

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820357

研究課題名(和文) 油脂蓄積珪藻からバイオディーゼル原料を放出させ、省エネルギーに回収する技術の開発

研究課題名(英文) Extracellular secretion of free fatty acid from a highly oil-accumulation diatom

研究代表者

前田 義昌 (Maeda, Yoshiaki)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30711155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂質高生産珪藻 *Fistulifera solari* 内に蓄積された油滴状の脂質を分解し、遊離脂肪酸として細胞外に放出することを目指し、遺伝子組み換え技術を用いてリパーゼの過剰発現を試みた。その結果、リパーゼ遺伝子高発現による細胞毒性の可能性が示唆された。そこで、加水分解活性部位に変異を加えた変異型リパーゼを GFP と融合して発現させたところ、細胞毒性を抑制でき、標的リパーゼの一部が油滴を包むように局在する様子が観察された。今後、当該リパーゼを細胞毒性示さないレベルで発現させるための発現制御システムを構築することにより、油滴からの遊離脂肪酸放出に適用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of lipase gene in the oleaginous diatom *Fistulifera solari* was performed in order to degrade triacylglycerol (TAG), and release free fatty acids from the transformant cells. However, the transformant only maintained the mutated lipase gene that lacked catalytically important residues, suggesting the cytotoxic effect of the lipase expression. To test whether the target lipase localize on the oil bodies, the mutated lipase-GFP fusion protein were expressed. Almost fusion protein exist in cytoplasm, while a part of the fusion protein was observed on the oil bodies. Although an inducible gene expression system could not be developed in this study, controlled expression of the target lipase is expected to be useful for degradation of TAG, and subsequent fatty acid secretion.

研究分野：生物工学

キーワード：微細藻類 バイオ燃料 遺伝子組み換え 組み換えタンパク質 リパーゼ 発現誘導システム

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の枯渇や地球温暖化への対策として、バイオ燃料生産への期待が高まりを見せている。その中でも既存のディーゼルエンジンで使用可能なバイオディーゼル(微細藻類などの生物由来のトリアシルグリセロール (TAG) とメタノールのエステル交換反応により生じる脂肪酸メチルエステル) は、直近の代替燃料として注目を浴びている。しかし現状では、燃料生産の際に投入・消費されるエネルギーの方が、生産される燃料に含まれるエネルギーよりもはるかに高く、その比率 (Energy production ratio, EPR) は、微細藻類を用いた場合には 0.1 程度である。この EPR を如何に大きくするかが今後の課題となっている。

当研究室ではこれまでに、バイオディーゼルの原料となる油脂を高生産する珪藻 *Fistulifera solaris* の取得に成功している。本株はバイオマスの 60% に達する油脂を細胞内に蓄積できるだけでなく、生育速度が速く、野外大量培養への適合性も高い等、世界中で研究されている数多くの微細藻類の中でも、*Nannochloropsis* 属等と同様に、油脂生産に最も適した株の一つである。しかし、このような有望株を用いた場合でも、EPR は 0.5 程度が上限である。その主な原因は、遠心分離などによる藻体回収工程における大きなエネルギー消費にある。そのため、この藻体回収工程を省エネルギー化しない限り、EPR の向上は望めないことが試算されていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、従来不可避であると考えられてきた培養液からの細胞回収工程を省略するために、油滴内の脂質(撮りあ知るグリセロール: TAG) を加水分解し、遊離した脂肪酸を細胞外に放出させることを目的とした。具体的には、TAG のエステル結合を消化する活性の高いリパーゼを、油滴に接触させる形で大量発現させる。細胞外に放出された脂肪酸 (FA) は、その高い疎水性により培養液に溶けずに層分離する。そのため、藻体回収工程を経ずにバイオディーゼルの原料となる脂肪酸を容易に回収できると考えられる

3. 研究の方法

F. solaris のゲノム情報からリパーゼ遺伝子の *in silico* 探索を行ったところ、Patatin 様リパーゼドメインを持つ新規リパーゼ候補遺伝子が発見された。この新規リパーゼと、出芽酵母において油滴に局在が確認されている TDL3 リパーゼの特徴を比較すると、リパーゼ触媒中心を持つこと、Patatin 様リパー

ゼドメインの前に疎水性ドメインを持つこと、更にアシル基転移活性触媒中心を併せ持つことなど、多くの特徴を共有していた (Fig. 1)。疎水領域は油滴を覆うリン脂質膜への結合に利用されていると考えられる。本研究ではこの新規リパーゼを GFP と融合させて発現させることを試みた。

