

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-148005

(P2017-148005A)

(43) 公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)		
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/12</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/12	Z N A C	4 B O 6 4
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/64</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	7/64		4 B O 6 5
<b>C 1 0 L</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 0 L	1/02		4 H O 1 3

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2016-35219 (P2016-35219)  
 (22) 出願日 平成28年2月26日 (2016. 2. 26)

(71) 出願人 506141225  
 株式会社ユーグレナ  
 東京都港区芝五丁目33番1号  
 (71) 出願人 505127721  
 公立大学法人大阪府立大学  
 大阪府堺市中央区学園町1番1号  
 (74) 代理人 100088580  
 弁理士 秋山 敦  
 (74) 代理人 100111109  
 弁理士 城田 百合子  
 (72) 発明者 中澤 昌美  
 大阪府堺市中央区学園町1番1号 公立大学  
 法人大阪府立大学内

最終頁に続く

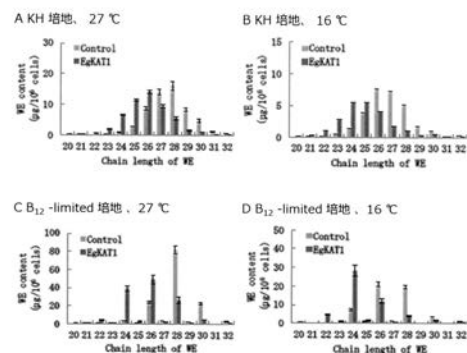
(54) 【発明の名称】 ユーグレナ、バイオ燃料組成物及びワックスエステルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】酸化、劣化しにくく、寒冷地でもバイオ燃料として好適に使用できるワックスエステルを含有するユーグレナ、バイオ燃料組成物及びワックスエステルの製造方法を提供する。

【解決手段】ワックスエステルを含有するユーグレナであって、ワックスエステルは、炭素原子数24~26のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とする。炭素原子数24~26のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とするワックスエステルを含むバイオ燃料組成物である。ユーグレナを、ユーグレナが増殖可能な増殖至適温度で培養する至適温度培養工程と、増殖至適温度よりも低い低温で、かつ酸素の供給のない条件下に、ユーグレナを保持する低温低酸素処理工程と、ユーグレナからワックスエステルを抽出する抽出工程と、を行うワックスエステルの製造方法である。

【選択図】 図25



各因子の組み合わせによる各炭素鎖長別WE量の変動

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ワックスエステルを含有するユーグレナであって、  
前記ワックスエステルは、炭素原子数 24 ~ 26 のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とすることを特徴とするユーグレナ。

## 【請求項 2】

前記ワックスエステルは、炭素原子数 12 の鎖長の脂肪酸を主成分とする脂肪酸と炭素原子数 12 の鎖長の脂肪アルコールを主成分とする脂肪アルコールがエステル結合してなることを特徴とする請求項 1 記載のユーグレナ。

## 【請求項 3】

3-ケトアシルCoAチオラーゼ (KAT) 1 遺伝子の発現が抑制されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のユーグレナ。

## 【請求項 4】

炭素原子数が奇数の鎖長の脂肪酸及び脂肪アルコールのそれぞれの量が、炭素原子数が偶数の鎖長の脂肪酸及び脂肪アルコールのそれぞれの量よりも少ないことを特徴とする請求項 2 記載のユーグレナ。

## 【請求項 5】

炭素原子数 24 ~ 26 のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とするワックスエステルを含むバイオ燃料組成物。

## 【請求項 6】

ユーグレナを、該ユーグレナが増殖可能な増殖至適温度で培養する至適温度培養工程と、

前記増殖至適温度よりも低い低温で、かつ酸素の供給のない条件下に、前記ユーグレナを保持する低温低酸素処理工程と、

前記ユーグレナからワックスエステルを抽出する抽出工程と、を行うことを特徴とするワックスエステルの製造方法。

## 【請求項 7】

3-ケトアシルCoAチオラーゼ (KAT) 1 遺伝子の発現が抑制された KAT1 ノックダウンユーグレナを、ユーグレナが増殖可能な増殖至適温度で培養する至適温度培養工程と、

前記増殖至適温度よりも低い低温で、かつ酸素の供給のない条件下に、前記 KAT1 ノックダウンユーグレナを保持する低温低酸素処理工程と、

前記 KAT1 ノックダウンユーグレナからワックスエステルを抽出する抽出工程と、を行うことを特徴とするワックスエステルの製造方法。

## 【請求項 8】

前記至適温度培養工程では、ビタミン B<sub>12</sub> の量を、ユーグレナの細胞分裂を阻害する程度の少量となるように制限したビタミン B<sub>12</sub> 制限培地で、前記ユーグレナの培養を行うことを特徴とする請求項 6 又は 7 記載のワックスエステルの製造方法。

## 【請求項 9】

前記抽出工程では、炭素原子数 24 ~ 26 のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とする前記ワックスエステルを抽出することを特徴とする請求項 6 乃至 8 いずれかが記載のワックスエステルの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ワックスエステルを含有するユーグレナ、バイオ燃料組成物及びワックスエステルの製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、化石燃料の枯渇や環境への影響等の問題から、代替燃料への期待が高まっている

10

20

30

40

50

。代替燃料の1つとして期待されるバイオ燃料は、輸送用燃料の代替物としての利用が可能なエネルギー資源である。特に、光合成生物由来バイオ燃料の利用は、概念的に大気中の二酸化炭素量を増加させることがなく、カーボンニュートラルとして扱われる。二酸化炭素が地球温暖化の主因とされることを念頭に置くと、バイオ燃料利用は地球温暖化の防止にも微力ながら寄与することができる。植物由来バイオ燃料の例としてサトウキビ、トウモロコシ等を原料としたバイオ燃料の生産が行われているが、これらは食品としても利用されるため競合による価格高騰や倫理面が問題となる。その問題へのアプローチとしてジャトロファ等の非可食性植物を用いたバイオ燃料研究も進んでいるが、高コストという問題に加え、食糧のための耕地と競合するという問題が指摘されている。これらの問題意識を背景として近年、欧米を含む世界中で微細藻類由来バイオ燃料の研究が進められている。微細藻類は植物と比較して、成長が早く、単位面積当たりの油脂生産量が10倍以上高い利点がある。さらに耕地不適合の土地でも太陽光が得られれば培養が可能であるため、植物用耕地を使用せずに済む利点もある。

10

#### 【0003】

ユーグレナ(*Euglena*)由来のワックスエステルを用いたバイオ燃料の実用化研究が進んでいる。

ユーグレナは、好気状態では余剰の光合成産物や外部の炭素源から得た炭素を-1,3-グルカンであるパラミロンとして貯蔵する。図1に示すように、低酸素状態では蓄積したパラミロンを出発物質として、ワックスエステルを発酵生産する。

20

#### 【0004】

図1の低酸素状態でのユーグレナワックスエステル生産経路において生産されるワックスエステルは、主成分がミリスチン酸-ミリスチルアルコール(C14:0-C14:0)である(非特許文献1)。

一般的に、多くの微細藻類が細胞内に蓄積するオイルは、C16以上かつ多価不飽和脂肪酸を多く含むトリアシルグリセロールであり、酸化および劣化しやすい。

それに対し、ユーグレナワックスエステルは、主成分がミリスチン酸ミリスチル(C14:0-C14:0Alc)であり、他の生物由来のものと比較して短い脂肪酸、脂肪アルコールからできていると共に、不飽和結合を持たないため、他の微細藻類由来オイルに比べて酸化に強く、軽質なバイオディーゼルへと変換可能であるという利点がある。

30

#### 【先行技術文献】

##### 【非特許文献】

#### 【0005】

【非特許文献1】Inui H et al., (1983) :Production and composition of wax esters by fermentation of *Euglena gracilis*. *Agric Biol Chem*, 47, 2669-2671.

