

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03043

研究課題名(和文) 石油産生緑藻*Botryococcus braunii*の群体形成機構の解明研究課題名(英文) Studies on the mechanism for colony formation by the hydrocarbon producing green microalga *Botryococcus braunii*

研究代表者

岡田 茂 (Okada, Shigeru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：00224014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：微細緑藻*Botryococcus braunii*は、石油代替燃料としての利用が期待できる炭化水素の他に、群体を形成するためのバイオポリマーも生産する。このバイオポリマーは本藻種の利用上、「やっかいもの」であることから、バイオポリマー量の少ない優れた藻株の作出を目指し、バイオポリマーの原料となる長鎖アルデヒドの生合成機構の解明を試みた。本藻種には通常の脂肪酸合成酵素の他に、脂肪酸の鎖長伸長反応を司ることが予測される酵素の遺伝子が、複数種発現しており、これらが長鎖アルデヒドの生成に関与する可能性が考えられた。当該遺伝子を酵母細胞で発現させることにより、その酵素の機能の特定を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、バイオ燃料源として期待されている微細緑藻*Botryococcus braunii*には、通常の植物プランクトンには存在しない、ユニークな脂肪酸合成酵素様タンパク質が存在することを示す事ができた。当該タンパク質の酵素学的機能を明らかにすることで、将来的にはバイオ燃料となる炭化水素の回収が、より容易な新藻株の作出等が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The green microalga *Botryococcus braunii* produces a lot of liquid hydrocarbons that can be used as alternative biofuels for petroleum. The alga also produces biopolymers to form algal colonies in which cells are embedded together. The biopolymer is, however, troublesome for the effective utilization of this algal species because it hampers easy recovery of hydrocarbons by trapping them. The biopolymer is derived from the long chain fatty aldehyde. Then the mechanism of the long chain fatty aldehyde biosynthesis was studied. Transcriptome analyses on the alga showed that unique fatty acid synthase-like genes are expressing in addition to the conventional plant-type fatty acid synthase genes. The unique fatty acid synthase-like protein seem to be responsible for the formation of the long chain fatty aldehyde. Thus characterization of enzymatic functions of the genes was tried by the heterologous gene expression system using yeast cells as the host.