Fistulifera solaris 由来
新規リパーゼ



出芽酵母由来 TDL3 リパーゼ

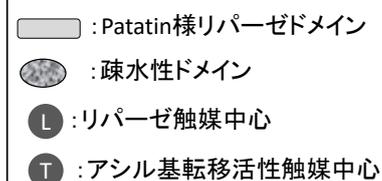


Fig. 1 当該株で見出された新規リパーゼと、出芽酵母で油滴への局在が確認された TDL3 リパーゼの比較

4. 研究成果

(1) リパーゼの発現・局在解析

標的とするリパーゼ遺伝子を *F. soaris* の cDNA から PCR 増幅し、強発現プロモーターである P_{GAPDH} の下流に挿入した (J Proteome Res, 2013, 12, 5293–5301)。この際、さらに下流に予め挿入した GFP 遺伝子と融合発現させるためにリパーゼ遺伝子の終止コドンを除いてクローニングを行った。構築したプラスミドをパーティクルボンバードメント法により珪藻細胞に導入した。得られた形質転換体がリパーゼ遺伝子を保持しているか確認するため、該当リパーゼ遺伝子を特異的に PCR 増幅し、シーケンス解析を行った。その結果、ゲノム上へのリパーゼ遺伝子の導入は確認されたものの、導入されたリパーゼ遺伝子は、触媒部位をコードする領域、具体的には、加水分解酵素の一般的な触媒活性部位である三つ組み残基のうちのアスパラギン酸をコードする領域含む 510 塩基が欠損していた (Fig. 2)。このことは、リパーゼを恒常的に強発現することにより、細胞毒性が生じる可能性が示唆しており、触媒部位に変異の入ったリパーゼ発現株のみ増殖できたものと考えられた。

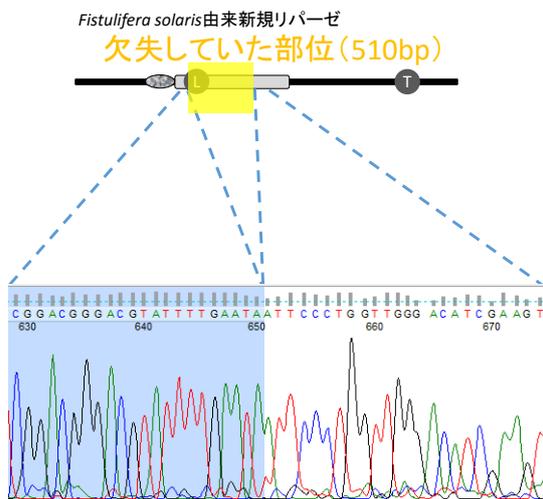


Fig. 2 当該株に導入したリパーゼ遺伝子の変異部位

一方、標的リパーゼの局在を確認するため、細胞毒性を示さないように触媒活性部位に部位特異的変異を加えた、加水分解活性を示さない変異リパーゼと、GFPの融合タンパク質発現ベクターを構築した。構築したベクターを当該株に導入の結果、加水分解能を失わせることで、細胞毒性を抑制し、局在解析を容易にすることができた。その結果、標的リパーゼの多くは細胞質に局在することが確認されたが、一部、油滴を包むように GFP 蛍光が局在する様子が観察され、標的リパーゼが油滴と相互作用する可能性が示唆された (Fig. 2)。今後、当該リパーゼを安定的に、細胞毒性を抑えた条件で発現することにより、油滴中のリパーゼから遊離脂肪酸に分解し、細胞外に放出するシステムを構築できると期待される。

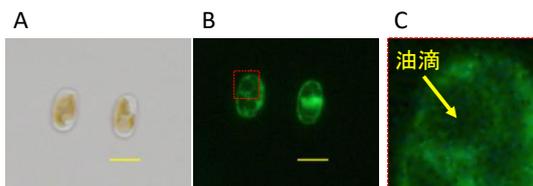


Fig. 3 変異リパーゼ-GFP 融合タンパク質発現形質転換体の明視野顕微鏡 (A)、及び蛍光顕微鏡 (B, C) 観察像 CはBの赤区画の拡大像

(2) 発現誘導システムの構築

(1) で示した通り、遺伝子組み換え技術を用いてリパーゼの過剰発現を試みたところ、細胞毒性の可能性が示唆された。そこで、当該株のトランスクリプトーム解析で得られた情報を基に、細胞が定常期に達し、脂質の蓄積が完了した後にのみに発現する遺伝子を検索した。その結果、硝酸塩代謝関連遺伝

子、トランスポーター遺伝子など、複数の候補遺伝子を選抜した。選抜した候補遺伝子上流のプロモーター配列を特定し、その下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を配置した、発現制御ベクターを構築した。構築したベクターを当該株に導入し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、GFP 蛍光を示す形質転換体得られたものの (Fig. 4)、GFP 蛍光は常時確認され、脂質の蓄積が完了した後にのみに発現するという、ネイティブな機能を人工的に再現することはできなかった。これは、発現制御システムの構築には、発現制御ベクターに組み込んだプロモーター配列だけでは不十分であり、その他の転写調節因子結合部位の補助を得る必要があるためであると考えられる。現在、微細藻類においてこれらの転写調節因子結合部位の同定は進んでおらず、今後の研究課題であると考えている。

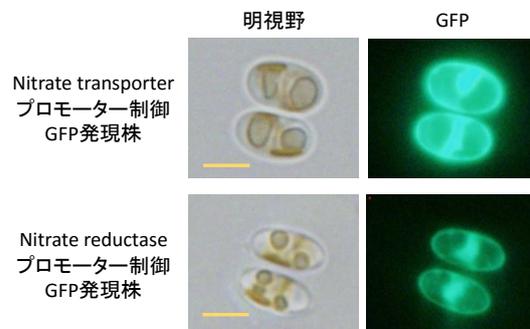


Fig. 4 Nitrate transporter、及び Nitrate reductase 遺伝子のプロモーター配列下流に GFP 遺伝子を導入して発現させた株の顕微鏡画像 緑色蛍光は栄養源の枯渇に関わらず、常に観察された。

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)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~biomol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 義昌 (MAEDA, Yoshiaki)

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：30711155