

研究報告書

「真核藻類のトリグリセリド代謝工学に関する基盤技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究者: 中村 友輝

1. 研究のねらい

真核藻類は、その高い脂質備蓄能力から、バイオディーゼルの原料となるトリグリセリド (TAG) 生産の材料として注目されている。これまでの研究から、真核藻類は種間で脂質組成の多様性が大きいことや、ある種の真核藻類では特に高い脂質蓄積が見られることなどが分かっている。また窒素欠乏などのストレスがクラミドモナス等の真核藻類において TAG 蓄積の増大をもたらすことなどが分かっている。しかしこうした一過的なストレス条件は、細胞の増殖を妨げ脂質収量の減少をもたらすことや、条件の管理に困難が伴うことなどから、バイオエネルギー創成への応用に向けた課題は少なくない。近年、クラミドモナスにおけるゲノムの解読が完了し、これまで困難とされてきた形質転換系等の遺伝学的ツールも急速に確立しつつある。また、これに伴い真核藻類における脂質代謝の分子生物学的知見も徐々に得られつつある。こうした現状から、真核藻類の TAG 代謝を分子レベルで研究する基盤は今やようやく整いつつあると言える。クラミドモナス等の真核藻類では、生化学、細胞生物学に加えて今や分子遺伝学的アプローチも可能で、さらに脂質備蓄能力に優れるため、脂質代謝学の研究には特に格好の材料といえる。しかもそれらの基礎的理解は昨今高まりつつある藻類でのバイオエネルギー創成に貢献する点で、研究の意義も一段と大きい。

以上の経緯から、本研究は真核藻類のモデル生物であるクラミドモナスにおいて TAG 代謝のメカニズムを分子レベルで包括的に理解し、その知見を踏まえて代謝スイッチング、人工マイクロ RNA やリピドミクス等の革新技术を組み合わせ、TAG の量および質を自在に改変する代謝工学の基盤を創出することを目指した。まず、順遺伝学的アプローチによる変異体の網羅的スクリーニングと逆遺伝学的アプローチによる候補遺伝子のノックアウトにより、クラミドモナスが油脂をどのように合成・備蓄しているかを、分子レベルで明らかにすることを目指した。次に、その知見をもとに、独自の「代謝スイッチング」や分子デザイン、リピドミクスなどの先端技術と確立された分子生物学、生化学的解析法を駆使して、任意の質と量をもつ油脂を自在に生産する技術の確立を目標とした。さらには、こうした脂質代謝改変技術が植物など他のモデル光合成生物でも適用できるか検討した。

2. 研究成果

(1) 概要

まず、クラミドモナスにおける脂質合成酵素遺伝子等の網羅的スクリーニングから、TAG 合成酵素であるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)をコードすると考えられる機能未知の遺伝子ファミリーを単離した。酵母の TAG 合成欠損株における発現解析から、このうち DGTT2 と呼ばれる遺伝子は野生株酵母の 10 倍近い量の TAG を蓄積できるこ

とがわかった(原著論文1)。次に、酵母の脂質代謝を改変することで、培養条件により乾燥菌体重量の 50%–150%にあたる多量の油脂を生産する方法を作り出した(論文投稿中)。さらに、こうした脂質代謝改変技術を植物に適用した。植物の組織のうち花が脂質の合成、備蓄に優れていることを明らかにし(原著論文2)、組織特異的な脂質代謝改変技術により花芽の一部で脂質代謝を改変し、開花時期を制御することに成功した(原著論文3)。

(2) 詳細

研究テーマ A:「藻類油脂合成酵素群の単離」

真核微細藻類のモデルであるクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)から、TAG 合成酵素であるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)をコードすると考えられる機能未知の遺伝子を網羅的に単離した。遺伝子配列解析の結果、クラミドモナスは I 型 DGAT を1つ(DGAT1)、II 型 DGAT を5つ(DGTT1-5)もつことがわかり、種子植物や動物、酵母などに比べて多数の II 型候補遺伝子をもつことがわかった。

