

# 藻類の二元的活用 ～エネルギー生産と環境浄化に向けて～

所属： 東京薬科大学大学 生命科学研究所 専攻

助成対象者：佐藤典裕

共同研究者：藤原祥子

## 概要

クロレラはトリアシルグリセロール蓄積能とヒ素耐性に優れるため、エネルギー生産とヒ素汚染水浄化の二元的同時利用が期待される。本研究では、ヒ酸ストレスがクロレラの脂質代謝や細胞のヒ素蓄積へ及ぼす影響を解析した。80 mM ヒ酸添加下、細胞の生育は抑制され、同時に脂肪滴が蓄積し、トリアシルグリセロールは全脂質の 55 mol%まで増加した。対し、チラコイド膜の膜脂質量やクロロフィル量は減少したことから、チラコイド膜の脂質や光化学系複合体の分解産物がトリアシルグリセロールの合成を支える可能性が示された。一方、細胞内の As 含有量は、72 時間で細胞乾燥重量あたり 1 %に達した。以上の結果から、クロレラでは、その生育が抑制されるヒ酸ストレス条件下、トリアシルグリセロールとヒ素蓄積が同時に誘導されることが示された。

## Abstract

*Chlorella*, which shows triacylglycerol hyper-accumulation and arsenic hyper-tolerance, is expected for its dual utilization for biofuel production and arsenic-polluted water purification. This study investigated the effects of arsenate stress on lipid metabolism and arsenic accumulation. With the addition of 80 mM arsenate, cells were completely repressed in growth, with noted accumulation of lipid droplets and triacylglycerol in three days, the latter of which reached 55 mol% of total lipids on a fatty acid basis. Inevitably, the lipids of thylakoid membranes, together with chlorophyll, were decreased in quantity, which implied that their degraded compounds supported the synthesis of triacylglycerol. Meanwhile, arsenic amounted to 1% dry cell weight. These results demonstrated that *Chlorella* cells induce triacylglycerol and arsenic accumulation under arsenate-stress conditions.

## 研究内容

### 背景

藻類は様々な環境ストレス下、トリアシルグリセロール (TG) を蓄積する。特にクロレラでは四種のストレスの混合条件下、わずか 72 時間で TG 量が藻類で最高レベルの細胞乾重量当たり 49% に達する。光合成生物由来のバイオ燃料はカーボンニュートラルなため、地球温暖化の抑制に効果的である。しかも、化石燃料と異なり、再生可能である。現在、TG を主成分とする作物種子油がバイオディーゼル燃料生産の原料として用いられるが、将来、バイオ燃料生産が食糧生産と競合する可能性がある。さらに、世界最大のパーム油生産のために、ナツメヤシが大規模栽培され、そのため熱帯雨林が破壊されてきた。作物と異なり、藻類は農地に適さない土地で施設を作り培養でき、しかもバイオマス生産性が高い。よって、TG 生産系を作物から藻類へ転換すれば、熱帯雨林の保全と TG 生産性の向上に、したがって地球温暖化防止に有効となる (Hu et al., 2008)。一方、ヒ素 (As) 汚染水は、健康被害をもたらす。多くの藻類種は As を細胞内に取り込み代謝するため強い As 耐性を示し、そのため As 汚染水の浄化への利用が期待される。最近、佐藤と藤原は、ヒ酸添加条件下、クロレラでは脂肪滴の出現と共に、TG が蓄積することを見出した。この結果は、クロレラでは As 汚染地域の水質浄化だけでなく、地球温暖化防止と組み合わせる二元的活用が有効であることを示唆している。この背景のもと、本研究は「クロレラの As ストレス誘導性の TG 蓄積機構」を調べる。これは藻類の TG 蓄積機構をこれまで見落とされてきた As ストレス下で解明するものであり、As ストレス応答での TG 蓄積の生理学的意義を理解する上で、また二元的活用の科学的基盤を示す上で重要である。

### 目的

クロレラがヒ酸ストレス応答で示す TG 蓄積について、その蓄積量が最大となるヒ酸濃度を明らかにする。次いで、その TG 蓄積を支える脂質代謝機構を調べ、得られた知見から、ヒ酸ストレス下での TG 蓄積に関して、その生理学的意義を議論する。

### 結果

*C. kessleri* においてヒ酸ストレスが誘導する脂肪滴蓄積に関して、まず、その誘導効果のヒ酸濃度依存性を調べた。ヒ酸添加量を 10~80 mM に振って、*C. kessleri* を 72 時間培養したところ、20 mM 以上で脂肪滴が蓄積し、特に 80 mM で顕著に現れた (図 1)。そこ

で、以後 80 mM ヒ酸添加を TG 蓄積誘導のためのストレス条件とし、解析を進めた。C. kessleri において OD<sub>730</sub> 値、即ち細胞の生育は、80 mM ヒ酸添加後 72 時間で培養開始時の 0.9 倍まで下がり、

