

ユーグレノイドによる海水利用型 CO₂ 資源化を目指した研究

中澤 昌美¹, 柏山 祐一郎²

¹ 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科, ² 福井工業大学

概要 微細藻類は、植物に比べ面積当たりの脂質収量が多く、CO₂ 固定能も高いため、バイオ燃料生産宿主として期待されている。微細藻類の培養には大量の水が必要なため、海水を利用したバイオ燃料生産が望まれる。淡水産の *Euglena gracilis* は、耐塩性が海水の 1/3 程度であるため、海水を用いた培養には不適である。本研究では、脂質生産能を有する海産ユーグレノイドを探索し、*Eutreptiella* sp. NIES-2325 株 (NIES2325) が低酸素下でワックスエステル (WE) を生産することを見出した。さらに、NIES2325 の脂質合成系を解析した。

NIES2325 を低酸素処理した結果、パラミロン量減少と WE (炭素長は主に 26 - 28) の生産がみられた。分解されたパラミロンと生成 WE の量から換算した、パラミロン→WE 変換率は約 7% であった。この値は、独立栄養条件の *E. gracilis* における変換率 25% よりも低かった。

ピルビン酸:NADP⁺酸化還元酵素 (PNO) は、*E. gracilis* における WE 合成系への唯一のアセチル-CoA 供給源である。本研究では、低酸素曝露前後の粗細胞抽出物を用いて、NIES2325 の PNO 活性を測定した。その結果、低酸素曝露により PNO 比活性は約 6 倍に上昇した。NIES2325 において PNO が低酸素条件下での代謝に重要な機能を有することが示唆された。

NIES2325 における PNO の 2 つのアイソザイムの生理機能を解析するために、RNAi による遺伝子サイレンシング法を開発した。二本鎖 RNA をエレクトロポレーション法により NIES2325 に導入した。mRNA 発現量を半定量 RT-PCR によりコントロール細胞と比較したところ、各 mRNA の発現抑制に成功したことが明らかとなった。さらに、ノックダウン細胞では、低酸素下での WE 産生量が減少していた。これらの結果から、NIES2325 の 2 つの PNO アイソザイムは低酸素下での WE 生産におけるアセチル-CoA の供給に関与している可能性が示唆された。一方で、本株での遺伝子ノックダウンは発現抑制の期間が短いことが明らかとなったため、遺伝子ノックアウトの技術開発や、そのために必要なゲノム、トランスクリプトームデータの解析も進める必要があると判断した。

1. 研究目的

近年、化石燃料の枯渇や、大気中二酸化炭素濃度上昇による気候変動への対策が全世界的な課題であり、環境負荷の少ない新たなエネルギーの開発が急務となっている。その代替エネルギーの一つとして、動植物資源などのバイオマスから生産されるバイオ燃料が注目されている。その中でも光合成生物を原料とするバイオ燃料は、光合成時に吸収した二酸化炭素を燃焼時に排出するとみなされるため、カーボンニュートラルと位置づけられている。例

として、トウモロコシやサトウキビなどの可食部を糖源としたバイオエタノール (主にアメリカやブラジル)、植物油を原料としたバイオディーゼル燃料 (主に EU) 等がある。しかし、これらは食糧との競合による価格の高騰や、耕地拡大のための森林伐採や環境汚染等の問題を引き起こしている。また、天候不順や自然災害による影響を受けやすいため、安定供給という課題もある。

そこで、植物とは異なる特性を有する光合成生物として、微細藻類を用いたバイオ燃料生産に注目が寄せられて

いる。微細藻類には、高い光合成能をもち、栄養欠乏などのストレス条件下で中性脂質やトリグリセリドなどの油脂を生産する種が多く存在する⁽¹⁾。加えて食糧と競合しないこと、陸上作物よりも単位面積当たりのエネルギー収量が高いことが利点として挙げられ、次世代の再生可能エネルギーの生産系として期待されている⁽²⁾。しかし、燃料生産のコストが高いことや、屋外大量培養条件下での安定した脂質生産が難しい等の問題も存在し、広く実用化されるには至っていない。これらの問題の解決に向け、培養コストの低減や脂質生産向上、安定生産に向けた技術開発が進められている。

