

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03119

研究課題名(和文) バイオ燃料と有用物質の同時生産を目指したユーグレナの複合的バイオリファイナリー化

研究課題名(英文) Construction of Euglena-based biorefinery

研究代表者

中澤 昌美 (Nakazawa, Masami)

大阪公立大学・大学院農学研究科 ・講師

研究者番号：90343417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：(1) ユーグレナワックスエステル合成において、ミトコンドリア内膜に結合したトランスヒドロゲナーゼ(NNT)が、ワックスエステル合成および嫌気下ATP合成に必須であること、還元型補酵素のリサイクルに寄与していることを明らかにした。さらに、NNTおよびリンゴ酸輸送経路が機能することで、ミトコンドリア内でのNADPH生成が、嫌氣的呼吸鎖へのNADH供給につながることが分かった。(2) 脂肪酸酸化逆行酵素の変異体を作製し、野生株と異なるワックスエステル組成を持つ安定変異株を多数作出した。(3) ユーグレナの安定核ゲノム形質転換法の開発に成功した。今後、代謝改変に利用可能なレベルまで系の改良を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嫌気・低酸素環境では、化合物の酸化が抑えられるため、生物において様々な中間代謝産物を合成する際に有利である一方、還元型補酵素の再生が妨げられたり、エネルギー獲得が低下することから十分に生かされていない側面がある。本研究では、嫌気環境でも効果的に酸化還元補酵素を再生しながら物質生産ができる、というユーグレナの代謝の仕組みを理解することで、ユーグレナそのもののバイオリファイナリーとしての可能性を伸ばすとともに、広い生物生産に嫌気・低酸素環境を活用できる原理を抽出することにつながるができる、という学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：(1) In Euglena wax ester synthesis, transhydrogenase (NNT) bound to the inner mitochondrial membrane is essential for wax ester synthesis and anaerobic ATP synthesis, and contributes to recycling of reduced cofactors. Furthermore, NNT and the malate transport pathway function to convert NADPH generated in mitochondria to NADH, which can be supplied for anaerobic respiration. (2) Stable knockout mutants of the enzymes of the fatty acid β -oxidation reversal pathway were produced, and a number of stable mutants with different wax ester compositions from the wild strain were generated. (3) We succeeded in developing a stable nuclear genome transformation method for Euglena. We will continue to improve the system to a level where it can be used for metabolic engineering.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：バイオリファイナリー 嫌氣的呼吸鎖 バイオ燃料 酸化逆行 嫌気 低酸素

1. 研究開始当初の背景

【社会的背景】温室効果ガス増加による気温上昇を「産業革命以前の水準から 1.5 以内」に抑えるために、国連主導で 2050 年までに世界の CO₂ 純排出量をゼロにする目標が掲げられている。なかでも、化石資源に依存した石油化学による物質生産を、再生可能資源を活用したバイオリファイナリーへ転換することは重要な行動目標である。光合成生物をバイオリファイナリーに活用できれば、さらに CO₂ 低減効果が期待される。植物は生育速度の遅さから、直接の物質生産に向かず、主に微生物発酵の糖質源として用いられている。これに対し、微細藻類は生育が早く、農業と競合しないため、物質生産への研究開発が進んでいる。しかし、主にコスト面の課題により実用化には至っていない。

【学術的背景】我々の研究グループは、真核藻類ユーグレナが、好気下で光合成産物から合成される貯蔵多糖を基質として、嫌気下でワックスエステルを生産することを見出してきた。ユーグレナが生産するワックスエステルは、他の微細藻類由来油脂と比べ主要構成脂質の鎖長が短く（炭素長 14）、不飽和結合を持たないため、バイオ燃料として高い適性を有している。

バイオ燃料は低コストでの大量供給が求められるため、同時に大量生成される培養上清や抽出残渣の処置が一般的な課題となっている。しかし申請者はバイオ燃料だけ作るという考えから脱却して、「利用価値の高い物質を副産物として同時生産させることで、副産物も資源として利用できる」と発想を転換した。これを実現すれば、ユーグレナをコスト面の課題をクリアした複合的バイオリファイナリーとして活用できると構想した。さらに、ユーグレナによるバイオ燃料生産能力を改変することで、ユーグレナ由来油脂の利用可能性をバイオ燃料以外にも広げることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