かつクロロフィル量は 0.4 倍に減少した。したがって、細胞生育は完全に抑制され、同時にクロロフィルが分解

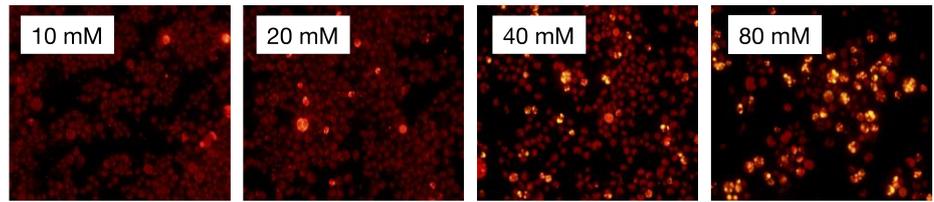


図1 クロレラにおける脂肪滴蓄積のヒ酸濃度依存性 クロレラ細胞を10-80 mMのヒ酸添加条件下、72時間培養し、細胞内の脂肪滴をナイルレッド染色し、蛍光顕微鏡で観察した。脂肪滴、クロロフィルが各々、黄色、赤色の蛍光を発した。

された。クロロフィルの分解は、クロロフィルを共因子とする光化学系複合体の分解を示唆していた。これに対応して、光合成活性は培養開始時に比べ 0.08 倍と劇的に減少した。

一方、脂質分析の結果、TG は培養開始時には検出されなかったが、ヒ酸添加後、経時的に増加し、72 時間後には脂肪酸ベースで全脂質の 55 mol%、細胞乾燥重量の 4 %まで蓄積した (図 2)。この TG の蓄積に伴い、膜脂質であるモノガラクトシルグリセロール

(MGDG)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルコリン (PC) は各々、培養液あたりで培養開始時の 0.4 倍、0.4 倍、0.3 倍に低下し、またホス

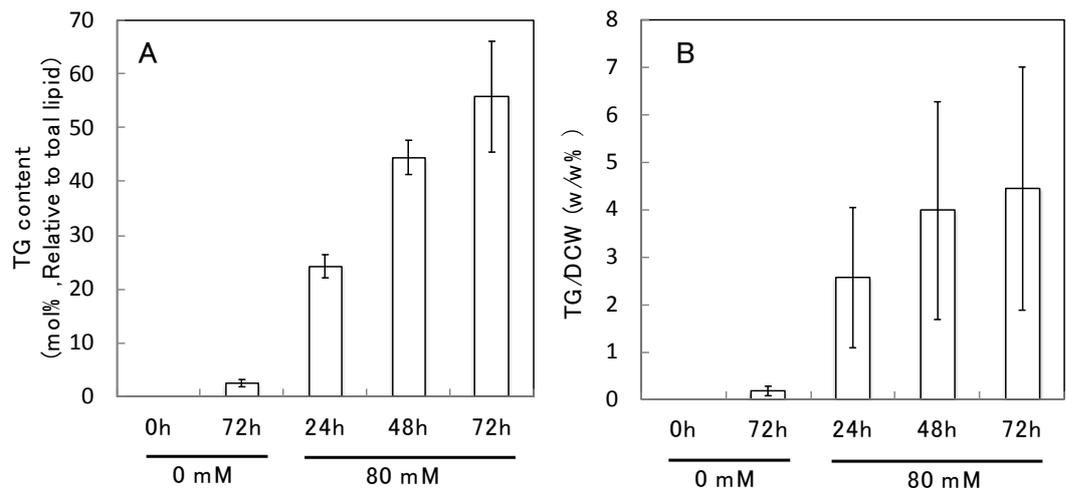


図2 80 mM ヒ酸ストレスによるTG蓄積誘導 クロレラ細胞を80 mMヒ酸暴露開始後、細胞に蓄積したTGを定量した。(A)全脂質におけるTGの割合。(B)細胞乾重量(DCW)におけるTG量の割合。バーはSEを示す。

ファチジルエタノールアミン (PE) はほぼ完全に欠失した。このため、これらの膜脂質では分解が進んだと考えられた (図 3)。TG は主な構成脂肪酸として、16:0、18:1、18:2、18:3 を含んでおり、このうち 18:2、18:3 は各々、TG の全脂肪酸の 28 %、13 %を占めた。これらの 2 種の不飽和脂肪酸は、脂肪酸が膜脂質に結合した形で不飽和化が進行し、生成する。定量的な解析から、18:2、18:3 について、ヒ酸添加条件下で蓄積した TG に含まれる量は MGDG、PG、PC、PE において、分解のため失われた量の総和とほぼ一致した。つまり膜脂質の分解により生じた不飽和脂肪酸が TG の合成系に供給されたと考えられる。

