

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14487

研究課題名(和文) オイルボディディスプレイ技術による有用物質の新規合成技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel bioprocess for valuable material production with oilbody-display technology

研究代表者

田中 剛 (Tanaka, Tsuyoshi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20345333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オイル生産微細藻類 *Fistulifera solaris* が有するオルガネラ、オイルボディを有機反応場として捉え、疎水性の高い化合物の新たな生合成プロセスの設計を行った。その基盤技術として、*F. solaris* のオイルボディ局在タンパク質を同定し、オイルボディディスプレイ技術を確立した。また、オイルボディに疎水性の高い化合物である高度不飽和脂肪酸を区画化し、効率的に生産できることを確認した。今後、オイルボディディスプレイ技術を活用することにより、様々な有用物質を効率的に生産できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Novel design for the bioprocess of hydrophobic molecule production was achieved in this study. The oil accumulation organelle, oil body, in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* was utilized as a reaction and storage space for the hydrophobic molecule production. Toward this goal, first, oil body-associated proteins were identified by the proteome analysis of the oil body fraction extracted from *F. solaris*. Using an identified protein as an anchor molecule, oil body-display technology was established. Subsequently, production of hydrophobic polyunsaturated fatty acids (PUFAs) was enhanced by genetic engineering. It was suggested that the produced PUFAs were partitioned into the oil bodies in *F. solaris*. These techniques can contribute to the efficient production of various hydrophobic molecules in microalgae.

研究分野：生物機能 バイオプロセス

キーワード：オイルボディ 珪藻 ディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

近年、微細藻類は原料用オイルやカロテノイド色素の生産ホストとしてだけではなく、高度不飽和脂肪酸やバイオ医薬品など多岐にわたる有用物質生産のホストとして注目が集まっている。微細藻類ホストの利点として、コストが安価であること、特有の翻訳後修飾が可能で、ウイルスの混入リスクがないことなどが挙げられる。しかし、微細藻類を含むいずれのホストにおいても、細胞毒性を示すような疎水性化合物を高効率に合成するプロセスは確立されていない。疎水性が高く生理活性を示す化合物は毒性が高く、細胞内に蓄積できないという技術的な障壁があったためである。

研究代表者はこれまでに、エネルギー貯蔵物質としてトリグリセリド (オイル) を高度に蓄積するオイル高生産微細藻類 *Fistulifera solaris* を分離し、世界先駆的に分子生物学的手法を確立してきた。*F. solaris* はオイルボディと呼ばれるオルガネラにトリグリセリドを蓄積し、そのオイル含量は 65% (w/w) に達する。このオイル生産微細藻類が有するオイルボディを有機反応場として利用できれば、疎水性の高い化合物を、オイルボディに区画化することで細胞毒性を低減し、効率的に生産することができる。あわせて、オイルボディへの物質輸送や形成機構に関与する多くの知見をもたらすことができ、学術的な意義も大きいと考える。

2. 研究の目的

本研究では、オイルボディを疎水性の高い有機反応場として利用するための基盤技術として、*F. solaris* のオイルボディへ標的タンパク質を局在させる、“オイルボディディスプレイ”技術 (Fig. 1) を確立することを第一の目的とした。さらに、脂肪酸など疎水性の高い化合物をオイルボディに区画化し、効率的に生産するためのプロセス設計を行うことを第二の目的とした。

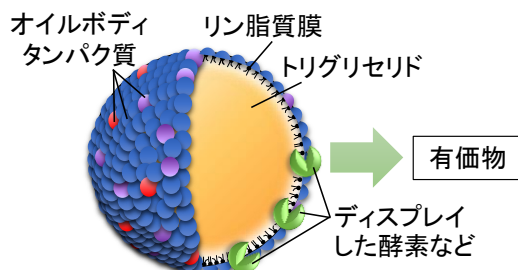


Fig. 1 オイルボディディスプレイ技術

3. 研究の方法

(1) オイルボディ局在タンパク質の探索

F. solaris を培養後、細胞を破碎し、超遠心分離によりオイルボディ画分を調製した。アセトン沈殿により回収したタンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した。ゲ

ルを切片化後、還元処理、アルキル化処理の後に、トリプシンによるゲル内消化を行った。その後、抽出液を加えてペプチドを抽出し、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) に供した。得られたマススペクトル情報を、*F. solaris* のゲノム情報に照合し、新規オイルボディ局在タンパク質候補の探索を行った。なお、LC-MS には direct nanoflow LC system (DiNa; KYA Technologies) と ESI IT mass spectrometer (LCQ-DECA XP; Thermo Fisher Scientific) を用い、ゲノム情報への照合は Bioworks ver. 3.3 (SEQUEST, Thermo Fisher Scientific) を用いた。

