

京都大学大学院生命科学研究所 梶川 昌 孝

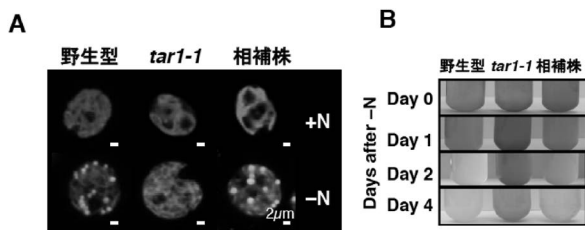
藻類での有用脂質生産と脂質蓄積制御因子の同定

はじめに

多くの藻類は窒素欠乏に応答して脂質・デンプンを高蓄積するが、栄養欠乏は藻類の生育を停止させる。良好な生育と高い生産性を両立させるために脂質・デンプン蓄積の分子機構を理解し制御する必要がある。しかし脂質・デンプン蓄積誘導の分子機構の全体像の解明には至っていない。筆者はモデル緑藻のクラミドモナスを用いて脂質蓄積異常変異体の探索と原因遺伝子の解析によりその分子機構の解明を進めた。また藻類はその高い光合成能や増殖能を活用した有用物質生産の場としても注目されている。そこで脂質蓄積制御因子の研究と並行し、藻類での代謝工学による有用物質生産の可能性を探るため、実用珪藻ツノケイソウを用いた有用脂肪酸リシノール酸の生産、ならびにクラミドモナスのスクアレノ生合成経路の改変を行った。以下に各研究の概略を記す。

1. 緑藻の窒素欠乏時の脂質蓄積制御因子 *TAR1* の解析

緑藻クラミドモナスの脂質蓄積異常変異体を解析し、栄養欠乏応答の鍵となる制御因子 *TAR1* を見出した (図1)¹⁾。 *TAR1* 遺伝子は *DYRK* ファミリーの *Yak1* サブファミリーに属するタンパク質リン酸化酵素をコードしており、光混合栄養条件において窒素や硫黄の欠乏に応答してクロロフィル分解と光合成活性を低下させ、培地中の酢酸からの脂質の生合成と蓄積を正に制御する因子であった。 *Yak1* サブファミリーは植物・藻類・菌類に広く保存されているが、実験開始当時、酵母 *Yak1* 以外の機能は不明であった。次世代シーケンスを用いた RNAseq による網羅的遺伝子発現解析から、葉緑体タンパク質の品質管理に関わる *VIPPI* 遺伝子やクロロフィル生合成に関与する複数の遺伝子発現が変異体で上昇していることが示された。これは藻類の栄養欠乏応答と遺伝子発現制御にタンパク質リン酸化酵素が重要な役割を担うことを示した最初の事例であるとともに、他の藻類においても *TAR1* オーソログ遺伝子が脂質蓄積量を増大するための育種ターゲットとなる可能性を示唆する。

図1. クラミドモナスの脂質蓄積異常変異体 *tar1-1* 株

A. 光混合栄養・窒素欠乏 (-N) 条件で2日間、*tar1-1* 変異体、野生株、相補株を培養し、BODIPYで油滴を染色した。*tar1-1* 変異体はTAGを蓄積できず油滴が発達しない一方、野生型および相補株ではTAGを含む油滴が発達した。B. *tar1-1* 変異体のステイグリーン表現型。