【非特許文献2】Guy A. et al., (1996) : Lipid and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1302. 17-45.

#### 【発明の概要】

##### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

ユーグレナは細胞内に乾燥重あたり30%程度のワックスエステルを生産するが、バイオ燃料として実用するにはさらなるワックスエステル生産量の向上が求められる。また、ワックスエステルをさらに目的用途に合ったバイオ燃料にするためには組成を改変することが望まれる。

40

#### 【0007】

本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、酸化、劣化しにくく、寒冷地でもバイオ燃料として好適に使用できるワックスエステルを含有するユーグレナ、バイオ燃料組成物及びワックスエステルの製造方法を提供することにある。

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

前記課題は、本発明のユーグレナによれば、ワックスエステルを含有するユーグレナで

50

あって、前記ワックスエステルは、炭素原子数24～26のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とすること、により解決される。

このように、ワックスエステルが、炭素原子数24～26のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とするため、炭素原子数が30以上である他の微細藻類由来のワックスエステルと比較して、酸化に強く、軽質で、凝固点も低く、寒冷地でもバイオ燃料として好適に使用可能なワックスエステルを得ることが可能となる。

また、このようなワックスエステルを含有するユーグレナを得ることができるので、ユーグレナを培養することにより、ワックスエステルの製造が可能となる。

#### 【0009】

このとき、前記ワックスエステルは、炭素原子数12の鎖長の脂肪酸を主成分とする脂肪酸と炭素原子数12の鎖長の脂肪アルコールを主成分とする脂肪アルコールがエステル結合してなるとよい。

また、3-ケトアシルCoAチオラーゼ(KAT)1遺伝子の発現が抑制されているとよい。

このように、中・長鎖脂肪酸伸長酵素のうちの一つである3-ケトアシルCoAチオラーゼ(KAT)1遺伝子の発現が抑制されているため、ユーグレナのワックスエステルの合成において、より短鎖長のワックスエステルを得ることが可能となる。

また、炭素原子数が奇数の鎖長の脂肪酸及び脂肪アルコールのそれぞれの量が、炭素原子数が偶数の鎖長の脂肪酸及び脂肪アルコールのそれぞれの量よりも少なくてもよい。

#### 【0010】

前記課題は、本発明のバイオ燃料組成物によれば、炭素原子数24～26のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とするワックスエステルを含むバイオ燃料組成物であること、により解決される。

#### 【0011】

前記課題は、本発明のワックスエステルの製造方法によれば、ユーグレナを、該ユーグレナが増殖可能な増殖至適温度で培養する至適温度培養工程と、前記増殖至適温度よりも低い低温で、かつ酸素の供給のない条件下に、前記ユーグレナを保持する低温低酸素処理工程と、前記ユーグレナからワックスエステルを抽出する抽出工程と、を行うこと、により解決される。

また、前記課題は、本発明のワックスエステルの製造方法によれば、3-ケトアシルCoAチオラーゼ(KAT)1遺伝子の発現が抑制されたKAT1ノックダウンユーグレナを、ユーグレナが増殖可能な増殖至適温度で培養する至適温度培養工程と、前記増殖至適温度よりも低い低温で、かつ酸素の供給のない条件下に、前記KAT1ノックダウンユーグレナを保持する低温低酸素処理工程と、前記KAT1ノックダウンユーグレナからワックスエステルを抽出する抽出工程と、を行うこと、により解決される。

このように、増殖至適温度よりも低い低温で、かつ酸素の供給のない条件下に、ユーグレナを保持する低温低酸素処理工程を行うことにより、ワックスエステルを構成する脂肪酸及び脂肪アルコールの鎖長が短縮化され、ワックスエステルの低分子化が達成できる。その結果、酸化、劣化し難く、寒冷地でもバイオ燃料として好適に利用できるワックスエステルを製造可能となる。

また、低温低酸素処理工程の前に至適温度培養工程を行っているため、至適温度培養工程で十分に藻体を増殖させてから、増殖が抑制される低温低酸素処理工程で、ワックスエステルの低分子化を促進することができる。従って、低温低酸素処理工程だけを行う場合よりも、短時間で、ワックスエステルの組成を改善できる。

#### 【0012】

このとき、前記至適温度培養工程では、ビタミンB<sub>12</sub>の量を、ユーグレナの細胞分裂を阻害する程度の少量となるように制限したビタミンB<sub>12</sub>制限培地で、前記ユーグレナの培養を行ってもよい。

このように構成しているため、炭素原子数の少ない炭素原子数24～26のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物の量が、より多くなり、ワックスエステルの低分子化がより促進される。

10

20

30

40

50

また、前記抽出工程では、炭素原子数 24 ~ 26 のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とする前記ワックスエステルを抽出してもよい。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、増殖至適温度よりも低い低温で、かつ酸素の供給のない条件下に、KAT1 ノックダウンユーグレナを保持する低温低酸素処理工程を行うことにより、ワックスエステルを構成する脂肪酸及び脂肪アルコールの鎖長が短縮化され、ワックスエステルの低分子化が達成できる。その結果、酸化、劣化し難く、寒冷地でもバイオ燃料として好適に利用できるワックスエステルを製造可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】低酸素状態でのユーグレナワックスエステル生産経路を示す図である。

