

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850223

研究課題名(和文) 微細藻類ユーグレナにおけるバイオ燃料生産増強および制御に向けた研究

研究課題名(英文) Studies on wax ester production in *Euglena gracilis*

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(系)・助教

研究者番号：90343417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：光合成生物ユーグレナは、低酸素状態で貯蔵多糖からバイオ燃料を生産する。ユーグレナによるバイオ燃料効率的生産を最終目的として、代謝メカニズム解明に向けた研究を展開した。特に、バイオ燃料増産・制御のための代謝改変ターゲットを、RNAiにより獲得することを目的として研究を展開した。糖・脂質代謝酵素の系統的ノックダウン実験の結果、低酸素下での脂質合成量および組成に大きく変化を及ぼす、3-ケトアシルCoAチオラーゼのアイソザイム3種類を見出した。中でもKAT1アイソザイムの発現抑制により、油脂が短鎖化し、低融点かつ酸化安定性の高いバイオディーゼル燃料を生産することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Euglena gracilis produces wax ester under hypoxic and anaerobic culture conditions. In wax ester fermentation, fatty acids are synthesized by reversing beta-oxidation in mitochondria. A major species of wax ester produced by E. gracilis is myristyl myristate. We reasoned that a slight metabolic modification would enable E. gracilis to produce a biofuel of ideal composition. In order to produce wax ester with shorter acyl chain length, we focused on isozymes of the enzyme 3-ketoacyl-CoA thiolase (KAT), a condensing enzyme of the mitochondrial fatty acid synthesis pathway in E. gracilis. Our gene silencing study of KAT isozymes revealed that three of six isozymes altered the wax ester amount and composition. In particular, silencing EgKAT1 induced a significant compositional shift to shorter carbon chain lengths in wax ester.

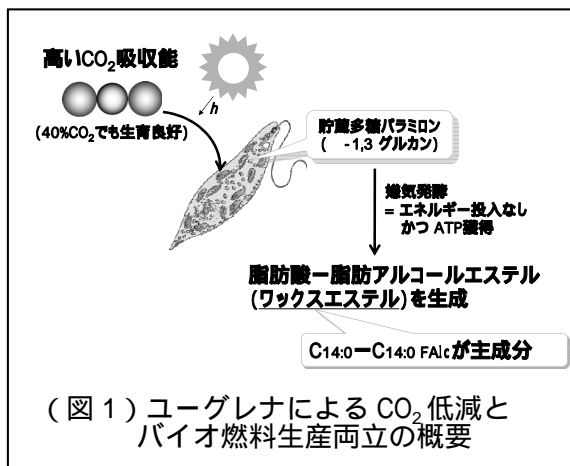
研究分野：細胞生理学

キーワード：バイオ燃料改質 低酸素下代謝 ワックスエステル ユーグレナ

1. 研究開始当初の背景

低炭素社会への転換は世界的課題であり、CO₂削減技術が求められている。同時に、石油資源枯渇や食糧価格高騰、食糧危機が現実化している。これらを一度に解決する策のひとつとして、微細藻類によるバイオ燃料生産が注目され、特に欧米で研究が加速している。藻類燃料関連ベンチャー企業も多く生まれているが、本格的利用や普及は途上である。特に燃料生産コストが高い、ライフサイクル評価(LCA)を考慮したCO₂削減が実現できていない、微細藻類の遺伝子操作は困難な場合が多く、代謝研究が遅れている、ことが問題である。

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。ユーグレナは40%の高濃度CO₂下でも光合成によりCO₂を吸収し生育する。そして、余剰の光合成産物や外部の炭素源から得た糖を、貯蔵多糖-1,3-グルカン「パラミロン」に変換して蓄積し、これを原料に嫌気発酵で脂肪酸-脂肪アルコールエステル「ワックスエステル」を生産する。ワックスエステルは容易にバイオディーゼルの原料に変換できるバイオ燃料である。主成分炭素長が14であり、植物油等と比較して短い。同時に、飽和化合物であるため、酸化安定性に優れている。これらの性質から、高い酸化安定性を持つ、低融点バイオディーゼル燃料への活用や、水素添加・熱分解後のバイオジェットへの活用が期待されている。



2. 研究の目的

ユーグレナによるCO₂の低減とバイオ燃料生産を両立する系を実現するためには、現状では生産量および生産過程でのCO₂放出量の両面の改善が必要である。ユーグレナが生産するワックスエステルを輸送用燃料として実用化する、という将来目標に向けては、さらなる生産量の向上や、質の向上、コスト