As 添加細胞ではさらに、膜脂質としてジアシルグリセリルトリメチルホモセリン (DGTS)が新規に出現し、全膜脂質あたり 14 % を占めた (図 3)。我々は、*C. kessleri*においてリン欠乏条件下、PC や PE といったリン脂質の割合が減少し、代わりに非リン脂質である DGTS が蓄積することを見出している。一般に、高濃度のヒ酸はリン酸の取り込みを阻害する。したがって、*C. kessleri*でもヒ酸添加細胞はリン欠乏状態に陥り、結果、DGTS が蓄積したと示唆された。恐らく、ヒ酸添加細胞はリン欠乏に対する適応応答としてリン酸がリン脂質の分解により確保され、さらに失われたリン脂質の代替として DGTS が機能するのであろう。種々の藻類では、リン欠乏ストレスが TG 蓄積を誘導することが報告されている。したがって、80 mM ヒ酸ストレスは P 欠乏ストレスを引き起こし、少なくともそれが引き金となり、TG 蓄積が誘導されたと考えられた。このヒ酸ストレス下で蓄積する TG はリン欠

乏により代謝が滞り、そのため過剰となったエネルギーのシンクと捉えることができる (Hu et al., 2008)。

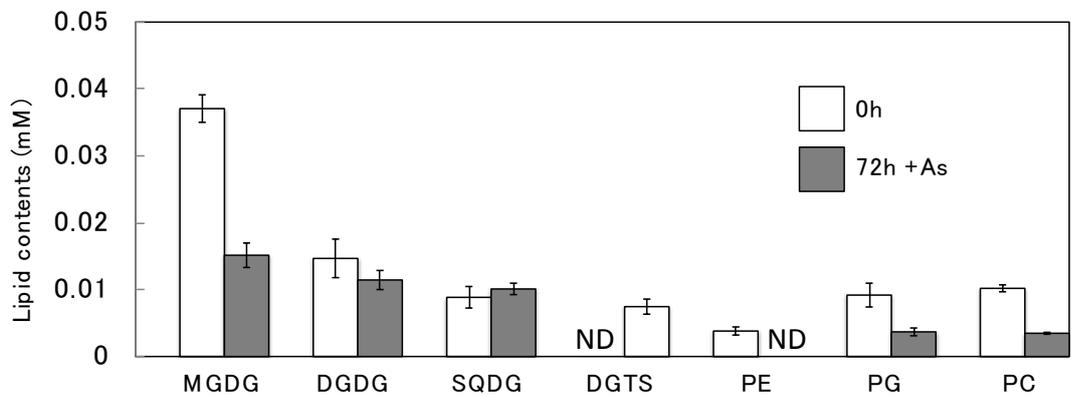


図3 80 mMヒ酸ストレスが膜脂質組成へ及ぼす影響 クロレラ細胞で80 mMヒ酸ストレスに暴露前(白棒)と暴露後72時間(灰棒)で、膜脂質組成を比較した。

## 今後

*C. Kessleri*では、核ゲノムの塩基配列が明らかにされている。今後は、他生物で既知の脂質代謝系の諸遺伝子のホモログを *C. kessleri*で見出し、各遺伝子ホモログに関して、ヒ酸ストレス下での発現パターンを調べる。これにより、ヒ酸ストレスが誘導する TG 蓄積の分子機構を *C. kessleri*で明らかにし、将来的には遺伝子改変による TG 蓄積能の増強を目指す。併せて、ICP/MS を用いて As 添加細胞の As 含有量を明らかにする。以上より、藻類のバイオ燃料と環境浄化に向けた二元的活用のモデルを *C. kessleri*で提示する。

## 引用文献

[1] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances.

Plant J. 54, 621-639.

#### 本助成に関わる成果物

##### [論文発表]

[1] Hayashi T, Ohtaki R, Hiorai K, Tsuzuki M, Sato N (2017) Optimization of seawater-based triacylglycerol accumulation in a freshwater green alga, *Chlorella kessleri*, through simultaneous imposition of lowered-temperature and enhanced-light intensity. *Algal Res* 28, 100-107.

[2] Aoki M, Sato N (2018) Fatty acid content and composition of triacylglycerols of *Chlorella kessleri*. *Bio-protocol* 8, 01.

[3] 佐藤典裕 (2018) 微細藻類のバイオ燃料化を目指した脂質研究—油性藻クロレラでの取り組み—. *Radioisotopes* 67, 571-572.

##### [口頭発表]

[1] 大石裕太郎、大滝理恵、藤原祥子、佐藤典裕 (2018) 緑藻クロレラの二元的利用 - バイオディーゼル燃料生産とヒ素汚染水浄化に向けて. 第60回日本脂質生化学会 (八王子、6月).

##### [ポスター発表]

[1] 大石裕太郎、大滝理恵、藤原祥子、佐藤典裕 (2018) 緑藻クロレラの二元的利用 - バイオディーゼル燃料生産とヒ素汚染水浄化に向けて. 日本植物学会第82回大会 (広島、9月).

[2] Yutaro Oishi, Rie Otaki, Shoko Fujiwara, Norihiro Sato (2018) Triacylglycerol accumulation in a green alga, *Chlorella kessleri*, under arsenic stress conditions. The 23<sup>rd</sup> International Symposium on Plant Lipids (Yokohama, July).