【図2】ユーグレナミトコンドリアの脂肪酸合成系を示す図である。

【図3】温度条件による細胞内パラミロン量の変動 (n=3) を示すグラフである。

【図4】低酸素処理時の温度条件の違いによるワックスエステル総量の変動 (n=3) を示すグラフである。

【図5】低酸素処理時の温度条件の違いによる炭素鎖長別ワックスエステル量の変動 (n=3) を示すグラフである。

【図6】低酸素処理時の温度条件の違いによる脂肪酸組成の変動 (n=3) を示すグラフである。

【図7】低酸素処理時の温度条件の違いによる脂肪アルコール組成の変動 (n=3) を示すグラフである。

【図8】低酸素処理時の温度条件の違いによるモデル燃料の凝固点低下を示すグラフである。

【図9】半定量RT-PCRによるKAT mRNA発現抑制効果の確認結果を示す図である。

【図10】好気状態におけるRNAi後ユーグレナ細胞の増殖曲線および生存率 (n=3) を示すグラフである。

【図11】低酸素0時間、48時間曝露後の細胞内パラミロン量 (n=3) を示すグラフである。

【図12】低温処理とEgKAT1 ノックダウンの組み合わせによるワックスエステル総量の変動を示すグラフである。

【図13】低温処理とEgKAT1 ノックダウンの組み合わせによる炭素鎖長別ワックスエステル量の変動を示すグラフである。

【図14】低温処理とEgKAT1 ノックダウンの組み合わせによる脂肪酸組成の変動のグラフである。

【図15】低温処理とEgKAT1 ノックダウンの組み合わせによる脂肪アルコール組成の変動のグラフである。

【図16】低温処理とEgKAT1 ノックダウンの組み合わせによるモデル燃料の融点・凝固点変動のグラフである。

【図17】ビタミンB<sub>12</sub>制限による生育への影響のグラフである。

【図18】ビタミンB<sub>12</sub>制限によるパラミロン分解の変化を示すグラフである。

【図19】ビタミンB<sub>12</sub>制限によるワックスエステル総量の変動を示すグラフである。

【図20】ビタミンB<sub>12</sub>制限による炭素鎖長別ワックスエステル量の変動を示すグラフである。

【図21】ビタミンB<sub>12</sub>制限による脂肪酸組成の変動を示すグラフである。

【図22】ビタミンB<sub>12</sub>制限による脂肪アルコール組成の変動を示すグラフである。

【図23】半定量RT-PCRによるKAT mRNA発現抑制効果の確認結果である。

【図24】各因子の組み合わせによるワックスエステル総量の変動を示すグラフである。

【図25】各因子の組み合わせによる各炭素鎖長別ワックスエステル量のグラフである。

【図26】各因子の組み合わせによる脂肪酸組成の変動を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 27】各因子の組み合わせによる脂肪アルコール組成の変動を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、ユーグレナ (*Euglena*)、バイオ燃料組成物及びワックスエステルの製造方法に関する。以下、本発明に係るユーグレナ、バイオ燃料組成物及びワックスエステルの製造方法について、詳細に説明する。

文中で特に断らない限り、本明細書で用いるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解される意味と同様の意味を有する。本明細書に記載されたものと同様又は同等の任意の方法及び材料は、本発明の実施又は試験において使用することができるが、好ましい方法及び材料を以下に記載する。

【0016】

ワックスエステルとは、脂肪酸と脂肪アルコールがエステル結合した化合物の総称をいう。

RNAi (RNA interference) とは、二本鎖RNAにより配列特異的に遺伝子発現が抑制される現象をいう。

【0017】

本発明のユーグレナは、ユーグレナ細胞を至適温度で培養した後、ワックス生産プロセスのみ温度を下げ、低温での低酸素処理を施して、ワックスエステルを低分子化したユーグレナである。また、至適温度における培養をビタミンB<sub>12</sub>欠乏培地で培養したものであってもよいし、3-ケトアシルCoAチオラーゼ (KAT) 1遺伝子の発現が抑制されたユーグレナを原料として至適温度での培養と低温での低酸素処理を行ったものであってもよい。

本発明のユーグレナは、炭素原子数 24 ~ 26 のうちいずれかの鎖長のワックスエステル化合物を主成分とし、炭素原子数 12 の鎖長の脂肪酸を主成分とする脂肪酸と炭素原子数 12 の鎖長の脂肪アルコールを主成分とする脂肪アルコールがエステル結合してなるワックスエステルを含有する。本発明のユーグレナは、3-ケトアシルCoAチオラーゼ (KAT) 1遺伝子の発現が抑制されたものであってもよい。

【0018】

<ユーグレナ>

ユーグレナとは、動物学や植物学の分類でユーグレナ属 (*Euglena*) に分類される植物、その変種、その変異種のすべてを含む。

【0019】

ここで、ユーグレナ属 (*Euglena*) の微生物とは、動物学では原生動物門 (Protozoa) の鞭毛虫綱 (Mastigophorea)、植物鞭毛虫亜綱 (Phytomastigophorea) に属するミドリムシ目 (Euglenida) のユーグレノイディナ亜目 (Euglenoidina) に属する微生物である。一方、ユーグレナ属の微生物は、植物学ではミドリムシ植物門 (Euglenophyta) のミドリムシ藻類綱 (Euglenophyceae) に属するミドリムシ目 (Euglenales) に属している。

【0020】

ユーグレナ属の微生物としては、具体的には、*Euglena acus*、*Euglena caudata*、*Euglena chadefaudii*、*Euglena deses*、*Euglena gracilis*、*Euglena granulata*、*Euglena intermedia*、*Euglena mutabilis*、*Euglena oxyuris*、*Euglena proxima*、*Euglena spirogyra*、*Euglena viridis*、*Euglena vermiformis*、*Euglena intermedia*、*Euglena piride*などが挙げられる。このうち特に、広く研究に利用されているユーグレナ グラシリス (*Euglena gracilis*) が好適である。特に、ユーグレナ・グラシリス (*E. gracilis*) Z株が挙げられる。

また、そのほか、ユーグレナ・グラシリス・クレプス、ユーグレナ・グラシリス・バルパチラス等の種や、ユーグレナ・グラシリス (*E. gracilis*) Z株の変異株 SM-ZK株 (葉緑体欠損株) や変種の var. *bacillaris*、これらの種の葉緑体の変異株等の遺伝子変異株を用いてもよい。また、その他のユーグレナ類、例えば *Astaia longa* を用いてもよい。

ユーグレナ属は、池や沼などの淡水中に広く分布しており、これらから分離して使用し

10

20

30

40

50

てもよく、また、すでに単離されている任意のユーグレナ属を使用してもよい。

【0021】

本発明のユーグレナは、その全ての変異株を包含する。また、これらの変異株の中には、遺伝的方法、たとえば組換え、形質導入、形質転換等により得られたものも含有される。

【0022】

<ユーグレナの低酸素状態におけるワックスエステル生産経路>

ユーグレナは、図1に示すように、低酸素状態では蓄積したパラミロンを出発物質として、ワックスエステルを発酵生産する。

微生物は嫌気状態に曝されると、解糖系から生じる還元力を消費するため発酵を行う。

低酸素状態のユーグレナにおいては、ワックスエステル発酵が還元力を消費する役割を担っている。

図1に示すように、低酸素状態に曝露されたユーグレナは、パラミロンを分解し、グルコース単位に分解する。その後、解糖を経て生産したピルビン酸はミトコンドリアでアセチルCoAに変換された後ATPを消費しない図2のde novo脂肪酸合成系を経て、アシルCoAを合成する。アシルCoAはミクロソームに輸送されワックスエステルへと合成されると考えられている。

