

令和 5 年 4 月 22 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05844

研究課題名(和文)藻類バイオマス開発のための嫌氣的代謝スイッチング制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on the anaerobic metabolic switching control mechanisms for algal biomass development

研究代表者

太田 大策(Ohta, Daisaku)

大阪公立大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10305659

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)：微細藻類バイオマス利用には、化石資源に依存しない社会構造への転換のために必要な技術開発への貢献が期待される。本研究では、ユーグレナの脂質生産力の増強活性(従来比で3倍)を持つ低分子有機化合物を新規に発見した成果を基にして、それらの作用機構の解析から、脂質代謝制御ポイントの解明を目的とした。これらの化合物は共通してキノン構造を持つことから、オルガネラの電子伝達経路への関与を検証した。得られた結果をWE産生が嫌気条件下で誘導されることと合わせて考察すると、電子伝達阻害による細胞内の環境変化(ATP濃度など)を感知するシグナルが脂質代謝と糖代謝のスイッチングに関与すると推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、低分子化合物の利用によって、微細藻類の脂質代謝機能改変が可能であることを示した。これらの化合物の代謝制御への直接利用のみではなく、化合物の機能解明は「低酸素防御応答としての代謝スイッチングの学術的理解」、および「藻類バイオマス開発のための新戦略創出」に結びつくと期待される。

研究成果の概要(英文)：Exploitation of microalgal biomass is expected to play a key role in the transition to a sustainable social system independent of the heavy consumption of fossil resources. The current study was based on our findings that low-molecular-weight organic compounds containing quinone structure exhibited strong activities (300%) to boost the wax ester (WE) biosynthesis in Euglena; our objective was to elucidate the regulatory points of WE biosynthesis by characterizing the mechanisms of action of these compounds. We studied the possible involvement of these quinones in the electron transfer activities in mitochondria and chloroplast and demonstrated that these quinones in fact affected the electron transfer activities and WE production. Taken together with the fact that WE production is induced by anoxia, it is supposed that there should be a system sensing intracellular environment (such as ATP concentration) involved in the between lipid and sugar metabolism.

研究分野：応用分子生物学

キーワード：脂質代謝 微細藻類 電子伝達経路 キノン類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

藻類バイオマス開発には循環型社会の駆動力の一つとして大きな期待があるが、社会実装に至るまでの様々な課題解決には、独創的研究による突破口が必須である。微細藻類 *Euglena gracilis* (ユーグレナ) が産生するワックスエステル(WE)も代替エネルギー源としての利用が期待されている。ユーグレナは好気的環境において余剰の光合成産物を 1,3-グルカン(パラミロン)に変換して貯蔵する。パラミロン蓄積量は細胞乾燥重当たり 50% 以上に達する。嫌気環境に置かれると、パラミロンの加水分解によって供給されるピルビン酸を利用した還元的 TCA 回路が活性化され、ATP 生産が可能となる。その副産物として、細胞乾燥重当たり 30% 以上の WE が蓄積する。この嫌氣的代謝においては、ミトコンドリアのロドキノン(RQ)を介した電子伝達経路の活性化によって駆動する還元的 TCA 回路を経由する代謝経路が関与する。WE 産生量は貯蔵パラミロンの量に依存するが、通常は大部分のパラミロンは消費されずに残存する。したがって、WE 増産のためには、脂質代謝の活性化とともに、パラミロン蓄積量を増大と WE への転換効率を上げることが必要である。

本研究に先立って、研究実施者はキノン骨格を有する一連の化合物の添加によって、ユーグレナの嫌氣的WE合成が劇的に増強されることを見出していた。これらの化合物は、独自に実施した425種類の芳香族化合物から構成される独自のケミカルライブラリーをスクリーニングによって発見したものであり、特に1,8-dihydroxy-10H-anthracen-9-one (OATN003), OATQ008, 1,4-diaminoanthracene-9,10-dione (OATQ008), ONAQ008, 2-methylnaphthalene-1,4-dione (ONAQ008) が、貯蔵したパラミロンを消費を加速し、WE蓄積を増強(蓄積量と蓄積速度)する作用(2.5~3倍)を持つことを明らかにした。

