

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380130

研究課題名（和文）EST解析情報を利用した微細緑藻による有用炭化水素生合成メカニズムの全貌解明

研究課題名（英文）Studies on the mechanisms for biosynthesis of useful hydrocarbons by a green microalga based on data from EST analyses.

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・准教授

研究者番号：00224014

研究成果の概要（和文）：微細藻 *Botryococcus braunii* は、ボツリオコッセンおよびメチルスクアレンという特異なトリテルペン系炭化水素を大量に生産するため、代替石油資源としての利用が期待されている。本研究では、本藻種において発現している遺伝子を詳細に調べることで、上記炭化水素の生合成および代謝に関与するいくつかの新奇酵素遺伝子の特定に成功し、炭化水素生合成メカニズムが他生物に例を見ない、全く新しいものであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A microalga *Botryococcus braunii* produces large amounts of triterpene hydrocarbons, botryococcenes and methylsqualenes that are specific to the species. Those hydrocarbons are thought to be attractive as an alternative of petroleum. In this study, genes expressed in the alga were analyzed and some genes coding for new enzymes concerned with biosyntheses and metabolism of the hydrocarbons were identified. The mechanism for hydrocarbon production by the alga was found to be quite unique.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2009 年度 | 7,700,000  | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 2010 年度 | 3,100,000  | 930,000   | 4,030,000  |
| 2011 年度 | 2,900,000  | 870,000   | 3,770,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 13,700,000 | 4,110,000 | 17,810,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学

キーワード：微細藻類、生合成、トリテルペン、炭化水素、代替石油生産、*Botryococcus braunii*

## 1. 研究開始当初の背景

微細緑藻 *Botryococcus braunii* は光合成により固定した炭酸ガスを大量の液状炭化水素に変換、蓄積するため、再生産可能なエネルギー資源として有望視されている。本藻種は生産する炭化水素のタイプにより A、B、L の 3 品種に分けられる。これらの内、B 品種は本藻種に特異的な botryococcene と呼ばれるトリテルペンと、メチルスクアレンを大

量に生産する。スマトラ産の原油中には botryococcene の還元物が多量に含まれており、本藻種は石油の起源の一つと考えられている。本藻種が生産する botryococcene 類は軽質化により航空燃料に相当する良質な燃料油としての利用が可能であるが、藻体の増殖速度が非常に遅く、単純な大量培養による実用化はコスト的に難しいと考えられてき

た。そこで本藻種におけるトリテルペン系炭化水素生産のメカニズムを分子レベルで明らかにし、増殖速度および炭化水素の収量を高めた新たな培養方法の開発、あるいは本藻種の炭化水素生合成システムを導入した新規生物による代替燃料油生産法の開発が必要であると考えられた。本研究の開始時には、スクアレン合成酵素(squalene synthase=SS)と相同性を示すアミノ酸配列を有する酵素(botryococcene synthase-like protein=BSL) 遺伝子の存在が確認されていた。本遺伝子を大腸菌で発現させて得られたリコンビナントタンパク質による、ファルネシルニリン酸(FPP)からの botryococcene の生成は確認できていなかった。しかし上記リコンビナント酵素を *B. braunii* の藻体ホモジネートに添加すると、藻体ホモジネート自体が有する botryococcene 合成活性が飛躍的に上昇したことから、本酵素が botryococcene の生成に密接に関与することが分かっていた。そのため、この混合により酵素活性を上昇させる未知のタンパク性補因子の探索を行うためには、EST 解析が有効であると考えられていた。これに関連し、米国エネルギー省の Joint Genome Institute (JGI) における本藻 B 品種の EST 解析プロジェクトが進行中であった。その成果は直ちに一般に公開されるものであったため、原油価格の高騰に伴い世界各地で本藻種による炭化水素生産に注目が集まる中、上記 EST 解析プロジェクトの完了とともに、国際研究グループ間での競争が激化することが予想された。そこで、上述の EST 解析の成果を利用して、炭化水素生合成メカニズムを解明する研究を直ちに着手する必要がある。