本研究グループでは、淡水に生育する *Euglena gracilis* (ユーグレナ) に注目して、バイオ燃料生産に関する研究を行ってきた⁽³⁾。ユーグレナは光合成を行うことで独立栄養的に生育でき、かつ鞭毛による運動能力を有するため、動物界と植物界の双方に分類される原生動物である。好気条件下においては大気中の二酸化炭素を固定し、 β -1,3-グルカンのパラミロンを貯蔵する。低酸素条件下においては、パラミロンを分解し、それをもとにバイオ燃料の原料となるワックスエステルを生産することが可能である。これはユーグレナにのみ知られてきた非常にユニークな代謝系である。ユーグレナワックスエステルの構成成分は主に短鎖の脂肪酸および脂肪アルコールであるため、低融点のバイオディーゼル燃料としての適性があるとともに、水素化異性化反応を行うことでジェット燃料へも利用可能である。これらの背景から、ユーグレナワックスエステルのバイオ燃料としての実用化に向けた商業生産の取り組みも行われている。

ユーグレナを含め、淡水に生息する微細藻類の培養には大量の淡水が必要であるが、淡水は地球上に存在する水全体の 3.5% であり、そのうちの多くは氷山や地下水として存在するため、大変貴重な資源である。一方、海水は地球上に広く存在するため、資源確保の観点からも海水を利用したバイオ燃料生産が望まれている。淡水種であるユーグレナは海水の 1/3 程度の塩濃度まででしか生存できないため、海水を利用した大量培養には不適である。そこで、本研究では海域に生息するユーグレナの近縁種に着目した。海産ユーグレノイド *Eutreptiella* 属(ユートレプチエラ)は、栄養価の高い海洋沿岸または汽水域に生息する赤潮を引き起こす鞭毛藻の 1 種であり、現在 18S

rDNA 配列をもとに現在 3 つのクレードに分類されている。本研究を開始するにあたり、予備検討としてカルチャーコレクションに保存されているユートレプチエラ 6 種について、バイオ燃料生産能をもつ株のスクリーニングを行ったところ、クレード I に属する *Eutreptiella* sp. NIES-2325 株(以下 NIES2325)において、ユーグレナと同様に、低酸素処理によりワックスエステルを生産することを世界で初めて見出した。このようなユニークな生理的特徴があるにも関わらず、ユートレプチエラを用いた生化学的研究は世界でも全く報告がない。本生物の代謝に関する知見を深めることは、海産ユーグレノイドであるユートレプチエラのバイオマス資源としての可能性を広げることにも繋がる。そこで、まず NIES2325 における低酸素下代謝の詳細の解明を目指した。

次に、NIES2325 の低酸素下代謝の解析を進めるにあたり、ユーグレナにおけるワックスエステル合成の必須酵素である pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase (PNO) に着目した。PNO は、NADP⁺ を電子受容体としてピルビン酸からアセチル-CoA への変換反応を触媒する酵素であり、ユーグレナには 1 種類のみ存在している。予備検討において、NIES2325 から PNO 遺伝子のクローニングを行った結果、ユーグレナ PNO と 72% のアミノ酸配列相同性を示し、推定活性部位残基を全て有する酵素遺伝子として PNO1 を見出した。さらに、公共データベースに公開された、NIES2325 と同じクレード I に属する *Eutreptiella* sp. CCMP 1594 株のトランスクリプトームデータを解析した結果、NIES2325 PNO1 とは遺伝的背景が異なり、ユーグレナ PNO と約 40% のアミノ酸配列相同性をもつ PNO アイソザイム(PNO2) が存在することが明らかとなった。そこで、本研究では NIES2325 PNO2 遺伝子をクローニングし、PNO1 および PNO2 のバイオ燃料生産における役割を明らかにすることを目指した。具体的には、エレクトロポレーション法を用いた RNA 干渉(RNAi) 法による遺伝子発現ノックダウンにより、NIES2325 における PNO1、PNO2 遺伝子の発現抑制による影響の解析を行った。