ユーグレナの潜在的な物質生産能力を理解し、さらに引き出す手法として、「電子伝達阻害による嫌気下炭素フロー転換」を用いることを構想した。ユーグレナの嫌気・低酸素下での代謝を主にミトコンドリア代謝を軸にして解析し、ワックスエステル代謝と有機酸代謝のつながりを理解、制御することを目指した。さらに、ユーグレナの代謝改変を実現する方法論として、ユーグレナの核ゲノム安定形質転換系の確立を目指した。

3. 研究の方法

ユーグレナワックスエステル合成系における嫌氣的呼吸鎖への還元力供給系の解析は、二重鎖 RNA の細胞導入による遺伝子ノックダウンの手法を用いた。ミトコンドリアの嫌氣的呼吸鎖の改変は、低い酸化還元を持つキノン種であるロドキノンの合成遺伝子のノックアウトおよび複合体 I の阻害剤であるロテノンを組み合わせて行った。酸化逆行経路の改変によるワックスエステル合成プロファイルの制御は、遺伝子ノックアウトの手法を用いて行った。核ゲノム形質転換系は、二重鎖 DNA 断片の細胞へのエレクトロポレーションにより実施した。レポーターとしては、分子量が小さく明るいルシフェラーゼである NanoLuc と、G418 への薬剤耐性を担う *neo^r* 遺伝子を融合させて用いた。

4. 研究成果

4.1 ワックスエステル合成系における嫌氣的呼吸鎖への還元力供給源の解析

ユーグレナワックスエステル合成系では、従来代謝モデルにおいて、ミトコンドリア内の NADPH 供給の重要性と、嫌氣的呼吸鎖の NADH 要求性というギャップが存在していた。そこで本研究では、ミトコンドリアでの補酵素変換酵素に着目した。膜結合型ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ (NNT) を RNA-seq データベースから見出し、発現抑制を行った。その結果、嫌気下でのワックスエステル合成および ATP 合成量が大幅に低下していた。また、培地中への大量のリンゴ酸放出が確認された。そこで、ミトコンドリアでのリンゴ酸代謝を担う酵素の候補として NADP⁺依存型リンゴ酸酵素の発現抑制を行ったところ、ほぼ同じフェノタイプが見られた。さらに、従来の代謝予想で、嫌気下でのミトコンドリアへの炭素流入を担うと考えられたミトコンドリアピルビン酸キャリアー (MPC) の阻害剤である UK5099 を用いたところ、嫌気下でのワックスエステル合成には影響しなかった。このことから、NNT による補酵素変換反応とリンゴ酸としてのミトコンドリアへの炭素輸送がワックスエステル合成系を支えていることが明らかとなった。これらの成果については、2022 年に FEBS Letter 誌に発表した。

4.2 嫌氣的呼吸鎖からワックスエステル合成系への電子供給を制限した細胞の解析

嫌氣的呼吸鎖からワックスエステル合成系への電子供給は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I からロドキノン (RQ) に電子が供給され、さらに電子伝達フラボタンパク質を介して、脂肪酸酸化逆行経路を構成する酵素であるアシル-CoA デヒドロゲナーゼに渡されることで行われること

が示唆されてきた (Nakazawa et al. 2018)。RQ は、好気呼吸の電子伝達体ユビキノン (UQ) から、*rquA* 遺伝子発現産物の機能により一段階で合成される、低酸化還元電位型キノンである。そこで、*rquA* 遺伝子破壊株を破壊し (以下 RQ 欠損株と記載)、ワックスエステル合成に及ぼす影響およびその他の有機酸合成に及ぼす影響を解析した。

RQ 欠損株は、コントロール株に比べて嫌気下でのワックスエステル合成量が 20%程度まで低下したが、合成能は、完全には無くならなかった。このとき、前項における NNT サイレンシング細胞とは異なり、嫌気下での細胞生存率はほとんど低下せず、嫌気処理 24 時間後の ATP 量もコントロール株とほとんど同じ値を示した。次に、嫌気処理によって培地中に分泌される有機酸量を HPLC により測定した。その結果、RQ 欠損株でリンゴ酸およびフマル酸の分泌量が増加していた。これらの代謝産物は、ワックスエステル合成が減少して余った炭素の行き先の一部として合成されたと考えられた。

