

海洋ハプト藻類のアルケノン合成経路の解明と オイル生産への基盤技術の開発に向けて[‡]

筑波大学 生命環境系、JST-CREST
鈴木 石根^{*}、白岩 善博

1. はじめに

近年の発展途上国での石油資源の需要の増加に加え、政情不安による産油国の原油生産量の減少の問題に加え、地球環境問題に関わる二酸化炭素の放出量の低減の必要性からも石油資源に代わる代替エネルギーの開発・生産が求められている。その上、昨年の東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所の事故による原子力エネルギーからのシフトの圧力も強く、新たな再生可能エネルギーとしてのバイオマス生産の技術開発は様々な方面から注目が集まっている。石油に代わるエネルギー源としては、前記の原子力に加え、太陽光・太陽熱・風力・水力・波力・潮力・地熱・バイオマス等様々なエネルギー資源が検討されているが、原子力・地熱を除き太陽の輻射エネルギーに起因するものである点が注目される。また、バイオマス以外のエネルギー源は現時点では主に電力の供給を目指したものであり、現在の石油エネルギーの内燃機関の液体燃料および化学工業原料として真の代替エネルギー資源と考えるには不十分である。すなわち現時点で想定される代替エネルギーのうち、バイオマスだけが液体燃料および工業原料を供給できるポテンシャルを有する点を考慮する必要がある。

バイオマスとは藻類や植物の光合成産物に由来する生物由来の有機物の総称のことである。従属栄養性の生物による利用価値の高いバイオマスへの変換は、現時点で有用な生産手段である。例えばサトウキビやトウモロコシ由来のショ糖やデンプンを酵母や発酵細菌によりアルコール発酵によりエタノールを生産する技術は、ブラジルなどいくつかの国において実用段階にある。しかしながら、バイオマス燃料の

生産利用の効率の面から、光合成生物の藻類や植物から直接利用できる形態であることが望ましい。陸上植物を活用したバイオマス生産は、食糧生産のための耕作地と土地利用の点で競合する。地球上の利用可能な耕作地は徐々に減少しており、また、発展途上国を中心に人口の増加傾向は継続していることから、食糧生産と競合が少ないバイオマス生産系の開発が望まれている、微細藻類は水中で増殖するため、水資源の確保が可能であれば耕作不適地においても生産が可能であり、さらに単位面積あたりの生産量は高等植物のそれに比べてもはるかに高いことが示され¹⁾、近年特に着目されている。藻類の中には湖沼や海洋において自発的に大増殖 (Bloom) を起こす種が多数知られており、限られたスペースで大規模培養を行うポテンシャルは高いといえる。ただし現時点で大量培養が可能な藻類株は数種類に限定されており、有用な形質の藻類の大量培養技術の開発が必要である。

2. 海産性微細藻類のメリット

微細藻類の大規模増殖には培養液作製のための大量の水が必要であり、淡水性の微細藻類の培養には十分な真水 (淡水) の確保が必要である。一般に耕作不適地は降水量が乏しく灌漑水が不足するが故に耕作不適地となっている場合が多く、そのような環境では淡水性藻類の大量培養には水問題という困難が伴うことが予想される。一方、海産性の藻類は海水をベースとした培養液で培養が可能であることから、海上あるいは海岸付近に培養施設を設置することにより、培養に必要な清浄水を獲得する事がより容易であると想像できる。

[‡] 解説特集「植物、藻類等を利用した物質生産の新しい展開とその課題」

^{*} 連絡先 E-mail: iwanes6803@biol.tsukuba.ac.jp

3. ハプト藻とは

ハプト藻はクロモアルベオラータに属する植物プランクトンで、紅藻に由来する葉緑体（プラスチド）を有する二次共生藻である²⁾。葉緑体は4重の包膜で覆われており、2重膜を持つプラスチドを含む陸上植物や緑藻・紅藻などの一次共生藻とは異なっており、光合成産物の細胞質への輸送とそれらを含めた代謝経路の全容の理解はまだ十分とはいえない³⁾。ハプト藻の多くは海洋性で低緯度から高緯度まで幅広く生息する。その一方で、淡水や塩湖に分布する種も知られている。海洋特に外洋においてそのバイオマスは膨大であり、一次生産者として特に重要な地位を占めている。ハプト藻類の中で、細胞表面に鱗片として炭酸カルシウムの精巧な構造の円盤状の結晶（円石・ココリス）を持つグループは、円石藻と呼ばれる。円石藻は光合成による二酸化炭素の有機物への固定に加えて、円石として炭酸カルシウムの結晶としても無機炭素を細胞に固定し、その死骸が海底に沈降することによる炭素の生物ポンプとして働くことから、地球上の炭素循環を考える上で特に重要な生物群といえる⁴⁾。円石藻はジュラ紀中期に誕生し、白亜紀に生息域を広く拡大した。かつて大増殖した円石藻の死骸の堆積に起因する石灰岩層が白亜紀の名称の元となった。現生の円石藻の中では、*Emiliania huxleyi* はその代表種であり、世界の様々な海域に生殖する株が知られ、ブルームを形成する種である。*E. huxleyi* を含むイソクリシス目に属する種の中には、アルケノンと呼ばれる独特な長鎖不飽和ケトンを合成し細胞内に蓄積するものが知られており、石油の起源となった生物群とその化合物の1つと考えられている⁵⁾。