## 2. 研究の目的

### (1) 効率の良いテルペン前駆体生合成経路に関する知見の集積

本藻種が大量のトリテルペンを生産できるということは、テルペン共通の前駆体であるイソペンテニルニリン酸(IPP)とジメチルアリルニリン酸(DMAPP)を効率よく供給できることを意味している。本藻種における IPP と DMAPP の生産は、メバロン酸経路では無く、メチルエリスリトールリン酸(MEP)経路によることが明らかになっていた。研究代表者らは MEP 経路の第一段階および第二段階で働く酵素の cDNA クローニングに成功していたが、EST 解析の結果から、本藻種における MEP 経路の全酵素に関する塩基配列情報の取得が期待できた。そこで、これらにつき網羅的な機能解析・発現解析を行い、トリテ

ルペンの生合成が MEP 経路とどのように連動しているかを明らかにすることで、本藻種がなぜ大量にトリテルペンを生産できるかの鍵を見つけ出すことを目的とした。

### (2) Botryococcene 合成活性発現の調節メカニズムの解明

大腸菌で生産したリコンビナント BSL の活性は、藻体中における botryococcene 類とメチルスクアレン類との存在比を考慮すると、かなり低いものにとどまった。加えて同酵素は SS と同様に、水溶性の基質であるファルネシルニリン酸から脂溶性のトリテルペン炭化水素を生成する反応を司るにも関わらず、SS と異なり、膜に結合する顕著な疎水性アミノ酸領域を有していなかった。また、界面活性剤の存在下では酵素活性が消失した。これらの結果は本酵素による botryococcene の生成には、既知のトリテルペン生合成酵素とは異なり、何らかの未知の因子との膜上での相互作用が重要である可能性を示していた。そこで EST 解析情報を利用し、本酵素と相互作用をし、活性の発現に関与する因子の特定を行うことを目的とした。

### (3) Botryococcene 合成関連酵素遺伝子の発現メカニズムの解明

*B. braunii* がなぜ botryococcene 類を大量に生産するのか、その生理的意義は不明である。

Botryococcene の合成に関与する遺伝子を特定できたことにより、その発現に関わる外的要因の解析が可能になった。そこで、様々な環境条件下における本酵素の遺伝子発現と酵素活性の相関関係を解析し、これにより炭化水素収量をより高める培養条件に関する情報を取得することを目的とした。

### (4) スクアレンおよび botryococcene を合成する酵素間の反応メカニズムの違いの解明

Botryococcene はスクアレンと同様に二分子のファルネシルニリン酸の縮合により、共通の中間体であるプレスクアレンニリン酸を経由して生成される。SS は、生物種間を超えてアミノ酸配列が非常に良く保存された 5 つのドメインを持ち、それらの反応への寄与が明らかになっている。一方、BSL は SS 中に見られる 5 つのドメインの内、4 つは保持していたが、5 番目のドメインが異なっていた。そこで SS および BSL 間における一次構造および予測される立体構造の違いが、反応生成物に及ぼす影響を調べることを目的とした。

### (5) 他生物細胞での botryococcene 生産システムの開発

上述の成果をもとに botryococcene の生合成に関与する酵素遺伝子を他生物に導入す

ることで、本藻種以外での炭化水素の生産法の開発が可能になる。形質転換する生物としては、イソプレノイド前駆体の生合成経路が強化されているものを選ぶ必要がある。緑藻 *Chlamydomonas* やラン藻等の光合成を行う生物の利用が望ましかったが、まず、第一段階として大腸菌や酵母等による発酵的な生産法を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本藻種におけるイソプレノイド前駆体生合成経路である、MEP 経路で働く酵素の内、すでにクローニングに成功しているもの以外の酵素につき cDNA クローニングを行った。JGI による EST 解析プロジェクトで得られたデータベースに加え、炭化水素を活発に生産している時期の藻体から、平均インサートサイズが大きい高品質の cDNA ライブラリーが利用可能である。これらを用いて MEP 経路の酵素の発現・機能解析を行った。酵素反応生成物の同定は、研究分担者の松永が担当した。また、必要に応じて遺伝子産物の機能解析は、連携研究者である葛山が保持している大腸菌の MEP 経路の変異株を用いて行った。機能が同定された遺伝子につきリアルタイム PCR システムを用い、これらの遺伝子の発現がトリテルペン生合成とどの様に連動しているかを検討した。

