

Microchloropsis gaditana のトリアシルグリセロールの蓄積量とその合成および分解酵素遺伝子発現量に関する研究

日大生産工(院) ○ 渡邊 歩
日大生産工 小森谷 友絵

1. 緒言

微細藻類によって産出されるTriacylglycerol(以後TAG)は、バイオディーゼルの原料として着目されている。TAGは微細藻類を窒素、リンなどの栄養が欠乏した環境下で培養することにより合成酵素により多量に合成され蓄積される。しかし蓄積されたTAGが加水分解酵素により分解され、微細藻類内のTAGの蓄積を維持することは難しい。

本研究では、TAG合成酵素 Phospholipid : Diacylglycerol acyltransferase (以後PDAT)とTAG分解酵素 Triglyceride lipase (以後TGL)に着目した。

TAGはPDAT, Diacylglycerol acyltransferase (以後DGAT)によりDiacylglycerolより合成され、TGLによりDiacylglycerolとFree fatty acidに加水分解される。Free fatty acidはAcyl-CoA synthaseによりAcyl-CoAとなる。その後Acyl-CoAは β -酸化を通して複数個のAcetyl-CoAにまで分解され、最終的に増殖のためのエネルギー源となる。脂肪酸代謝経路をFig. 1に示す。そのためTAG蓄積量向上にはPDAT遺伝子発現量の増加、TGL遺伝子発現量の低減が求められる。そのためここでは窒素による栄養不足や栄養充足条件下で培養したときの微細藻類 *Microchloropsis gaditana* のTAG蓄積量とPDAT, TGL遺伝子発現量の関連性について研究した。

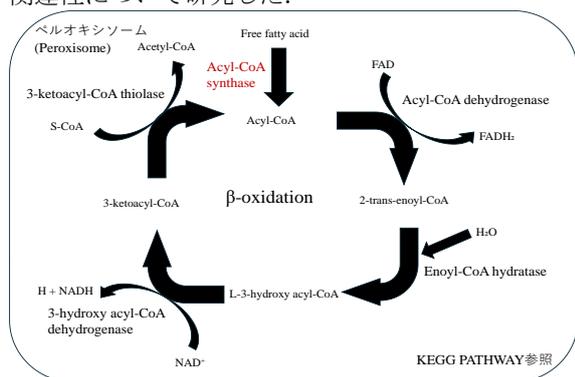


Fig. 1 Fatty acid metabolic pathway

2. 実験方法

2.1 前培養

微細藻類 *Microchloropsis gaditana*(NIES-2587)は

F/2 培地を用いて培養し、その後 14 °C, 9,000 rpm で遠心分離を 20 分間行いペレットとして得た。次に藻類ペレットは滅菌水で懸濁させた後、紫外可視分光光度計 UV-1800(SHIMADZU)を用い 720 nm で濁度測定を行い、濃度調整することで藻類懸濁液を調製し、実験培養に用いた。

2.2 実験培養

2.1 の方法で準備した *Microchloropsis gaditana* を窒素源(NaNO₃)濃度 0, 75, 150, 225 mg/L に調整した培養液で 14 日間培養した。培養は、光合成量子束密度 20 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で照射し、2%CO₂エアレーション下で行った。また一定時間ごとに培養液をサンプリングし、サンプル中に含まれる TAG 蓄積量と PDAT, TGL 遺伝子発現量を測定した。また、波長 720 nm における濁度を測定し、微細藻類の増殖の指標とした。

2.3 標準添加法を用いた TAG 蓄積量の測定

微細藻類のサンプリング液を 14 °C, 9,000 rpm で 15 分間遠心分離し、そのペレットを凍結乾燥させた。凍結乾燥物を 20 mL の F/2 培地で懸濁し、5 本の 5 mL ポリプロピレンチューブに 1.98 mL ずつ分注した。次に最終容量が 2 mL となるようにイソプロパノールとトリオレイン標準溶液を添加量を変化させて加えた。その後親油性蛍光物質 Nile red を 20 μL 加え暗所で 1 分間転倒混和させ、室温、暗所で 5 分間静置させた後蛍光測定を行った。測定された蛍光値を用いて *Microchloropsis gaditana* 一個体あたりの TAG 蓄積量を算出した。

2.4 PDAT, TGL 遺伝子発現量の測定

微細藻類 RNA を Nucleo spin RNA (TaKaRa)を用いて抽出した。その後 RT-PCR を行い、抽出した

Relationship between The Amount of Triacylglycerol Accumulated in *Microchloropsis gaditana* and It Is Expression Levels of The Synthesis and Degradation Enzyme Genes

Ayumu Watanabe, and Tomoe Komoriya

RNA から cDNA を得た。その cDNA を THUNDERBIRD™ tSYBR® qPCR Mix(TOYOBO)を用いて定量的リアルタイム PCR を行い、検出された蛍光値から PDAT, TGL 遺伝子発現量を求めた。

