

実用珪藻ツノケイソウによるリシノール酸の生産に成功

<概要>

福澤秀哉 生命科学研究所教授、梶川昌孝 同助教、伊福健太郎 同助教らの研究グループは、小川順 京都大学農学研究科教授、岸野重信 同助教、安藤晃規 同助教らの協力を得て、牡蠣（カキ）やウニの養殖で餌として利用されている植物プランクトンの珪藻ツノケイソウを用いて、ヒマシ油の主な成分であるリシノール酸の生産に成功しました。リシノール酸は、鎮痛剤や抗炎症剤といった医薬品や、携帯電話に使われる機能性プラスチック、自動車エンジンの潤滑油の原料として利用されていますが、原料のトウゴマ種子が毒性をもつため、現在は無害な代替生物での生産方法が求められていました。本研究では、植物プランクトンの中でも実用珪藻に代謝工学を施し、本来生産していなかったリシノール酸を生産させることが可能である事を初めて示しました。本成果は、11月10日に英国学術誌 *Scientific Reports* にオンライン掲載されました。

<本研究成果のポイント>

- 福澤教授らは、ツノケイソウが水産試験場などで大量培養の実績があり活発な脂質生成経路を持つことから、高付加価値脂質の生産の場として利用できると考えた。
- 本研究では、リシノール酸の生合成酵素遺伝子を真菌の一種「麦角菌」から単離し、矩形波パルスを用いたエレクトロポレーション法（特許取得済）によりツノケイソウに導入して、リシノール酸生産株を確立した（図1）。光合成で増殖する植物プランクトンには元々存在しない有用脂肪酸を生産することに世界で初めて成功した。
- 脂肪酸鎖長延長酵素を強化することで、リシノール酸の生産量をさらに向上することに成功した。
- 水酸基が露出するリシノール酸が培養液に存在すると、酵母を含む多くの微生物の増殖が阻害されることから、リシノール酸生産の障害となっていた。これに対してツノケイソウは、リシノール酸の水酸基に脂肪酸を新たに結合することで水酸基を無くし、新しくエステル構造をもつ油脂（**エステル TAG**、図2参照）を蓄積しつつ増殖した。**エステル TAG** は、容易にリシノール酸に再変換でき、それ自体に薬理活性が期待されることから、ツノケイソウはリシノール酸だけでなく**エステル TAG** の供給源としても活用できる可能性がある。

●細胞の増殖は 25°Cが適していたが、リシノール酸生産には 15°C以下での培養が適していたことから、気温の低い地方での培養に利点がある。

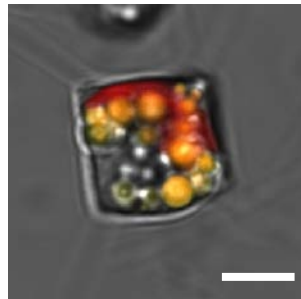


図 1. リシノール酸を蓄積したツノケイソウ株の共焦点顕微鏡観察像

中性脂質を含む油滴を黄色で、葉緑体を赤色で示す。細胞内に球状の油滴構造が複数発達している。リシノール酸はエステル化 TAG として油滴内の中性脂質に含まれると考えられる。バーは 5 μm。