2. 研究方法

2.1 実験生物および培養方法

スクリーニングには、ユートレプチエラの 3 つの分類群のうち、クレード I から *Eutreptiella* sp. CCMP 1594 株と *Eutreptiella* sp. NIES2325 株、クレード II から *Eutreptiella*

gymnastica DB06 株と *Eutreptiella gymnastica* NIES 381 株, クレード III から *Eutreptiella eupharyngea* DB14 株と *Eutreptiella eupharyngea* OS18 株を使用した。脂質の生成が確認された *Eutreptiella* sp. NIES-2325 株 (NIES2325) については, 以下のように実験を進めた。天然海水をベースとした独立栄養培地である ESM 培地を用い, 20°C, 15 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 明期 14 時間暗期 10 時間の条件で培養した。低酸素処理は, 50 ml 容遠心管に細胞を移し, アルゴンガスで 5 分間バブリングした後, 密栓し, 遮光・巡回して行った。

2. 2 タンパク質の抽出

NIES2325 培養液約 15 ml から細胞を回収した。回収した細胞に破砕用バッファー 100 μl を添加し, ハンディソニック (TOMY SEIKO model UR-20P) を用いてアルゴンガスを吹き付けながら氷上で超音波破砕した。破砕は出力 8 で 15 秒 \times 3 回行った。その後, 遠心分離 (17700 \times g, 4°C, 10 min) し, 上清を回収した。この分離操作を 4 回繰り返し, 上清をタンパク質サンプルとして用いた。

《破砕用バッファー》

25 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 20% エチレングリコール, 10 mM チオ硫酸ナトリウム, 1 mM ジチオスレイトール, 1 mM 塩化マグネシウム, 1 mM PMSE, 0.1 mM チアミンピロリン酸, 50 mM 2-メルカプトエタノール

2. 3 PNO 活性測定

NIES2325 培養液約 45 ml から細胞を回収した。PNO 活性測定は Inui らの方法⁽⁴⁾に従って, PNO の反応により生成した NADPH 量を 340 nm の吸光度変化を測定することで求めた。

2. 4 細胞内ワックスエステルの抽出・測定

Nakazawa らの方法⁽⁵⁾に従って, Bligh-Dyer 法による脂質抽出およびガスクロマトグラフィーによる定量を行った。定常期に達した NIES2325 培養液 9 mL を 15 mL 容ファルコンチューブに移し, アルゴンガスを培養液中に吹き込み, その後気相をアルゴンガスで満たした。パラフィルムを巻き密封した後, 光合成による酸素発生を防ぐためにアルミホイルで遮光し, 20°C で静置して 24 時間低酸素状態に曝露した。ガスクロマトグラフィーは GC-2014 (島津製作所) を用い, 2.5% Thermon-3000 カラムで 240°C の恒温分析により測定した。検出は FID により行った。スタ

ンダードには既知濃度の C14:0-C14:0Alc (Larodan) を用い, 外部標準法により濃度を決定した。

2. 5 細胞内パラミロン量の抽出・測定

Yokota らの方法⁽⁶⁾を一部改変し, 細胞からワックスエステルを抽出した残渣の沈殿物からパラミロンを抽出した。全糖量の測定はフェノール硫酸法により行い, 既知濃度のグルコース水溶液をスタンダードとして用いた。パラミロン量は脱水縮合を考慮してモノマー分子量を 162 として求めた。

2. 6 RNA 抽出

RNA 抽出は ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて行った。試薬は原則として RNase free のものを用い, 水は DEPC 処理水 (ナカライテスク) を使用した。

2. 7 二本鎖 RNA の調製

T7 配列付加 cDNA 断片を調製し, MEGAscript® RNAi Kit (Thermo) を用いて, 目的酵素遺伝子に対応する二本鎖 RNA を作製した。

2. 8 エレクトロポレーション法による二本鎖 RNA の導入

二本鎖 RNA 30 μg 分を検討済みバッファー (未発表のため, 詳細は割愛) に懸濁後の細胞に混合した。この溶液をキュベットに入れて, BTM Electro Cell Manipulator ECM630 を用いて電気パルスを印加した。導入後, 直ちに細胞懸濁液を ESM 培地 15 mL に接種し, 活性酸素による損傷を防ぐために遮光下 20°C で 1 日間静置培養を行った後, 光照射下での静置培養を行った。

