓄積した(雑誌論文(1))。

以上の結果から、カロテノイド合成系遺伝子の発現を抑制した細胞では、通常は良好な増殖が見られる光条件(光強度  $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  連続白色光照射)でも光ストレスを受けたような表現型を示すことが明らかになり(図4、雑誌論文(1))。ユーグレナ培養におけるカロテノイドの光ストレス緩和機能の重要性が明らかになった。

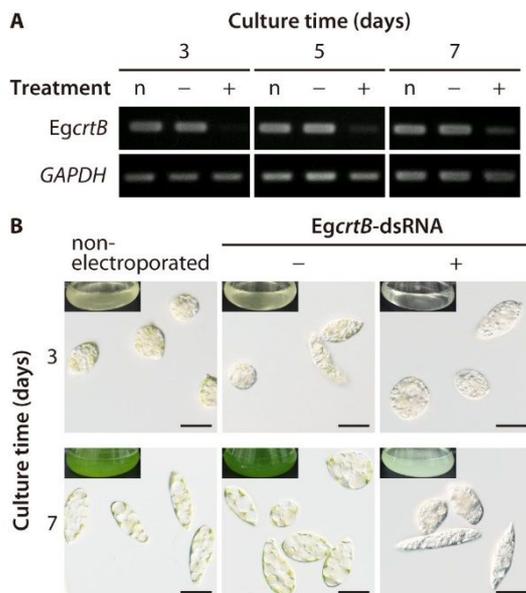


図4. *EgcrTB* 遺伝子を RNAi により発現抑制したユーグレナ細胞における *EgcrTB* 遺伝子発現レベルの解析と表現型の顕微鏡観察像(雑誌論文(1)Fig.4より引用)

以上、本研究課題により、ユーグレナ細胞の屋外培養での生産性が下がる環境要因の一つが強光照射であると明確に特定することができ、カロテノイド合成と強光ストレスとの強い相関を明らかにした。カロテノイド遺伝子の単離についても予想以上に進展した。そこで、カロテノイド合成系の研究を中心に集中的に分子機構の解析を進めることで、屋外培養での微細藻類の生産性低下の問題解決により直接的な解決策を与える新たな研究課題の提案を計画し、平成29年度に新たに採択された科研費基盤研究Cの新たな課題(課題番号17K07945「微細藻類の強光ストレス耐性向上のための分子機構の解明」)を通じて実現を目指すこととした。従って、

本研究課題は、実質的には平成28年度に終了した。

#### 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2件)

- (1) Kato S, Soshino M, Takaichi S, Ishikawa T, Nagata N, Asahina M, Shinomura T (2017) Suppression of the phytoene synthase gene (*EgcrTB*) alters carotenoid content and intracellular structure of *Euglena gracilis*, BMC Plant Biology, 17: 125 (pp.1-10) DOI 10.1186/s12870-017-1066-7 (査読有)
- (2) Kato S, Takaichi S, Ishikawa T, Asahina M, Takahashi S, Shinomura T (2016) Identification and functional analysis of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (*crtE*) and phytoene synthase gene (*crtB*) for carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*, BMC Plant Biol, 16:4 (pp.1-12) DOI 10.1186/s12870-015-0698-8 (査読有)

[学会発表](計31件)

- (1) Shota Kato, Koji Takahashi, Yuri Tanno, Hisakazu Yamane, Tomoko Shinomura, Effects of jasmonates on the content of photosynthetic pigments in *Euglena gracilis*, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017年3月
- (2) Shun Tamaki, Shota Kato, Tomoko Shinomura, Takahiro Ishikawa, Hiromasa Imaishi, Functional characterization of  $\beta$ -carotene hydroxylase genes in microalga *Euglena gracilis*, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017年3月
- (3) 加瀬大地, 加藤翔太, 湯本絵美, 横田孝雄, 山根久和, 石川孝博, 永田典子, 篠村知子, 微細藻類 *Euglena gracilis* におけるジャスモン酸合成系遺伝子の探索および発現解析, 第6回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム, 宇都宮, 2016年12月
- (4) 曾篠美花, 加藤翔太, 高市真一, 石川孝博, 朝比奈雅志, 篠村知子, 微細藻類ユーグレナのフィトエン合成酵素遺伝子の発現抑制がカロテノイド組成に及ぼす影響, 第6回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム, 宇都宮, 2016年12月
- (5) 高橋晃司, 渡邊陽太, 加藤翔太, 山根久和, 篠村知子, ジャスモン酸類の添加がユーグレナのクロロフィル含量に及ぼす影響, 第6回宇都宮大学オプトバイオ