4. ハプト藻が蓄積するアルケノン（長鎖不飽和ケトン）

アルケノンは、炭素数が37-39の直鎖のメチルケトン、あるいはエチルケトンである（図1）。円石藻の細胞では全有機物の重量の20-30%にも相当するアルケノンが細胞内に蓄積される。分子内に2から4個の不飽和結合を有し、たいへん興味深いことにその二重結合は全てトランス型であり、一般的な膜脂質脂肪酸やトリグリセリドの脂肪酸の二重結合がシス型であるのとは異なっている⁶⁾。不飽和結合の位置はアルケノンの炭素-炭素結合に正確に7つおきに導入されて

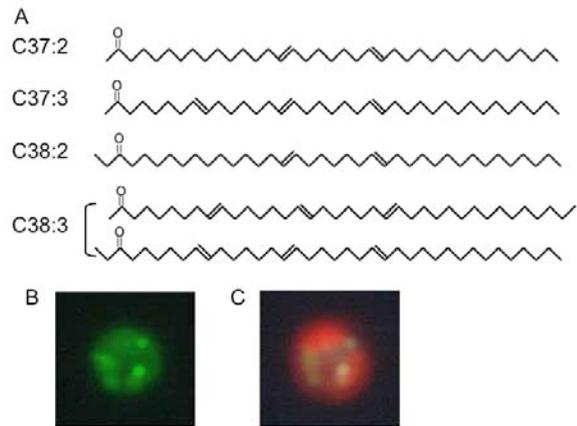


図1 代表的なアルケノンの構造 (A) と *E. huxleyi* 細胞のナイルレッド染色蛍光顕微鏡像 (B)、ナイルレッド染色像にクロロフィル蛍光画像を重ねた図 (C)。細胞内の球形の粒子がアルケノンの集合体。

いる。一般的な膜脂質やトリグリセリドに含まれる多価不飽和脂肪酸中の不飽和結合は3つおきであることと比較しても、既知の膜脂質脂肪酸の不飽和化反応とは異なる独自の不飽和化機構の存在が示唆されている。アルケノン自体は微生物による分解を受けにくく、化学的にも安定な化合物のため、かつてその海域や湖沼で生息した植物プランクトンに由来する海底や湖底の堆積物からも発見・同定され、円石藻類の生育環境復元のための指標化合物とされている。さらに興味深いことには、細胞内のアルケノン分子の不飽和結合の数は、低温により増加することが知られており、海底堆積物中のアルケノン分子の不飽和結合の数をを用いて、その物質が堆積した古代の海洋温度の推定を行う分子温度計としても活用されている⁷⁾。先述したようにアルケノン分子の不飽和結合はトランス型であり、トランス型の不飽和結合は温度の低下による分子の流動性の低下を抑制する効果が少ないと想定されることから、低温による不飽和度の上昇の生理的意義は不明である。いずれにしてもアルケノンに関する研究は、これまで生物学的視野からの解析は少なく、有機地球環境科学の分野から進められることが多かったことは、アルケノンのこのような性質によるものであり、今後は生物学的知見からの解析がより一層進められることが期待される。

円石藻イソクリシス目による、アルケノン蓄積の生理的意義は明確にはされていない。以前は円石を形成し比重が増した細胞に浮力を与えるためという説もあったが⁸⁾、現在では貯蔵炭素化合物の一種と考える

説が一般的となっている⁹⁾。培地中のリン酸塩などの栄養塩の枯渇や低温あるいは増殖により光条件が生育を制限するような環境条件となると、アルケノンの蓄積が促進される。アルケノンを蓄積した細胞を暗所におくなどして光合成を停止させると、細胞のアルケノン含量の低下が見られたことから、貯蔵炭素化合物であると考えられている。

アルケノンを蓄積する *E. huxleyi* 細胞を材料として、Pyrolysis（非酸素存在下での熱分解）を行うと、アルケノンは温度条件により異なる分子種に分解を受ける¹⁰⁾。200-300°Cではガソリンや軽油などの液体燃料に含まれる炭化水素種に分解され、400-500°Cでは液体成分は減少し、メタンやエタンなどの天然ガス成分に分解を受ける¹¹⁾。この性質はアルケノンが石油や天然ガスの起源となった物質の1つであることを示唆するとともに、円石藻の大量培養により人工的にアルケノンを大量生産できれば、石油代替資源として活用可能である事を示す結果である。