低減が求められる。主な課題は、生産量増大、原料からの変換効率向上、生産速度増大、に大別できる。加えて、実用化に向けた改良点としてバイオ燃料の質=組成の制御が望まれる。

3. 研究の方法

カーボンニュートラルなバイオ燃料生産への上記課題に対し、

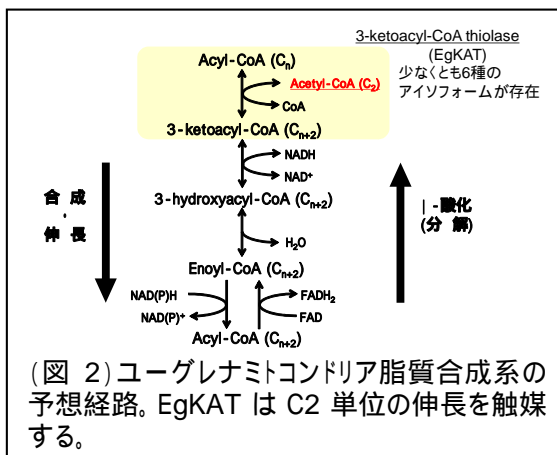
ロックダウンによって貯蔵多糖・ワックスエステル量の変動する、ミトコンドリア糖代謝・脂質代謝関連酵素の探索と解析、

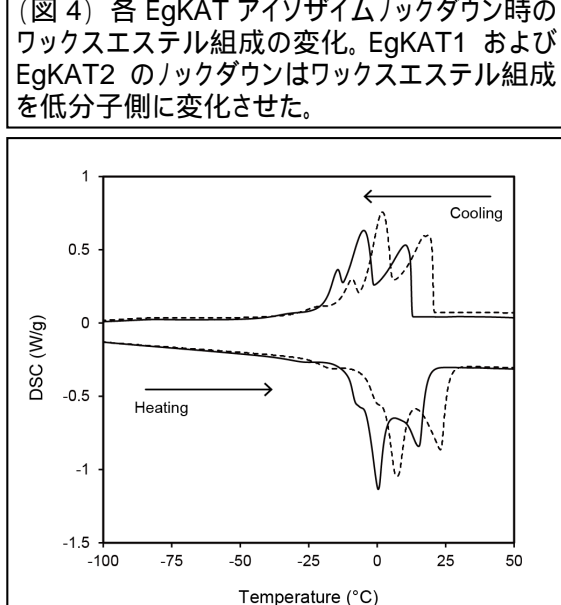
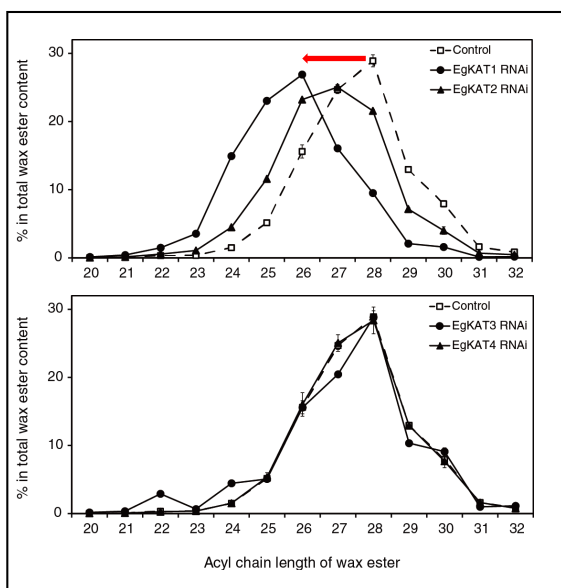
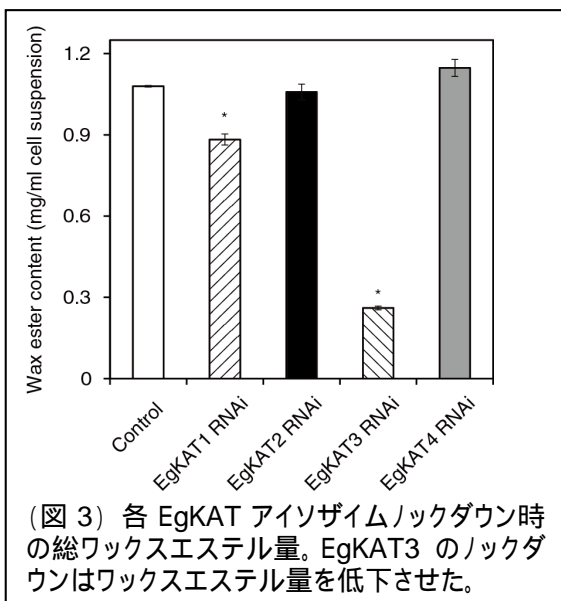
嫌気状態(=ワックスエステル生産状態)への初期応答に關与する細胞内シグナル伝達経路の同定と解析