この研究結果は低分子化合物添加によって嫌気条件下で誘導される代謝スイッチング機能(糖代謝と脂質代謝)を操作し、有用物質生産を制御できる可能性をはじめて示すものであった。そこで、これらのキノン類がユーグレナの脂質生合成能を増強する作用機構の解明し、嫌氣的代謝スイッチングの制御メカニズムを明らかにすることは、「低酸素防御応答としての代謝スイッチングの学術的理解」、および「藻類バイオマス開発のための新戦略創出」につながる突破口となると考えた。さらに、研究成果は、藻類代謝改変の新戦略創出にとどまらず、嫌氣的エネルギー生産に依存して増殖する寄生虫の化学療法、腫瘍増殖に関わるミトコンドリア代謝調節メカニズム解明、医薬・農薬の研究プロジェクトなど、様々な研究領域の推進力となると期待される。

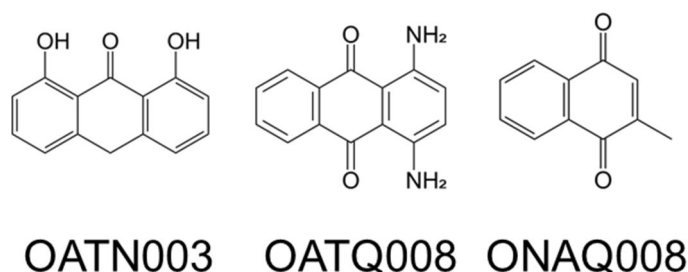


図1. 活性化化合物の化学構造: OATN003 (1,8-dihydroxy-10H-anthracen-9-one; anthralin, dithranol), OATQ008 (1,4-diaminoanthracene-9,10-dione), ONAQ008 (2-methylnaphthalene-1,4-dione; menadione, vitamin K₃).

2. 研究の目的

ユーグレナの嫌氣的WE合成を劇的に増強する代謝改変活性を持つキノン類の作用機序を解明し、藻類バイオマス開発研究の独創的な突破口を開くことを目的とした。研究は、キノン類が「嫌気条件下でのミトコンドリアATP 生産を可能にする代謝スイッチング」に介入するという作業仮説に基づいて計画した。科学的根拠は、代謝改変化合物がキノン類であること、ユーグレナの嫌氣的WE合成は、嫌氣的TCA回路の活性化に依存すること、嫌氣的エネルギー生産にはロドキノンを介した嫌氣的呼吸鎖の活性化による脂肪酸合成が関与すること、の3点に要約できる。

3. 研究の方法

本研究では、構造活性相関解析、ミトコンドリア呼吸鎖と代謝変動の解析、クリックケミストリーによる標的分子同定、の3課題を実施し、キノン類による代謝改変と脂質合成増強の作用機構の解明を目指すこととした。

構造活性相関：代謝改変デザインを可能にする。これまでの実験で、構造が異なるキノン類は、脂肪酸組成(鎖長、偶数鎖・奇数鎖比)に異なる影響を及ぼすこと、脂肪酸合成阻害剤との併用ではTCA回路中間体(コハク酸などのカルボン酸類)が高蓄積することがわかった。そこで、これらのキノン類に加え、ミトコンドリア呼吸鎖に明確な作用点を持つ薬剤(ナフトキノ誘導体のアトコパン等)で誘導される代謝変動(WE、脂肪酸、有機酸など)を解析し、化合物構造、呼吸鎖阻害活性、代謝改変(代謝物の種類と量)の相関を精査する。また、安定同位体標識フラックス解析から、糖質・脂質代謝間の炭素骨格供給の代謝制御を解明する。これらの結果を基にして、貯蔵糖質から目的物質を生産するための代謝改変デザインに必要な化合物構造を明らかにし、より高活性の代謝改変化合物の創製を可能にする。

作用機構解明：嫌氣的呼吸鎖への影響を実証する。嫌気環境でのフマル酸からコハク酸の生成に関与する「ユビキノ/ロドキノ比」が、これらキノン類の添加で変動するか否かをLC-MS 分析で調べ、キノンプル組成変動と脂質蓄積量の関連を明らかにする。また、単離ミトコンドリアのプロテオーム解析によって「呼吸鎖複合体の成分変動」を調べることで、キノン類存在下での嫌氣的TCA 回路への代謝スイッチングをタンパク質レベルで検証する。さらに、キノン類が呼吸鎖複合体のキノン触媒部位に作用する可能性を検証するため、嫌気呼吸を担う「複合体-I や複合体-II の活性に与える影響」を調べる。これらの実験は、クリックケミストリーによる標的分子同定と協調的に進める。

作用点同定：作用機構解明が順調に進まない場合を想定し、クリックケミストリーによるキノン類の分子標的の直接同定を進める。代謝改変活性を持つアントラキノ類構造を基にしてプローブ化合物(光反応性誘導体、アジド基導入、放射性同位元素標識体)を合成する。合成したプローブ化合物の代謝改変活性を検証するとともに、ユーグレナあるいは単離ミトコンドリアに存在する標的分子との結合・単離に用いる。標的分子はプロテオーム解析によって同定する。