5. アルケノンの合成経路の解明と生産性向上に向けて

アルケノンの大量生産系の構築のためには、円石藻のアルケノン合成経路の解明とその合成経路の人工的な改変が必要とである。円石藻 *E. huxleyi* のゲノムプロジェクトは、カリフォルニア州立大学サンマルコ校の Betsy Read 博士のグループが中心となって、アメリカエネルギー省の DOE Joint Genome Institute (JGI) で進められ、ドラフト配列が公開されている (<http://genome.jgi-psf.org/Emihu1/Emihu1.home.html>)。また、EST配列の収集も盛んに行われ2012年3月現在、13万を超える配列がデータベースに登録されている¹²⁻¹⁴⁾。しかしながらアルケノン合成系に関わる代謝酵素遺伝子を配列情報から抽出することは容易ではない。我々の研究室では、脂肪酸合成の縮合反応を阻害するセルレニンの添加によりアルケノンの合成が阻害されることを見出している¹⁵⁾。セルレニンは脂肪酸の伸長反応に加えて、ポリケチド合成酵素の縮合反応も阻害することから、i) 脂肪酸の伸長系を経て超長鎖の脂肪酸から直鎖のケトンが合成されるか、ii) 脂肪酸が縮合して直鎖のケトンが合成されるか、iii) アルケノン合成に特化したポリケチド合成酵素が存在するのか、iv) あるいは全く未知の代謝系による経路であるのか、現時点では判断できる状況にはない。円石

藻は細胞膜脂質にドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) を多量に含む¹⁶⁾。したがって、いわゆる超長鎖脂肪酸の合成経路が存在し、その実体は酵素遺伝子レベルでかなり明らかとなっている¹⁶⁾。しかしながら、DHAやEPAの合成は複数のシス型不飽和結合の導入と密接に関連しており、アルケノン分子のトランス型の不飽和結合を複数含みそれぞれが7つおきに存在すること、また炭素数22のDHAよりさらに炭素数の多いことから考えても超長鎖脂肪酸の合成系とは独立した経路を想定する方が自然であろう。他の生物で知られる脂肪酸の縮合反応に関わる酵素のホモログ¹⁷⁾は、*E. huxleyi* のゲノムや ESTライブラリーからは見出されていない。また、ラン藻 *Anabaena* sp. PCC7120 のヘテロシストの細胞表面の脂質はポリケチド合成酵素により合成されることが示されており^{18,19)}、ポリケチド合成系によるアルケノンの合成の可能性は排除できないが、実体は明らかとなっていない。*E. huxleyi* のゲノム・EST情報からこれまで見出されていないタイプの複数の脂肪酸不飽和化酵素のホモログが同定されており、これらのうちのいずれかがアルケノンのトランス型の不飽和結合の導入に関わる可能性が示唆されているが、その詳細は今後の解析を待たねばならない。

また我々の研究室では、アルケノン合成の中間体を網羅的に同定することにより、アルケノンの合成経路を明らかにする試みをはじめている。これまで全く知られていなかった新奇の代謝経路・代謝経路によりアルケノンが合成されている可能性は否定できず、この種のアプローチは未知の代謝経路の同定には有効であると考えている。

また、多数の *E. huxleyi* の培養株をカルチャーコレクションより入手し、そのアルケノン分子種を解析したところ、予想以上に株間で蓄積する分子種に偏りがあることがわかった。それら優先するアルケノン分子種が異なる株間で遺伝子発現レベルを網羅的に解析することで、その原因遺伝子の同定が可能となることも期待される。

一方で、アルケノン含量の増加・有用性の高い分子種あるいは代謝中間体の大量生産に不可欠な遺伝子操作技術の確立にも力を入れている。円石藻 *E. huxleyi* のゲノム塩基配列の特徴は、GC含量が極めて高く (70%超)、外来遺伝子の発現は容易ではないと思われるので、内在性の遺伝子配列を用いた遺伝子操

作系の構築を目指している。

上記のようなアプローチを組み合わせ、海産性の微細藻類の利点をいかして近い将来石油に取って代わる有用バイオマスの生産システムの構築を目指している。なお本研究は、科学技術振興機構 (JST) の、戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」により助成を受けている。