研究分野：水圏天然物化学

キーワード：Botryococcus braunii 脂肪酸 バイオポリマー 群体 バイオ燃料

1. 研究開始当初の背景

近年、その高い生産性や、生産の場が農作物と競合しない利点から、微細藻類が、バイオ燃料源として注目されている。バイオ燃料源として研究対象にされている微細藻類の多くは、トリグリセリドまたはワックスエステルという、脂肪酸を構成要素とする脂質を生産する。これらは脂肪酸メチルエステルに変換することで、ディーゼル系燃料として利用できる。しかしながら脂肪酸メチルエステルは、分子内に酸素原子を含んでいる。すなわち、すでに一部「酸化」されているため、燃焼時における発熱量が比較的小さい。そのため、「軽く」、「高発熱量」を必要とする、航空燃料には適していない。それに対し、微細藻類の中には炭化水素を生産するものがある。中でも淡水産緑藻 *Botryococcus braunii* は、液状炭化水素を大量に生産するため有望視されている。本藻種には、生産する炭化水素のタイプが異なる A、B および L の三品種が存在する。A 品種は脂肪酸を前駆体する直鎖アルケンを生産するのに対し、B および L 品種は、テルペン系炭化水素を生産する。本種は単細胞性の藻類であるが、個々の細胞を、自身で生産する親油性バイオポリマーで繋ぎ止め、数百 μm にも達する群体を形成する特徴を持つ。群体を形成し、捕食され難い大きさになることで身を守っているとも、比重を小さくして浮上することで、光合成における光の獲得を有利にしているとも言われているが、その生物学的意義は全く不明である。これに加え、本藻種が他種と比べて特異な点は、生産した炭化水素を細胞内に蓄積せず、細胞外へ分泌することである。そのため、他藻種とは異なり、本藻種では細胞を破砕する事無く、すなわち低エネルギーの投入で、バイオ燃料となる炭化水素を回収できると考えられがちである。しかしながら実際には、細胞外に分泌された炭化水素は、細胞間を繋ぎ止めている親油性バイオポリマーに捕捉されており、単なる圧搾や、未処理の湿藻体からの有機溶媒抽出では、ほとんど回収できない。また、当該バイオポリマーは、藻体乾燥重量の 10% 以上に達することから、バイオ燃料として利用可能な炭化水素に変換されるべき、光合成で固定された炭素が、燃え難い化合物の生産に「無駄遣い」されてしまっているとも言える。さらには、より優れた形質を持つ新株の作出を目指し、本藻種の遺伝子組換えが、各方面で盛んに試みられているが、未だに確立されていない。これは上記バイオポリマーが物理的障壁となり、外来遺伝子の導入を阻んでいるためと考えられている。したがって、本藻種の親油性バイオポリマーは、本藻種の有効利用の観点からは、「やっかいもの」と考えられる。その反面、当該バイオポリマーは、ゴム状の弾性を有することから、新たな生物素材としての有効利用が期待できる。本藻種が生産する当該バイオポリマーは、品種の違いによらず、炭素数 32 (C_{32}) の長鎖脂肪族ジアルデヒドが、共通の主要構成要素となっている。このジアルデヒドの生合成は、まず、オレイン酸等の通常の脂肪酸が出發物質となり、炭素鎖伸長により C_{32} の超長鎖モノカルボン酸へと変換された後、末端へのカルボキシル基の導入、両末端カルボキシル基のアルデヒド基への還元を経て生成するものと推定されている。A 品種に見られるバイオポリマーは、この C_{32} ジアルデヒドのみが構成要素として縮合して生成するのに対し、B および L 品種のバイオポリマーは、それぞれの品種に特異的なトリテルペン、テトラテルペン骨格が、A 品種と同様のバイオポリマーに、アセタール結合を介して組み込まれている(図 1)。これらのことから、A、B および L 品種でのバイオポリマー生合成は、 C_{32} ジアルデヒドの生成、およびその縮合までは共通であり、それ以降の過程が異なるものと考えられる。「本藻種は何故バイオポリマーを生産して群体を形成するのか?」、「品種間で親油性バイオポリマーの化学構造が異なるのは何故か?」、「バイオポリマーはどのように生合成されるのか?」は全く不明である。これらの謎を明らかにし、本藻種におけるバイオポリマーの生産を抑制することができれば、細胞外へ分泌された炭化水素が捕捉されず、直接培地中に放出され、また外来遺伝子の導入も容易という望ましい形質を持つ、新たな藻株の作出へと繋げることが期待できると考えられた。

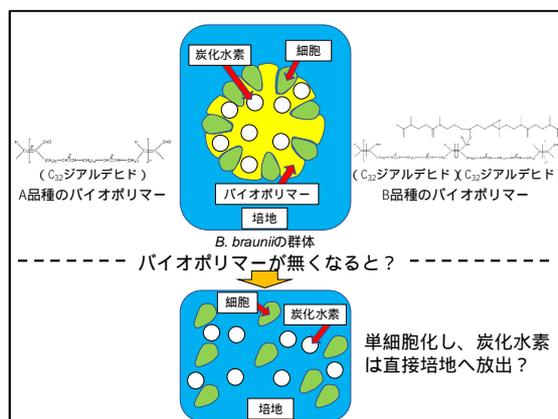


図 1 . *B. braunii* の群体を形成するバイオポリマー

2. 研究の目的

上述の様に、本藻種が生産する炭化水素は、細胞外に分泌されるにも関わらず、細胞同士を繋ぎ止めている親油性のバイオポリマーに捕捉されてしまい、容易には回収できない。仮にバイオポリマーを持たない、「非群体性」の *B. braunii* を作出できれば、細胞から分泌された炭化水素は行き場を失い、直接培地中に放出されることになり、これを掬い取る事等で回収することで、藻体を殺すことなく連続的に培養を続けた状態で、生産された炭化水素を、低エネルギー投入で回収する「ミルクキング」が可能になる。加えて外来遺伝子の導入も容易という望ましい形質を持つ藻株の作出へと繋げることが期待できる。これらの事は本藻種の実用化に向けて大きな飛躍となると考えられる。しかしながら、なぜ、どの様にバイオポリマーを生産し、群体を形成するかは全く分かっていない。そこで、今まで全く明らかになっていない、*B. braunii* におけるバイオポリマー生合成機構、特に各品種のバイオポリマーにおいて主要な構成成分となっている、長鎖アルデヒドの生合成機構を解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *B. braunii* S 品種の炭化水素組成およびトランスクリプトーム解析