の2項目のアプローチから研究を進めた。2年の研究期間中に、特にこの項目についてブレークスルーがあったため、そちらに焦点をあて研究を展開した。

4. 研究成果

解糖系、TCA回路、低酸素下脂質合成系の各酵素に着目し、RNAiによる発現抑制実験を行った。その中で「3-ケトアシルCoAチオラーゼ(KAT)」のロックダウン実験から得られた成果について概説する。KATはユーグレナの低酸素下脂質合成経路の中で、アセチル-CoAの縮合による脂肪酸伸長反応を触媒する酵素である。本研究においてKAT遺伝子候補を6種見出し、その中で3種類がワックスエステル合成経路で機能していることを明らかにした。ロックダウン細胞におけるワックスエステル量および組成の解析から、1種は短鎖~中鎖脂肪酸伸長酵素として、2種は中鎖~長鎖脂肪酸伸長酵素として機能していることを見出した。さらに、予想しなかった成果として、中鎖~長鎖脂肪酸伸長酵素の発現を抑制すると、ワックスエステル生産量はほとんど変化しなかったが、短い脂質鎖からなるワックスエステルが合成できた。このように、代謝改変により低温適性の向上したバイオ燃料を生産することに成功した。





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 1 件)

Nakazawa, M., Andoh, H., Koyama, K., Watanabe, Y., Nakai, T., Ueda, M., Sakamoto, T., Inui, H., Nakano, Y. and Miyatake, K.

Alteration of wax ester content and composition in *Euglena gracilis* with gene silencing of 3-ketoacyl-CoA thiolase isozymes. *Lipids* 50(5) 2015, 483-492. DOI: 10.1007/s11745-015-4010-3

〔学会発表〕(計 7 件)

小山 啓一郎、中澤 昌美 他「ユーグレナワックスエステル生産制御に向けた 3-ケトアシル CoA チオラーゼの機能解明」日本農芸化学会関西支部第 490 回講演会、2015 年 7 月 4 日、大阪府立大学(大阪府堺市)

中澤 昌美 他「ユーグレナ 3-ケトアシル CoA チオラーゼ発現抑制によるワックスエステル生産の制御」2015 年度日本農芸化学会大会、2015 年 3 月 26 日、岡山大学(岡山県岡山市)

Masami Nakazawa "Biofuel production in a CO₂-absorbing microalga" 2015 OCARINA Annual International Meeting (招待講演) 2015 年 3 月 5 日、大阪市立大学杉本キャンパス(大阪府大阪市)

中澤 昌美「バイオ燃料を生産する微細藻類、ユーグレナ」第 14 回けいはんな植物科学懇談会(招待講演)2014 年 11 月 11 日、京都大学生存圏研究所(京都府宇治市)

小山 啓一郎、中澤 昌美 他「ユーグレナ 3-ケトアシル CoA チオラーゼ発現抑制によるワックスエステル生産の制御」ユーグレナ研究会第 30 回記念集会、2014 年 11 月 8 日、奈良東大寺文化センター(奈良県奈良市)

太田 剛志、中澤 昌美 他「低酸素状態におけるユーグレナ代謝系に炭素源が及ぼす影響について」2014 年度日本生物工学会大会(2 件)2014 年度日本生物工学会大会、2014 年 9 月 8 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

小山 啓一郎、中澤 昌美 他「ユーグレナのワックスエステル発酵における 3-ケトアシル CoA チオラーゼアイソフォームの役割について」2014 年度日本生物工学会大会、2014 年 9 月 8 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：ユーグレナ，バイオ燃料組成物及びその製造方法

発明者：中澤昌美，鈴木健吾

権利者：株式会社ユーグレナ、公立大学法人大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2016-035219

出願年月日：2016.2.26

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/BE/>

6．研究組織

(1)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・助教

研究者番号：

90343417