2. 9 逆転写反応

RNA を抽出後, PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いて cDNA を調製した。

2. 10 半定量 PCR

上記の cDNA 溶液を鋳型として, GoTaq® Green master mix (Promega) を用いて半定量 RT-PCR を行い, PNO1, PNO2 mRNA 発現量を解析した。プライマーは目的遺伝子領域内で約 500 bp の cDNA 断片が増幅されるように設計した。内部標準コントロールとして α -チューブリンを用いた。

3. 研究結果

3. 1 PNO 活性

PNO は, ユーグレナのワックスエステル合成系において基質となるアセチル-CoA を供給する唯一の酵素である

と考えられている⁽⁷⁾。そこで、NIES2325 が PNO 活性を有しているかを粗酵素液を用いて調べた。

好気条件で培養した NIES2325 において、わずかではあるが PNO 活性がみられた。そして低酸素曝露を行うことにより PNO 活性が約 6 倍上昇した。この結果より、NIES2325 においても PNO は好気下よりも低酸素下の代謝で重要な機能を有することが示唆された(表1)。

3. 2 低酸素曝露による細胞内パラミロン量の変化

好気条件で培養した細胞と、24 時間低酸素曝露を行った細胞からパラミロンを抽出し、フェノール硫酸法にて定量を行った(図 1)。その結果、低酸素曝露により細胞内パラミロンが有意に減少した。よって、NIES2325 は低酸素下代謝の出発基質としてパラミロン分解産物を利用している可能性が示唆された。パラミロンの分解率は 30%であり、この値は別途検討を行った独立栄養で培養したユージェレナでの値 (24%)と比較するとやや高い値であった。

3. 3 細胞内ワックスエステル生産

好気条件で培養した細胞と、24 時間低酸素曝露を行った細胞から脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィーにて定量を行った(図 2)。その結果、低酸素処理を行った細胞から抽出した画分でのみ C26, C28 を主としたワックスエステルの生産が確認された。

表 1 低酸素曝露前後の NIES2325 PNO 活性

	(nmol/min/mg protein)
NIES2325 好気	4.85
NIES2325 低酸素曝露後	28.7

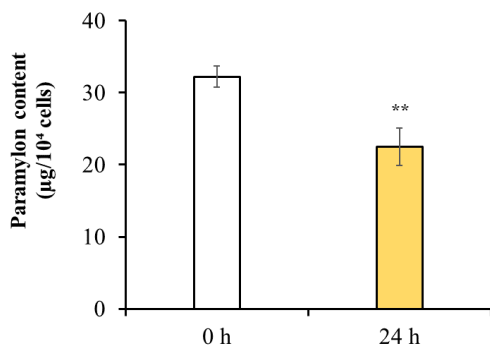
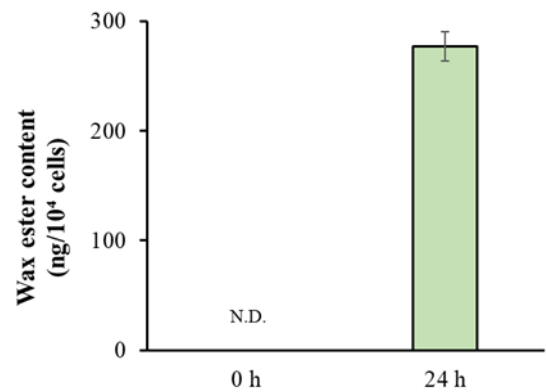


図 1 低酸素曝露前 (0 h) および 24 時間低酸素曝露した際のパラミロン量 1×10^4 細胞あたりの細胞内パラミロン量を示した。(**: $P < 0.01$) (n=3)

(a)



(b)