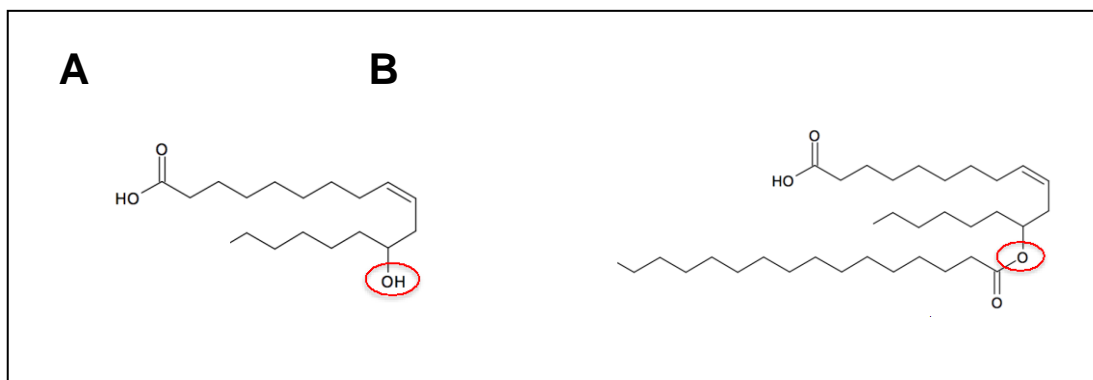


図 2. リシノール酸とエステル化

リシノール酸 (A) の水酸基 (A の赤丸) に他の脂肪酸のカルボキシ基がエステル結合することでエステル化 (B) となる。エステル化がグリセロールと結合した油脂をエステル化 TAG という。

1. 研究背景

藻類を供給源としたバイオ燃料生産については社会的な要求もあり、高脂質・高炭化水素蓄積性の藻類の探索や、モデル藻類を用いた油脂蓄積機構の研究が国内外において取り組まれています。しかし、現段階では燃料として生産させるよりも、付加価値の高い有用物質の生産が実現性が高いと考えられています。我々は機能性プラスチックや工業製品の原料として利用可能な水酸化脂肪酸のリシノール酸に着目しました。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ますが、トウゴマの種子は毒性物質をもつなど問題点が多く、他生物での生産が求められます。そこで、水産業で商業的に利用され高油脂蓄積能を持つ珪藻ツノケイソウ (*Chaetoceros gracilis*) での代謝工学的手法を用いた生産に成功しました。本研究結果から藻類がその代替供給源となる可能性を示しました。

2. 研究手法と成果

ツノケイソウは栄養欠乏培地への交換や有機炭素源の必要なく中性脂質を高蓄積します。また本研究グループの伊福らにより、外来遺伝子の導入が可能となっていました。そこで我々は、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、まずツノケイソウでのリシノール酸生産を試みました。*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 蓄積しました。これは全ての脂質を構成する脂肪酸の 8.8% に相当します。リシノール酸蓄積による生育への影響は見られず、ツノケイソウでの *CpFAH* 遺伝子発現によるリシノール酸生産には低温での培養が有効でした。

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）から生合成されますが、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）をより多く含んでいます。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 株に導入しました。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% にまで増加しました。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ました。

Cp4 株はどの生育温度においても野生型と同様に生育しました。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ました。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、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 70% が分子内の水酸基に他の脂肪酸が新たに 1 分子結合したエステル構造をもつ油脂（エステル TAG、図 2 参照）として蓄積することが判明しました。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テル TAG に変換されて蓄積することがわかりました。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テル TAG 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ました。

3. 波及効果、今後の研究展開

今回我々はツノケイソウの代謝工学によって初めて有用脂肪酸のリシノール酸の生成が可能であることを示しました。トウゴマに代わるリシノール酸の代替供給源として、これまで油脂を貯める高等植物や従属型微生物である酵母が候補となっています。一方で、植物には遺伝子組換え体の野外栽培に制限があること、従属栄養型微生物には油脂の生成に有機物炭素源が必要でコストが高く、またリシノール酸自体が細胞毒性を示す問題があり、実用化には至っていません。藻類は光合成により固定した炭素を元にカーボンニュートラルに油脂を生産するため、培養に有機物炭素源が不要です。また閉鎖系での培養を行うことで組換え体の管理が可能であることから、リシノール酸の代替供給源となる可能性があります。

今回報告したツノケイソウ系統の細胞内のリシノール酸蓄積量は最大で酵母での報告の約 10% 程度と未だ低く、1 g のリシノール酸を得るために 90L の培養が必要です。そこで今後更なる代謝改変により基質のオレイン酸の増量を試みます。また培地中の珪酸濃度が細胞の油脂蓄積量に影響を与えることが知られているので、油脂蓄積に最適な培地組成をさらに検討する予定です。リシノール酸からエステル TAG への変換反応を担う未知の酵素を同定することで、本来リシノール酸を持たないツノケイソウがエステル TAG 生成能を持つことの生物学的な理由に迫ります。この仕組みを酵母などのリシノール酸生産微生物に導入することでリシノール酸の細胞