- シンポジウム、宇都宮、2016年12月
- (6) 丹野夕麗、小島崇裕、加藤翔太、石川孝博、朝比奈雅志、篠村知子、微細藻類 *Euglena gracilis* の明暗周期培養におけるカロテノイド合成系遺伝子発現の解析、第6回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、宇都宮、2016年12月
- (7) 加藤翔太、高市真一、石川孝博、永田典子、朝比奈雅志、篠村知子、強光が微細藻類ユーグレナの光合成色素含量に及ぼす影響、第6回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、宇都宮、2016年12月
- (8) 丹野夕麗、加藤翔太、石川孝博、朝比奈雅志、篠村知子、*Euglena gracilis* のカロテノイド合成系の遺伝子発現に及ぼす明暗周期の影響解析、ユーグレナ研究会第32回研究集会、東京、2016年11月
- (9) 加藤翔太、加瀬大地、高橋晃司、渡邊陽太、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、篠村知子、*Euglena gracilis* の光環境応答におけるジャスモン酸の生理機能の解析、ユーグレナ研究会第32回研究集会、東京、2016年11月
- (10) 加藤翔太、高橋晃司、渡邊陽太、加瀬大地、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、篠村知子、微細藻類 *Euglena gracilis* の光ストレス応答におけるジャスモン酸の生理機能の解析、植物化学調節学会第51回大会、高知、2016年10月
- (11) 加藤翔太、高市真一、石川孝博、永田典子、朝比奈雅志、高橋宣治、篠村知子、光ストレス下における微細藻類 *Euglena gracilis* のカロテノイド組成と葉緑体構造の解析、日本植物学会第80回大会、沖縄、2016年9月
- (12) 曾篠美花、加藤翔太、高市真一、石川孝博、児玉豊、朝比奈雅志、高橋宣治、篠村知子、微細藻類ユーグレナのフィトエン合成酵素遺伝子 (*Egcr1B*) 発現の調節、日本植物学会第80回大会、沖縄、2016年9月
- (13) 加瀬大地、加藤翔太、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、石川孝博、篠村知子、微細藻類 *Euglena gracilis* のジャスモン酸合成系遺伝子の探索、日本植物学会第80回大会、沖縄、2016年9月
- (14) Shota Kato, Shinichi Takaichi, Takahiro Ishikawa, Masashi Asahina, Senji Takahashi, Tomoko Shinomura, Function of carotenoids and their biosynthesis under light stress in *Euglena gracilis*, 第57回日本植物生理学会年会、盛岡(岩手大学)、2016年3月
- (15) Mika Soshino, Shota Kato, Shinichi Takaichi, Takahiro Ishikawa, Masashi Asahina, Senji Takahashi, Tomoko Shinomura, Effects of suppression of the phytoene synthase gene on cell concentration and carotenoid synthesis in *Euglena gracilis*, 第57回日本植物生理学会年会、盛岡(岩手大学)、2016年3月18-20日
- (16) Tomoko Shinomura, A potential feedstock for biofuel production from microalgae based on their natural history and basic research of their environmental responses, Invited Seminar of ImPaCT Project, the Department of Chemistry, School of Science, the University of Tokyo, Tokyo University, 2016年3月
- (17) 加藤翔太、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、高橋宣治、篠村知子、微細藻類 *Euglena gracilis* のカロテノイド合成系の強光ストレス応答、第5回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、宇都宮、2015年12月
- (18) 曾篠美花、加藤翔太、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、篠村知子、微細藻類ユーグレナのフィトエン合成酵素遺伝子 (*Egcr1B*) の発現抑制が細胞増殖に及ぼす影響、第5回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、宇都宮、2015年12月
- (19) 西村裕一、中林菜月、加瀬大地、加藤翔太、篠村知子、サリチル酸が微細藻類ユーグレナの増殖に及ぼす影響、第5回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、宇都宮、2015年12月
- (20) 加瀬大地、加藤翔太、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、石川孝博、篠村知子、培養時の光環境が微細藻類 *Euglena gracilis* の内生ジャスモン酸量に及ぼす影響、第5回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、宇都宮、2015年12月
- (21) 加藤翔太、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、高橋宣治、篠村知子、低温・光ストレスが *Euglena gracilis* の増殖とカロテノイド組成に及ぼす影響、ユーグレナ研究会第31回研究集会、宮崎、2015年11月
- (22) 加瀬大地、加藤翔太、湯本絵美、横田孝雄、山根久和、石川孝博、篠村知子、微細藻類 *Euglena gracilis* の内生ジャスモン酸の測定と機能解析、植物化学調節学会第50回大会、東京、2015年10月
- (23) 加藤翔太、中林菜月、西村裕一、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、高橋宣治、篠村知子、微細藻類 *Euglena gracilis* のカロテノイド合成系の温度および光環境応答、日本植物学会第79回大会、新潟、2015年9月
- (24) Shota Kato, Daichi Kase, Tomoyo Oyatsu, Shinichi Takaichi, Takahiro Ishikawa, Masashi Asahina, Senji Takahashi, Tomoko Shinomura, Expression of phytoene synthase gene in *Euglena gracilis* and its responses to cold-light stress, 12<sup>th</sup>