3. 結果及び考察

3.1 TAG蓄積量

Fig. 2に0, 12日目におけるTAG蓄積量を示す。TAG蓄積量は12日目にて最大値を示した。TAG蓄積はNaNO₃濃度を上げることにより、減少することが分かった。

3.2 PDAT, TGL遺伝子発現量

Fig. 3に合成酵素PDAT遺伝子発現量の推移, Fig. 4に分解酵素TGL遺伝子発現量の推移を示す。

PDAT遺伝子発現量はNaNO₃濃度 0 mg/L下で最大値を示し、またNaNO₃濃度が上昇すると、減少した。一方でTGL遺伝子発現量はNaNO₃濃度225 mg/L下で最大値を示した。またNaNO₃濃度0 mg/L下, 2, 6, 8, 10日目にて高値を示した。

3.3 Acyl-CoA synthase遺伝子発現量

F.Kongら²⁾によってFatty acidの第一段階反応を触媒するCrACX2遺伝子発現量が窒素飢餓下にて抑制されていることが報告された。そこで本研究ではNaNO₃濃度によるCrACX2遺伝子同様β-酸化に関わるAcyl-CoA synthase遺伝子の発現量の変化を調べた。

Fig. 5にAcyl-CoA synthase遺伝子発現量の推移を示す。Acyl-CoA synthase遺伝子発現量はNaNO₃ 225 mg/L下にて他の条件下と比較して高い値を示した。Acyl-CoAは、Acyl-CoA synthaseの働きによりFatty acidから生成される物質であり(Fig. 1), エネルギーを生産するための重要な役割を持っている。そのため窒素源が多いときは、Acyl-CoA synthaseが多く発現されFatty acidが分解され、窒素飢餓状態では、Acyl-CoA synthase遺伝子が発現されずFatty acidは分解されにくく、蓄積がされたと考えられる。

4. 結言

*Microchloropsis gaditana*は、栄養飢餓条件下で培養するとPDAT遺伝子発現量が増加し、TGL遺伝子発現量とAcyl-CoA synthase遺伝子発現量が減少した。このことにより、TAGが多量に蓄積されることが示唆された。

さらに、定量的リアルタイムPCRを用いて、DGAT, 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase遺伝子発現量の測定を行うことで、高TAG蓄積に向けた対応が明らかになると考えられる。

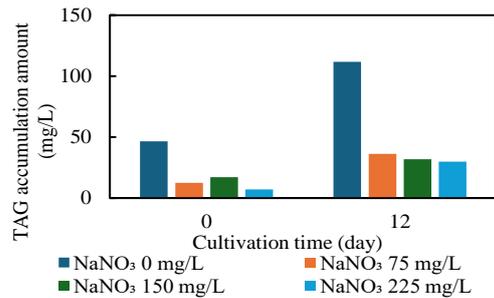


Fig. 2 TAG accumulation amount under NaNO₃ concentration of 0, 75, 150, 225 mg/L

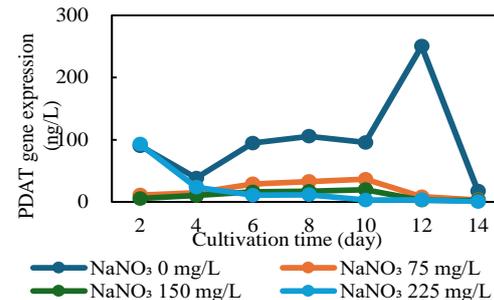


Fig. 3 PDAT gene expression under NaNO₃ concentration of 0, 75, 150, 225 mg/L

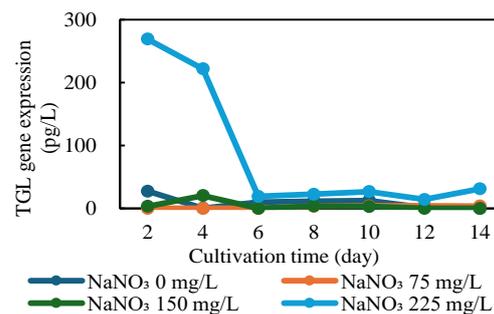


Fig. 4 TGL gene expression under NaNO₃ concentration of 0, 75, 150, 225 mg/L

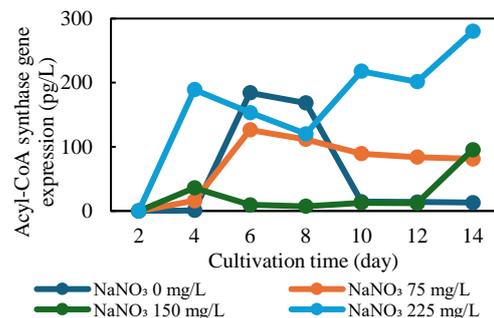


Fig. 5 Acyl-CoA synthase gene expression under NaNO₃ concentration of 0, 75, 150, 225 mg/L

参考文献

- 1) Elena Bertozzini. Et al., Journal of Microbiological Methods. 2011, vol. 87, pp17-23.
- 2) Kong Fantao. Et al., Plant Journal. 2017, vol. 90, pp358-371.