近年、従来から知られていた *B. braunii* の A、B および L 品種に加え、炭素数 20 の短鎖アルカン (icosane) のみを生産するという S 品種の存在が提唱された。S 品種の群体形成に關与するバイオポリマーにおいて、他品種と同様に長鎖アルデヒドが主要構成成分であるかは不明であったが、炭化水素を含めた脂質組成が単純であれば、バイオポリマー生合成関連遺伝子の探索も、より容易であることが期待された。そこで 18S rDNA 塩基配列を用いた分子系統上、S 品種に属すると考えられる数株を入手できたことから、これらの株を AF-6 培地で培養し、炭化水素組成分析を行うとともに、対数増殖期の藻体から mRNA を調製、RNAseq 解析を行い、長鎖アルデヒドの生合成に關連することが予測される遺伝子の探索を行った。

(2) 脂肪酸合成阻害剤の影響

本藻種の群体形成に必要なバイオポリマーの主要構成要素である長鎖アルデヒドは、オレイン酸等の脂肪酸の鎖長が伸長して生成する。従って脂肪酸の生合成を抑えることで、当該バイオポリマーの生合成を抑えることが期待できる。そこで脂肪酸生合成の阻害剤である cerulenin または C75 を、それぞれ改変 Chu13 培地に添加し、*B. braunii* の B 品種である Showa 株を 48 時間培養した。対照区として阻害剤を加えない培養も行った。培養後の藻体は一部を脂質分析用に凍結乾燥処理し、残りは RNA 抽出用に液体窒素で凍結後、-80 で保存した。凍結乾燥藻体から、ヘキサンおよびクロロホルム・メタノール混液を用いた二段階抽出により、細胞外および細胞内脂質の抽出を行った。さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、炭化水素画分とその他の脂質画分に分け、それぞれの画分を定量した。炭化水素画分につき、GC-MS により組成分析を行うとともに、その他の脂質画分についてはケン化処理後、構成脂肪酸をメチルエステルに変換し、脂肪酸組成を GC-MS により分析した。また、各試験藻体から mRNA を抽出し、RNAseq 解析を行い、発現量に変化の見られた遺伝子を探索することで、脂肪酸およびバイオポリマーの生合成に關与している可能性のある酵素の特定を試みた。

(3) 脂肪酸合成酵素様遺伝子の機能解析

A、B および L の各品種のトランスクリプトーム全てにおいて、通常の植物細胞に存在する型脂肪酸合成酵素遺伝子に加えて、型脂肪酸合成酵素と類似したタンパク質をコードしていると考えられる遺伝子が発現していた。そこで B 品種由来の型脂肪酸合成酵素様遺伝子を cDNA クローニングにより取得し、酵母発現用ベクター pYES2 に組み込んだ。当該プラスミドを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入し、ガラクトースにより発現誘導を行った。当該酵母を凍結乾燥後、アセトンおよびクロロホルム・メタノール混液で全脂質を抽出し、塩酸-メタノールによるメチルエステル交換反応により構成脂肪酸をメチルエステル化し、GC-MS により組成分析を行った。