Received March 26, 2012, Accepted March 26, 2012,
Published April 30, 2012

参考文献

- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25, 294-306.
- Vesteg, M., Vacula, R., and Krajcovic, J. (2009) On the origin of chloroplasts, import mechanisms of chloroplast-targeted proteins, and loss of photosynthetic ability -review, *Folia Microbiol.* 54, 303-321.
- Tsuji, Y., Suzuki, I., and Shiraiwa, Y. (2009) Photosynthetic carbon assimilation in the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Haptophyta): Evidence for the predominant operation of the c3 cycle and the contribution of β -carboxylases to the active anaplerotic reaction, *Plant Cell Physiol.* 50, 318-329.
- Shiraiwa, Y. (2003) Physiological regulation of carbon fixation in the photosynthesis and calcification of coccolithophorids, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136, 775-783.
- Jordan, R. W., and Kleijne, A. (1994) A classification system for living coccolithophores, in *Coccolithophores* (Winter, A. and Siesser, W. G. Eds.), pp. 83-105, Cambridge University Press, Cambridge.
- Rechka, J. A. and Maxwell, J. R. (1988) Characterisation of alkenone temperature indicators in sediments and organisms, *Org. Geochem.*, 13, 727-734.
- Brassell, S. C. (1993) Applications of biomarkers for delineating marine paleoclimatic fluctuations during the Pleistocene, in *Organic Geochemistry*, (Engel, S. C. and Macko, S. A. Eds.), pp. 699-737, Plenum Press, New York.
- Fernandez, E., Balch, W. M., Maranon, E., and Holligan P. M. (1994) High rates of lipid biosynthesis in cultured, mesocosm and coastal populations of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114, 13-22.
- Epstein, B. L., D'Hondt, S., and Hargraves, P. E. (2001) The possible metabolic role of C₃₇ alkenones in *Emiliania huxleyi*, *Org. Geochem.* 32, 867-875.
- Wu, Q., Shiraiwa, Y., Takeda, H., Sheng, G., and Fu, J. (1999) Liquid-Saturated Hydrocarbons Resulting from Pyrolysis of the Marine Coccolithophores *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*, *Mar. Biotechnol.* 1, 346-352.
- Wu, Q., Dai, J., Shiraiwa, Y., Sheng, G., and Fu, J. (1999) A renewable energy source-hydrocarbon gasses resulting from pyrolysis of the marine nanoplanktonic alga *Emiliania huxleyi*, *J. Applied Phycol.* 11, 137-142.
- Wahlund, T. M., Hadaegh, A. R., Clark, R., Nguyen, B., Fanelli, M., and Read, B. A. (2004) Analysis of expressed sequence tags from calcifying cells of marine coccolithophorid (*Emiliania huxleyi*), *Mar. Biotechnol.* 6, 278-290.
- Kegel, J., M. J. Allen, K. Metfies, W. H. Wilson, D. Wolf-Gladrow, and K. Valentin. (2007) Pilot study of an EST approach of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* during a virus infection, *Gene* 406, 209-216.
- von Dassow, P., Ogata, H., Probert, I., Wincker, P., Da Silva, C., Audic, S., Claverie, J. M., and de Vargas, C. (2009) Transcriptome analysis of functional differentiation between haploid and diploid cells of *Emiliania huxleyi*, a globally significant photosynthetic calcifying cell, *Genome Biol.* 10, R114.
- Shiraiwa, Y., Kubota M., Sorrosa, P., and von Wettstein-Knowles, P. (2005) Alkenone synthesis in *Emiliania huxleyi* probed with radiolabeled substrate and a fatty acid synthesis inhibitor, in *Recent Advances in Marine Science and Technology*, 2004. (Saxena, N. Ed.) pp 27-36, PACON International, Hawaii.
- Sayanova, O., Haslam, R. P., Calerón, M. V., López, N. R., Worthy, C., Rooks, P., Allen, M. J., and Napier, J. A. (2011) Identification and functional characterisation of genes encoding the ω -3 polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway from the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, *Phytochemistry.* 72, 594-600.
- Beller, H. R., Goh, E. B., and Keasling, J. D. (2010) Genes involved in long-chain alkene biosynthesis in *Micrococcus luteus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1212-1223.
- Fan, Q., Huang, G., Lechno-Yossef, S., Wolk, C. P., Kaneko, T., and Tabata, S. (2005) Clustered genes required for synthesis and deposition of envelope glycolipids in *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Mol. Microbiol.* 58, 227-243.
- Awai, K., and Wolk, C. P. (2007) Identification of the glycosyl transferase required for synthesis of the principal glycolipid characteristic of heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 98-102.

Elucidation of the synthetic pathway of alkenones in marine Haptophyceae
and development of fundamental technologies to oil production

Iwane Suzuki*, Yoshihiro Siraiwa

Faculty of Environmental Sciences, University of Tsukuba, CREST, Japan Science and Technology Agency