研究テーマ B:「酵母での藻類油脂合成系の構築」

ポリメラーゼ連鎖反応によりクラミドモナスのジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ候補遺伝子の各々を増幅した。これらを、TAG 合成を欠損した出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の変異体 $\Delta dga1 \Delta o1$ に導入して酵素タンパク質発現させることで、酵母の中で TAG の生産を回復することができるかを調べた。その結果、DGTT2を導入すると、酵母が通常の約 10 倍に近い量の油脂を生産することがわかった。蓄積した油脂の組成分析を行ったところ、DGTT2 が生産した油脂は酵母の野生株が生産する油脂と同じ品質を持つことがわかった。

研究テーマ C:「代謝スイッチング法による藻類油脂大量生産技術基盤の構築」

DGTT2 の形質転換による酵母での油脂生産量をさらに向上させるため、酵母の脂質代謝を人為的に改変した。油脂合成と細胞膜を構成する膜脂質の合成は共通の前駆体に由来しているため、まず膜脂質生合成の鍵酵素の機能を欠損させ、代謝の流れを油脂合成に転換した。さらに、この代謝の逆反応を触媒する酵素を欠損させ、油脂生産の前駆体となる物質であるジアシルグリセロールが蓄積しやすいようにした。その結果、培養条件により乾燥菌体重量の 50%–150%にあたる多量の油脂が生産できるようになった。この酵母は野生株と比べて生育速度が約半分に減少し、細胞が肥大化を起こして内部に大量の脂質滴を蓄積していることがわかった。

研究テーマ D:「脂質代謝改変技術の植物への応用—脂質改変による開花制御」

多細胞生物である植物は細胞や組織の分化が進んでおり、脂質代謝改変は酵母や緑藻に比べ、より複雑になると考えられる。しかしながら、植物で脂質代謝改変を行うことは有用物質生産や炭素固定能の向上に資する。そこで、シロイヌナズナを材料とし、脂質備蓄能の高い花器官に特異的な脂質代謝改変技術を開発することを目指した。花における脂質の機能は不明な点が多いが、我々は、開花制御を司るフロリゲンタンパク質が脂質結合性モチーフを持っていることに着目し、脂質の変化がフロリゲン—脂質の結合を介して開花制御に関与するという仮説を立てた。まず、フロリゲンが脂質分子に結合するかどうかを、種々の脂質分子種について調べたところ、リン脂質 phosphatidylcholine(PC)に特異的に結合することがわ

かった。そこで、花芽のうちフロリゲンが作用する部位でのみ脂質代謝改変を行い PC 量を増加させると花は早咲きになり、逆に減少させると花は遅咲きになった。この影響はフロリゲンを欠損すると顕著にみられなくなった。さらに、PC 分子種は昼夜で変動していることがわかり、不飽和度の高い夜の分子種は飽和度の高い昼の分子種と比べてフロリゲンとの結合が弱いことがわかった。そこで、脂質代謝改変を行い日中に夜の分子種を増加させると花は遅咲きになった。以上の結果から、フロリゲンは日周変動を示す PC と結合することにより開花時期を制御していることが明らかとなった。

3. 今後の展開

本研究から、クラミドモナスの油脂合成酵素遺伝子が油脂蓄積に優れた機能性をもつことが世界に先駆けて明らかとなった。また、ほぼ同時期にアメリカの研究グループにより、DGTT2 がシロイヌナズナの葉においても大量の油脂を蓄積させることが独立に発見された。今後、こうした機能性に優れた藻類の遺伝子リソースを整備することで、これらの特性を生かした新たな代謝工学的手法の確立と、革新的な有用物質生産技術の開発が国際的に期待される。