一方このとき、コハク酸分泌量はあまり変化していなかった。コハク酸はユーグレナの嫌気下での最終代謝産物のひとつとして知られている。嫌氣的呼吸鎖を介した経路により合成されることが予測されている。複合体 I で NADH 酸化により生じた電子が、フマル酸還元酵素 (複合体 II の逆行であると予測) に供給され、コハク酸が合成される。これまで、RQ を持つ生物においては、コハク酸合成反応への電子供給は RQ を介して行われることが推測されてきたが、本研究における RQ 欠損株での解析結果は、その予想とは異なるものであった。

そこで、複合体 I の阻害剤であるロテノンを嫌気処理時に用いることで、ユーグレナの嫌氣的呼吸鎖からの電子の流れをより詳細に理解することを目指した。ワックスエステル合成量は、RQ を合成できるコントロール細胞においては、ロテノン添加によるワックスエステル量の低下は 25%程度であったことに対し、RQ 合成欠損株では、60%以上低下していた。コントロール細胞のワックスエステル量と比べると、RQ 合成欠損株のワックスエステル量は 5%未満まで低下していた。このことから、RQ は、ワックスエステル合成系に非常に効率よく電子を供給していること、ユビキノンもしくは他の電子伝達体も低い効率ながらワックスエステル合成系に複合体 I で生じた電子を供給することができることが示唆された。嫌気下でのコハク酸分泌量は、コントロール株ではロテノン添加により少し増加する傾向があったが、RQ 欠損株ではロテノン添加により 30~50%程度低下していた。フマル酸、リンゴ酸については単離株ごとに一貫した傾向が見られなかった。これらのことから、RQ からのフマル酸還元反応への還元力供給は、嫌氣的呼吸鎖を介さない経路が大きく寄与していること、RQ 以外の電子伝達系からフマル酸還元反応への還元力供給には複合体 I からの電子の寄与が大きいことが示唆された。今後、ワックスエステル合成系に用いられなかった炭素がどの代謝産物に供給されているのかをさらに検討していく必要がある。

4.3 酸化逆行経路の改変によるワックスエステル合成プロファイルの制御

脂肪酸 酸化系の逆行経路の発現改変が、ワックスエステルに及ぼす影響について調べた。これまでの研究からワックスエステル合成への寄与が強く示唆されている 3-ケトアシル-CoA チオラーゼ (KAT) とアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (ACD) の各アイソザイムに注目した。まず、これまでワックスエステル鎖長に及ぼす影響が不明であった ACD の 2 種のアイソザイム (ACD1, ACD2) の単独ノックアウト体および二重ノックアウト体を作製し、嫌気条件下でのワックスエステル生産について調べた。二重ノックアウト体では、ワックスエステル合成量が 10%以下にまで低下した。このことから、ACD1 と ACD2 はワックスエステル合成系における主要な ACD アイソザイムであることが示唆された。次に、各単独ノックアウト体についてワックスエステル合成量と組成を調べた結果、ACD1 ノックアウト細胞では、10-20%程度ワックスエステル合成量が低下し、ワックスエステル組成がコントロールよりも長鎖化していた。一方で、ACD2 ノックアウト細胞では、ワックスエステル合成にはほとんど変化がなく、ワックスエステル組成は短鎖化していた。これらのことから、ACD1 と ACD2 は生体内で異なる鎖長特異性を有するとともに、互いの触媒機能を一部補うことができることが示唆された。KAT についても、2 種のアイソザイムに着目して検討した。KAT1 および KAT2 は過去の遺伝子サイレンシング実験においてワックスエステルの短鎖化を引き起こすことが分かっている (Nakazawa et al. 2015)。本科研費研究では、遺伝子ノックアウト体を作製することで、安定的にワックスエステル組成が短鎖化した KAT 変異体の作製に成功した。ここまでの結果でワックスエステルの組成を短鎖化させた 3 種のターゲット遺伝子 (ACD2, KAT1, KAT2) について、二重および三重変異体を作製し、さらにワックスエステル組成を評価した。その結果、三重変異体では相加的な短鎖化傾向がみられた。これらの成果については、現在論文投稿準備を進めている。

4.4 ユーグレナ核ゲノム形質転換法の開発

ユーグレナの代謝改変には、既に十分な実績のある遺伝子ノックアウトの手法に加えて、核ゲノムの安定形質転換法の適用が不可欠である。これまでにいくつかの報告があるが、再現性に乏しく、さらに代謝改変に利用可能なレベルの形質転換法は知られていない。そこで、本研究では代謝改変に利用可能な形質転換系の開発を目指した。二重鎖 DNA をエレクトロポレーションで導入する方法を用い、マーカー遺伝子として *NanoLuc-neo'* を用いた。ユーグレナの高発現遺伝子の 5'-近接領域配列、3'-近接領域配列をインバース PCR 法によりクローニングし、発光強度と薬剤耐性の 2 つの指標から形質転換体を選抜した。その結果、複数のプロモーター候補配列

