

## 論文要旨

微細藻類を用いた油脂生産のための植物生理学的研究：油脂生合成系の解明および環境影響評価

人間文化創成科学研究科 ライフサイエンス専攻 松脇いずみ

### <背景と目的>

トレボキシア藻綱に属する単細胞藻類である *Pseudochoricystis ellipsoidea* Obi 株は、窒素栄養欠乏条件下でトリアシルグリセロール (TAG) を多量に蓄積するため (Sato *et al.* 2010), 石油に代わるエネルギー源として有望視され、実用化に向けた大量培養や、油脂抽出の技術開発が行われている。

本研究では、*P. ellipsoidea* Obi 株が油脂を蓄積するメカニズムを解明するため、植物生理学的な解析を行った (第 1 章)。また、*P. ellipsoidea* Obi 株を屋外開放系で大量培養する際のリスクを調べるため、環境影響評価を行った (第 2 章)。

### <結果と考察>

第 1 章では、*P. ellipsoidea* Obi 株の油脂生合成に関わる代謝機構について述べる。

本研究では、*P. ellipsoidea* Obi 株の TAG 蓄積を誘導するため、培地中窒素濃度 25 mg/L, 2%CO<sub>2</sub> 通気, 25°C, 連続明期 (356 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) に培養条件を決定した。*P. ellipsoidea* Obi 株の増殖に伴って培地中の窒素が欠乏すると、細胞内の C/N バランスの変化によって TAG 蓄積が誘導された。

まず、TAG 合成が盛んな時期の特徴を述べる。TAG 合成の最後の段階は、ジアシルグリセロール (DAG) にアシル基を一つ付加する反応であるが、アシル CoA 由来のアシル基を付加する複数のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT) の遺伝子発現は、TAG 蓄積に伴って上昇した。一方、リン脂質由来の脂肪酸を付加するリン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (PDAT) の発現上昇は見られなかった。TAG 合成の盛んな時期に機能しているのは DGAT であると考えられた。また、脂肪酸合成阻害剤であるセルレニンを経済濃度 5 μM で与えた場合、TAG 合成が 96%阻害されたことから、TAG のアシル基として供給される脂肪酸は *de novo* 合成由来であると考えられた。TAG を合成する時期に光合成活性は低下しており、デンプン蓄積量の減少とデンプン分解系の遺伝子の発現上昇が見られたことから、デンプン由来の炭素が脂肪酸合成系に供給されている可能性が示唆された。放射性標識したグルコースを用いた C6/C1 実験により、グルコースが分解される際、解糖系ではなくペントースリン酸経路 (PP 経路) を経由する割合が増加していることがわかった。解糖系・PP 経路に関わる酵素の遺伝子発現の変化も、C6/C1 実験の結果を支持していた。脂肪酸合成には還元力 NADPH が必要である。PP 経路を活性化することによって、光合成反応からの NADPH の供給量の不足を補っていると考えられた。

増殖初期は TAG 合成能が低くデンプン合成能が高い。この時期の炭素の流れは、TAG 合成が盛んな時期とは異なっていた。[1-<sup>14</sup>C]オレイン酸を与えた実験から、TAG が分解されてデンプン合成に供給されていることが示された。増殖初期ではセルレニンによる TAG 合成能の阻害度は低く、*de*

*novo* 合成の寄与する割合が少ないか、または増殖後期とは異なった酵素を用いて脂肪酸合成を行っている可能性が推測された。

細胞の形態も、培養日数に伴って変化していた。対数増殖期の細胞はサイズが大きかったが、透過型電子顕微鏡を用いた内部構造の解析により、細胞内に複数の内生孢子を含んでいることがわかった。定常期になると多数の内生孢子を含む細胞は見当たらなくなり、細胞のサイズは小さくなった。対数増殖期の細胞の内部には小さな油滴が多数観察されたが、TAG蓄積に伴って大きな油滴が少数見られる状態に変化した。油滴どうしが融合している様子も観察された。小胞体ストレスをもたらしブレフェルジン A (BFA) は *Chlamydomonas reinhardtii* や *Chlorella vulgaris* において油滴の形成を促進すると報告されているが (Kim *et al.* 2013, Kato *et al.* 2013), 本研究でも BFA 投与による TAG 合成能の増加が確認された。デンプン粒は葉緑体内に存在していた。増殖初期には大型の葉緑体が見られたが、油滴が細胞の大部分を占める増殖後期には、葉緑体のチラコイド膜の減少が見られた。

第 2 章では、屋外で大量培養された *P. ellipsoidea* Obi 株が周辺環境へ流出する場合を想定した、環境影響評価について述べる。

本研究では、自然界から採取した水を用いて、*P. ellipsoidea* Obi 株の生残性や増殖能を評価するモデル実験系を構築した。実験の結果、*P. ellipsoidea* Obi 株が自然環境に流出した場合、生残性は認められるが、硝酸性窒素が検出限界以下であれば、増殖しないことがわかった。*P. ellipsoidea* Obi 株が増殖しない水に人為的に硝酸性窒素を添加すると、*P. ellipsoidea* Obi 株の増殖率が顕著に上昇し、硝酸性窒素が限定要因であったことを確認した。*P. ellipsoidea* Obi 株は、硝酸性窒素もアンモニア性窒素も利用できる藻類である。しかし硝酸性窒素が検出限界以下の場合は、アンモニア性窒素が存在しても増殖しなかったことから、自然界の水における *P. ellipsoidea* Obi 株の増殖に大きく影響するのは硝酸性窒素であると結論した。硝酸性窒素を利用出来ないミュータントを用いて、上記と同様の実験を行ったところ、野生型の *P. ellipsoidea* Obi 株が増殖する水においても、ミュータントは増殖することができず、このようなミュータントの使用により、自然界への流出時のリスクを軽減することができると考えられる。

また、実際に *P. ellipsoidea* Obi 株を屋外開放系で大量培養している施設の近辺で、1 ヶ月間にわたる *P. ellipsoidea* Obi 株の飛散状況を調査した。光学顕微鏡で観察したところ、*P. ellipsoidea* Obi 株が優占種として確認されることはなく、飛散して爆発的に増殖する可能性は低い事が示された。PCR を用いて *P. ellipsoidea* Obi 株を特異的に検出した結果、施設から 150 m の位置において飛散が確認された。また、飛散は風向きにも影響され、培養施設の近くでも風の方向と逆であれば、飛散していないことがわかった。

#### Reference

- Satoh A. *et al.* (2010) J. Jpn. Inst. Energy **89**, 909-913.  
Kim S. *et al.* (2013) PLoS ONE **8**, e81978.  
Kato N. *et al.* (2013) Plant Cell Physiol. **54**, 1585-1599.