

令和元年6月20日現在

機関番号：32704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12647

研究課題名(和文)貯蔵脂質と貯蔵多糖合成の代謝スイッチングの仕組み

研究課題名(英文)Regulation of metabolic switching in storage lipid and storage polysaccharide

研究代表者

新家 弘也 (ARAIE, HIROYA)

関東学院大学・理工学部・助教

研究者番号：30596169

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)：多糖と脂質合成はトレードオフの関係にあり、多糖を貯蔵物質として利用する藻類は、脂質合成を促進するためには貯蔵した多糖から脂質への変換が必要になる。多糖と脂質の両方を貯蔵物質として利用しているT-Iso株では、多糖から脂質への変換ではなく、炭素フローを脂質へ変化させることが、特にアルケノン増産には重要な事が分かった。また、変異株の解析から、脂質への炭素フローの変化に細胞内C/Nバランスの関与が、TAGを阻害することでアルケノンが増産できることが示唆された。最後に、ゲノム比較解析より、PKSがアルケノン合成遺伝子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質アルケノンは貯蔵脂質という機能が示唆されているが、同じ貯蔵物質である多糖との相互関係が分かっていなかった。また、今まで様々な培養条件が試されてきたが、アルケノンの増産は達成されていなかった。今回、変異株を用いたことで初めてアルケノン増産への道筋が見えてきた。更に、ゲノム比較解析からアルケノン合成遺伝子候補としてポリケチド合成酵素が初めて見つかった。本研究成果により、アルケノン合成の制御や遺伝子の輪郭が見え始め、アルケノンを藻類バイオ燃料として利用できる可能性が高まったといえるだろう。

研究成果の概要(英文)：Algae which use polysaccharides as energy storage need polysaccharides conversion into lipids for lipid accumulation because of the trade-off between polysaccharides and lipid. In T-Iso strains that use both polysaccharides and lipids as energy storage, we found that change of carbon flow to lipids rather than conversion of polysaccharides into lipids was important for lipid production especially alkenone production. In addition, analysis of the mutant strains suggest that intracellular C/N balance is involved in the change of carbon flow to lipids. Mutant analysis also suggests that alkenone production could be increased by inhibition TAG production. Finally, comparative genome analysis suggested that Polyketide synthase may be an alkenone synthase gene.

研究分野：植物代謝生理

キーワード：アルケノン 炭素分配 ハプト藻 脂質 多糖 Tisochrysis 重イオンビーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

燃料油をほぼ 100% 輸入に依存するわが国において、バイオ燃料の国内生産によるエネルギーの安定供給は、持続可能社会の最も基本となる課題である。従来のバイオディーゼルは、triacylglycerol (TAG) に含まれる脂肪酸を改質して利用しているが、植物や藻類の脂肪酸は多価共役二重結合をもつために化学的に不安定で酸化しやすく、長期保存に向かず実用化の大きな妨げとなっている。脂質アルケノンは、*Emiliana huxleyi*, *Tisochrysis lutea* を含むハプト藻 5 種のみで合成することが知られている炭素数 37~39 の長鎖不飽和ケトンである。このアルケノンは非共役二重結合を持ち極めて安定であり、その二重結合を固体触媒で水素付加反応によって切断することで、石油と同等なパラフィン類を直接生成可能であることから新たな藻類バイオ燃料として利用可能である。しかし、その生合成についてはほとんど分かっていない。

近年、藻類バイオ燃料の研究が盛んに行われ、藻類における脂質合成の促進を目指した研究が数多く報告されている。特に、窒素欠乏などの栄養欠乏による脂質含量増加が知られており、多糖などの貯蔵物質が脂質合成に利用されることが分かっている。しかし、栄養欠乏時には細胞の生育が抑制されてしまうため、細胞増殖と脂質合成を個々に促す 2 段階培養が必要となる。これら貯蔵多糖は、陸上植物や緑藻では不溶性のデンプン (α -グルカン) であるが、珪藻やハプト藻では可溶性の β -グルカンであることが知られている。最近、ハプト藻 *E. huxleyi* で ^{14}C 放射性同位体ラベル実験により、多糖 β -グルカンではなく脂質アルケノンが主な貯蔵物質として機能していることが示された (Tsuji Y *et al.*, 2015, *Mar. Biotechnol.*)。そのため、アルケノンであれば貯蔵多糖から脂質への変換を経ず、細胞の生育を阻害することなく、細胞増殖しながら蓄積できると考えられる。

我々はこれまでに、アルケノンを合成するハプト藻 *T. lutea* (T-Iso) 株を用い、高崎量子応用研究所で重イオンビームを寒天プレート上の細胞に照射し、アルケノン合成能を失った株、アルケノン合成能が低下または増加した株の作出に成功してきた。この *T. lutea* では、多糖 β -グルカンも多く含むことが分かっており (Irina, S *et al.*, 2014, *Carbohydrate Polymers*)、*E. huxleyi* と異なりアルケノンと β -グルカンの 2 種を貯蔵物質として利用していると考えられる。