4. 研究成果

構造活性相関

WE 合成促進をもたらす化合物の至適濃度、蓄積する脂質の性質は未調査であり、WE 合成の炭素源となるパラミロンの消長についても不明であった。そこでまず、これらの化合物処理が、ユーグレナのWE

産生に与える影響を精査することに焦点をあてた。まず、嫌氣的 WE 合成が促進される際の、貯蔵糖質パラミロンの消費量を調べた。通常(キノン類無添加)の嫌氣的 WE 合成量は、暗所 24 時間の培養で $70 \mu\text{g per } 10^7 \text{ cells}$, この時にはパラミロンが約 50% 残存した ($370 \pm 20 \mu\text{g per } 10^7 \text{ cells}$)。キノン類, (OATN003, OATQ008, ONAQ008) を濃度 $100 \mu\text{M}$ で添加した時, WE 蓄積量はそれぞれ 2.3 倍, 2.8 倍, 2.4 倍に増加した。この時のパラミロン残存量はそれぞれ, 18%, 8%, 23% となっていた。すなわち, これらのキノン化合物添加による WE 合成の促進は, パラミロン消費の促進を伴うこと, すなわち貯蔵糖質を利用から脂質合成までの一連の代謝活性が促進されることがわかった。また, この条件下で蓄積する WE の組成を GC-MS によって分析したところ, 炭素鎖長 29-32 の脂肪酸を含む WE が増加していた。これらの結果から, キノン化合物の存在下, 細胞質での貯蔵糖質の分解促進によって, ミトコンドリアへのリンゴ酸あるいはピルビン酸の脂肪酸合成への供給促進が起こったと推察された。しかしながら, これらの WE 合成促進の作用点は, パラミロンの加水分解, ミトコンドリアマトリクスの酵素反応, ミトコンドリア内膜の電子伝達のいずれにあるのか不明であることから, 単離ミトコンドリアでの活性確認のためのミトコンドリア単離を進めた。一方, 保有するキノン類を含むケミカルライブラリーの化合物 425 種類 (J Biosci Bioeng. 2022 133:243-249. doi: 10.1016/j.jbiosc.2021.12.005) を精査したが, 明瞭な構造活性相関は明らかにできなかった。今後, OATN003, OATQ008, および ONAQ008 などの構造類縁体に焦点を当てて調べる必要がある。また, ミトコンドリア呼吸鎖に明確な作用点を持つ薬剤(ナフトキノ誘導体のアトコパン等)の添加による WE の増産効果は認められなかった。

作用機構解明

キノン骨格を有する活性化合物がユーグレナのミトコンドリア電子伝達活性に及ぼす影響を調べるため, ユーグレナ生細胞にキノン類を添加し, その時の溶存酸素濃度を調べた。その結果, OATN003 と ONAQ008 添加で暗所での酸素消費が上昇すること, また OATN003, OATQ008, および ONAQ008 の全てで HCO_3^- 依存の光依存の酸素消費が阻害されることがわかった。