【0023】

ワックスエステル発酵はユーグレナの持つ独特な代謝系の一つであり、脂肪酸酸化の逆行反応によるアセチルCoAからのde novo脂肪酸合成が含まれている(Inui et al., (1982): FEBS LETTERS, 150(1), 89-93)。この経路はATP消費を伴わない反応により構成されており、解糖より生じた還元力を消費することができる。これにより、ユーグレナは低酸素状態においても、ワックスエステル発酵によりATPを獲得しながら酸化還元バランスを維持し生存する。

他の生物の発酵形式として代表的なものにはエタノール発酵や乳酸発酵があるが、これらの発酵産物は水溶性であるため細胞内の代謝に干渉するとともに、細胞外へ放出される。

一方、ワックスエステルは不溶性であり、細胞への毒性が低いと考えられ、細胞内に蓄積される。また、低酸素条件下で蓄積したワックスエステルは好気条件になると分解されてエネルギー産生に用いられる。よって、ワックスエステル発酵は他生物の発酵に比べて炭素源のロスが少ない低酸素条件下でのエネルギー獲得系であるといえる(北岡正三郎(1989): ユーグレナ 生理と生化学 学会出版センター)。

【0024】

<ユーグレナのde novo脂肪酸伸長酵素>

ユーグレナミトコンドリアでは低酸素下で機能する脂肪酸合成系が存在する。本合成系は3-ケトアシルCoAチオラーゼ(EgKAT)によるアセチルCoA2分子の縮合から開始するため、ATPの消費を伴わずにアシル鎖伸長反応を進行する。

ユーグレナのワックスエステル発酵における脂肪酸合成はミトコンドリアの脂肪酸酸化系の逆反応と考えられている(Inui H et. al., (1984): European journal of biochemistry, 142(1), 121.126.)。図2に示すように、この反応はエノイルCoAレダクターゼ、エノイルCoAヒドラターゼ、ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ、3-ケトアシルCoAチオラーゼ(KAT)という4つの酵素から成り立っている。

【0025】

KATにはアセチルCoAとアシルCoAの縮合を触媒するThiolase I (E.C. 2.3.1.16)とアセチルCoA2分子の縮合を触媒するThiolase II (E.C.2.3.1.9)が知られている。

さらに、Thiolase Iには、様々な基質特異性を持つアイソザイムが細胞内に複数存在している。ユーグレナが持つKATに関しては、酸化の複合体酵素の研究にてKAT活性の存在が報告されている(Uwa Winkler et. al., (2003): Plant Physiology, 131, 753-762.)。しかし、ワックスエステル合成経路で機能するKATアイソザイムに関する報告はこれまでなかった。KATはアシルCoAの伸長反応を触媒するため、ワックスエステル鎖長制御を行

10

20

30

40

50

上で重要な因子だと考えられる。そこで本発明者らは、ワックスエステル合成系で機能するKATアイソザイムを探索するとともに、各KATアイソザイムの役割を明らかにするために研究を進めた。RNAiを用いたノックダウンによりワックスエステル生産量や組成の制御を行い、ユーグレナが生産するワックスエステルを改変することを目指した。

#### 【0026】

<ワックスエステルの製造方法>

本発明のワックスエステルの製造方法は、本発明のユーグレナを培養し、培養したユーグレナからワックスエステルを抽出することにより、ワックスエステルを製造する方法である。

本発明のワックスエステルの製造方法では、まず、ユーグレナを、ユーグレナが増殖可能な増殖至適温度で培養する至適温度培養工程を行う。ユーグレナとして、3-ケトアシルCoAチオラーゼ(KAT)1遺伝子の発現が抑制されたKAT1ノックダウンユーグレナを用いてもよい。

この工程では、ユーグレナの増殖至適温度である25~28の範囲内の温度で培養を行う。また、この時、培地に添加するビタミンB<sub>12</sub>を、通常よりも制限してもよい。ビタミンB<sub>12</sub>の量は、ユーグレナの細胞分裂を阻害する程度の少ない量とするとよい。

培地中には、酸素を含む気体、例えば、空気の通気を行う。

#### 【0027】

その後、増殖至適温度よりも低い低温で、かつ酸素の供給のない条件下に、ユーグレナを保持する低温低酸素処理工程を行う。

この工程では、ユーグレナの増殖至適温度よりも低い温度、例えば、0~25、好ましくは、15~20、更に好ましくは、17程度の温度とする。

また、培地中に酸素を含む気体の通気をしていたものを、停止させ、ユーグレナを沈降させることにより、培地を低酸素又は酸素欠乏状態とする。

#### 【0028】

その後、公知の方法により、ユーグレナからワックスエステルを抽出し、回収する。

回収したワックスエステルは、バイオ燃料として用いることのできるバイオ燃料組成物である。ワックスエステルは、単独でバイオ燃料として用いてもよいし、他の燃料に混合して用いてもよい。

#### 【実施例】

#### 【0029】

以下、具体的実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

各実験において、試薬は特に記載の無い限り、市販の特級試薬を用い、その他の材料及び装置は、文中に記載した。

#### 【0030】

(実験1 低温低酸素処理)

((方法))

本実験では、培養時ではなく細胞を低酸素に曝露する際の温度を、ユーグレナの培養至適温度である27と、ユーグレナが増殖しない低温である16として低酸素処理を行い、ワックスエステル合成におよぼす影響について調べた。

・材料及び試薬

本実験では、葉緑体を有する*Euglena gracilis* Z株(以下ユーグレナ野生株)をstreptomycin処理で人工的に葉緑体を永久欠損させた変異体*Euglena gracilis* SM-ZK株(以下ユーグレナ葉緑体欠損株)(Oda Y. et. al., (1982): J Gen Microbiol, 128, 853-858.)を使用した。

#### 【0031】

・ユーグレナの培養方法

従属栄養培地として表1のKoren-Hutner培地(KH培地)を用いた。

#### 【0032】

10

20

30

40

50

【表 1】

構成成分	量(g/l)	構成成分	量(mg/l)
アルギニン塩酸塩	0.5	EDTA・2ナトリウム	50
アスパラギン酸	0.3	硫酸鉄アンモニウム・6水和物	50
グルコース	12	硫酸マンガン・1水和物	18
グルタミン酸	4.0	硫酸亜鉛・7水和物	25
グリシン	0.3	モリブデン酸ナトリウム・4水和物	4.0
ヒスチジン塩酸塩	0.05	硫酸銅	1.2
リンゴ酸	6.5	バナジン酸アンモニウム	0.5
クエン酸・3ナトリウム	0.5	硫酸コバルト・7水和物	0.5
コハク酸・2ナトリウム	0.1	ホウ酸	0.6
硫酸アンモニウム	0.5	硫酸ニッケル・6水和物	0.5
炭酸水素アンモニウム	0.25	ビタミンB1	2.5
リン酸二水素カリウム	0.25	ビタミンB12	0.005
炭酸マグネシウム	0.6		
炭酸カルシウム	0.12		