4. 研究成果

(1) *B. braunii* S 品種の炭化水素組成およびトランスクリプトーム解析

B. braunii の A、B および L 品種に属する藻株は、炭化水素以外の脂質組成も比較的複雑であり、様々な長鎖脂質を生合成している。これらの長鎖脂質は、群体を形成するバイオポリマーの主要構成成分である長鎖アルデヒドと同様、オレイン酸を主たる前駆体として、炭素鎖伸長反応を経て生成する。そのため、炭素鎖伸長に關わる酵素遺伝子の多様性が予測され、長鎖アルデヒド生合成酵素遺伝子の判別が難しいと考えられた。これに対し、近年その存在が提唱された S 品種は、炭素数 20 のアルカンである icosane のみを生産すると報告されていることから、炭化水素等の脂質生合成に關わる酵素遺伝子と、オレイン酸を前駆体とする炭素鎖伸長反応を司る長鎖アルデヒド生合成酵素遺伝子との判別が、より容易であることが期待された。そこで、18S rDNA 塩基配列を用いた分子系統解析上、S 品種に属すると考えられる 5 藻株 (OIT-292、OIT-446、OIT-605、OIT-620、OIT-623) の分譲を受け、まず、炭化水素組成の分析を行った。その結果、これらの株では炭化水素として icosane は検出されなかった。その一方、分析した全ての

株に於いて 9-nonadecene と L 品種に特徴的な lycopadiene が検出された。図 2 に一例として OIT-292 株の分析結果を示す。

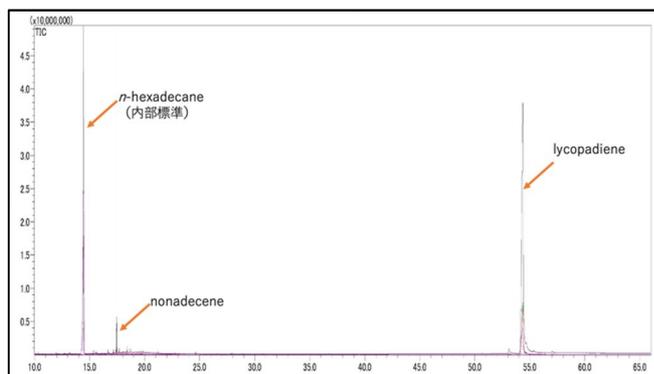


図 2. 分子系統上 S 品種とされた藻株 (OIT-292 株) の炭化水素組成

さらに OIT-292、OIT-605、および OIT-623 株につき RNAseq 解析を行った。その結果、*B. braunii* L 品種から報告されている lycopaoctane 合成酵素 (lycopaoctane synthase=LOS) 遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が、いずれの株においても発現していた。LOS は L 品種に特異的な炭化水素である lycopadiene の前駆体である lycopaoctane を生成する酵素である。また RNAseq 解析を行わなかった OIT-446 および OIT-620 株についても、LOS 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、LOS 遺伝子の全長クローンを得ることができた。次に得られた LOS 遺伝子から、その演繹アミノ酸配列中 C 末端に存在する膜貫通領域をコードしていると推定される部分を除去し、大腸菌発現ベクター-pET28b に組み込んだ。当該プラスミドを大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) に導入し、IPTG により発現誘導を行った。当該大腸菌の粗ホモジネートを、ゲラニルゲラニルピリン酸と NADPH の存在下インキュベートしたところ、lycopaoctane の生成が確認された。このことから S 品種と呼ばれる藻株は、活性を有する LOS をコードしている遺伝子を発現していることが明らかになった。したがって S 品種と言われる *B. braunii* の藻株は、実際には icosane という品種特異的な炭化水素を生産する新品種ではなく、従来からある L 品種に含められるべきことが明らかになった。

(2) 脂肪酸合成阻害剤の影響

B. braunii に脂肪酸合成酵素の阻害剤を投与して培養し、炭化水素やその他の脂質の組成に与える影響を調べる事で、脂肪酸合成酵素が長鎖アルデヒドやバイオポリマーの生合成への様に関与しているかを明らかにすることを試みた。それとともに、脂肪酸合成酵素阻害剤により各種遺伝子の発現がどのように変化するかを、RNAseq 解析により調べた。本試験では、A、B および L 品種の中で、最もトランスクリプトームデータベースが充実していた B 品種に属する Showa 株を用いた。脂肪酸合成酵素の阻害剤である cerulenin または C75 を、それぞれ 20 μ M の濃度で改変 Chu13 培地に添加し、Showa 株を 48 時間培養した。ヘキサソール抽出およびクロロホルム・メタノール混液抽出で、それぞれ得られる細胞外脂質および細胞内脂質の含量は、表 1 に示す通りであった。