(2) オイルボディ局在タンパク質の組み換え発現

F. solaris の内在性プロモーターの下流に、オイルボディ局在タンパク質と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質をコードする遺伝子を配したプラスミドを調製した。調製したプラスミドをパーティクルガン法により、*F. solaris* の細胞内に導入した。

(3) 高度不飽和脂肪酸のオイルボディへの区画化

上記と同様の方法で、オイル組成を制御する酵素の一つであるデサチュラーゼをコードする遺伝子を配したプラスミドを調製し、*F. solaris* の細胞内に導入した。得られた形質転換体から抽出したオイルに塩酸/メタノール混合溶液を加え、100°C で加熱することにより脂肪酸メチルエステルを調製した。調製した脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS) に供した。なお、GC-MS には GC-MS-QP2010 Plus (島津製作所) を用いた。

4. 研究成果

(1) 新規オイルボディ局在タンパク質候補の同定

オイルを高蓄積する条件で *F. solaris* を培養後、オイルボディ画分を調製した。この際、細胞破碎方法やオイルボディ画分の洗浄方法を検討することで、精製度の高いオイルボディ画分の調製方法を確立することができた。調製したオイルボディ画分からタンパク質を抽出し、トリプシン消化後に LC-MS による同定を行った。以上のようなプロテオーム解析の結果、オイルボディ局在タンパク質候補を複数獲得することができた。

同じ羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* のオイルボディ画分に含まれるタンパク質のプロテオーム解析では、珪藻を含む分類群であるストラメノパイルの生物のゲノムに広く保存されている Stramenopile-type lipid droplet protein (StLDP) が同定されている (*Plant Cell Physiol* 2016, 57, 397-406)。これに対して、*F. solaris* のゲノム上には StLDP をコードする遺伝子は存在しているものの、*F. solaris* のオイルボディ画分からは StLDP は検

出されなかった。このことから、珪藻のオイルボディには、必ずしも StLDP が含まれていないことが示唆された。*P. tricornutum* においても StLDP の機能は不明であるが、植物のオイルボディに局在する Oleosin と配列相同性を有することが報告されている。植物において Oleosin は、オイルボディ同士の融合を妨げ、オイルボディのサイズを制御する機能を示す。*F. solaris* のオイルボディにおいて Oleosin と配列相同性を示す StLDP が検出されなかったことは、細胞内で巨大なオイルボディを形成する *F. solaris* の形質に関係している可能性が示唆された。

(2) オイルボディディスプレイ技術の開発

プロテオーム解析により同定したオイルボディ局在タンパク質候補に GFP を融合発現した (Fig. 2)。その際、パーティクルガン法により発現プラスミドを導入したもの、形質転換体が得られない場合が多かった。これは、オイルボディ局在タンパク質候補を過剰に組み換え発現させた場合、細胞毒性を示すためであると考えられた。そこで、組み換えタンパク質の発現量を調整するため、複数の内在性プロモーターを検討し、形質転換体の取得を試みた。その結果、オイルボディ局在タンパク質候補である膜貫通タンパク質と GFP の融合タンパク質を発現した形質転換体の獲得に成功した。

得られた形質転換体を蛍光顕微鏡により観察し、融合タンパク質の細胞内における局在を確認した。その結果、細胞内のオイルボディ上に緑色蛍光が観察された。このことから、オイルボディ局在タンパク質候補は、実際にオイルボディに局在していることが確認された。また、同定されたオイルボディ局在タンパク質をアンカータンパク質として用い、組み換えタンパク質を融合発現することで、オイルボディ上にディスプレイできることが示された。

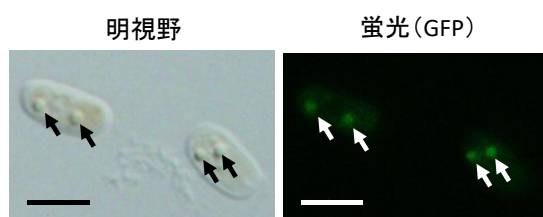


Fig. 2 オイルボディ局在タンパク質-GFP 融合タンパク質発現形質転換体の顕微鏡観察像 矢印がオイルボディを示す。(スケールバー: 5 μ m)

(3) オイルボディへの区画化を利用した高度不飽和脂肪酸の効率的生産プロセスの設計

高度不飽和脂肪酸はサプリメントなどに用いられる需要の高い有用物質である。現在、高度不飽和脂肪酸は、主に魚油を原料として生産されているが、拡大する需要のため安定

的供給が難しく、魚油以外の供給源が求められている。微細藻類が蓄積するオイルには高度不飽和脂肪酸を豊富に含有していることから、魚油に代わる高度不飽和脂肪酸の供給源として注目されている。本研究で用いた珪藻 *F. solaris* は高度不飽和脂肪酸の一つであるエイコサペンタエン酸 (EPA) を、光独立栄養下で培養した微細藻類の中で最も高いレベルで生産することができる。そこで本研究では、EPA の更なる生産性向上を目指し、オイルボディへの区画化を利用した高度不飽和脂肪酸の効率的生産プロセスの設計を行った。