## 【0033】

500ml容坂口フラスコに、pHを5.0に調整した150mlの表1のKH培地を分注し、121℃、15分のオートクレーブにより滅菌した。この培地に、4~5日間程度の培養で定常期に達したユーグレナ(15~20×10<sup>6</sup> cells/ml)を1ml接種し、24時間の連続光照射条件下、27℃で振盪培養した。

## 【0034】

細胞数計測には、粒子計数分析装置(CDA-1000)を用いた。10倍ルゴール液を、ヨウ素1g、ヨウ化カリウム2gにH<sub>2</sub>Oを全量が300mlになるよう添加して調製した。

ユーグレナの培養液とルゴール液を1:1の割合で混合することで細胞を固定し、この細胞液を適宜希釈して使用した。生存率測定はPropidium iodide (PI, Life Technologies<sup>TM</sup>)による死細胞染色を蛍光観察することにより行った。

## 【0035】

・細胞数の測定および生存率測定

細胞数計測では、ユーグレナ培養液を100μl採取し、0.5μlのPIを添加して約15分間静置した。その後、プレパラートを作製してHSオールインワン蛍光顕微鏡BZ-9000(KEYENCE)で観察した。撮影した写真をもとに、(全細胞数 - PI染色細胞数) / 全細胞数で生存率を算出した。

## 【0036】

・ユーグレナ低酸素曝露方法

本実験で原料ユーグレナ細胞として用いたユーグレナ葉緑体欠損株は、静置すると培養容器の底へ沈む性質があった。静置して沈降した条件では、通気が悪く、さらに溶存酸素は自らの呼吸によって消費されることから、細胞は低酸素状態にあると考えられる。そこで、本実験では、低酸素状態とは、ユーグレナ細胞を静置した状態と規定した。

## 【0037】

好気状態で対数増殖期後期まで生育させたユーグレナ細胞1.5 mlを1.5mlエッペンドルフチューブに移し、温度を16℃(低温)、27℃(通常時の培養温度)に設定したインキュベーター内で静置することにより低酸素処理を行った。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 8 】

## ・パラミロンの抽出・定量

遠心分離 (17400 × g, 1分) により、約  $0.5 \times 10^6$  cells のユーグレナを回収し、蒸留水で洗浄した後、上清を完全に除去した。パラミロン抽出はYokotaらの方法 (Yokota A et al., (1982) : Arch. Biochem. Biophys. 213 (2), 530-537.) に従って行った。定量はフェノール硫酸法 (Hodge J. E., Hofreiter, B. T. (1962) In Method in Carbohydrate Chemistry, 1, 380-394.) により行い、既知濃度のグルコース水溶液をスタンダードとして用いた。

## 【 0 0 3 9 】

## ・ワックスエステル抽出分析法

1.5 ml エピンドルフチューブにユーグレナ培養液 1.5 ml を移し、24h 静置して低酸素処理を行った。その後遠心分離 (17400 × g, 1分, 4 ) し上清を除去した後、蒸留水で洗浄し、完全に上清を除去した。ワックスエステル抽出及び定量は、Inuiらの方法 (Inui, H et al., (1982) ) に従って行った。ガスクロマトグラフィーはGC-2014を用い、2.5% Thermo-3000カラムで、235 の恒温分析により測定した。スタンダードには、既知濃度のC14:0-C14:0Alcを用いた。

## 【 0 0 4 0 】

## ・ワックスエステルの精製

粗抽出ワックスエステルをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。シリカゲルカラムは脱脂綿で先細部を密栓したパスツールピペット (直径5mm) にシリカゲル60 (230-400mesh, Merck) を充填することにより作製した。溶媒はヘキサン、溶出は1% ジエチルエーテルを含むヘキサンで行った。

## ・ワックスエステルのケン化

ワックスエステルのケン化はInuiらの方法 (Inui H et al. (1983) ) に従って行い、脂肪酸画分 (FA) と脂肪アルコール画分 (FAlc) を獲得した。

## 【 0 0 4 1 】

## ・脂肪酸のメチル化

ワックスエステルのケン化により獲得した脂肪酸に対して、トリメチルシリルジアゾメタンによるメチル化処理を行い、脂肪酸メチルエステルを獲得した。まず、トルエン、ヘキサン、メタノールを1:1:1で混合し、混合液200 μl で脂肪酸サンプルを溶解させた。トリメチルシリルジアゾメタンを10 μl 添加して数分放置した。反応後、飽和食塩水を200 μl 加えて混合後遠心し、有機相 (上層) と水相 (下層) を分離させた。有機相を回収・乾固し、脂肪酸メチルエステル画分 (FAME) とした。

## 【 0 0 4 2 】

## ・脂肪アルコール、メチル化脂肪酸の分析

ガスクロマトグラフィーはGC-2014を用い、2.5% Thermo-3000カラムで、155 の恒温分析により脂肪酸メチルエステル、脂肪アルコールを測定した。保持時間のスタンダードとしてC12-Alc、C14-Alc、C12-FAME、C14-FAMEを用いた。

## 【 0 0 4 3 】

## ・示差走査熱量計 (DSC) によるモデル燃料作製の熱特性解析

モデル燃料を用いて示差走査熱量測定 (DSC6100, Seiko Instruments Inc.) により熱分析を行った。

示差走査熱量計 (DSC) とは、一定の熱を与えながら、基準物質と試料の温度を測定して、試料の熱物性を温度差として捉え、試料の状態変化による吸熱反応や発熱反応を測定する装置である。

目的ワックスエステルの脂肪酸・脂肪アルコール組成をもとに市販の脂肪酸メチルエステルと脂肪アルコールを混合後湯煎により融解し、DSCサンプルとした。

-150 から80 までを5 /分で加熱し、続けて-150 まで冷却する2ステップのプログラムで凝固点、融点の測定を行った (Dunn RO, (1999) : Thermal analysis of alternative diesel fuels from vegetable oils., J AM oil Chem Soc, 76, 109-115.) 。

10

20

30

40

50

## 【0044】

( (結果) )

・培養温度が低酸素状態のパラミロン分解におよぼす影響

対数増殖期後期まで27 振盪培養したユーグレナ細胞を27 (対比例1)、16 (実施例1)の温度条件で低酸素処理し、処理前(0時間)および24時間後の細胞の貯蔵パラミロン量を、( (方法) )の「・パラミロンの抽出・定量」に示した方法で測定した。結果を、図3に示す。

図3の結果より、16 での低酸素処理(実施例1)により、27 (対比例1)と比べてパラミロン分解量は減少した。

## 【0045】

・培養温度によるワックスエステル合成への影響

27 で3日間振盪培養したユーグレナ細胞を27 (対比例1)、16 (実施例1)の温度条件で低酸素処理した。

24時間後に細胞ワックスエステルを抽出し、( (方法) )の「・ワックスエステル抽出分析法」に示した方法で測定した。ワックスエステルの総量を図4、鎖長ごとのワックスエステル量を図5に示した。ここでのワックスエステル総量とは、炭素鎖長20から32の各鎖長ワックスエステル量の合計とする。