また、本研究で開発を進めた代謝改変技術は高等植物でも適用できることが分かった。特に、脂質とフロリゲンが相互作用し、脂質の改変により開花時期を変えることができたことは基礎研究と応用の両面で画期的な発見であり、こうした知見をもとに脂質改変から開花を制御する技術が花き産業や有用作物の分子育種、また有用物質やバイオエネルギーの生産に貢献することが期待できる。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究により、クラミドモナスに存在する油脂合成酵素が網羅的に単離された。これらのうち、DGTT2 が油脂合成における機能に優れていることがわかり、遺伝子形質転換技術を用いて酵母に多量の油脂を蓄積させることが可能となった。藻類由来遺伝子のこうした高い機能性は、なぜ藻類が油脂生産にすぐれるのかを明らかにするための重要な知見となるとともに、藻類由来遺伝子を用いた有用物質技術を構築するための新たな手掛かりとなる。

代謝改変の方法論は多細胞生物である高等植物でも適用することができ、脂質—フロリゲンの結合を基軸とした開花制御の新たなモデルと、脂質改変により開花時期を制御する技術開発の可能性が提示できた。このことは基礎と応用の両面で重要な知見であるといえる。

藻類での応用については、遺伝子改変技術の開発が他のモデル生物に比べて遅れていることや種間での多様性が大きいことなどもあり、技術開発の上でまだ課題が多く残されている。今後、引き続きこの点に取り組み、種々の藻類で油脂が高生産できる技術基盤の確立を目指したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

バイオディーゼルの原料となる油脂トリグリセリドを、藻類を用いて大量生産する新技術の開発を目指した研究を行っている。真核微細藻類のモデルであるクラミドモナスから、油脂合成関連酵素を網羅的に単離し、藻類が油脂生産にすぐれるのかを明らかにするための

重要な知見を得た。酵母での藻類油脂合成系の構築藻類由来遺伝子を用いた有用物質技術として酵母での藻類油脂合成系を構築するなど、独創的な研究で発展性が期待される。また、論文などの業績においても満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、国際的視野に立って、藻類、酵母及び植物など幅広い分野で、豊かな感性と豊富なアイデアを活かした研究を推進することを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Chun-Hsien Hung, Ming-Yang Ho, Kazue Kanehara and Yuki Nakamura. Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* (2013) 587(15):2364–2370.
2. Yuki Nakamura, Fernando Andres, Kazue Kanehara, Yu-chi Liu, Peter Dörmann and George Coupland. Arabidopsis florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. *Nature Communications* (2014) in press
3. Yuki Nakamura, Norman Z. W. Teo, Guanghou Shui, Christine H.L. Chua, Wei-Fun Cheong, Sriram Parameswaran, Ryota Koizumi, Hiroyuki Ohta, Markus R. Wenk, and Toshiro Ito. Transcriptomic and lipidomic profiles of glycerolipids during Arabidopsis flower development. *New Phytologist* (2014) in press

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著作物

- Nakamura Y*. (2013) NPC: non-specific phospholipase Cs in plant functions. In "Phospholipases in Plant Signaling (Wang, X ed)" Springer-Verlag Berlin Heidelberg, in press
- Nakamura Y*. (2013) Galactolipid biosynthesis in flowers. *Botanical Studies*, 54:29.
- Nakamura Y*. Assaying Plant Phosphatidic Acid Phosphatase Activity. In "Plant Lipid Signaling Protocols (Munnik T and Heilmann I, eds)" *Methods in Molecular Biology* 1009:233–240, Springer, 2013
- Nakamura Y*. (2013) Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog Lipid Res* 52:43–50.

国際学会招待講演

- Nakamura Y. Lipid metabolic switching to alter lipid levels in algae and plants. 4th International Singapore Lipid Symposium (Singapore, 2012年3月)
- Nakamura Y. Meristem maintenance by phospholipid biosynthesis. 第28回中華植物学会

- 大会及 2012 Symposium on Innovative Plant Sciences (Taipei, 2012 年 12 月)
- Nakamura Y. Phospholipids function in coordinating reproductive processes. Gordon Research Conferences 2013, Plant Lipids, Metabolism & Function (Galveston, TX, 2013 年 1 月)
 - Nakamura Y. Membrane lipid remodeling in response to phosphate starvation. 1st International Symposium on Root Systems Biology (Taipei, 2013 年 9 月)

プレスリリース

「脂質が開花時期を制御することを発見」(仮題) プレス発表準備中