表 1. 脂肪酸合成酵素阻害剤を投与した藻体中の脂質含量 (乾重量%)

	対照区	Cerulenin 投与区	C75 投与区
細胞外炭化水素	37.0	35.4	35.1
細胞外脂質	3.7	2.3	0.5
細胞内脂質	12.8	0.8	0.9

阻害剤の投与により、細胞外炭化水素は多少減少する傾向が見られたが、その程度は大きく無かった。これは Showa 株が生産・蓄積する炭化水素はトリテルペン類であるため、その生産は生合成経路上、脂肪酸の生合成とは直接関係していないためと考えられた。これに対し、脂肪酸由来の脂質が主成分であることが知られている細胞内脂質画分は、cerulenin と C75 のいずれを投与した場合でも顕著に減少した。その一方、細胞内脂質由来の脂肪酸メチルエステルにつき GC-MS 解析を行ったところ、対照区および阻害剤投与区間で組成に大きな差が見られなかった。この事から脂肪酸の伸長反応における特定の段階が阻害されている訳では無いことが示された。次に脂肪酸合成酵素阻害剤により、発現量が変動している遺伝子の特定を RNAseq により試みた。発現量の変動として \log_2 (倍率変化) > 1.5 となったものを「発現が上昇した遺伝子」、 \log_2 (倍率変化) < -1.5 となったものを「発現が低下した遺伝子」と定義すると、cerulenin 投与区では 909 遺伝子の発現が上昇し、726 遺伝子の発現が低下した。また、C75 投与区では 325 遺

伝子の発現が上昇し、439 遺伝子の発現が低下した。

本トランスクリプトームデータベースにおいて、植物での一般的な脂肪酸生合成に關与している型脂肪酸合成酵素の構成要素である、ketosynthase(KS)、acyltransferase(AT)、enoylreductase (ER) をコードしている遺伝子が同定された。これらの内、葉緑体に局在すると考えられる ER 遺伝子の発現が、cerulenin あるいは C75 の投与により低下する傾向が見られたが、他の遺伝子では阻害剤投与による発現量の明瞭な変化が見られなかった。これに対し、後述する様に *B. braunii* の各品種で見られる型脂肪酸合成酵素様タンパク質をコードしている遺伝子の1つが、cerulenin 投与により優位に発現量が低下していた。脂肪酸の鎖長伸長により生成する炭化水素を生産しない B および L 品種でも、型脂肪酸合成酵素様タンパク質遺伝子の存在が確認された一方、A、B および L の3品種に共通して存在する、脂肪酸の伸長により生成する化合物は、長鎖アルデヒドおよびバイオポリマーであることから、当該酵素は群体形成の鍵となる酵素である可能性が高いものと考えられた。

(3) 脂肪酸合成酵素様遺伝子の機能解析

脂肪酸の生合成では、アセチル CoA とマロニル CoA の縮合によるケト基の生成、ケト基の水酸基への還元、脱水による二重結合の生成、二重結合のメチレン基への還元という、連続した4つの反応が繰り返されて、鎖長が伸長していく。植物におけるこの脂肪酸の生合成は、acyltransferase (AT)、ketosynthase (KS)、ketoreductase (KR)、dehydrogenase (DH)、enoylreductase (ER)、acyl carrier protein (ACP) という別々の機能を持つタンパク質の複合体からなる型脂肪酸合成酵素により司られている。*B. braunii* の群体を形成しているバイオポリマーの主要構成成分である C₃₂ ジアルデヒドの生合成前駆体として、オレイン酸等の一般的な脂肪酸から、上記脂肪酸鎖の伸長反応を経て、炭素数 32 の超長鎖脂肪酸が作られるものと考えられる。本藻種の A、B および L 品種は、生産する炭化水素のタイプは異なるものの、バイオポリマーの主要構成要素はいずれも C₃₂ ジアルデヒドであることから、3品種に共通した酵素が、この炭素鎖の伸長を行うことが予想された。