## 【0046】

図4に示すように、16 での低酸素処理(実施例1)により、ワックスエステル総量は27 低酸素処理区(対比例1)の約50%となった。図5に示すように、27 低酸素処理区(対比例1)では、最も量の多いワックスエステル分子種(以下ワックスエステル組成ピークと記載)はC28であったが、16 低酸素処理区(実施例1)ではC26に変化した。C24、C25のワックスエステルは16 処理区(実施例1)において、27 処理区(対比例1)と比較して絶対量が増加していた。

## 【0047】

・脂肪酸組成、脂肪アルコール組成の変動

粗抽出ワックスエステルを( (方法) )の「・ワックスエステルの精製」「・ワックスエステルのケン化」に示した方法で精製、ケン化し、脂肪アルコールと脂肪酸を獲得した。脂肪酸は( (方法) )の「・脂肪酸のメチル化」に示した方法でメチル化した。脂肪酸メチルエステル、脂肪アルコールを( (方法) )の「・脂肪アルコール、メチル化脂肪酸の分析」に示した方法で測定した。脂肪酸組成の測定結果を図6に、脂肪アルコール組成の測定結果を図7に示す。

## 【0048】

図6より、16 での低酸素処理(実施例1)により、脂肪酸組成は、27 低酸素処理(対比例1)と比べC12、C13の割合が増加し、C14より長鎖脂肪酸の占める割合は減少した。

図7より、16 での低酸素処理(実施例1)により、脂肪アルコール組成は、27 低酸素処理(対比例1)と比べC12、C13の割合が増加し、C14より長鎖脂肪アルコールの占める割合は減少した。

## 【0049】

・低温処理によるモデル燃料の凝固点変化

図4の脂肪酸組成、図5の脂肪アルコール組成をもとに脂肪酸メチルエステルと脂肪アルコールを混合し、27 処理区モデル燃料(対比例1)と低温処理区モデル燃料(実施例1)を作製した。

( (方法) )の「・示差走査熱量計(DSC)によるモデル燃料作製の熱特性解析」の方法により、モデル燃料の凝固点を測定した。測定結果を、図8に示す。

27 処理モデル燃料(対比例1)の凝固点は20、低温処理モデル燃料(実施例1)の凝固点は15.7 であり、低温処理を行うことで約4 凝固点が低下した。

## 【0050】

ユーグレナの増殖過程を含めて16 の低温で行う場合には、ユーグレナの増殖が遅く、

10

20

30

40

50

全体として培養日数が長くなることが予想されるが、本実験では、実施例1において、予めユーグレナを27℃で振盪培養にすることで、4日目に定常期となり、定常期後の細胞に低酸素処理を行うことにより、培養日数を減らしつつ低温適性が向上したワックスエステルの獲得に成功した。

#### 【0051】

低温条件で低酸素曝露を行うと、パラミロンの分解量が減少した。そして、ワックスエステルの総量が減少してワックスエステル組成が短鎖側にシフトした。パラミロン分解量の減少およびワックスエステル総量の減少はユーグレナが低温に曝されたことにより代謝が低下したためだと考えられる。

#### 【0052】

(実験2 低温処理とEgKAT1ノックダウンの組み合わせがワックスエステル発酵に及ぼす影響)

実験1にて、ユーグレナを低温(16℃)に曝して低酸素処理すると、低分子化したワックスエステルが得られた。そこで、本実験では、低温処理とEgKAT1ノックダウンの組み合わせがワックスエステル発酵に及ぼす影響を解析した。

#### 【0053】

(反応機序)

ユーグレナ細胞が低酸素状態に陥ると、図1に示すように、細胞内に貯蔵されていたパラミロンがグルコース単位に分解され、解糖系を経てピルビン酸となり、ミトコンドリアに輸送された後、ピルビン酸:NAD<sup>+</sup>酸化還元酵素の作用によってアセチルCoAに酸化脱炭酸される。その後、ミトコンドリアに局在するde novo脂肪酸合成系でアシルCoAへと変換され、ミクロソームでワックスエステルへと合成される。ユーグレナの細胞内には、細胞内局在の異なる3種の脂肪酸合成系が存在する。一つは細胞質に存在する動物型脂肪酸合成系(FAS I)、もう一つは葉緑体に存在する植物型のACP依存型脂肪酸合成系(FAS II)、そして上に述べたミトコンドリア局在アセチルCoA依存型脂肪酸合成系である。

#### 【0054】

このように、細胞内に複数の脂肪酸合成系が存在する生物は非常に珍しい。FAS IとFAS IIはアセチルCoAのマロニルCoAへの活性化のステップから開始され、この反応でATPを消費する。そのため、解糖と組み合わせても正味のATPを獲得できない。

しかしミトコンドリアに存在する脂肪酸合成系は、図2に示すように、アセチルCoAの二分子縮合から始まる脂肪酸酸化の逆行で脂肪酸が合成され、この反応ではATPを消費しないため、低酸素状態でも脂肪酸を合成とエネルギー獲得を両立することができる。一般的な生物での脂肪酸酸化の逆行反応において、エノイルCoAの還元によるアシルCoA合成を触媒するエノイルCoAレダクターゼは、C4基質であるクロトニルCoAに作用しない。そのため、この系でのde novo脂肪酸合成はできず、中鎖脂肪酸の伸長反応系として機能している。

#### 【0055】

一方、ユーグレナにおいては基質特異性の異なる3種のアイソザイムが存在し、そのうち1種がC4基質クロトニルCoAに高い基質特異性を持つ。このことによりユーグレナでは、脂肪酸酸化の逆行経路で脂肪酸のde novo合成が可能となっている。

#### 【0056】

3-ケトアシルCoAチオラーゼ(KAT)は脂肪酸酸化及びその逆行経路で機能する酵素であり、図2において、アシルCoAとアセチルCoAのクライゼン縮合反応を触媒し3-ケトアシルCoAを合成する。この反応によりアシルCoAの炭素鎖長は2個分伸長する。

一般的な生物は基質特異性の異なるKATアイソザイムを複数持っている。ユーグレナワックスエステル合成系においても基質特異性の異なる複数のKATアイソザイムが機能していると考えられる。本発明者らは、これらのKATアイソザイムを制御することはワックスエステル組成の改変につながると考えた。

#### 【0057】

本発明者らは、調査を行ったところ、ユーグレナESTデータベース上(TBestDB)で6種

10

20

30

40

50

のEgKATアイソザイム (EgKAT1~6) の存在を見出した。

本実験では、ワックスエステル生産において機能するEgKATアイソザイムを特定し、それらの発現制御がワックスエステル生産に及ぼす影響を明らかにするために、RNAiによるEgKAT遺伝子のノックダウンを行った。

【0058】

( (EgKAT遺伝子のノックダウン) )