の取得に成功し、ゲノムに外来遺伝子が挿入された安定変異体が確認できた。これらの成果は2023年に *Algal Research* 誌に掲載された。今後、代謝改変への適用を進めていくとともに、さらなる系の改変も進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ebenezer ThankGod Echezona、15名省略、Nakazawa Masami、10名省略、Field Mark C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Euglena International Network (EIN): Driving euglenoid biotechnology for the benefit of a challenged world	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio059561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.059561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 中澤 昌美	4. 巻 101
2. 論文標題 ユーグレナ古今東西	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 187 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.101.4_187	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masami Nakazawa; Mutsuki Takahashi; Ryuta Hayashi; Yuki Matsubara; Yuichiro Kashiya; Mitsuhiro Ueda; Hiroshi Inui; Tatsuji Sakamoto	4. 巻 595
2. 論文標題 NADPH to NADH conversion by mitochondrial transhydrogenase is indispensable for sustaining anaerobic metabolism in <i>Euglena gracilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2922-2930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa Masami, Andoh Hiroko, Tsujii Hiromi, Amada Katsumi, Okuno Hitomi, Gejima Yusuke, Iizuka Kumi, Haruguchi Daiki, Maruyama Moe, Kashiya Yuichiro, Ueda Mitsuhiro, Miyatake Kazutaka, Sakamoto Tatsuji	4. 巻 75
2. 論文標題 Stable nuclear transformation methods for <i>Euglena gracilis</i> and its application to a related <i>Euglenida</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 103292 ~ 103292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2023.103292	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11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 永峰佐久良、上田光宏、阪本龍司、中澤昌美
2. 発表標題 ゲノム編集によるユーグレナのワックスエステル組成改変
3. 学会等名 第38回ユーグレナ研究会研究集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masami Nakazawa
2. 発表標題 Anaerobic wax ester production in <i>Euglena gracilis</i>
3. 学会等名 Euglena day, ULiege (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masami Nakazawa
2. 発表標題 Anaerobic Respiration Coupled with Wax Ester Production in <i>Euglena gracilis</i>
3. 学会等名 3rd Annual International Congress on Euglenoids 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masami Nakazawa
2. 発表標題 Wax ester production coupled with anaerobic respiration in <i>Euglena gracilis</i>
3. 学会等名 ISEP Virtual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中澤 昌美、高橋 夢月、柏山祐一郎、乾 博、上田 光宏、阪本 龍司
2. 発表標題 ユーグレナワックスエステル合成系におけるミトコンドリア補酵素変換の重要性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masami Nakazawa
2. 発表標題 Wax ester production coupled with anaerobic respiration in <i>Euglena gracilis</i>
3. 学会等名 ISEP Virtual Meeting 2023 (Online) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 夢月、中澤 昌美、乾 博、上田 光宏、阪本 龍司
2. 発表標題 ユーグレナワックスエステル発酵における補酵素変換の重要性
3. 学会等名 ユーグレナ研究会第36回研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masami Nakazawa
2. 発表標題 Anaerobic mitochondria in Euglenoids: metabolic and evolutionary aspects of anaerobic mitochondria.
3. 学会等名 1st Annual International Congress on Euglenoids (Web) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中澤 昌美、高橋 夢月、柏山祐一郎、乾 博、上田 光宏、阪本 龍司
2. 発表標題 ユグレナワックスエステル合成系におけるミトコンドリア補酵素変換の重要性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 (Web)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤昌美、高橋夢月、乾 博、坂元君年、上田光宏、阪本龍司
2. 発表標題 口ドキノンを介する嫌氣的呼吸鎖と共役した長鎖脂肪酸合成系の解明
3. 学会等名 第30回イソプレノイド研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masami Nakazawa
2. 発表標題 Anaerobic ATP production coupled with fatty acid synthesis in Euglena mitochondria
3. 学会等名 Euglena International Network inaugural meeting (国際学会)
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
研究協力者	柏山 祐一郎 (Kashiyama Yuichiro) (00611782)	福井工業大学・環境学部・教授 (33401)	LC/MSによるキノン測定

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