毒性を回避する有効なツールとなることが期待出来ます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学技術振興機構（JST）の戦略的創造研究推進事業「先端的低炭素化技術開発（ALCA）」の「珪藻のフィジオロミクスに基づく褐色のエネルギー革命」（菓子野康浩代表）による成果です。

<論文情報>

Masataka Kajikawa、 Tatsuki Abe、 Kentaro Ifuku、 Ken-ichi Furutani、 Dongyi Yan、 Tomoyo Okuda、 Akinori Ando、 Shigenobu Kishino、 Jun Ogawa & Hideya Fukuzawa: “Production of ricinoleic acid-containing monoestolide triacylglycerides in an oleaginous diatom, *Chaetoceros gracilis*” **Scientific Reports** (論文受理 2016.10.21)

<関連特許>

- 国内特許：「3段階方式矩形波多重パルスを利用した藻類細胞への遺伝子導入法」第5721191号、米国特許番号9255276.
- 国内特許：「珪藻の新規形質転換ベクターおよびその含有する新規プロモーター配列」特願PCT/JP2015/075372(出願中).

<用語解説>

珪藻

主要な海洋性の植物プランクトン。地球上の二酸化炭素固定量の約25%を担うとされる。種特異的な構造の珪酸質の被殻を持ち、その形態的な特徴から丸い形の殻をもつ中心目と縦溝があり細長い形状をした羽状目に分けられる。

ツノケイソウ

珪藻綱中心目に属する珪藻の仲間です。シリカ被殻に長い突起をもつ。本研究で用いたツノケイソウ（学名 *Chaetoceros gracilis*）は群体を作らず単細胞で、その大きさは角を加えると、8-12 μm。広く東南アジア地域で養殖エビの幼生期の餌として用いられる。また二枚貝の生育に必要な長鎖不飽和脂肪酸を含むことから、国内では牡蠣、ハマグリ、赤ウニなどの養殖稚貝の餌として大量培養装置を用いて生産されており、培養の効率化の研究が進められている。

リシノール酸

リシノール酸は医療から工業まで幅広く利用される有用脂肪酸である。伝統的に鎮静

剤や抗炎症剤として用いられる他、リシノール酸を重合することで柔軟性に富んだポリアミド 11 として工業原料に利用される。また熱分解することで生成されるセバシン酸が潤滑油として利用される。また、化学的に分子内の水酸基に他のリシノール酸を重合することで縮合リシノレイン酸が生成し、チョコレート等の粘度低下剤として利用されている。リシノール酸は主にトウダイグサ科の亜熱帯植物トウゴマ (*Ricinus communis*) の種子油 (ひまし油) をケン化することによって生産されるが、原産国であるインドや東南アジアでの作付面積および輸出量が減少しており、またトウゴマ種子には毒性タンパク質のリシンやアルカロイドのリシニンが含まれているため、より安全な生物を用いた安定的な生産と供給が求められている。

脂肪酸水酸化酵素

オレイン酸の $\Delta 12$ 位の炭素を水酸化する酵素タンパク質。トウゴマおよびイネ科植物の穂に寄生する麦角菌から単離されている。英名は fatty acid hydroxylase (FAH)。

脂肪酸鎖長延長酵素

脂肪酸の鎖長を 2 炭素分延長する酵素。脂肪酸は縮合、還元、脱水、還元の 4 段階により 2 炭素単位で伸長される。このうちの最初の縮合反応が鎖長延長反応全体の律速反応であり基質特異性を有していることから、縮合酵素を指して「elongase」と呼ばれる。本研究で用いた糸状菌の脂肪酸鎖長延長酵素 MALCE1 はこの縮合反応を触媒する酵素であり、炭素鎖 16 の飽和脂肪酸であるパルミチン酸を主な基質とする。

形質転換

外来遺伝子を DNA 分子として直接細胞内に導入し、その遺伝的性質を変えること。藻類や植物の形質転換には、電気パルスにより瞬間的に細胞に穴を開けるエレクトロポレーション法、空気銃を用いるパーティクルガン法、微生物を用いるアグロバクテリウム法などが用いられる。本研究でのツノケイソウへの遺伝子導入には、既に特許が成立している矩形波パルスを用いたエレクトロポレーション法を用いた。