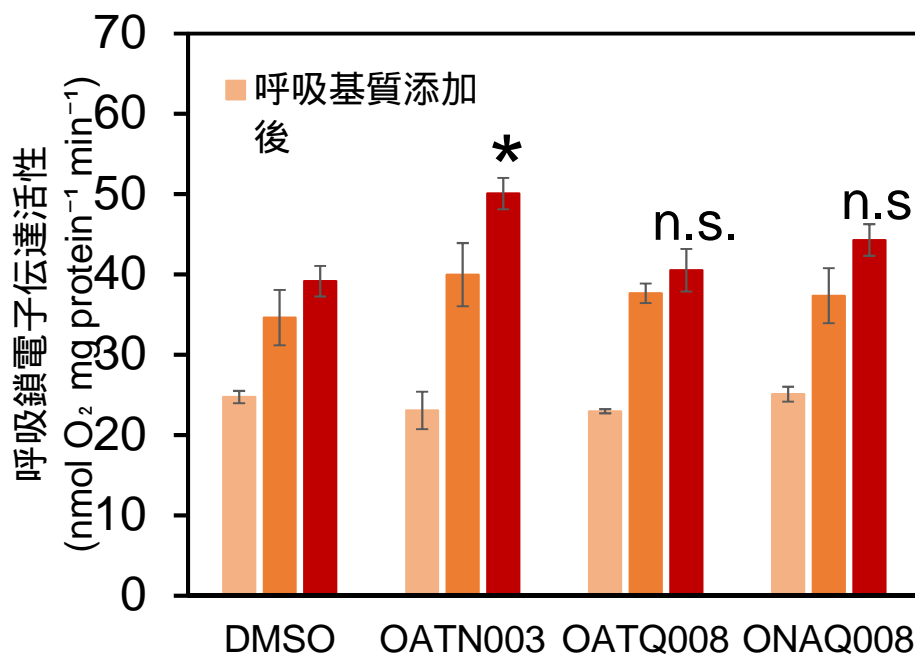


図 2. 活性化合物添加が単離ミトコンドリア電子伝達活性に及ぼす影響

Student's *t*-test による有意差検定 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, n.s.: not significant) を実施。 $n = 3$ 。

これらのキノン類が光合成電子伝達とミトコンドリア呼吸鎖電子伝達の両方に作用する可能性があると考えられたが、活性化化合物存在下、異種オルガネラ間の相互作用を *in vitro* で検証する具体的な方法は存在しない。そこで、細胞レベルからオルガネラレベルでの実験を行うことで、活性化化合物の作用点の絞り込むため、ミトコンドリアと葉緑体のそれぞれにおいて、キノン類活性化化合物が電子伝達活性に及ぼす阻害・促進の影響を評価した。まず好氣的に培養したユーグレナからもミトコンドリアを単離し、呼吸基質、ピルビン酸、リンゴ酸などを添加し、キノン類が呼吸鎖電子伝達に及ぼす影響を調べた。その結果、OATN003 添加でミトコンドリア呼吸鎖電子伝達活性が上昇したが、OATQ008 と ONAQ008 添加では統計的に有意な活性化は認められなかった (図 2)。次に、単離チラコイド膜のフェリシアン化カリウム依存の酸素発生に対するキノン類の添加効果を検討したところ、OATN003、OATQ008、および ONAQ008 のすべてで、顕著な酸素発生の阻害が認められた。これら 3 種類のキノン類は WE 蓄積増強活性を持つ。そこで、光合成電子伝達阻害と WE 蓄積増強作用の関連を検証するため、光合成阻害型除草剤 (DCMU, DBMI, *p*CMB) の添加が WE 蓄積量に及ぼす影響を調べた。その結果、いずれの場合においても、OATN003、OATQ008、および ONAQ008 と同じレベルの WE 蓄積の増強がみられた。一方、光合成阻害型除草剤とこれらのキノン類の同時処理では WE 蓄積増強の相乗効果は得られなかった。

作用点同定:

研究期間内に、プロテオミクスとクリックケミストリーによる作用点同定の実験には進むことができず、実質的な作用点 (分子標的) の解明はできなかったが、ミトコンドリアと葉緑体の電子伝達経路の攪乱が WE 蓄積増強に至ることを明らかにすることができた。また、今回の研究をすすめる中で、ユーグレナから単離ミトコンドリアとチラコイド膜を大量に調製し、生化学実験に供試する実験系を確立することができた。今後、単離オルガネラを用いた、より詳細な作用機序の解析と作用点の同定を進める。

以上の結果を総合すると、キノン類活性化化合物による WE 産生の増強はミトコンドリアと葉緑体の機能の両方への介入の複合的な結果と考えられる。これまでの実験では、光照射下で好氣的に培養したユーグレナを供試したが、実際には嫌気条件下で WE 生産の活性化が起こる。今後、嫌気条件下での培養後に単離したオルガネラを用いて実験する。また、生細胞における活性化化合物の作用がどのように統合されるかを解析するための実験に着手する。キノン類活性化化合物がオルガネラ電子伝達活性に影響を及ぼすことが明らかとなったため、酸化/還元プローブや電位差測定プローブによって数値化した酸化還元レベルを細胞内環境マーカーとし、WE 産生量、メタボローム情報、化合物の添加濃度、培養環境などの関係を解析する。最終的には、酸化還元レベルを低分子化合物の添加によって調節し、WE 産生の増強に直結する可能性を検証する。

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 T, Masatoshi N, Tanaka Y, Sato Km Okazawa A, Kanasya S, Ohta D	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤一裕、小川拓水、岡澤敦司、太田大策
2. 発表標題 ワックスエステル蓄積増強活性を持つ化合物の作用機序の解析
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

〔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	三芳 秀人 (Miyoshi Hideto) (20190829)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	

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