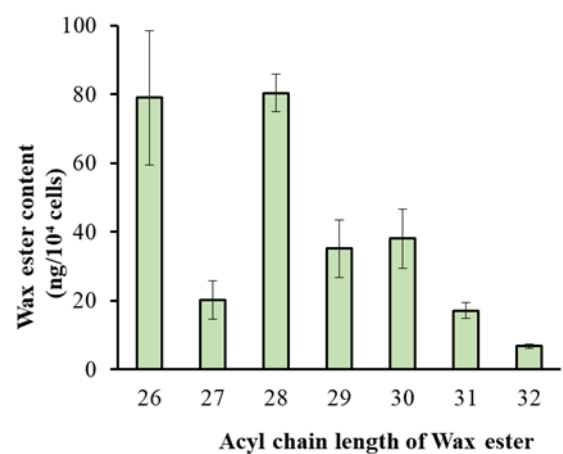


図 2 低酸素曝露によるワックスエステル生産量

1×10^4 細胞あたりの(a)ワックスエステル量, (b) ワックスエステル組成を示した。(N.D.; Not detected) (n=3)

3. 4 mRNA 発現抑制効果の確認

PNO1, PNO2 単独および同時ノックダウンを行った細胞とコントロール細胞を好気状態で 3, 5, 7 日間生育させ、半定量 RT-PCR によって発現抑制効果を調べた(図 3)。3 日目のサンプリングでは、好気状態において、PNO1, PNO2 単独および同時ノックダウンにおいて、それぞれの mRNA 発現抑制を確認した(a)。しかし 5 日目には、PNO2 単独および PNO1, 2 の同時ノックダウンにおいて PNO2 の mRNA に由来する cDNA が僅かに検出され(b), 7 日目には全ての細胞で PNO1, PNO2 の mRNA に由来する cDNA が検出された(c)。

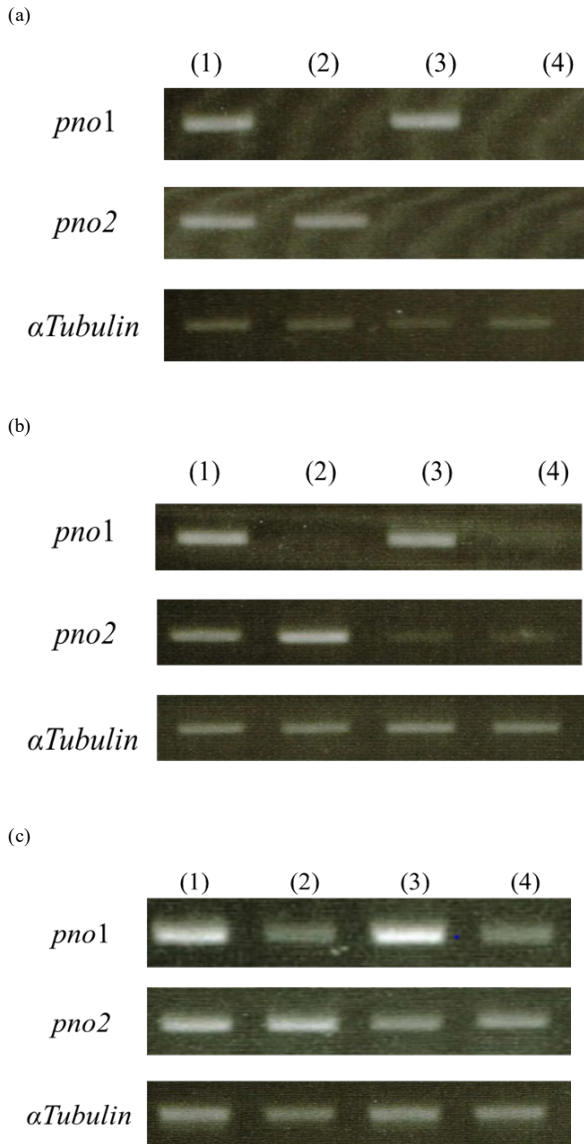


図3 半定量 RT-PCR により調べた各遺伝子の発現量
好気条件下で (a) 3 日間, (b) 5 日間, (c) 7 日間生育させた際の細胞の発現量を示した。((1) : Control, (2) : PNO1 RNAi, (3) : PNO2 RNAi, (4) : PNO1&2 RNAi)

3. 5 ワックスエステル合成への影響

ワックスエステル合成への影響を調べた。PNO1, PNO2 単独および同時ノックダウンを行った細胞とコントロール細胞を好気状態で 3, 5, 7 日間生育させ、24 時間低酸素曝露後のワックスエステル生産量をガスクロマトグラフィーにて測定した(図 4)。

