

(様式11)

論文審査の要旨 (課程博士)

生物システム応用科学府長 殿

審査委員 主査 田中 剛 (印)
副査 稲田 全規 (印)
副査 竹山 春子 (印)
副査 松田 浩珍 (印)
副査 吉野 知子 (印)

学位申請者	<u>共同先進健康科学 専攻</u> 平成 <u>22</u> 年度入学 学籍番号 <u>10702105</u> 氏名 <u>須永 吉彦</u>
申請学位	博士 (生命科学)
論文題目	Analysis of highly oil-producing process in marine diatom <i>Fistulifera solaris</i> JPCC DA0580 based on transcriptomics (海洋珪藻 <i>Fistulifera solaris</i> JPCC DA0580 のトランスクリプトミクスによるオイル高生産機構の解析)

論文審査要旨 (2,000 字程度)

本研究では、微細藻類を用いたバイオ燃料生産におけるオイル生産性の向上を目指し、海洋珪藻 *Fistulifera solaris* の生育とオイル蓄積が同時進行する代謝機構を解明することを大目的とした。具体的には、代謝機構解析に必要となる *F. solaris* の遺伝子領域予測と、発現タンパク質の局在予測を、既報のプロセスに必要な応じた改変を加えて行い、さらにその有効性を検証することを第一の目的とした。また、*F. solaris* の遺伝子発現解析を行い、オイル高生産株におけるオイル蓄積に関与する代謝機構を解明することを第二の目的とした。本研究により得られた成果を各章ごとにまとめる。

第2章では、トランスクリプトーム解析で追跡対象とする遺伝子群を選抜することを目的に、*F. solaris* におけるオイル生産関連遺伝子の同定を試みた。初めに、遺伝子領域予測ソフトである AUGUSTUS を *F. solaris* 用にカスタマイズした。カスタマイズした AUGUSTUS を用いて、遺伝子領域の再予測を実施したところ、核ゲノム上の総遺伝子数は 20,455 個となった。次に、オイル蓄積に関与すると考えられる代謝経路 (解糖系、TCA 回路、窒素代謝、カルビン回路、糖新生、多糖合成経路、多糖分解経路、脂肪酸合成経路、グリセロ脂質合成経路、多価不飽和脂肪酸合成経路、脂肪酸分解経路) 中の遺伝子の探索を行った。ホモロジー検索、モチーフ・ドメイン検索、系統樹解析の結果、283 個の TAG 蓄積関連遺伝子を同定することが可能であった。AUGUSTUS カスタマイズ前には同定されていない遺伝子が 86 個含まれていたことから、遺伝子領域予測が高精度化されたことが確認された。さらに、より詳細に *F. solaris* の代謝経路を解析するために、独自のタンパク質の局在予測解析フローを構築した。構築したフローの予測精度を評価したところ、単独の局在予測プログラムでは成しえない高い精度を有していることが示された。また、構築した予測解析フローの確度を評価すると共に、学習により生じた遺伝子領域変化の妥当性を評価するために、*F. solaris* タンパク質に由来する輸送ペプチドと GFP との融合タンパク質の細胞内局在を実験的に調べることにした。その結果、構築した予測解析フローの予測結果と、実験的に確認したタンパク質の局在が一致したことから、本予測解析フローの有効性が示された。加えて、AUGUSTUS の学習によって、より正確に輸送ペプチドを含む遺伝子領域が予測可能になったことが示された。最後に、283 個のオイル生産関連遺伝子がコードするタンパク質の局在予測解析を行い、*F. solaris* におけるオイル生産に係る炭素フラックス関連代謝経路の細胞内局在予測を行った。その結果、AUGUSTUS の学習前ではオイル生産に係る炭素フラックス関連代謝経路にギャップが多

かったのに対し、学習後では多くのギャップが埋まり、よりつながった代謝経路を予測できることが確認された。予測された *F. solaris* の TAG 蓄積関連代謝経路は、同じ羽状目珪藻に分類される *P. tricornutum* の代謝経路と酷似していた。特定種におけるオイル高生産機構の解明に至るような核心的な知見は見出されなかったものの、遺伝子予測精度の向上と局在予測解析によって、遺伝子発現解析で追跡対象とする遺伝子群を選抜することが可能となった。

第3章では、*F. solaris* のトランスクリプトーム解析を実施し、動的な遺伝子発現応答をモニタリングすることで、オイル高生産に関与する代謝機構を明らかにすることを旨とした。*F. solaris* のオイル蓄積をモニタリングしたところ、オイル蓄積しながら細胞増殖を行うことが確認された。オイル蓄積の各フェーズにおいて RNA を抽出し、次世代シーケンサを用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した。その結果、脂肪酸・TAG 合成経路中の遺伝子の発現増加が確認された。また、オイル蓄積中にも関わらず、ミトコンドリアの脂肪酸分解経路遺伝子の発現が増加していることが明らかとなった。脂肪酸分解経路の活性化は、増殖とオイル蓄積の同時進行が見られていない他の微細藻類では確認されておらず、両者の密接な関連性が示唆された。以上より、*F. solaris* では、①脂肪酸・グリセロ脂質合成経路の活性化、②脂肪酸分解によるエネルギーの獲得が生じ、オイル生産中にも細胞増殖が維持され、オイル高生産性を獲得していると考えられた。

本研究では、微細藻類を用いたバイオ燃料生産の生産性向上を目指し、生育とオイル蓄積が同時進行する代謝機構を遺伝子レベルで明らかにした。具体的には、まず、既存の大規模シーケンス解析技術に改変を加え、非モデル生物である *F. solaris* に対して適用可能にし、各遺伝子により発現されるタンパク質の局在を明らかにした。今回の研究手法は他の非モデル生物にも適用できるものである。また、従来の遺伝子発現解析では見出されていない生育とオイル蓄積が同時に進行している際に、ミトコンドリアの脂肪酸分解経路の発現が促進されるという遺伝子発現変動が明らかとなり、当該株のオイル高生産に寄与する代謝機構を明らかにした。以上より、本研究の学術的な意義は大きいと言えるが、本研究で得られた知見を基に代謝改変を行うことで、当該株のオイル生産性を更に高めることができると期待されることから、本研究の工学的な意義も大きい。そのため、博士論文最終試験の審査基準を満たし、合格と判断した