(2) 研究代表者は既存の SS のアッセイ法を改良し、FPP を基質とした藻体粗抽出物中の botryococcene 合成活性の検出に世界で初めて成功した。このアッセイ法により、本藻種における SS 活性が、培養期間全体を通して検出されるのに対し、botryococcene の合成活性は、細胞が活発に増殖している時期にのみ検出された。したがって botryococcene 合成活性の発現は、細胞の生理的状态により何らかの制御を受けているものと考えられた。また、大腸菌発現系で得られるリコンビナント BSL 自体は、FPP からの botryococcene 合成活性を欠くことや、その演繹アミノ酸配列中には、膜との結合を示唆する顕著な疎水性領域が無いこと等から、本酵素の活性発現には、既知のトリテルペン生合成酵素とは異なり、何らかの未知の因子と膜上で相互作用することが必要である可能性が示唆された。その様な因子の候補の一つとしてメチル基転移酵素を想定した。Botryococcene 類は炭素数 30 の物が作られた後、*S*-アデノシルメチオニン由来のメチル基により順次修飾され、炭素数 34 程度と同族体となって細胞外に排出され、細胞間マトリクスに蓄積される。従って botryococcene の

生成、蓄積にはメチル基転移酵素が密接に関与している可能性が考えられた。研究代表者は Kentucky 大学 Chappell 教授、Texas A&M 大学 Devarenne 助教授との共同研究で、本藻種からステロールメチル基転移酵素に類似した新規酵素遺伝子を、何種類かクローニングしていた。そこで、これらの遺伝子を、スクアレン蓄積能を有する酵母の変異株に導入し、その細胞内での蓄積物を分析した。また、メチル基転移酵素以外の因子が関与している可能性を考慮し、BSL 遺伝子を FPP 蓄積能のある酵母細胞内で過剰発現させ、その反応生成物の解析を行った。さらに EST 解析情報から、BSL と協奏的に作用することで botryococcene の生成に関与する可能性のある、他の候補遺伝子の探索を行った。

(3) 本藻種の SS 遺伝子に続き、BSL 遺伝子を特定できたことにより、環境要因(光質、栄養塩濃度、温度ストレス、細胞密度の変化等)と、上記酵素の遺伝子発現および酵素活性の変化の関係を「可視化」することが可能となった。そこで様々な培養条件下および生理状態での、藻体中の SS および BSL 遺伝子の発現レベルおよび酵素活性を解析した。

(4) 上記研究(2)により、BSL とともに botryococcene 合成活性を発現させる因子が確定した。そこでこれらを FPP を蓄積する酵母細胞に導入し、過剰発現することで、炭化水素生産の大量生産法の確立を目指した。

### 4. 研究成果

#### (1) MEP 経路の酵素の cDNA クローニングおよび機能解析

高等植物において、テルペン前駆体を供給する MEP 経路で働く 7 種類の酵素の内、1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)、1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR)、4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (HDR) の 3 つが、最終的なテルペンの生成量に影響を与えるとの知見が得られていることから、まず、これらの cDNA クローニングを行い、全長クローンを得た。本藻種は高等植物と同様に 3 種の DXS アイソザイム (DXS-I, II, III) を有していた。ゲノム情報が明らかになって他の単細胞藻類全てにおいて、DXS が一種しか存在していないことを考えると、この複数の DXS アイソザイムの存在が、*B. braunii* による特異なトリテルペン生産を支えている可能性が示唆された。DXS-I ~ III および DXR 遺伝子につき大腸菌発現系により得られたリコンビナントタンパク質につき、その機能を確認したところ、いずれも活性を有する酵素をコードしていることが明らかになった。ま