好気培養 3 日目から 24 時間低酸素曝露した細胞におけるワックスエステル生産量を比較すると、ノックダウン細胞ではコントロール細胞の 50~60%程度まで減少した。

PNO1, PNO2 単独ノックダウン時でワックスエステル生産量が減少したことより, PNO1, PNO2 は共に NIES2325 のワックスエステル生産に関与する酵素である可能性が示唆された。

PNO1 と PNO2 の機能分担に関する知見を得るために, 両遺伝子を単独でノックダウンした際と同時にノックダウンした際のワックスエステル生産量を比較したところ, 両者には大きな変化は見られなかった。そのため, 本研究の結果からは PNO1 と PNO2 の機能分担に関して結論付けることはできなかった。

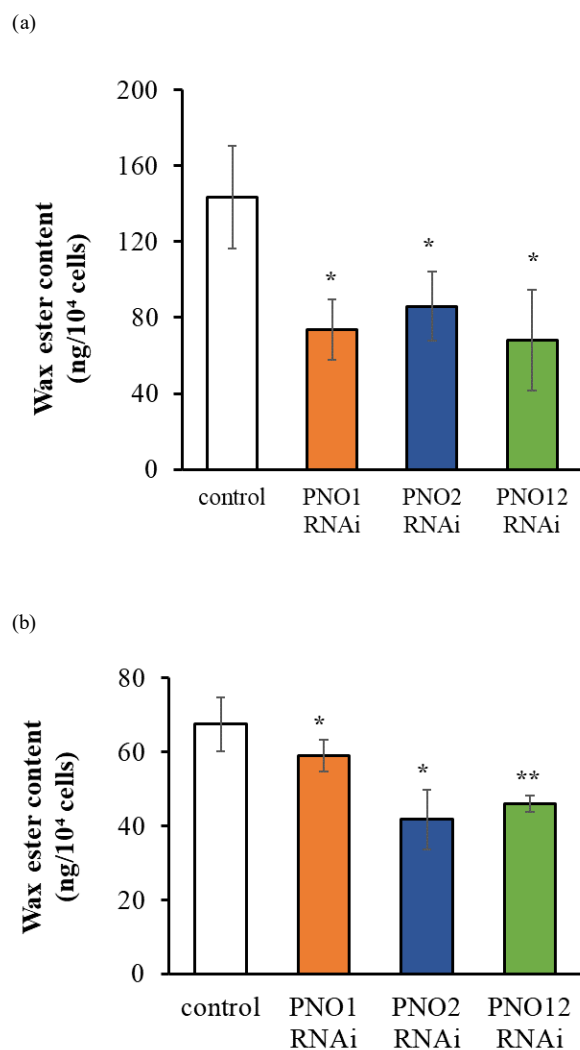


図4 低酸素曝露前後の各発現抑制細胞におけるワックスエステル量

好気条件下で (a) 3 日間, (b) 5 日間生育させた際の細胞の低酸素曝露前後のワックスエステル量を示した。(* : P < 0.05, ** : P < 0.01) (n=3)

4. 考察

4.1 NIES2325におけるパラミロンからワックスエステルへの変換率について

図1と図2の結果を基に低酸素曝露によるパラミロン減少量とワックスエステル生産量を仮想の代謝中間体であるアセチル-CoA のモル数に換算して比較すると、パラミロンからのワックスエステルへの変換率は7.6%であった。これは、別途検証を行った、独立栄養で培養したユーグレナにおける変換率25%と比べて低い値であった。NIES2325は低酸素条件下でパラミロンを分解し、ワックスエステルを生産するとともに他の物質も生産している可能性が示唆された。

4.2 今回開発した遺伝子ノックダウン系の検証

今回開発した手法を用いた遺伝子サイレンシング実験では、培養期間が長くなるにつれノックダウン細胞のmRNA発現量が回復する傾向にあり、短期間のみでしか効果が確認できなかった。今後より詳細な機能解析のため、長期間で安定した発現抑制効果を持続させる条件の検討や、遺伝子ノックアウトの手法を開発することが必要であると考えている。

