

## 研究成果報告書

所属機関	職名	氏名
大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科	講師	小川 拓水

研究テーマ

無機炭素取り込み能力を強化したユーグレナの開発

研究報告

## 1. 研究の背景と目的

低炭素・循環型社会の実現に向けて、実用藻類のバイオマス生産能力を高める新技術の開発が求められている。藻類の主要蓄積物質である糖質や脂質は化石燃料の代替エネルギー原料となり、嫌気的条件下で生成するコハク酸などのジカルボン酸類は石油化学製品を代替するバイオプラスチックの原料となる。また、藻類やその精製物は食品や化粧品の原料にもなる。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、貯蔵多糖（パラミロン）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するとともに、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）。ユーグレナによるワックスエステル生産量は、細胞乾燥重量の 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  $\text{CO}_2$  固定を伴う代謝経路が関わることを見出した。しかし、ワックスエステル発酵の進行過程において、環境中  $\text{CO}_2$  がどのようにして細胞内に取り込まれ、 $\text{CO}_2$  固定を伴う代謝酵素が存在する細胞内画分へと輸送されるのかについては不明な点が多い。本研究では、この環境中  $\text{CO}_2$  の取り込みや輸送に関わる分子機構の一端を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究成果および考察

安定同位体標識した  $^{13}\text{C}_2$  を培地に通気してワックスエステル発酵を誘導したところ、 $^{13}\text{C}$  がワックスエステル分子内に取り込まれたことから、無機炭素輸送システムの存在が示唆された。このシステムの構成要素として、細胞内膜系に局在する無機炭素輸送体の存在や無機炭素の濃縮に関わる炭酸脱水素酵素の関与などが想定される。しかし、研究開始時点でユーグレナのゲノムは解読されておらず、利用可能な遺伝子発現データは限定的であった。そこで、順遺伝学的なアプローチによって無機炭素輸送システムに関わる因子を探索するための実験を計画した。ユーグレナは高濃度の  $\text{CO}_2$  通気条件下で旺盛に増殖することが知られている。この高度な  $\text{CO}_2$  耐性には無機炭素輸送システムが貢献していると考えられる。一方、 $\text{CO}_2$  耐性に関わる遺伝子が突然変異によって欠損した場合、高濃度の  $\text{CO}_2$  通気条件下での増殖に何らかの影響が生じることが予想される。そこで、ユーグレナにエチルメタンサルホン酸 (EMS) を処理することで突然変異誘発システムを作出し、 $\text{CO}_2$  通気条件下で生育させ、増殖速度に異常を来した個体を選抜し、その原因遺伝子同定へと繋げる。

EMS 処理実験の材料として、28℃ に設定した恒温培養機内で Koren-Hutner (KH) 液体培地 (pH 5.0) で継代培養したユーグレナ (*Euglena gracilis* Z 株) を用いた。EMS 処理前に顕微鏡下で観察したところ、緑色個体の中に白色個体が散見された。また、緑色個体の中にも細胞サイズが大きい個体や小さい個体が混在していた。継代培養を繰り返したことで集団内に遺伝子突然変異が蓄積したことが原因だと考えられた。そこで、この継代培養株 (元株とした) を KH 寒天培地に塗布して 7 日間培養し、得られたシングルコロニー 6 個を KH 液体培地に接種して旋回培養し、これらを単離系統 (EG01-06) とした。単離系統を新しい KH 液体培地に継代して旋回培養し、培養開始から 1 日置きに 7 日目までの間、波長 750 nm における吸光度を測定して 1 回目の継代の増殖曲線を作成した。どの単離系統についても元株と比較して増殖の遅延が見られた。比較的良好な増殖を示した EG01, EG03, および EG04 を新しい KH 液体培地に継代し、同様にして 2 回目の継代の増殖曲線を作成したところ、EG01, EG03, EG04, および元株の増殖曲線がほぼ一致した (図1)。2 回目の継代培養開始から 4 日目に顕微鏡下で観察したところ、どの単離系統においても白色個体は見られず、細胞サイズのばらつきも小さかった (図2)。

