

(様式5)

指導教員 承認印	主	副	副
	㊟	㊟	㊟

令和元年 12月 9日
Year Month Day

学位（博士）論文要旨
(Doctoral thesis abstract)

論文提出者	生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻 (博士課程) 平成 <u>29</u> 年度入学(Your Entrance Fiscal Year) 氏名 <u>野々山 智美</u> ㊟ (Your Name(Family, First) and Seal)			
主指導教員 氏名 Chief Advisor's Name	田中 剛	副指導教員 氏名 Education Advisor's Name	竹山 春子	副指導教員 氏名
論文題目 Title	オイル高蓄積珪藻 <i>Fistulifera solaris</i> の脂質代謝に関わるオルガネラ間相互作用の解析 Analysis of organelle interactions involving lipid metabolism in the oleaginous diatom <i>Fistulifera solaris</i>			
論文要旨 (和文要旨(2000 字程度)または英文要旨(500words)) ※欧文・和文どちらでもよい。但し、和文の場合は英訳を付すこと。 Write a summary in Japanese (2000 characters) or in English (500words). If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English. <p>オイル高蓄積珪藻 <i>Fistulifera solaris</i> は高いトリアシルグリセロール (TAG)含有率を示すことから、当該株より抽出した TAG を利用したバイオ燃料生産の実現が期待されている。これまでに、当該株を用いた屋外大量およびバイオ燃料生産プロセスが確立されており、コスト試算もされているが、経済産業省が 2030 年度までの目標として掲げるバイオジェット燃料価格と比較すると、現状では約 2 倍の生産コストが必要である。この課題の解決に向けて <i>F. solaris</i> の TAG 代謝経路解明が求められており、これまでにゲノム解析、トランスクリプトーム解析、リポドーム解析が行われてきたが TAG 分解経路および合成経路ともに未知の機構も多く残されている。そこで本研究は、近年様々な生物種において細胞の代謝に関与することが明らかになってきた「オルガネラ間相互作用」に着目した解析を行うことで、<i>F. solaris</i> における TAG 代謝機構を解明することを目的とした。</p> <p>第 1 章では、珪藻で報告されている TAG 代謝経路を総括した。その結果、動物や高等植物等で重要な TAG 分解経路として報告されているリポファジー (オイルボディ - 液胞間相互作用) が、珪藻で解析されておらず、TAG 生産性向上に向けた代謝改変のターゲットになり得ることを見出した。また、<i>F. solaris</i> が他の珪藻と比較して高い TAG 生産性を示す一因として、二次共生の過程により生じた葉緑体と小胞体 (Endoplasmic reticulum: ER) の代謝経路の局在パターンの多様性に基づくものである可能性が考えられた。以上より、バイオ燃料生産時の TAG 生産性向上に向け、<i>F. solaris</i> のオイルボディ - 液胞間相互作用および葉緑体 - ER 間相互作用の解析が求められることを示し、本研究の目的と意義を明らかにした。</p> <p>第 2 章では、液胞によってオイルボディを分解するオートファジーの一種であるリポファジーが、<i>F. solaris</i> で起こり得るかどうか評価した。オートファジーの阻害剤を用いた実験結果より、オートファジーが栄養源再添加に伴う TAG 分解に影響することが示唆された。オートファジーと TAG 分解との関連は、トランスクリプトーム解析の結果より得られた TAG 分解時のオートファジー関連遺伝子の発現向上からも裏付けられた。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた液胞とオイルボディの観察結果から、栄養源再添加に伴う TAG 分解時には液胞がオイルボディを被覆する割合が増加することを明らかにし、TAG 分解に液胞とオイルボディ</p>				

イの物理的接触が関与することを示した。以上より、オルガネラ間相互作用の一種であるリポファジーは *F. solaris* に存在することを明らかにした。本研究により、*F. solaris* を含めた珪藻で初めてリポファジーを確認した。また、オートファジー阻害剤の添加により、TAG 分解条件において約 1.4 倍のオイルボディ体積向上を実現し、リポファジーの阻害がバイオ燃料生産に向けた TAG 生産性向上に応用可能であることを示した。