・半定量RT-PCR

好気状態で3日間培養したユーグレナからtotal RNAを抽出し、逆転写によりcDNAを獲得した。半定量RT-PCRによって各遺伝子の発現量を調べた。

以下、半定量RT-PCRについて説明する。

-ユーグレナ細胞からのtotal RNAの抽出

RNAの抽出にはISOGEN II (NIPPON GENE) を用いた。試薬は、原則としてRNase freeのものを用い、水はDEPC処理したものを使用した。

500  $\mu$ lのユーグレナ培養液から遠心によりユーグレナ細胞ペレットを回収し、500  $\mu$ lのISOGEN IIを加えて完全に懸濁した。200  $\mu$ lのDEPC水を加え、15秒間激しく攪拌し、室温で15分静置した。遠心分離 (17400  $\times$  g、15、15分) を行った後、沈殿付近を取らないように上清画分から500  $\mu$ l回収した。これに2.5  $\mu$ lのp-プロモアニソールを加え、15秒間激しく攪拌し、室温で5分静置した。遠心分離 (17400  $\times$  g、15、10分) を行った後、沈殿付近を取らないように上清画分から300  $\mu$ l回収した。回収した液量と同量のイソプロパノールを添加し、転倒混和後、室温で10分静置した。遠心分離 (17400  $\times$  g、15、10分) 後、上清を捨て、沈殿に対して500  $\mu$ lの75%エタノールを加え、遠心分離した (7700  $\times$  g、15、3分)。75%エタノールで再度沈殿を洗浄し、遠心分離した (7700  $\times$  g、15、3分)。上清を完全に取り除き、12  $\mu$ lのDEPC水で溶解した。RNA濃度は分光光度計によって、A260値を測定することで求めた。

【0059】

-逆転写反応

total RNAを鋳型として、PrimeScriptR RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) により逆転写反応を行った。

表2の反応液(1)を42℃で2分インキュベートし、氷上で急冷した。

【0060】

【表2】

#### 反応液(1)

5 $\times$ gDNA Eraser Buffer	2 $\mu$ l
gDNA Eraser	1 $\mu$ l
total RNA	1 $\mu$ g
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l
<hr/>	
total	10 $\mu$ l

【0061】

反応液(1)に、表3の反応液(2)を加え混合後、37℃で15分、85℃で5秒インキュベートすることで、cDNAを得た。

【0062】

10

20

30

40

【表 3】

## 反応液(2)

5×PrimeScript® Buffer 2 ( for Real Time )	4 $\mu$ l
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	1 $\mu$ l
RT Primer Mix	1 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4 $\mu$ l
total	10 $\mu$ l

10

## 【 0 0 6 3 】

## -半定量PCR

合成したcDNAを鋳型として、表 4 ~ 表 6 の条件で半定量PCRを行った。また、反応後の確認は1%ゲルを用いたアガロースゲル電気泳動により行った。

## 【 0 0 6 4 】

【表 4】

PCR 反応系	GoTaq Green Master Mix , 2× ( Promega )	10 $\mu$ l	20
	Forward Primer (20 mM)	0.4 $\mu$ l	
	Reverse Primer (20 mM)	0.4 $\mu$ l	
	鋳型 cDNA	0.5 $\mu$ l	
	滅菌水	8.7 $\mu$ l	
	total	20 $\mu$ l	

PCR 反応条件	94°C	2 min		30
	94°C	30 sec	} × x cycles	
	55°C	20 sec		
	72°C	30 sec		
	72°C	7 min		
	4°C	$\infty$		

## 【 0 0 6 5 】

【表 5】

40

## 各EgKATアイソザイムのcDNA増幅におけるPCRサイクル数

	Cycle (x)		Cycle (x)
EgKAT1	25	EgKAT4	28
EgKAT2	25	EgKAT5	28
EgKAT3	22	EgKAT6	30

50

【 0 0 6 6 】

【 表 6 】

## 半定量用 PCR プライマー

EgKAT1	Fw	5'-CTCATCCATCTCCTCACGGGA-3'
	Rv	5'-ATGCTTGGCCGTAAAGTTGCG-3'
EgKAT2	Fw	5'-ATGAAGGGAATGCGGAAGGTTG-3'
	Rv	5'-GATTTAGTGACTCGTTCAACGT-3'
EgKAT3	Fw	5'-CTGCTATGACGCCCTCACTC-3'
	Rv	5'-AGTCACACTCCCCACCTTTG-3'
EgKAT4	Fw	5'-CATATGTCTTGCCCACTGTA-3'
	Rv	5'-GTAATGTGACCAGGATACGG-3'
EgKAT5	Fw	5'-CTACCCTGAAACCCACCTCCA-3'
	Rv	5'-GACGTTCTCCGACGTGATG-3'
EgKAT6	Fw	5'-TCACAATGCTCAACCGAGT-3'
	Rv	5'-CTTGTTGTTTCATCCGGTATC-3'

10

20

【 0 0 6 7 】

また、ハウスキーピング遺伝子として  $\beta$ -チューブリンを採用した。 $\beta$ -チューブリン cDNA断片の増幅には表 7 のプライマーを用い、18 サイクルの反応により行った。

【 0 0 6 8 】

【 表 7 】

Atub\_770Fw : 5'-CATCACCGAGTTCCAGACCA-3'

Atub\_1267Rv : 5'-TCACCTTCCTCCATACCCTCT-3'

30

【 0 0 6 9 】

-二本鎖RNA (以下dsRNA) の作製

逆転写により獲得したcDNAを用い、両端にT7配列を付加したEgKAT cDNA部分断片をPCRにより増幅、精製した。精製後のcDNA断片500ngもしくは1  $\mu$ gをT7転写反応に用いた。T7転写反応以降はMEGAscript (登録商標) RNAi Kit (Applied Biosystems) を用いて各EgKATに対応するdsRNAを作製した。

dsRNA用プライマーを、表 8 に示す。

【 0 0 7 0 】

【表 8】

## dsRNA用プライマー

EgKAT1	Fw	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAC</u> CCTAGCGTCAACAGCCTTT-3'	
	Rv	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> TGTGCCCCAAAACTCAGCTGTC-3'	
EgKAT2	Fw	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> CTCACAAACACCGAATCTC-3'	
	Rv	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> ACTGCTGGCACTGGACTTTC-3'	10
EgKAT3	Fw	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> TGATAAGGCCATTATCGGT-3'	
	Rv	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> ATCCAAGGGGTAAGCCACAA-3'	
EgKAT4	Fw	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> TGCGGCCGAGATCGTCCC-3'	
	Rv	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> AAACGCCTCGTGCAGCTCCACC-3'	
EgKAT5	Fw	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAC</u> GTGGTCATCGTCAGC-3'	
	Rv	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> GTTGGATGGAGGTGGTTTC-3'	20
EgKAT6	Fw	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> CGCCTCCAAGACCATCC-3'	
	Rv	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> TCCGTGGCACAGACTTCTG-3'	

## 【0071】

-エレクトロポレーション法を用いたRNAi

PBS (+) で二度洗浄した  $10 \times 10^6$  cells/ml のユーグレナ細胞  $400 \mu\text{l}$ 、 $15 \mu\text{g}$  分の二本鎖RNAをキュベットに入れ、軽くピペッティングした。PBS (+) の組成は、表 9 の通りである。