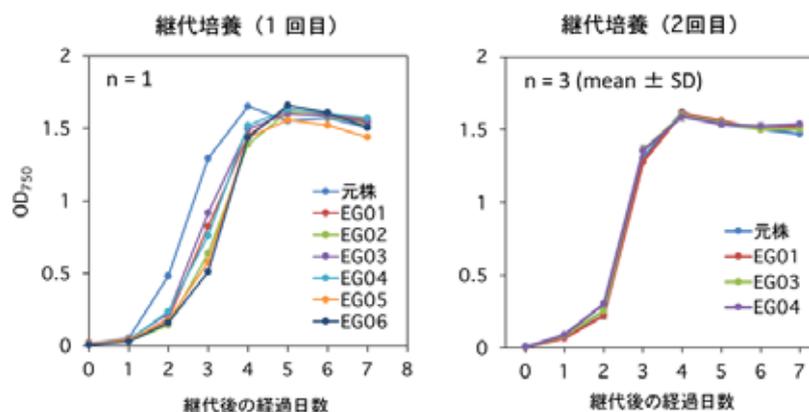


図1. 単離系統の増殖曲線

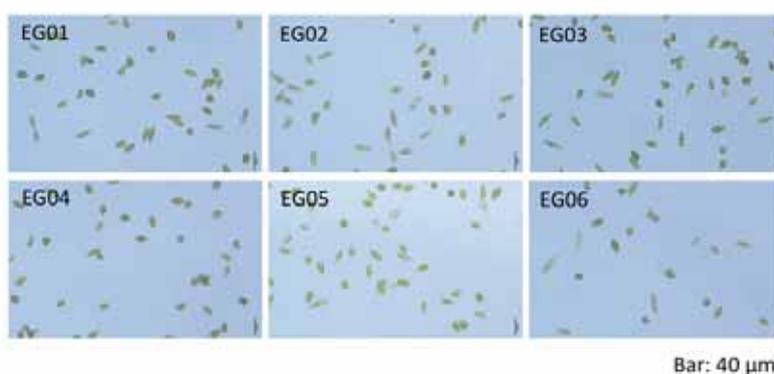


図2. 単離系統の様子

次に、単離系統 (EG01, EG03, EG04) のワックスエステル産生能を元株と比較した。KH 液体培地で 4 日間旋回培養した後、培養液を蓋つきの遠沈管に移して蓋を締め、暗所で静置培養することでワックスエステル発酵を誘導した。誘導開始から 24 時間後、培養液を遠心分離して回収した細胞ペレットから全脂質を抽出し、抽出液を GC-MS により分析した。ワックスエステルのピーク面積値を抽出溶媒に加えた内部標準物質のピーク面積値で割り相対ピーク面積値を算出し、全ワックスエステルおよび主要成分である C28 ワックスエステルを元株と単離系統 (EG01, EG03, EG04) 間で比較したところ、5% 水準で有意な差は見られなかった (図3)。このことから、単離系統 (EG01, EG03, EG04) のワックスエステル産生能は元株と同等であることが示唆された。