た、本藻種のHDR遺伝子については、大腸菌のHDR遺伝子欠損株中で発現させることで大長期の生育が回復したことから、活性を有する酵素をコードしていることが明らかになった。MEP経路における他の4種の酵素についても全長クローニングが終了しており、逐次機能解析を行っている段階である。

## (2) Botryococcene 合成活性発現メカニズムの解明

FPP を大量に蓄積することができる酵母の変異株細胞内で BSL 遺伝子を発現させ、その細胞内成分を分析したところ、BSL 遺伝子を導入していない酵母には見られない成分が GC-MS で確認された。当該成分はプレスクアレンアルコールであることが判明したことから、酵母細胞中において BSL は、スクアレン合成酵素の第一段階目の反応を行い、生成したプレスクアレンニリン酸 (PSPP) が酵母のホスファターゼにより、プレスクアレンアルコールに変換されているものと考えられた。したがって BSL は FPP から PSPP への変換という、スクアレンおよび botryococcene の生合成において共通の反応を行えるもの、二段階目の反応に必要な何かは不足しているものと考えられた。これに関連し、藻体ホモジネートを用いたアッセイでは、NADPH を反応系に加えることで FPP からのスクアレンおよび botryococcene の生成を検出できる。しかし、もし PSPP から botryococcene への変換時に NADPH が直接利用されるので無く、藻体ホモジネート内に特異的に存在する因子により、NADPH の還元力が一旦他のヒドリド供与体に伝達されてから働くのであれば、大腸菌や酵母で作られた BSL のみを用いるアッセイ系では、PSPP から botryococcene への変換は起こらないことになる。そこで上述の藻体に特異的に存在するタンパク性の因子として、フェレドキシンやフェレドキシン NADP<sup>+</sup>還元酵素等、NADPH とカップリングして機能するタンパク質をコードしている遺伝子をクローニングし、得られたタンパク質と BSL と組み合わせてアッセイを行ったが botryococcene の生成は見られなかった。そこで細胞内の redox に関与する他の候補遺伝子の探索を、EST データベースを用いて行ったところ、SS と相同性を示す遺伝子が BSL の他に2つ存在することが明らかになった。そこで BSL をスクアレン合成酵素様タンパク質-1 (squalene synthase-like protein-1=SSL-1) と改名し、新たに見つかった遺伝子をそれぞれ SSL-2、SSL-3 と命名した。SSL-2 あるいは SSL-3 が、SSL-1 が触媒しない SS 合成反応における二段階目の反応を行う可能

性が考えられたので、これらの翻訳産物の機能解析を行った。SSL-1~3 遺伝子を単独で、あるいは SSL-1 と SSL-2、又は SSL-1 と SSL-3 の組み合わせで、FPP 蓄積能を有する酵母内に導入したところ、SSL-3 単体では何も生じなかったが、SSL-1 と SSL-3 を共発現させると botryococcene が生成した。また、少量のスクアレンも生成していることが確認された。したがって SSL-3 は FPP を基質として PSPP を生成することは出来ないが、SSL-1 により作られた PSPP を利用して二段階目の反応のみを行えることが分かった。一方、SSL-2 は単独で NADPH の存在化、FPP を基質として少量のスクアレンとともにビスファルネシルエーテルという、今まで *B. braunii* からは検出されなかった化合物を主成分として生成した。また、SSL-1 と SSL-2 の組み合わせでは、botryococcene は生成せず、代わりにスクアレンが生成した。一般的にスクアレンは SS という単一の酵素が二段階の反応を行う事で生成する。それに対し、一段階ずつ別々の酵素が働くことでスクアレンが生成する例は、この SSL-2 が初めてであり、*B. braunii* に特異的なものと考えられた。従って SSL-2 は本藻種に特異的なメチルスクアレン、およびその誘導体等の二次代謝産物を作るために藻体内で機能しているものと推定された。これらの結果は大腸菌で発現させた精製リコンビナントタンパク質を用いた in vitro のアッセイでも同様であった。

本研究により、*B. braunii* におけるトリテルペン類の生合成が、他生物に例を見ないユニークな物 (図1) であることが明らかになった。

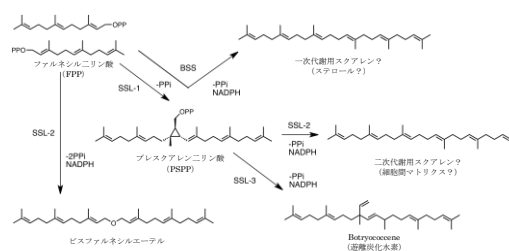


図1. *B. braunii* における新規トリテルペン生合成メカニズム

## (3) 他生物細胞での botryococcene 生産システムの開発

上記 (2) により botryococcene およびスクアレンの生合成に関与する酵素遺伝子群が同定されたことから、他生物細胞での botryococcene の生産を試みた。SSL-1 およ

び SSL-3 遺伝子それぞれの 3' 下流域に、*B. braunii* の SS に見られる膜結合領域をコードしている部位を接続し、FPP 蓄積能を持つ酵母細胞内で過剰発現させたところ、培地 1L 当たり 70mg の botryococcene の生産が確認された。これにより発酵的な手法による botryococcene 生産の展望が開けた。

#### (4) Botryococcene 合成関連酵素遺伝子の発現メカニズムの解明

上記 (2) により botryococcene およびスクアレンの生合成に関与する酵素遺伝子群が同定されたことから、これらの遺伝子の異なる増殖段階における発現を、リアルタイム PCR により解析した。その結果、*B. braunii* の藻体ホモジネートにおける、両テルペン合成活性の高まる時期に、SSL-1~3 の mRNA 蓄積量も多いことが明らかになった。現在、各種培養条件下においてこれらの遺伝子発現がどの様に変化するか精査を行っている。

#### (5) トリテルペンメチル基転移酵素の同定

当初、botryococcene 合成活性の発現に、SSL-1 と協奏的に機能する可能性を想定していたメチル基転移酵素に代わり、SSL-2 および SSL-3 が同定されたことで、トリテルペンメチル基転移酵素による botryococcene 類の生成の可能性は否定された。しかし、当該酵素はテルペン類の主鎖に分岐構造を導入する酵素であり、オクタン価の高い炭化水素系燃料を生産する上で重要である。そこで得られていた遺伝子の機能同定を行った。cDNA ライブラリーからのスクリーニングおよび EST データベースからの検索により、ステロールメチル基転移酵素と相同性を示す 6 種の遺伝子が得られた。これらを *B. braunii* 由来の SS を導入したスクアレן蓄積能を有する酵母変異体、あるいは SSL-1 と SSL-3 の両者を導入した botryococcene 蓄積能を有する酵母変異体に導入して、細胞内の蓄積物を分析した。その結果 6 種のステロールメチル基転移酵素様タンパク質の内、3 種がスクアレןあるいは botryococcene にメチル基を導入することが出来た。これらを triterpene methyltransferase-1~3 (TMT-1~3) と命名した。TMT-1 および TMT-2 は、スクアレן骨格の両末端に近い二箇所の二重結合にメチル基を導入した。一方 TMT-3 は、botryococcene 骨格の両末端に近い二箇所の二重結合にメチル基を導入した。*B. braunii* には、分子骨格のより内側に存在する二重結合にもメチル基が導入された C<sub>34</sub>botryococcene や、テトラメチルスクアレןが存在するが、今回同定されたメチル基転移酵素は、これらのよりメチル化の進んだト