第 3 章では、TAG 合成を担う葉緑体と ER に着目し、*F. solaris* に特異的な葉緑体および ER 上の代謝経路の特定を試みた。珪藻綱あるいは珪藻を三次共生して進化した渦鞭毛藻由来の 108 種のゲノム情報またはトランスクリプトーム情報を用い、*F. solaris* のゲノム情報と比較した。その結果、分岐鎖アミノ酸合成経路、リシン合成経路、ピルビン酸ハブ経路、スクアレン合成経路の合計 4 経路に関して、*F. solaris* が特異的な局在パターンを有する可能性を示した。このうち、特に分岐鎖アミノ酸合成経路とリシン合成経路に関しては、通常は葉緑体局在する酵素の一部が ER に局在することを *in silico* 解析で予測した。局在パターンが変化した酵素の多くは、TAG 合成の基質として利用される NADPH を要求する反応を触媒するものだった。また、*F. solaris* 中の分岐鎖アミノ酸合成経路のケトール酸レダクトイソメラーゼ (KR) の局在を、GFP を用いて確認した。その結果、他の珪藻とは異なり *F. solaris* では、KR が葉緑体に局在しないことを確認した。KR 遺伝子は、*F. solaris* では TAG 合成時に発現が大幅に向上することから、TAG 合成に寄与している可能性を示した。以上より、TAG 合成時の基質を生成する酵素群の局在パターンが葉緑体と ER 間で変化することで、*F. solaris* は他の珪藻と比較して高い TAG 生産性を獲得した可能性を示した。本研究により、従来のオミックス解析は特定できなかった *F. solaris* のオイル高蓄積能に寄与する代謝経路の候補を絞り込むことができた。

第 4 章では、本研究により新たに明らかになった *F. solaris* における TAG 代謝機構をまとめた。

本研究では、オルガネラ間相互作用に着目した TAG 代謝機構の解析を珪藻で初めて実施した。その結果、これまでに珪藻で発見されていなかった TAG 分解機構を発見した。また *F. solaris* に特異的な TAG 合成に関連する代謝経路の局在パターンを特定した。今後は、本研究で得られた知見に基づいた代謝改変を行うことで、バイオ燃料生産時の TAG 生産性向上につながると期待される。

(英訳) ※和文要旨の場合(300 words)

If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English.(300 words)

An oleaginous diatom *Fistulifera solaris* is a promising candidate for biofuel production because of its high triacylglycerol (TAG) content. Although the outdoor mass cultivation technique for this strain is available, the biofuel production cost should be twice lower at least in terms of the aim in 2030 which was proposed by Ministry of Economy, Trade and Industry. In order to enhance TAG productivity, TAG metabolism in *F. solaris* has been analyzed by genomics, transcriptomics, and lipidomics. However, the critical factors controlling *F. solaris* TAG degradation or synthesis have not been fully identified. In this study, we analyzed TAG metabolism in *F. solaris* with new perspectives, organelle interactions. The effect of lipid droplet - vacuole interaction on TAG degradation was evaluated by inhibitor assay, confocal microscopy, and gene transcription level. The results of these experiments revealed that the lipid droplet - vacuole interaction called lipophagy was one of the lipid droplet degradation mechanism in *F. solaris*. This is the first study for observation of lipophagy among diatoms. The inhibition of lipophagy achieved 1.4 times higher TAG contents in TAG degradation condition, and this result shows metabolic engineering of lipophagy would enhance TAG productivity for biofuel production. Furthermore, the effect of chloroplast - ER interaction on TAG synthesis in *F. solaris* was analyzed by comparison of genome and transcriptome data of diatoms and dinotoms. As a result, four pathways were predicted to show specific localization patterns of *F. solaris*. Especially, ketol-acid reductoisomerase (KR) on branched chain amino acids (BCAA) synthesis pathway was predicted to localize on ER whereas KR in other diatoms localized on chloroplast. GFP localization analysis also supported this specific localization. Because KR requires NADPH, which is one of the substances for TAG synthesis, the localization pattern changes might contribute to oleaginous phenotype of *F. solaris*. In conclusion, the analysis of organelle interactions indicated that lipid droplet - vacuole interaction affects TAG degradation, and chloroplast - ER interaction affects TAG synthesis, respectively. This is a new insight for the TAG metabolism of *F. solaris*, and it would be a target for metabolic engineering to enhance TAG productivity for biofuel production.