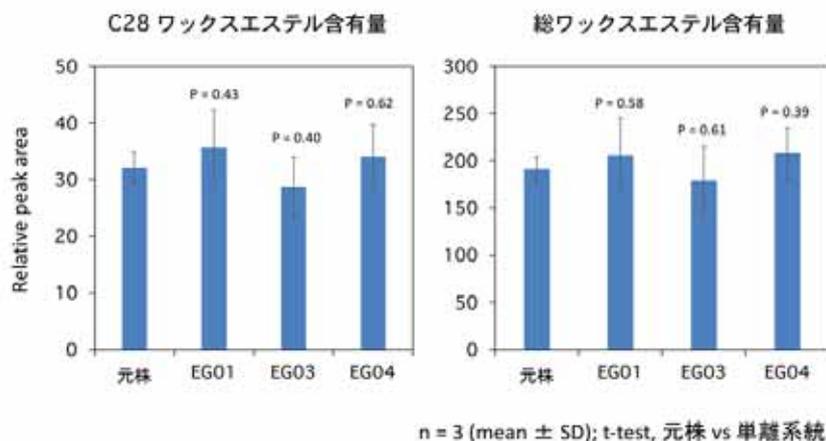


図3. 単離系統のワックスエステル産生能

単離系統 EG03 を用い、EMS 処理条件を検討した。EG03 を 24 ウェルプレートに継代し、ドラフトチャンバー内で EMS 溶液（終濃度 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0%）を添加して 20 分間振盪培養した。細胞を KH 液体培地で 3 回洗浄した後に、24 ウェルプレートに移し、KH 液体培地で 3 日間巡回培養した。顕微鏡下で観察したところ、EMS 処理濃度 2.0% の試験区では異常な細胞形態を示す個体が散見された（図4）。次に EMS 処理濃度を 0.5, 1.0, 2.0, 4.0% に変更し、処理時間を 60 分間に延長して同様の実験を行った（図5）。EMS 処理濃度 1.0% と 2.0% の試験区では増殖に遅延が見られ、異常な細胞形態を示す個体が散見された。一方、これらの試験区では培養開始後 8 日目までに無処理と同程度まで増殖した。EMS 処理濃度 4.0% の試験区では増殖が見られなかった。以上より、EMS 処理条件は、終濃度 1.0~2.0%、処理時間 60 分間に決定した。現在、EG03 に EMS 処理をして得られた突然変異誘発系統を継代維持している。

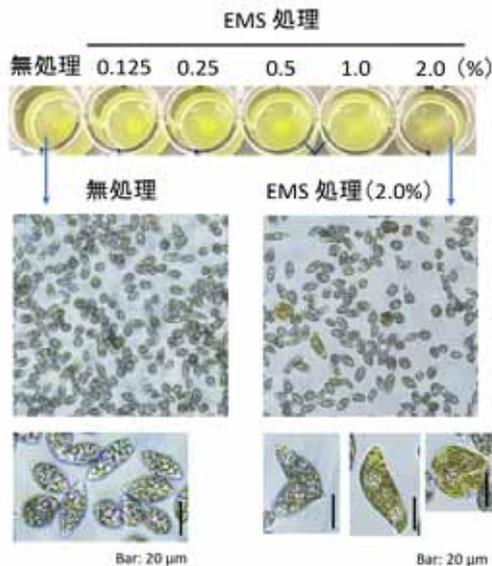


図4. EMS 処理濃度の検討

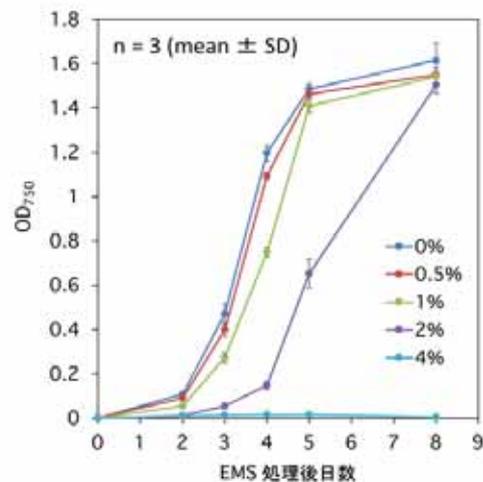


図5. EMS 処理後の単離系統 EG03 の増殖曲線

### 3. 将来展望

単離系統に EMS 処理をして得られた突然変異誘発系統には、細胞増殖以外の細胞内プロセスに関与する遺伝子に突然変異が導入された個体が含まれていることが期待される。今後、EMS 処理による突然変異誘発系統を CO<sub>2</sub> 通気条件下で培養し、増殖速度に異常を来した個体を選抜し、その原因遺伝子同定へと繋げる。将来的には、実用藻類の一種であるユーグレナのバイオマス産生能力を高める新技術を開発し、低炭素・循環型社会の実現に貢献したい。

### 4. 研究発表

日本農芸化学会にて発表を予定。