

(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 ⑩
副査 竹山 春子 ⑩
副査 宮浦 千里 ⑩
副査 田中 秀幸 ⑩
副査 吉野 知子 ⑩

学位申請者	<u>共同先進健康科学</u> 専攻 平成 <u>23</u> 年度入学 学籍番号 <u>11702107</u> 氏名 <u>野島 大佑</u>
申請学位	博士 (生命科学)
論文題目	海洋珪藻 <i>Fistulifera</i> 属 JPCC DA0580 株のオレオソーム局在タンパク質の解析

論文審査要旨 (2,000 字程度)

近年、化石燃料の枯渇や地球温暖化の影響により、代替燃料としてバイオ燃料が着目されている。バイオ燃料とはバイオマスから得られる燃料であり、バイオエタノールやバイオディーゼル燃料(Bio diesel fuel; BDF)に代表される。バイオマスとしてはトウモロコシ、大豆、木質バイオマス等が用いられてきたが、食糧や飼料との競合及び広大な耕地の必要性などの問題点から、より生産性の高い藻類を用いたバイオ燃料生産が注目されている。当研究室では BDF 生産を目的とした微細藻類のスクリーニングを行い、オイル含量が 60% と非常に高い海洋珪藻 *Fistulifera* 属 JPCC DA0580 株を見出した。微細藻類は細胞内で合成したオイルをオレオソームと呼ばれる細胞内オルガネラに蓄積しているが、その大きさや数は微細藻類の種類によって様々であり、またその培養法によっても大きく変化する動的な挙動が観察されている。これまで、このような動的挙動を制御する生物学的因子を解析した研究はほとんど行われていない。その為、微細藻類におけるオレオソーム形成や分解のメカニズム解明については不明な点が多い。動物細胞や高等植物といった生物では、オレオソーム形成機構及び分解機構とそのオレオソームに特異的に存在するタンパク質がオイル蓄積に関与していることが明らかになってきている。一方で、微細藻類におけるオレオソーム解析を行った報告例は非常に少なく、また珪藻における報告例はない。そこで本研究では海洋珪藻 *Fistulifera* 属 JPCC DA0580 株のオレオソーム形成機構を解明することを目指し、珪藻由来オレオソームのプロテオーム解析の基盤技術を確立し、そのオレオソーム形成関連タンパク質を同定することを目的とした。

第 1 章では、動物細胞及び高等植物で報告されているオレオソーム形成機構及びオレオソーム局在タンパク質の機能、微細藻類のオレオソームのプロテオーム解析の現状、珪藻のオレオソームプロテオーム解析の問題点をまとめ、本研究の目的と意義を明らかにした。

第 2 章ではショットガンプロテオーム解析に基づくオレオソーム局在タンパク質の同定を試みた。珪藻は細胞壁にシリカで形成される珪殻とよばれる非常に強固な殻を有している為、まずビーズを用いた破碎法と超音波破碎の 2 条件の細胞破碎法の検討を行った。その結果、ビーズを用いた破碎法において、十分な破碎効率とオレオソーム画分の回収を行うことが出来た。さらに回収したオレオソーム画分からタンパク質の抽出

を行い、nanoLC-MS を用いてペプチドの解析を行い、得られた MS/MS スペクトルと全ゲノムデータベースと比較することでタンパク質の同定を行った。オレオソーム画分から同定したタンパク質と細胞質画分との比較解析により、オレオソーム画分に特異的に存在する 22 タンパク質を特定した。更に *in silico* 解析を行い、細胞内の局在予測及びアミノ酸疎水性度による膜貫通領域予測を行い、5 タンパク質をオレオソーム局在タンパク質候補として同定した。同定したオレオソーム局在タンパク質候補に対し、緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合したタンパク質発現ベクターを構築し、パーティクルガン法により遺伝子の導入を行った。その結果、同定した 5 タンパク質のうち、2 タンパク質でオレオソーム上に GFP 蛍光を観察できた。これにより本手法を用いたオレオソーム局在タンパク質の同定が可能であることが示された。更に珪藻類として世界初となるオレオソーム局在タンパク質の同定に成功した。

第 3 章ではプロテオーム解析に基づくオレオソーム形成関連タンパク質の同定を行い、比較解析法からは同定できない新たなオレオソーム形成に関与するタンパク質の同定を行った。回収したオレオソーム画分を塩、界面活性剤、カオトロピック塩をそれぞれ含む溶液で洗浄することで、主要な混入タンパク質であるクロロフィル結合タンパク質の指標となるクロロフィルを減少させる最も効果的な方法を検討した。その結果、カオトロピック塩である尿素を含む溶液で洗浄する方法が最もクロロフィルの混入を減少出来ることが示された。尿素溶液で洗浄したオレオソーム画分からタンパク質を抽出し、第 2 章と同様に nanoLC-MS を用いてタンパク質の同定を行った。その結果、これまで同定されていなかった小胞体膜に局在するリボソーム由来のタンパク質や骨格タンパク質として小胞形成に関与するクラスリン、細胞内小胞輸送に関与する Rab ファミリータンパク質等が同定され、当該株のオレオソーム形成が動物細胞や高等植物同様に小胞体膜に由来し、これらの小胞形成・輸送タンパク質がオレオソーム形成に関連していることが示唆された。

第 4 章では、本研究により得られた成果をまとめ、当該株におけるオレオソーム形成機構の推定を行った。

本研究により、珪藻におけるオレオソーム局在タンパク質を同定する手法を構築され、世界初となる珪藻のオレオソーム局在タンパク質の知見を得ることが出来た。また本手法は単離の困難なオルガネラを持つ微細藻類のプロテオーム解析を行う上で重要な技術である。またこれらプロテオーム解析により得られたオレオソームの形成に関連するタンパク質情報は、ゲノミクスやトランスクリプトミクスからは得られないオイル蓄積に関する重要な知見となり、メタボリックエンジニアリングの新規ターゲットとなり得ることから、微細藻類を用いた更なるオイル高生産への応用が期待できる。