

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06342

研究課題名(和文) ユーグレナの嫌氣的二酸化炭素固定経路の生理機能解明とその物質生産への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the physiological role of the anaerobic carbon dioxide fixation pathway in Euglena

研究代表者

小川 拓水 (Ogawa, Takumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：00580367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ユーグレナは好気環境下では光合成を行い、余剰光合成産物を貯蔵多糖に変換して細胞内に蓄積する。嫌気環境下では、この貯蔵多糖が主要な炭素供給源となり、還元的TCA回路の活性化によるATP産生とワックスエステル蓄積が誘導される(ワックスエステル発酵)。我々は、ユーグレナのワックスエステル発酵に環境中CO<sub>2</sub>固定を伴う代謝経路(嫌氣的CO<sub>2</sub>固定経路と呼ぶ)が関わることを見出した(Padermshoke and Ogawa et al. 2016)。本研究は、ユーグレナの嫌氣的CO<sub>2</sub>固定経路が担う生理的役割の解明を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微細藻類は光合成により二酸化炭素を有機物に固定し、そこから多様な有用物質を生合成する能力を持つ。優れた物質生産能を備えた数種の微細藻類は、食品、サプリメント、化粧品などの原料として利用されており、近年では、バイオディーゼルやバイオプラスチックの原料となる生物資源としても注目を集めている。微細藻類ユーグレナは、嫌気環境下でバイオディーゼル燃料の原料として利用可能なワックスエステルを生合成する能力を持つ。ユーグレナの嫌気環境下での炭素代謝に関する新知見の獲得は、ユーグレナが嫌気環境下で産生する有用物質の品質や生産性を向上させる代謝工学の新たな技術の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Under aerobic conditions, Euglena performs photosynthesis and converts excess photosynthetic products into storage polysaccharides. Under anaerobic conditions, this storage polysaccharide becomes a major carbon source, inducing ATP production and wax ester accumulation through activation of the reductive TCA cycle (wax ester fermentation). Our previous results suggest that the environmental CO<sub>2</sub> fixation is involved in the wax ester fermentation. This study aimed to elucidate the physiological role of the anaerobic CO<sub>2</sub> fixation in Euglena.

研究分野：環境農学

キーワード：藻類バイオマス ユーグレナ ワックスエステル発酵 還元的TCA回路 嫌氣的代謝 低酸素ストレス  
ミトコンドリア

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ユーグレナは、バイオマス生産効率の優れたモデル藻類の一種である。嫌気的環境下では、パラミロンと呼ばれる貯蔵多糖を分解代謝して、解糖系およびミトコンドリア内の脂肪酸合成経路を駆動して代謝エネルギーを獲得し、最終産物としてワックスエステルを合成・蓄積する(ワックスエステル発酵)。ワックスエステル産生量は、乾燥細胞重量の50%にも及ぶといわれているが、この驚異的なバイオマス生産能力を支える炭素代謝の全体像については未だ不明な点も多い。我々は、ユーグレナのワックスエステル発酵に環境中CO<sub>2</sub>固定を伴う代謝経路(嫌气的CO<sub>2</sub>固定経路と呼ぶ)が関わることを見出した(Padermshoke and Ogawa et al. 2016)。ユーグレナは光合成による環境中CO<sub>2</sub>固定に加えて、ワックスエステル発酵の進行過程においても環境中CO<sub>2</sub>固定を行うことが示唆された。しかし、研究開始当初、嫌気的環境下でこの代謝経路が起動することの生理的役割は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、ユーグレナの嫌气的CO<sub>2</sub>固定経路が担う生理的役割の解明を目的とする。嫌气的CO<sub>2</sub>固定経路は、嫌気的環境に適応した極限環境微生物、寄生性動物、がん細胞などでよく知られているが、酸素発生型光合成を行う微細藻類における知見は限定的である。本研究の遂行により、嫌気的環境に適応した生物のエネルギー獲得戦略の進化や多様性に関する新知見獲得が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 嫌气的CO<sub>2</sub>固定経路の鍵酵素遺伝子の同定