F. solaris の EPA 生合成経路でボトルネックとなる反応を触媒する酵素、 ω 3 デサチュラーゼを過剰発現する形質転換体を作出したところ、EPA の生産量が顕著に増加した。質量分析計による解析の結果、合成された EPA はオイルボディ内に蓄積されるトリグリセリドに取り込まれていることが示唆された。作出した形質転換体の生育は野生株と同等であることから、疎水性の高い化合物を、オイルボディに区画化することで細胞毒性を低減し、効率的に生産することができたと考えられた。

以上のことから、脂質高蓄積珪藻 *F. solaris* において、オイルボディ局在タンパク質を同定し、オイルボディディスプレイ技術を確立した。また、オイルボディに疎水性の高い化合物である高度不飽和脂肪酸を区画化し、効率的に生産できることを確認した。今後、オイルボディディスプレイ技術を活用することにより、様々な有用物質を効率的に生産できると期待される。

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 3 件)

(1) Daisuke Nojima, Tomomi Nonoyama, Tsuyoshi Tanaka “Lipid droplet-associated proteins in diverse microalgae revealed by proteomic analysis” *Perspectives in Phycology*, 4, 25-32 (2017) 査読有, DOI: 10.1127/pip/2017/0069

(2) Yoshiaki Maeda, Daisuke Nojima, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka “Structure and Properties of oil bodies in diatoms” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 372, pii: 20160408 (2017) 査読有, DOI: 10.1098/rstb.2016.0408

(3) Tsuyoshi Tanaka, Takashi Yabuuchi, Yoshiaki Maeda, Daisuke Nojima, Mitsufumi Matsumoto, Tomoko Yoshino “Production of Eicosapentaenoic Acid by high cell density cultivation of the marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris*” *Bioresource Technology*, 245,

567-572 (2017) 査読有, DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.005

〔学会発表〕 (計 6 件)

(国際学会)

(1) Tomomi Nonoyama, Daisuke Nojima, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Mitsufumi Matsumoto, Chris Bowler, Tsuyoshi Tanaka “Functional analysis of microalgal oil body-associated proteins identified from oleaginous diatom *Fistulifera solaris* JPCC DA0580”, The 73rd Fujihara Seminar International Conference “Molecular Life of Diatoms”, 生田神社社会館, 兵庫, 2017 年 7 月 9 日-13 日

(2) Daisuke Nojima, Takashi Yabuuchi, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Mitsufumi Matsumoto, Tsuyoshi Tanaka “Eicosapentaenoic acid production from oleaginous microalga *Fistulifera solaris* by high cell density cultivation”, 7th International Conference on Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts, Hyatt Regency, Miami, Florida, USA, 2017 年 6 月 19 日-21 日

(3) Tomomi Nonoyama, Daisuke Nojima, Yoshiaki Maeda, Mitsufumi Matsumoto, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka “Identification and functional analysis of oil body-associated proteins of oleaginous diatom *Fistulifera solaris* JPCC DA0580”, The 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, University of Hawaii at Manoa, Hawaii, USA, 2017 年 5 月 21 日-24 日

(国内学会)

(4) 嶋田 礼迪, 野島 大佑, 松本 光史, 吉野 知子, 田中 剛, “海洋珪藻 *Fistulifera solaris* における高付加価値脂肪酸の生産向上” 第 4 回分子珪藻研究会, 関西学院大学 大阪梅田キャンパス, 大阪, 2017 年 12 月 23 日

(5) 前田 義昌, 籾内 貴史, 野島 大佑, 吉野 知子, 田中 剛, “海洋珪藻 *Fistulifera solaris* の高密度培養による多価不飽和脂肪酸生産” 第 19 回マリンバイオテクノロジー学会 仙台大会, 東北大学 青葉山新キャンパス, 宮城, 2017 年 6 月 3 日-4 日

(6) 野島 大佑, 吉野 知子, 田中 剛, “オイル高蓄積海洋珪藻 *Fistulifera solaris* におけるオイルボディタンパク質の解析” 第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場 ANA クラウンプラザホテル富山, 富山, 2016 年 9 月 28 日-30 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 剛 (TANAKA, Tsuyoshi)

東京農工大学

大学院工学研究院 教授

研究者番号: 20345333

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし