

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01724

研究課題名（和文）藻類オルガネラ工学に基づく医薬品原料の多段階生合成プロセスの創成

研究課題名（英文）Development of multistep processes for pharmaceutical manufacturing with the algal-organelle engineering

研究代表者

田中 剛（Tanaka, Tsuyoshi）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20345333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、微細藻類を生物ホストとしたバイオ医薬品であるプロスタグランジン類（PG）を製造するプロセスの構築し、その生産性の向上を試みた。研究代表者はこれまでに、微細藻類で初となるPG生産をオイル高蓄積珪藻*Fistulifera solaris*をホストとして用いて達成している。本研究では、新たな生物ホストとして珪藻*Phaeodactylum tricornutum*を用いて、C20脂肪酸をPGに変換するシクロオキシゲナーゼを異種発現させたPG生産株を作出した。得られた株のPG生産性を評価したところ、10倍以上のPG生産性の向上が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、研究代表者が独自に確立した細胞毒性を示すような疎水性化合物を微細藻類のオルガネラ、オイルボディ内で生産する技術を他種の珪藻に適用し、生産性の向上を達成したものである。市場規模が大きいPG生産において微細藻類をホストとして利用することは、持続可能かつ循環型のバイオエコノミー実現に貢献する。さらに、その生産性は他種と比較して高く、産業への波及効果は非常に大きい。本技術は、様々なバイオ医薬品を微細藻類ホスト細胞内で生産する際に応用することができ、社会的に意義深い。また、異種発現したシクロオキシゲナーゼによるPG生産の細胞内動態に関する知見を得られた点で学術的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：The manufacturing process for prostaglandins (PG) using microalgae was developed and the PG productivity was improved. The model diatom, *Phaeodactylum tricornutum* was utilized as a host for PG production. Heterogeneous expression of cyclooxygenase, which produces PG from C20 fatty acids as precursors, in *P. tricornutum* was conducted for PG-producing strain development. As a result, efficient production of PG was achieved with over 10-fold higher productivity than the previously reported transgenic microalgae and plants.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：微細藻類 有用物質生産 プロスタグランジン

### 1. 研究開始当初の背景

藻類は、持続可能かつ循環型のバイオエコノミーを確立するための重要なホストであり、脂肪酸に由来する様々な疎水性化合物の生産の可能性を秘めている。しかし、疎水性が高く生理活性を示す化合物は毒性が高く、細胞内に蓄積できないという技術的障壁があった。そこで、医薬品原料であるプロスタグランジン (PG)を対象に、藻類オルガネラであるオイルボディ内に疎水分子を効率的に格納する独自の取り組みにより、化合物濃縮および細胞毒性の回避を行い、プロスタグランジン生産性の飛躍的な向上を実現することを目指した。そのために、本研究では化合物の部品工場となる葉緑体、加工・製造ラインとなる小胞体、貯蔵庫であるオイルボディなどの藻類細胞内の各オルガネラ間の相互作用を理解し、各オルガネラで逐次反応を進める、多段階生成プロセスを創成し、生産性の飛躍的な向上を目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、微細藻類をホスト細胞として用いた医薬品生産プロセスの構築及び生産量向上を目指した。

研究代表者はこれまでに、環境中から分離し保有しているオイル高蓄積珪藻 *Fistulifera solaris* を用いて、バイオジェット燃料生産ホストとしての有用性を示してきた。これまでに、当該株の全ゲノム解析が終了し、オイル合成経路とその共役経路を特定している。さらに、当該株を用いて、微細藻類で初となる代謝改変による PG 生産を実現している。本研究では、*F. solaris* に加えて、珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* を新たな生物ホストとして、PG 生産株を作出するとともに、PG 生産性の評価を行った。

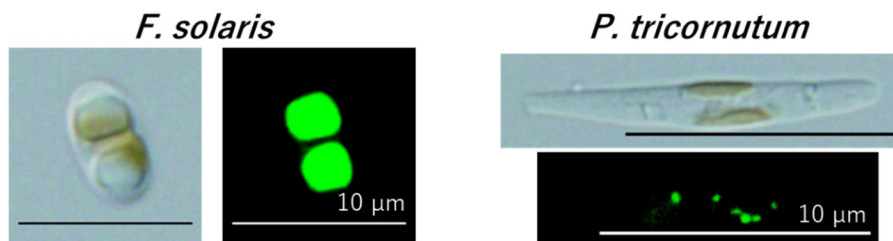


図1 本研究で用いた微細藻類ホストの顕微鏡写真。

### 3. 研究の方法

#### (1) *P. tricornutum* におけるプロスタグランジン合成酵素遺伝子の探索

*P. tricornutum* ゲノム上の予測遺伝子に対し BLAST 検索を行った。この際、クエリー配列には論文報告があるタンパク質配列を用いた。PG はシクロオキシゲナーゼ (COX) の触媒作用により、前駆体である C20 脂肪酸 (アラキドン酸、エイコサペンタエン酸など) から変換されて生産される。*cox* 遺伝子の探索には、ヒト由来の *cox-1* 遺伝子、珪藻 *Skeletonema marinoi*, *Thalassiosira rotula* および紅藻オゴノリ (*Gracilaria vermiculophylla*) に由来する *cox* 遺伝子 (*Smcox*, *Trcox*, *Avcox*) のアミノ酸配列をクエリー配列として用いた。PG 合成酵素遺伝子の探索にはヒト由来 PG 合成酵素遺伝子である PGD シンターゼ (*PGDS*) 遺伝子、PGE シンターゼ (*PGES*) 遺伝子、PGF シンターゼ (*PGFS*) 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列をクエリー配列として用いた。その後、Clustal Omega を用いて、ヒットした配列およびクエリー配列のアライメントを実施した。また、InterProScan を用いて保持するドメイン・モチーフの検索を行った。

#### (2) COX 発現組み換え株の作出

C20 脂肪酸を PG へ変換する COX を異種発現する *P. tricornutum* の遺伝子組み換え株を作出した。まず、*F. solaris* の内在性プロモーター (グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子プロモーター) の下流に、*Smcox*, *Trcox*, *Avcox* 遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。加えて、*cox* 遺伝子を緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) と融合発現する発現カセットも設計した。構築したプラスミドをパーティクルガン法により *P. tricornutum* に導入し、遺伝子組み換え株を得た。

#### (3) COX 発現組み換え株における PG 生産の評価

COX 発現組み換え株を培養後、細胞を回収し、種々の溶媒を用いて PG を抽出した。酢酸エチルで抽出した画分を、高速液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析 (liquid chromatography tandem mass spectrometry; LC/MS/MS) に供した。得られたスペクトルデータから PG の定量評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *P. tricornutum* におけるプロスタグランジン合成酵素遺伝子の探索

*P. tricornutum* を PG 生産ホストとして用いるために、*P. tricornutum* のゲノム内に COX 及び PG 合成酵素をコードする遺伝子の有無を確認した。*cox* 遺伝子の BLAST 検索の結果、相同性のある配列は同定されなかった。このことから、*P. tricornutum* のゲノム内には *cox* 遺伝子を保持していないことが示唆された。次に、PG 合成酵素遺伝子の BLAST 検索を行った結果、ヒト由来の PGD 合成酵素 (PGDS)、PGE 合成酵素 (PGES) 及び PGF 合成酵素 (PGFS) と相同性の高い配列を *P. tricornutum* が保持していることが予測された。*P. tricornutum* における PGES 候補配列については、他の PG 合成酵素候補配列に比べて相同性が低かった。また、ヒト由来 PG 合成酵素配列及び珪藻由来 PG 合成酵素候補配列をアライメントした結果、*P. tricornutum* の PG 合成酵素候補配列においてそれぞれのヒト由来酵素の活性部位を多く保存していた。さらに、*P. tricornutum* 由来の推定 PG 合成酵素が保持するドメインを Interproscan によって検索した結果、ヒト由来 PG 合成酵素及び先行研究で探索された珪藻 *F. solaris* 由来 PG 合成酵素が保持するドメインと一致していた。これらのことから、*P. tricornutum* ゲノム上に PG 合成酵素遺伝子が保存されていることを確認した。

##### (2) COX 発現 *P. tricornutum* の遺伝子組み換え株における PG の多段階生合成

COX 発現プラスミドを導入した *P. tricornutum* の遺伝子組み換え株を獲得した。*cox* 遺伝子は RT-PCR によって発現量を確認した。その結果、Sm*cox* 導入株では 6 クローン、Tr*cox* 導入株では 6 クローン、Av*cox* 導入株では 10 クローンの形質転換体において目的の位置に *cox* 遺伝子由来するバンドが確認され、*cox* 遺伝子の存在を確認した。COX 発現株の内、発現の良好な株について質量分析法により PG の生産を確認した。その結果、*P. tricornutum* 野生株では確認されなかった PG の生産が、AvCOX 発現株において確認された。しかし、珪藻由来の COX 遺伝子である SmCOX、TrCOX 発現株では PG の生産が確認されなかった。珪藻由来の COX は酵素活性が未解明であるため、機能解析に向けて更なる解析が必要である。AvCOX 発現株では、アラキドン酸が前駆体である PG2 類 (PGF2 $\alpha$ ) とエイコサペンタエン酸が前駆体の PG3 類 (PGD3、PGE3、PGF3 $\alpha$ ) の生産が確認された。これらのことから、珪藻 *P. tricornutum* における *cox* 遺伝子の導入により、PG 生合成用ホストの作出に成功したことが示された。COX の前駆体となるアラキドン酸やエイコサペンタエン酸は小胞体内で生合成され、局在していることが明らかになっている。本研究で得られた株では、主に PG 類は細胞質に遊離脂肪酸として局在していることから、オイルボディー中で COX を介して PG へ変換され、何らかの機構により遊離脂肪酸として細胞質へ輸送されたことが示唆され、多段階生合成プロセスの構築がなされていることが示唆された。さらに、AvCOX 発現株のうち、最も PG 生産量が高かった株の PG 生産性を評価したところ *F. solaris* の PG 生産株と比較して約 10 倍の向上が確認された。また、その他の植物等における *cox* 発現株と比較すると、最大で約 100 倍の PG 生産性を達成した。

以上のように本研究では、珪藻 *P. tricornutum* における *cox* 遺伝子の異種発現による医薬品プロスタグランジンの生産に成功した。その生産性は他種の生物ホストを用いた場合と比較して、10 倍以上に向上した。本研究は、微細藻類ホストを用いた CO<sub>2</sub> からの医薬品製造の実現に貢献するものであり、今後 PG の細胞内局在や細胞内代謝メカニズムを詳しく解析することにより、さらなる生産性の向上が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suhaimi Noraiza, Maeda Yoshiaki, Yoshino Tomoko, Tanaka Tsuyoshi	4. 巻 133
2. 論文標題 Effects of fatty acid synthase-inhibitors on polyunsaturated fatty acid production in marine diatom <i>Fistulifera solaris</i> JPCC DA0580	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 340 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.12.014	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 -
1. 著者名 Maeda Yoshiaki, Kobayashi Ryosuke, Watanabe Kahori, Yoshino Tomoko, Bowler Chris, Matsumoto Mitsufumi, Tanaka Tsuyoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Chromosome-Scale Genome Assembly of the Marine Oleaginous Diatom <i>Fistulifera solaris</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 788 ~ 800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-022-10147-7	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 該当する
1. 著者名 Naser Insaf, Yabu Yusuke, Maeda Yoshiaki, Tanaka Tsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Highly Efficient Genetic Transformation Methods for the Marine Oleaginous Diatom <i>Fistulifera solaris</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-022-10189-x	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 -
1. 著者名 Maeda Yoshiaki, Watanabe Kahori, Kaha Marshila, Yabu Yusuke, Yoshino Tomoko, Matsumoto Mitsufumi, Tanaka Tsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Assessment on the oil accumulation by knockdown of triacylglycerol lipase in the oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00453-w	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 Tanaka Tsuyoshi, Maeda Yoshiaki, Suhaimi Noraiza, Tsuneoka Chiharu, Nonoyama Tomomi, Yoshino Tomoko, Kato Naohiro, Lauersen Kyle J.	4. 巻 57
2. 論文標題 Intron-mediated enhancement of transgene expression in the oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i> towards bisabolene production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102345 ~ 102345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2021.102345	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 該当する

1. 著者名 Maeda Yoshiaki, Tsuru Yuki, Matsumoto Nana, Nonoyama Tomomi, Yoshino Tomoko, Matsumoto Mitsufumi, Tanaka Tsuyoshi	4. 巻 118
2. 論文標題 Prostaglandin production by the microalga with heterologous expression of cyclooxygenase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 2734 ~ 2743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.27792	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14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 菊地美穂, 松本奈々, 鶴雄基, 前田義昌, 吉野知子, 田中剛
2. 発表標題 シクロオキシゲナーゼを利用した海洋微細藻類におけるプロスタグランジンの生合成
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Insaf Naser, Yusuke Yabu, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka
2. 発表標題 Establishment of an efficient genetic transformation system for the marine diatom <i>Fistulifera solaris</i>
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊地美穂, 松本奈々, 前田義昌, 吉野知子, 田中剛
2. 発表標題 海洋珪藻 <i>Fistulifera solaris</i> におけるシクロオキシゲナーゼを用いたプロスタグランジン生産
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊久保涼太, 寺内一星, 柏山祐一郎, 前田義昌, 吉野知子, 田中剛
2. 発表標題 クロロフィル異化酵素の発現による海洋珪藻 <i>Fistulifera solaris</i> の捕食耐性株の創製
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 剛
2. 発表標題 マリンバイオテクノロジーと微細藻類からのバイオジェット燃料の社会実装
3. 学会等名 2022年度・電気化学会キャパシタ技術委員会 第4回研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Marshila Kaha, Masayoshi Noda, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Mitsufumi Matsumoto, Tsuyoshi Tanaka
2. 発表標題 Proteomic analysis of the oil bodies with different sizes in the marine diatom <i>Fistulifera solalis</i> for oil body-engineering
3. 学会等名 6th Molecular Life of Diatoms (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumika Kaneko, Siiichiro Moriya, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka
2. 発表標題 The physiological role and structural arrangement of the mitochondria of <i>Fistulifera solalis</i> in the degradation process
3. 学会等名 6th Molecular Life of Diatoms (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seiichiro Moriya, Tomomi Nonoyama, , Daisuke Nojima, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Mitsufumi Matsumoto, Tsuyoshi Tanaka
2. 発表標題 Analysis of the interaction between vacuoles and lipid droplets in oleaginous diatom <i>Fistulifera solalis</i> toward enhancement of biofuel production
3. 学会等名 International Conference on Algal Biomass, Biofules and Bioproducts (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Marshila Kaha, Masayoshi Noda, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Mitsufumi Matsumoto, Tsuyoshi Tanaka
2. 発表標題 Identification of novel oil body-associated proteins in the marine diatom <i>Fistulifera solaris</i> based on the proteomic analysis of the oil bodies with different sizes
3. 学会等名 第21回マリンバイオロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noraiza Suhaimi, Chiharu Tsuneoka, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Mitsufumi Matsumoto, Tsuyoshi Tanaka
2. 発表標題 ntron-mediated enhancement of transgene expression in the oleaginous diatom <i>Fistulifera soraris</i> towards bisabolence production
3. 学会等名 第21回マリンバイオロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 大河, 屋部 祐介, 渡邊 かほり, 前田 義昌, 吉野 知子, 松本 光史, 田中 剛
2. 発表標題 海洋珪藻Fistulifera solarisのゲノム編集における内在性マーカー遺伝子の有効性評価
3. 学会等名 第21回マリンバイオロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森屋 星一郎, 野々山 智美, 野島 大祐, 野田 将礼, 前田 義昌, 吉野 知子, 田中 剛
2. 発表標題 オイル高蓄積珪藻Fistulifera solarisにおけるリポファジーの解析
3. 学会等名 第21回マリンバイオロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子 由美花, 森屋 星一郎, 前田 義昌, 吉野 知子, 田中 剛
2. 発表標題 オイル分解時の海洋珪藻Fistulifera solarisにおけるミトコンドリアの役割
3. 学会等名 第21回マリンバイオロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 大河, 渡邊 かほり, 前田 義昌, 吉野 知子, 松本 光史, 田中 剛
2. 発表標題 エピソードベクターを用いたオイル高生産珪藻Fistulifera solarisの形質転換法の確立
3. 学会等名 第21回マリンバイオロジー学会大会
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	吉野 知子  (Yoshino Tomoko)  (30409750)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授   (12605)	
研究 分担者	前田 義昌  (Maeda Yoshiaki)  (30711155)	筑波大学・生命環境系・准教授   (12102)	

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