2. 分子育種による藻類をプラットフォームとした有用脂質生産

2-1. ツノケイソウでのリシノール酸生産

水酸化脂肪酸のリシノール酸は鎮痛剤や抗炎症剤といった医薬品や携帯電話等に用いられる機能性プラスチック、ならびに自動車エンジンの潤滑油の原料として利用されている。現在、リシノール酸はトウゴマの種子油から精製されているが、原料のトウゴマの種子は毒性物質をもつ点、海外からの種子の供給量が低下していること等の問題があり、他生物を用いた代替生産方法の確立が求められている。リシノール酸の代替生産を行う候補としてツノケイソウに着目した。ツノケイソウは牡蠣やウニの養殖で餌として利用されており中性脂質を高蓄積する性質をもつ (図2A)。筆者らの共同研究グループにより、高効率な外来遺伝子の導入が可能となった。そこで、麦角菌由来のリシノール酸生合成酵素 (脂肪酸水酸化酵素) 遺伝子 *CpFAH* を導入した形質転換体を作成し、ツノケイソウでのリシノール酸生産を試みた²⁾。 *CpFAH* 発現株の中で最もリシノール酸を生産した *Cp4* 株を用いて、生育可能な15°Cから25°Cまでの範囲で蓄積量が最大となる温度を調べた結果、最も低温の15°Cで培養7日目に細胞あたり2.2 pg蓄積した (図2B)。これは全ての脂質を構成する脂肪酸の8.8%に相当する。リシノール酸は内在性の脂肪酸であるオレイン酸 (炭素鎖18) から生合成されるが、ツノケイソウの脂質はオレイン酸よりも鎖長の短いパルミチン酸 (炭素鎖16) をより多く含む。そこでパルミチン酸を炭素鎖18の脂肪酸に変換してオレイン酸の供給量を増やすために、糸状菌由来のパルミチン酸特異的な鎖長延長酵素遺伝子 *MALCE1* を *Cp4* 株に導入した。その結果、リシノール酸の含有量は1.5倍多くなり細胞あたり3.3 pg、全脂質の12%にまで増加した。一方パルミチン酸は60%減少し、脂肪酸代謝のフラックスを変えることに成功した。 *Cp4* 株はどの生育温度においても野生型と同様に生育する。一方、酵母に *CpFAH* を発現させた先行研究では細胞内のリシノール酸は細胞増殖を顕著に阻害し、分子内の水酸基に細胞毒性があることが示唆された。ツノケイソウではこの毒性を回避する仕組みがあると予想し、

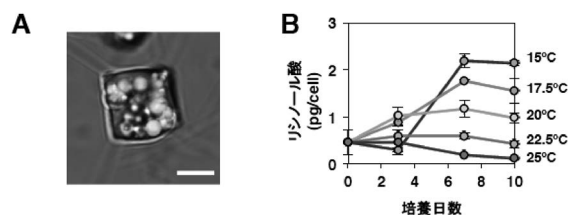


図2. リシノール酸を蓄積するツノケイソウ株の作出

A. 培養7日目のリシノール酸生産株 *Cp4* の細胞観察像。BODIPYで油滴を染色した。バーは5 μm。
B. *Cp4* 株における温度依存的なリシノール酸の蓄積。15°Cで最も多くのリシノール酸を蓄積した。

Cp4株のリシノール酸を含む脂質の構造を決定した結果、細胞内のリシノール酸の約70%が分子内の水酸基に他の脂肪酸が新たに1分子結合したエストライド構造をもつ脂質(図3)として蓄積することが判明した。また培地中にリシノール酸メチルを添加して野生型ツノケイソウを生育させた場合にも、細胞内に取り込まれたリシノール酸は速やかにエストライドに変換されて蓄積することがわかった。以上の結果からツノケイソウは水酸基を持つリシノール酸をエストライドに変換する仕組みを持ち、分子内の水酸基を他の脂肪酸でマスクすることで細胞毒性を回避していることが示唆された。

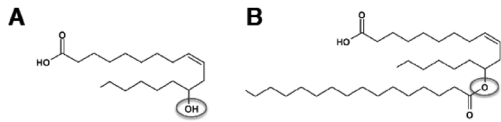


図3. リシノール酸とエストライド
リシノール酸(A)の水酸基に他の脂肪酸のカルボキシル基がエステル結合することでエストライド(B)となる。

2-2. クラミドモナスでのスクアレン代謝経路の改変

スクアレンは化粧品や医薬品原料となるがサメ肝油を主な原料として供給されており、持続的な代替供給源の創出が課題である。そこで藻類でのスクアレン生産に向けて、スクアレン量の増大に寄与する可能性のある遺伝子を、クラミドモナスでのスクアレン代謝経路の改変により検証した³⁾。スクアレンはクラミドモナスにおいてステロール生合成の中間生成物であるため細胞内に蓄積しない。そこでクラミドモナスのスクアレン蓄積量を増大させるために、スクアレンを2,3-オキシドスクアレンに変換するスクアレンエポキシダーゼ *CrSQE* 遺伝子の発現抑制体を作出したところ、細胞乾燥重量 (mg) あたり 1.1 μg のスクアレンが蓄積した(図4)。またエルゴステロールを生育に要求する酵母のスクアレンエポキシダーゼ遺伝子変異体に、*CrSQE* 遺伝子をヘテロ発現させるとその表現型を回復したことから、*CrSQE* が機能的なスクアレンエポキシダーゼをコードすることが示された。一方で、スクアレン合成を担うスクアレンシンターゼ *CrSQS* 遺伝子についても、組換え *CrSQS* タンパク質がスクアレン合成酵素活性を有することを確認した上で、過剰発現するクラミドモナス形質転換体を作出したが、スクアレン量の増大は見られなかった。さらに *CrSQE* 発現抑制と *CrSQS* 過剰発現を同時に起こす形質転換体を構築したが、スクアレン蓄積量は *CrSQE* 発現抑制体における蓄積量と変わらなかった。以上の結果から、少なくとも *CrSQE* 遺伝子は藻類にスクアレンを高蓄積させるための育種ターゲットになりうると思われる。

