

講演番号：4C31a12

講演日時、会場：3月29日 11:21～ C校舎31会場

ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入によるユーグレナのバイオ燃料生産性の向上

Expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in *Euglena gracilis* leads to increases in biomass production

○木村 彩子<sup>1,2</sup>、小川 貴央<sup>1,2</sup>、作山 治美<sup>1,2</sup>、丸田 隆典<sup>2,3</sup>、鈴木 健吾<sup>2,4</sup>、石川 孝博<sup>2,3</sup>、田茂井 政宏<sup>1,2</sup>、重岡 成<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>近畿大・農・バイオ、<sup>2</sup>JST, CREST、<sup>3</sup>島根大・生資科・生命工、<sup>4</sup>(株)ユーグレナ)

○Ayako KIMURA<sup>1,2</sup>, Takahisa OGAWA<sup>1,2</sup>, Harumi SAKUYAMA<sup>1,2</sup>, Takanori MARUTA<sup>2,3</sup>, Kengo SUZUKI<sup>2,4</sup>, Takahiro ISHIKAWA<sup>2,3</sup>, Masahiro TAMOI<sup>1,2</sup>, Shigeru SHIGEOKA<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Kinki Univ., <sup>2</sup>JST, CREST, <sup>3</sup>Shimane Univ., <sup>4</sup>euglena Co., Ltd.)

【目的】近年、次世代エネルギー資源として藻類バイオ燃料が注目されている。真核藻類ユーグレナは、好気条件下では光合成産物として貯蔵多糖パラミロンを蓄積し、嫌気条件下に移行するとパラミロンを分解し、ワックスエステル発酵によりミリスチン酸 (C14) とミリスチルアルコール (C14) からなるミリスチルミリスレート (C28) を主成分とするワックスエステルを高生産する特徴を有する。C14 程度の軽質な脂肪酸は、一般的なバイオディーゼルはもちろん代替ジェット燃料としての利用も期待されている。他の微細藻類の多くは鎖長 C16 以上の脂肪酸が主要な生成物であることから、ユーグレナの C14 合成能は際立った特徴である。そこで本研究ではユーグレナのワックスエステル生産性向上を目的として、ラン藻カルビン回路で機能する FBP/SBPase 遺伝子をユーグレナへ形質転換し、ユーグレナのバイオマス生産性に及ぼす光合成能強化の影響について解析した。

【方法・結果】CaMV35S プロモーター下流にラン藻 FBP/SBPase 遺伝子を連結したプラスミド DNA (pRI101-35S: *fbp/sbp*) の LB-RB 領域を PCR により増幅し、対数増殖期まで培養したユーグレナ野生株へパーティクルガン法により導入した。パロモマイシン添加培地で選抜を繰り返し、複数の薬剤耐性株を得た。得られた薬剤耐性株について、導入遺伝子特異的なプライマーを用いたゲノミック PCR および抗 FBP/SBPase 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、FBP/SBPase 遺伝子の導入および葉緑体でのタンパク質の発現を確認した。最も高い FBP/SBPase タンパク質発現が認められた EpFS4 株の FBPase 活性は、野生株の約 1.4 倍に上昇していた。通常条件 (光独立栄養培地、100  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 0.04%  $\text{CO}_2$ ) で野生株と生育比較を行った結果、生育速度に顕著な差は認められなかったが、EpFS4 株において細胞体積の増加が認められた。一方、強光・高  $\text{CO}_2$  条件 (350  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 0.3%  $\text{CO}_2$ ) で生育比較を行った結果、EpFS4 株は野生株と比較して生育速度の上昇、細胞体積の増加が認められ、EpFS4 株の光合成活性は野生株の約 1.5 倍、クロロフィル量は野生株の約 1.6 倍、バイオマス量 (乾燥重量) は野生株の約 2 倍に増加していた。パラミロン蓄積量は細胞あたりで野生株の約 1.2 倍、培養体積あたりでは約 2 倍に増加していた。さらに、同条件下で培養した細胞を 24 時間嫌気処理し、ワックスエステル (C28) および脂肪酸を GC-MS により定量した結果、EpFS4 株のワックスエステル (C28) 量は野生株の約 100 倍に増加しており、総脂肪酸量は約 1.9 倍、中でも C14 は野生株の約 5.6 倍に増加していた。以上より、FBP/SBPase 遺伝子導入による光合成能の強化は、ユーグレナのバイオマスおよびワックスエステル生産性向上を可能にすることが示された。

*Euglena*, transformation, biofuel