そこで、今回 S 品種として RNAseq 解析を行った藻株も含め、A、B および L 品種に属する藻株のトランスクリプトームデータを、改めて詳細に比較した。すると興味深いことに、全ての藻株において、上記植物の脂肪酸合成を司る型脂肪酸合成酵素複合体の各酵素をコードしている遺伝子に加え、KS、AT、DH、ER、KR、ACP の各ドメインが1本のポリペプチド鎖上に存在する型脂肪酸合成酵素と類似したタンパク質をコードしている遺伝子が発現している事を見出した。一例として、B 品種に属する Showa 株で発現が確認された、5種の型脂肪酸合成酵素様タンパク質の演繹アミノ酸配列の模式図を図3に示す。

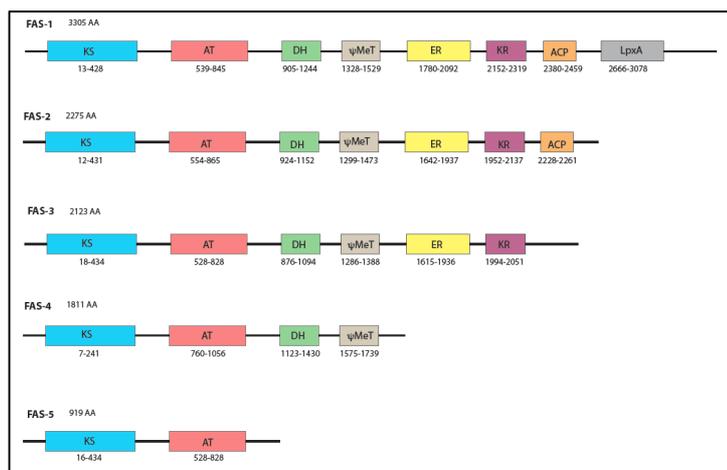


図3 . *B. braunii* Showa 株で見つかった型脂肪酸合成酵素様タンパク質遺伝子の演繹アミノ酸配列の模式図

上図において FAS-1 および FAS-2 と名付けたタンパク質では、脂肪酸の生合成に必要な KS、AT、DH、ER、KR および ACP の全てのドメインを有していた。また、FAS-3~FAS-5 では、一部のドメインを欠失しているが、各ドメインのアミノ酸残基数が、FAS-1 および FAS-2 とは異なっている事から、RNAseq 解析におけるアセンブリ時に人為的に生じたものではなく、独立した遺伝子として発現しているものと考えられた。そこで FAS-1 遺伝子のタンパク質コード領域を cDNA クローニングし、酵母発現用ベクター-pYES2 に組み込んだ。当該プラスミドを酵母 *S. cerevisiae* に導入し、その脂溶性成分を酵母野生株の物と比較したが、当該遺伝子発現酵母に特異的な成分は検出できなかった。この原因として、酵母内で生産されたりコンビナントタンパク質に対するホスホパンテテイン鎖の付加等が不十分で、活性型タンパク質が生産されていなかった可能性がある。今後は発現系を大腸菌等に変えることで当該タンパク質の機能を確認する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡田 茂
2. 発表標題 Production of highly methylated triterpene hydrocarbons by a strain of the green microalga <i>Botryococcus braunii</i> isolated in Japan
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上杉一馬, 松永茂樹, 岡田 茂, 河村耕史
2. 発表標題 微細緑藻 <i>Botryococcus braunii</i> S品種の炭化水素分析
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上杉一馬, 松永茂樹, 岡田 茂, 河村耕史
2. 発表標題 微細緑藻 <i>Botryococcus braunii</i> S品種はS品種特異的な炭化水素を作らない
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上杉一馬, Holger Jenke-Kodama, 松永茂樹, 岡田 茂, 河村耕史
2. 発表標題 微細緑藻 <i>Botryococcus braunii</i> S品種はlycopaoctaeneを合成するL品種である
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	松永 茂樹 (Matsunaga Shigeki) (60183951)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------