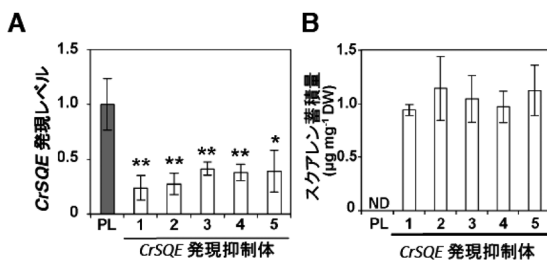


図4. スクアレン蓄積量が増大した *CrSQE* 発現抑制体
5株の *CrSQE* 発現抑制体の *CrSQE* 遺伝子の発現レベル (A) と細胞乾燥重量あたりのスクアレン蓄積量 (B)。PL: 形質転換に用いた親株。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

おわりに

本研究により、藻類の栄養欠乏下での光合成活性と代謝変動にタンパク質リン酸化酵素が重要な働きをすることが明らかになった。現在、TAR1によってリン酸化制御を受けることが予想される新奇因子について変異体解析に基づく機能解析を進めており、TAR1を起点としたタンパク質リン酸化の制御機構の全容解明につながると期待される。またツノケイソウのリシノール酸生産株の解析から、ツノケイソウがリシノール酸をエストライドTAGへ変換する代謝経路を持つことを明らかにした。この変換反応を担う酵素を同定できれば、ツノケイソウでの生産性の強化に加えて、酵母など他の微生物でのRAの細胞毒性を回避したエストライドTAGの生産につながると期待される。今後も藻類の栄養欠乏への応答機構と藻類での有用物質生産という基礎と応用の両面に貢献する研究を進めていきたい。

(引用文献)

- 1) M. Kajikawa, Y. Sawaragi, H. Shinkawa, T. Yamano, A. Ando, M. Kato, M. Hirono, N. Sato & H. Fukuzawa: *Plant Physiol.*, **168**, 752-764 (2015)
- 2) M. Kajikawa, T. Abe, K. Ifuku, K. Furutani, D. Yan, T. Okuda, A. Ando, S. Kishino, J. Ogawa & H. Fukuzawa: *Sci. Rep.*, **6**, 36809 (2016)
- 3) M. Kajikawa, S. Kinohira, A. Ando, M. Shimoyama, M. Kato & H. Fukuzawa: *PLoS ONE*, **10**(3), e0120446 (2015)

謝辞 本研究は、京都大学大学院生命科学研究科微生物細胞機構学分野において実施されたものです。この研究の機会を与えていただくとともに、日々ご指導、ご支援を賜りました福澤秀哉教授に心より御礼申し上げます。京都大学大学院農学研究科教授・小川順先生、お茶の水女子大学基幹研究院教授・加藤美砂子先生、京都大学大学院生命科学研究科助教・伊福健太郎先生、東京大学大学院総合文化研究科教授・佐藤直樹先生、法政大学生命科学部教授・廣野雅文先生との共同研究によって本課題が推進されましたことに御礼申し上げます。また本研究を支えてくださいました研究室のスタッフならびに共に研究を行ってきた在学生の皆様、修了生の皆様に感謝いたします。大学院在籍時よりご指導、多くのご助言を賜りました京都大学名誉教授・故大山莞爾先生ならびに京都大学大学院生命科学研究科教授・河内孝之先生に感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関西支部長・河田照雄先生(京都大学大学院農学研究科教授)ならびにご支援くださいました先生方に厚く御礼申し上げます。