5. 今後の課題

今回開発した手法を用いた遺伝子サイレンシング実験では、培養期間が長くなるにつれノックダウン細胞のmRNA発現量が回復する傾向にあり、短期間のみでしか効果が確認できなかった。今後より詳細な機能解析のため、長期間で安定した発現抑制効果を持続させる条件の検討が必要になると考えている。本助成研究では、その検討の端緒とすべく、遺伝子ノックアウトの手法を開発について検討をはじめるとともに、開発に必要な遺伝子配列データの取得にも取り組んだ。今後これらを発展させ、NIES2325を「生化学・分子生物学ツールの整った海産微細藻類」として提供していきたい。

6. 文献

1. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 2008;54(4):621-639.
2. Wijffels RH, Barbosa MJ. An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 2010;329(5993):796-799.
3. Inui H, Ishikawa T, Tamoi M. Wax Ester Fermentation and Its Application for Biofuel Production. *Adv Exp Med Biol.* 2017;979:269-283.
4. Inui H, Ono K, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. Purification and characterization of pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem.* 1987;262(19):9130-9135.
5. Nakazawa M, Andoh H, Koyama K, Watanabe Y, Nakai T, Ueda M, Sakamoto T, Inui H, Nakano Y, Miyatake K. Alteration of Wax Ester Content and Composition in *Euglena gracilis* with Gene Silencing of 3-ketoacyl-CoA Thiolase Isozymes. *Lipids.* 2015;50(5):483-492.
6. Yokota A, Hosotani K, Kitaoka S. Mechanism of metabolic regulation in photoassimilation of propionate in *Euglena gracilis* z. *Arch Biochem Biophys.* 1982;213(2):530-537.
7. Nakazawa M, Hayashi R, Takenaka S, Inui H, Ishikawa T, Ueda M, Sakamoto T, Nakano Y, Miyatake K. Physiological functions of pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase and 2-oxoglutarate decarboxylase in *Euglena gracilis* under aerobic and anaerobic conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81(7):1386-1393.

Biofuel Production Concomitant with CO₂ Fixation by Marine Euglenoid, *Eutreptiella* sp.

Masami Nakazawa¹, Yuichiro Kashiya²

¹ Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

² Graduate School of Engineering, Fukui University of Technology

Summary

There are great prospects for microalgae in producing biofuel, which have a higher lipid yield per unit area and higher CO₂ fixation capacity than higher plants. Biofuel production using seawater is desirable from the perspective of securing resources because cultivation of microalgae requires large quantities of water. As a freshwater species, *Euglena gracilis* can only survive in salt concentrations of up to 1/3 of seawater, making it unsuitable for cultivation using seawater. In this study, we screened for marine Euglenoid with lipid-producing capacity and found that *Eutreptiella* sp. strain NIES-2325 (hereafter NIES2325) produce WE upon exposure to hypoxia. We tried to elucidate the details of lipid metabolism of NIES2325.

NIES2325 cultures were treated with hypoxia, and as a result, reduction of paramylon content and production of wax esters (carbon length was mainly 26-28) are observed. Comparison of the degraded paramylon and produced WE contents showed that the conversion rate from paramylon to WE was about 7%. This is lower than the conversion rate of 25% in *Euglena gracilis* cultured under autotrophic conditions.

Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase (PNO) has been considered to be the sole acetyl-CoA source to the WE synthesis system in *Euglena*. In this study, PNO activities in NIES2325 were measured using crude cell extract before and after hypoxic exposure. The PNO specific activity increased approximately 6-fold upon hypoxia exposure. This suggests that PNO has an important function in metabolism under hypoxia than under aerobic conditions in NIES2325.

To analyze the physiological function of isozymes of PNO in NIES2325, this study developed a gene silencing method using RNAi to suppress PNO1 and PNO2 gene expression. Double-stranded RNA was introduced into NIES2325 by electroporation. The mRNA expression levels of cells cultured under aerobic conditions were compared with control cells by semi-quantitative RT-PCR, and the expression of each mRNA was successfully suppressed. In addition, a decrease in WE production under hypoxia was observed in the knockdown cells. These results suggest that the two PNO isozymes of NIES2325 may be involved in the supply of acetyl-CoA in WE production under hypoxia.