これまでの研究から、細胞質 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) およびミトコンドリア isocitrate dehydrogenase (IDH) が嫌气的CO<sub>2</sub>固定の鍵酵素であることを示唆する結果を得ている (Padermshoke and Ogawa et al. 2016)。そこでまず、RNAi 法によりこれらの酵素をコードする遺伝子の発現をノックダウンし、TCA 回路中間体およびワックスエステル蓄積量の解析を行うことで、個々の遺伝子のワックスエステル発酵への関与の有無を明らかにすることを計画した。単独遺伝子の発現抑制で影響が見られない場合には、生育や代謝への影響を考慮しつつ、複数遺伝子の同時発現抑制を試みる。嫌气的CO<sub>2</sub>固定経路への関与を確認できた酵素遺伝子は、パーティクルガン法でユーグレナに導入し、過剰発現系統を作出し、嫌気的環境下でのバイオマス生産量の増強効果の有無を明らかにするとともに、異種タンパク質発現系で組換えタンパク質を発現させ、酵素の生化学的諸性質を解析する。

### (2) 嫌气的CO<sub>2</sub>固定経路が担う生理的役割の解明

これまでの研究から、酵素阻害剤を用いた実験により、PEPCK によるCO<sub>2</sub>固定が還元的TCA回路へのリンゴ酸供給に寄与することを明らかにした (Padermshoke and Ogawa et al. 2016)。しかし、IDH によるCO<sub>2</sub>固定反応が担う生理的役割は不明であった。そこで、ミトコンドリア内から細胞質へのクエン酸の輸送がリンゴ酸の逆方向への輸送と共役して起こることで還元的TCA回路が起動するという作業仮説を立てた。この作業仮説を検証するために、ユーグレナ細胞から代謝活性を保った状態のミトコンドリアを単離する条件を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 公的データベースよりユーグレナのESTデータやRNAseqデータを収集した。RNAseqデータはNCBIのSequence Get Browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/>)で検索ワードEuglenaとして検索した。その結果、4つのプロジェクト(GDJR01、GEFR01、GGOE01、LQMU01)がヒットした。これらのうち、Data typeがTranscriptome or Gene expressionであり、かつ試料が特定の単離オルガネラ由来ではない2つのプロジェクト(GDJR01、GEFR01)のコンティグをダウンロードして以後の解析に用いた。既知のPEPCKおよびIDHの塩基配列をクエリとしてダウンロードした塩基配列をデータベースに指定してBLAST解析を行なった。その結果、PEPCKは3種類、IDHは6種類の非冗長な塩基配列がヒットした。次に得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換し、InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)でタンパク質の機能を予測した。その結果、PEPCKは、ATP依存型PEPCKとGTP依存型PEPCKの2種類が存在することが示唆された。IDHは、単量体で機能するNADP依存型IDHおよび二量体で機能するNADP依存型IDHの2種類が存在することが示唆された。今後、本解析により得られた部分塩基配列を基にしてRACE法を用いてcDNAの全長塩基配列を解読し、RNAi