リテルペン類を生成出来なかった事から、本種には更に別のメチル基転移酵素が存在する可能性が示唆された。

#### 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 T. D. Niehaus, S. Kinison, S. Okada, Y.-S. Yeo, S. A. Bell, P. Cui, T. P. Devarenne, J. Chappell, Functional identification of triterpene methyltransferases from *Botryococcus braunii* Race B, *J. Biol. Chem.*, 査読有、**287**, 2012, 8163-8173, DOI 10.1074/jbc.M111.316059

② D. Matsushima, H. Jenke-Kodama, Y. Sato, Y. Fukunaga, K. Sumimoto, T. Kuzuyama, S. Matsunaga, S. Okada, The single cellular green microalga *Botryococcus braunii*, race B possesses three distinct 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases, *Plant Sci.*, 査読有、**185-186**, 2012, 309-320, doi:10.1016/j.plantsci.2012.01.002

③ T. D. Niehaus, S. Okada, T. P. Devarenne, D. S. Watt, V. Sviripa, J. Chappell, Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有、**108**, 2011, 12260-12265, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.11062221108

[学会発表] (計 7 件)

① T. D. Niehaus, S. Okada, T. P. Devarenne, D. S. Watt, V. Sviripa, J. Chappell, Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*, TERPNET2011, 2011 年 5 月 24 日, Kalmar, Sweden

② K. Fujisawa, H. Jenke-Kodama, T. Kurokawa, Y. Fukunaga, S. Matsunaga, S. Okada, Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from the B race of a green microalga *Botryococcus braunii*, TERPNET2011, 2011 年 5 月 24 日, Kalmar, Sweden

③ T. D. Niehaus、S. Okada、S. Wu、T. P. Devarenne、D. S. Watt、V. Sviripa、J. Chappell、Elucidation of novel triterpene pathways in *Botryococcus* and engineering plants for high-value oil production、TERPNET2011、2011年5月23日、Kalmar、Sweden

④福永有佑、岡田 茂、松永茂樹、T. Niehaus、J. Chappell、微細緑藻 *Botryococcus braunii* のトリテルペン生合成関連遺伝子の発現解析、平成23年度日本水産学会春季大会、2011年3月30日、東京

⑤ T. Weiss、P. Cui、S. Okada、J. Chappell、T. P. Devarenne、Molecular exploration of C<sub>34</sub> botryococcene production in *Botryococcus braunii*、TERPNET2009、2009年5月27日、Tokyo、Japan

⑥ T. Niehaus、S. Kinison、S. Okada、T. P. Devarenne、J. Chappell、Elucidation of the linear triterpene biosynthetic pathways in *Botryococcus braunii*、TERPNET2009、2009年5月27日、Tokyo、Japan

⑦ K. Sumimoto、S. Okada、S. Matsunaga、Characterization of 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B、TERPNET2009、2009年5月26日、Tokyo、Japan

〔図書〕(計1件)

岡田 茂、シーエムシー出版、マリンバイオテクノロジーの新潮流「第4章 1. バイオエネルギー」、2011、141-166

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

① 名称 : New *Botryococcus braunii* triterpene synthase, useful for producing high levels of triterpene hydrocarbons  
発明者: J. Chappell、S. Okada、T. Niehaus、T. Devarenne  
権利者 : 同上  
種類 : 特許  
番号 : US2011294182-A1  
出願年月日 : 2011年12月1日  
国内外の別 : 国外

② 名称 : Novel polypeptide isolated from *Botryococcus braunii*, useful for producing triterpenes including botryococcene and squalene

発明者 : J. Chappell、T. Devarenne、T. Niehaus、S. Okada

権利者 : University of Kentucky Research Foundation

種類 : 特許

番号 : US2010041120-A1 ; US7985568-B2

出願年月日 : 2009年8月11日

国内外の別 : 国外

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号 : 00224014

(2) 研究分担者

松永 茂樹 (MATSUNAGA SHIGEKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 : 60183951

(3) 連携研究者

葛山 智久 (KUZUYAMA TOMOHISA)

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号 : 30280952