- International Meeting on  
Biosynthesis, Functions and  
Synthetic Biology of Isoprenoids,  
Vancouver, Canada, June, 2015
- (25) 加藤翔太、加瀬大地、大谷津知世、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、高橋宣治、篠村知子、ユーグレナのカロテン合成系遺伝子の単離と機能解析、第56回日本植物生理学会、東京、2015年3月
- (26) 加藤翔太、加瀬大地、大谷津知世、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、篠村知子、微細藻類ユーグレナにおけるカロテノイド合成系の強光ストレス応答、第4回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、宇都宮、2014年12月
- (27) 加瀬大地、大谷津知世、曾篠美花、加藤翔太、湯本絵美、横田孝雄、篠村知子、光環境因子が及ぼす *Euglena* 細胞への影響、第4回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、宇都宮、2014年12月
- (28) 加藤翔太、加瀬大地、大谷津知世、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、篠村知子、ユーグレナのフィトエン合成酵素遺伝子 *crtB* の単離と機能解析、ユーグレナ研究会第30回研究集会、奈良、2014年11月
- (29) 加藤翔太、加瀬大地、大谷津知世、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、篠村知子、強光ストレス下における微細藻類 *Euglena* のカロテノイドの機能の解明、植物化学調節学会第49回大会、京都、2014年10月
- (30) 秋庭聖也、澤井元輝、高木涼太、榎元廣文、篠村知子、オイルレッドO染色を用いた脂質蓄積微細藻類の簡便なスクリーニング法の開発、ユーグレナ研究会第29回研究集会、石川県野々市市、2013年11月
- (31) Tomoko Shinomura, The 2nd Pacific Rim Energy & Sustainability Conference, Biodiesel fuel production from algae: problems in cultivation from a laboratory to an outdoor, Hiroshima, July, 2013

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 帝京大学理工学部バイオサイエンス学科の研究活動、学会発表  
[http://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science\\_tech/bio\\_science/research.html](http://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science_tech/bio_science/research.html)
- (2) 帝京大学研究室紹介：植物分子細胞学研究室（篠村知子研究室）  
[http://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science\\_tech/bio\\_science\\_shinomura.html](http://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science_tech/bio_science_shinomura.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠村 知子 (SHINOMURA, Tomoko)  
帝京大学・理工学部・教授  
研究者番号：80579235

(2) 研究協力者

朝比奈 雅志 (ASAHINA, Masashi)  
帝京大学・理工学部・准教授

加藤 翔太 (KATO, Shota)  
帝京大学・理工学部・研究員