法により個々の遺伝子のワックスエステル発酵への関与の有無を明らかにする。

(2) ユーグレナ生細胞から代謝活性を保持したミトコンドリアを単離する条件を検討した。まず、単離ミトコンドリアの呼吸活性を評価するために酸素電極装置のセットアップを行った。ユーグレナの単離ミトコンドリア調製方法が記載されている文献情報を整理したところ、Tokunaga et al. (Agr. Biol. Chem., 40, 1439-1440, 1976)の方法が広く用いられていた。この方法では、まず、ユーグレナを通常培地で培養した後、ビタミン B<sub>12</sub> 低含有培地に継代して数日間培養する。遠心分離により回収した細胞をキモトリプシン処理することで細胞表面を覆うペリクルを部分消化し、低張液中で穏やかに攪拌して細胞破碎を行い、遠心分離により粗ミトコンドリア標品を調製する。得られた粗ミトコンドリア標品をパーコール密度勾配超遠心法で細胞分画することにより精製ミトコンドリアを得る。ビタミン B<sub>12</sub> 制限により細胞分裂が抑制され細胞が肥大し、タンパク質分解酵素によるペリクル消化効率が向上すると言われている。しかし、ビタミン B<sub>12</sub> 低含有培地での培養はミトコンドリアにおける各種の生化学的反応にも影響を与えることが予想されるため、本研究の目的を達成するための実験操作としてビタミン B<sub>12</sub> 低含有培地での培養は避けるべきだと考えた。そこで、ユーグレナを通常濃度のビタミン B<sub>12</sub> 含有培地で培養し、それ以外の実験操作は Tokunaga et al. (1976)に記載の方法に従いミトコンドリア単離を試みた。得られた粗ミトコンドリア標品を供試し、クラーク型酸素電極装置を用いてコハク酸、リンゴ酸、グルタミン酸を呼吸基質とした時の測定セル内の溶存酸素濃度の経時変化を測定したが、溶存酸素濃度の変化を確認することはできなかった。

この結果を受けて、まず、培養条件がミトコンドリアの形態に与える影響を評価することにした。通常培地で培養したユーグレナにミトコンドリア蛍光標識試薬 2-[4-(Dimethylamino)styryl]-1-methylpyridinium iodide (DASPMI) を処理し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、DASPMI 由来の蛍光が細胞全体に網目状に分布していた。続いて、ビタミン B<sub>12</sub> 制限培地で培養したユーグレナに DASPMI を処理し、同様に観察したところ、DASPMI 由来の蛍光が顆粒状に観察された。この結果から、培養条件の違いがミトコンドリア形態に影響し、このことが通常培地で培養した細胞からのミトコンドリア収量が低い原因の一つではないかと考えられた。また、キモトリプシン処理によりミトコンドリア呼吸活性が低下している可能性も考えられた。

そこで、培養スケールを拡大するとともに、細部破碎方法を酵素法から圧力式細胞破碎装置を用いて細胞破碎を行う方法に変更した。細胞破碎時のバッファー組成、細胞濃度、窒素ガス充填圧力、攪拌方法等を変更して細胞破碎処理を行い、得られた細胞破碎液を顕微鏡下で観察し、約半数の細胞が破碎される条件を決定した。細胞破碎液を分画遠心法により分画し、粗ミトコンドリア標品を調製した。得られた粗ミトコンドリア標品をパーコール密度勾配遠心法により分画し、ミトコンドリア標品を得た。本ミトコンドリア標品の呼吸活性をクラーク型酸素電極装置により測定したところ、各種の呼吸基質添加により酸素消費速度が上昇することを確認した。現在、本実験条件で調製したミトコンドリア標品への他オルガネラの混入状況を確認するために、各種オルガネラマーカータンパク質の抗体を用いたウエスタンブロッティングを進めている。今後、本ミトコンドリア標品を用いてミトコンドリア内膜を介した物質輸送を解析するためのモデル実験系を構築する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa Takumi, Nakamoto Masatoshi, Tanaka Yuki, Sato Kazuhiro, Okazawa Atsushi, Kanaya Shigehiko, Ohta Daisaku	4. 巻 133
2. 論文標題 Exploration and characterization of chemical stimulators to maximize the wax ester production by <i>Euglena gracilis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 243 - 249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川拓水, 中本雅俊, 田中佑樹, 岡澤敦司, 太田大策
2. 発表標題 ケミカルバイオロジー手法によるユーグレナのワックスエステル産生能の増強
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川拓水, 田中佑樹, 中本雅俊, 岡澤敦司, 太田大策
2. 発表標題 芳香族化合物を用いたユーグレナのワックスエステル発酵増強技術の開発
3. 学会等名 日本農薬学会第45回大会
4. 発表年 2020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	太田 大策  (Ohta Daisaku)  (10305659)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授    (24403)	

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
---------	---------