2. 研究の目的

アルケノンを合成するハプト藻では、通常貯蔵物質として利用される多糖ではなく、貯蔵物質として脂質アルケノンを利用していることが示唆されており、2 者の関連性についてはほとんど分かっていない。また、*E. huxleyi* では中性多糖 β -グルカン合成量は少なく、細胞外構造物となる円石に含まれる酸性多糖の合成量が多いことが示された。しかし、酸性多糖は細胞外に出てしまうため貯蔵物質とは考えられない。そこで、本研究では β -グルカン合成量が多く、アルケノンを合成し、円石を持たないため酸性多糖の合成量が少ないと考えられる *T. lutea* (T-Iso 株) に着目し、貯蔵物質である β -グルカンとアルケノンの代謝調節の仕組みを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験には、*T. lutea* (T-Iso 株) と重イオンビーム照射で得られたその変異株を用いた。まず、野生株で多糖合成阻害により同じ貯蔵物質であるアルケノン量が増加するか、阻害剤アクレアシン A、ツニカマイシンによる影響を観察した。また、紅藻や緑藻で脂質合成と細胞増殖のスイッチを切り替えるタンパク質 TOR の阻害剤ラパマイシンのアルケノンへの影響を観察した。次に、藻類で脂質合成が促進されると知られている栄養欠乏条件である窒素欠乏とリン欠乏について、細胞内炭素フローの変化と TAG 合成遺伝子の発現解析を行なった。

アルケノン合成能を失った変異株では、野生株と明暗条件で細胞内炭素フローの変化を比較した。また、アルケノン合成能が低下した変異株と共に野生株とのゲノム比較解析を行なった。アルケノン合成能が増強された変異株では、変異株 2 株を用い二酸化炭素添加における細胞内炭素フローの変化を調べた。

細胞内炭素フローの変化は、細胞内全有機炭素、タンパク質、多糖および脂質量を測定した。それぞれ、全有機炭素計 (TOC-L、島津)、ブラッドフォード法、フェノール硫酸法、ガスクロマトグラフィー (GC-FID、島津) で定量した。脂質については、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで極性脂質と中性脂質 (アルケノン、トリグリセリド) 2 画分の計 3 画分に分け、それぞれを測定した。また、光合成活性は酸素電極 (Oxytherm、Hansatech) で測定した。遺伝子発現解析では、RNA 抽出は TRIzol 試薬で行い、cDNA 合成および qPCR は THUNDERBIRD SYBR (東洋紡) を用い、StepOnePlus (Applied Biosystems) で行った。ゲノム比較解析では、DNA 抽出は DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) で行い、シーケンス解析はタカラバイオで行った。

4. 研究成果

まず、阻害剤添加実験では、アルケノン合成量の増加は見られなかった。ツニカマイシンでは0.5µg/mLで、ラパマイシンでは5µg/mLで生育の阻害効果が見られたが、アクレアシンAでは10µg/mLでも生育に阻害効果は見られなかった。顕微鏡観察の結果、ツニカマイシン添加で脂質体の膨張が見られた。

ハプト藻*Emiliania huxleyi*では、貯蔵物質と考えられた中性多糖ではなく脂質アルケノンが貯蔵物質として機能していることが示されている。そこで基礎的情報を得たところ、*E. huxleyi*と*T. lutea*で中性多糖は全有機炭素の約5%及び15%を占め、アルケノンは約18%及び9%であった。更に、暗条件に移すことでエネルギー源として主にどちらを利用しているか調べた結果、*E. huxleyi*では報告の通りアルケノンが主に利用されていたが、*T. lutea*では中性多糖やTAGが主に利用されており、アルケノンの分解速度は遅く、同じアルケノン産生種でもその代謝調節が異なる事が明らかになった。アルケノンを合成しなくなった変異体では、生育、光合成活性、炭素固定量及び中性多糖量に差は見られなかったが、TAGを多く蓄積していた。次に、野生株で窒素欠乏またはリン欠乏時の細胞内炭素分配の変化を調べた結果、どちらの場合もTAG合成のスイッチがオンになった。窒素欠乏時にはTAG蓄積量に変化は見られなかったが、リン欠乏時はTAG蓄積量が増加し、その炭素分配率が増加する一方で多糖の炭素分配率が減少していた。この時、両条件下でTAG合成遺伝子の発現解析をしたところ、2種のDiacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1)の発現量が上昇していた。一方、アルケノン蓄積量については両条件で変化は見られず、生育にアルケノン量は依存していた。アルケノン合成能が増強された変異株では、そのうち2株の光合成活性を測定したところ、野生株と比較して最大光合成活性が1.5倍ほど上昇していた。また、TAG蓄積量を調べたところ、1株では減少していたが、もう1株ではアルケノン蓄積量の増加率と同程度増加していた。高CO₂条件で培養したところ、すべての条件でアルケノン高産生株は1.2~1.5倍のアルケノン蓄積量を示した。特に5%CO₂条件では、野生株と異なり両株でアルケノンとTAGへの炭素分配率の増加が見られ多糖の炭素分配率が減少していた。

最後に、野生株とアルケノン非産生株のゲノムを比較解析した。この際、アルケノン低産生株も同時に比較解析したところ、野生株に対して両変異体で併せて151箇所の変異があり、そのうち遺伝子に影響しそうな4箇所の変異が見つかった。その中でも両変異体で共通してポリケチド合成遺伝子(PKS)に変異が見られ、この遺伝子のアルケノン合成への関与が示唆された。

今回、リン欠乏時に多糖からTAGへ、5%CO₂通気で野生株では見られない多糖から両中性脂質への炭素フローの切り替えが見られた。さらなる解析により炭素フローを切り替える仕組みが明らかになることが期待される。また、これまでアルケノン合成系についてはほとんど解明されておらず、PKSがアルケノン合成系解明への糸口となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

なし

〔学会発表〕(計2件)

1. 新家弘也, 栗木愛菜, 鈴木石根, ハプト藻 *Tisochrysis lutea* におけるオイル蓄積機構の解析, 第43回日本藻類学会, 2019年

2. 新家弘也, 竹島蒔人, 鈴木石根, 白岩善博, アルケノン産生ハプト藻における貯蔵物質への炭素分配様式の解析, 第19回 マリンバイオテクノロジー学会, 2017年

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。