## 【0072】

30

## 【表 9】

## PBS (+)

NaCl	0.8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.29 g
KCl	0.02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02 g
50 mM MgOAc	1 ml
9 mM CaOAc	1 ml
H <sub>2</sub> O	

100 ml

40

## 【0073】

その後、装置にBMS-ECM630を用い、二本鎖RNA  $15 \mu\text{g}$  について、抵抗  $50 \Omega$  で、エレクトロポレーションを行った。この際、ネガティブコントロールにはdsRNAの代わりにTE buffer (0mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)) を  $15 \mu\text{l}$  使用した。

50

なお、同じ反応系に対して電圧と電気容量の組合せを、1回目0.5kV, 120  $\mu$ F, 2回目1.2kV, 50  $\mu$ Fに変えて2回の電気パルスを与えた。

## 【0074】

キュベットはGap長さが2mmのものを用いた。パルス後の細胞を回収し、KH培地1mlが入った5mlプラスチックチューブに移した後、蓋をパラフィルムで固定し、ローテーターで巡回培養した。27 で、3h巡回培養した後、KH培地3mlが入った試験管に150  $\mu$ l移すことで継代し、27 で振盪培養した。

## 【0075】

( (結果) )

・RNAiによるEgKAT mRNA発現抑制効果の確認

( (方法) )の「-二本鎖RNA(以下dsRNA)の作製」「-エレクトロポレーション法を用いたRNAi」により、EgKAT RNAiを行った細胞およびコントロール細胞を対数増殖期後期まで振盪培養した。( (方法) )の「-ユーグレナ細胞からのtotal RNAの抽出」により、培養後の細胞からtotal RNAを抽出し、「-逆転写反応」により逆転写を行った後、半定量RT-PCRによってEgKAT mRNA発現量を調べた。

結果を、図9に示す。図9のように、EgKATノックダウン細胞が得られていた。

## 【0076】

・EgKATのノックダウンによる細胞の生育、生存への影響

RNAiを行った細胞の好気状態における増殖曲線を測定した。測定結果を、図10のグラフに示す。

図10の結果より、好気状態の生育において、コントロール細胞とEgKATノックダウン細胞の間に差は認められなかった。このことから、好気状態において、EgKATのノックダウンはユーグレナの生育に影響を及ぼさないことが明らかになった。

## 【0077】

次に、3日間振盪培養した細胞を低酸素処理し、48時間後の細胞の生存率を測定した。表10に、結果を示す。

## 【0078】

## 【表10】

低酸素48h曝露後のEgKAT発現抑制ユーグレナの生存率

	生存率 (%)
Control	80 $\pm$ 2.4
EgKAT1 RNAi	72 $\pm$ 8.0
EgKAT2 RNAi	77 $\pm$ 12
EgKAT3 RNAi	42 $\pm$ 9.9
EgKAT4 RNAi	86 $\pm$ 7.6
EgKAT5 RNAi	73 $\pm$ 23
EgKAT6 RNAi	81 $\pm$ 10

## 【0079】

表10の結果より、低酸素状態において、EgKAT3ノックダウン細胞では生存率が約50%にまで低下していた。また、コントロール細胞とEgKAT3を除くEgKATアイソザイムノックダウン細胞では生存率は70%以上であり、ほぼ同等の生存率を示した。

## 【0080】

・EgKATのノックダウンによるパラミロンの合成・分解への影響

EgKAT RNAiを行った細胞およびコントロール細胞を3日間振盪培養した後、低酸素処理し、0時間および48時間後に細胞内パラミロン量を実験1( (方法) )の「・パラミロン

10

20

30

40

50

の抽出・定量」に示した方法で測定した。結果を、図11のグラフに示す。

図11の結果より、低酸素培養0時間および48時間後のパラミロン量はコントロール細胞とノックダウン細胞の間で大きな差はなかった。

#### 【0081】

・低温処理とEgKAT1ノックダウンの組み合わせがワックスエステル総量におよぼす影響

EgKAT1 RNAiを行った細胞およびコントロール細胞を好気状態で4日間生育させた細胞を27℃または16℃で低酸素処理し、24時間後の細胞内に存在するワックスエステルを実験1と同様の方法で抽出し、分析した。

図12に、27℃・コントロール細胞（対比例2）および16℃・EgKAT1ノックダウン細胞（実施例2）のワックスエステル総量、図13に炭素鎖長別のワックスエステル量を示す。

10

#### 【0082】

図12に示すように、二つの因子を組み合わせさせた16℃・EgKAT1ノックダウン細胞（実施例2）において、ワックスエステル総量は27℃・コントロール細胞（対比例2）の約40%となった。

図13に示すように、ワックスエステル組成ピークは27℃・コントロール細胞（対比例2）ではC28であることにに対して、組み合わせさせた16℃・EgKAT1ノックダウン細胞（実施例2）において、C24、C25の割合が高くなり、C21～C25の絶対量も27℃・コントロール細胞（対比例2）と比べて高くなった。

#### 【0083】

・低温処理とEgKAT1のノックダウンの組み合わせが脂肪酸、脂肪アルコール組成におよぼす影響

粗抽出ワックスエステルを実験1の（（方法））「ワックスエステルの精製」「ワックスエステルのケン化」に示した方法で精製、ケン化し、脂肪アルコールと脂肪酸を獲得した。脂肪酸は実験1の（（方法））「脂肪酸のメチル化」に示した方法でメチル化した。脂肪酸メチルエステル、脂肪アルコールを実験1の（（方法））「脂肪アルコール、メチル化脂肪酸の分析」に示した方法で精製し、脂肪酸組成は図14、脂肪アルコール組成は図15に示す。

20

#### 【0084】

図14より、27℃・コントロール（対比例2）の脂肪酸組成ではC14の割合が最も高いが、16℃・EgKAT1 RNAi（実施例2）ではC12の割合が最も高くなり、C11の割合も増加した。

30

図15より、脂肪アルコールについても、16℃・EgKAT1 RNAi（実施例2）によりC11、C12の割合が増加した。

#### 【0085】

・DSCによるモデル燃料の熱特性解析

図14の27℃・Control（対比例2）、16℃・EgKAT1 RNAi（実施例2）の脂肪酸組成、図15の脂肪アルコール組成をもとに脂肪酸メチルエステルと脂肪アルコールを混合し、27℃・Controlモデル燃料（対比例2）と16℃・EgKAT1 RNAiモデル燃料（実施例2）を作製した。実験1の（（方法））の「DSCによるモデル燃料の熱特性解析」の方法により、モデル燃料の凝固点・融点を測定した。

40

結果を図16に示す。図16に示すように、コントロールモデル燃料（対比例2）の凝固点は20℃、低温処理モデル燃料（実施例2）の凝固点は7.2℃であり、低温処理を行うことで約13℃凝固点が低下した。

#### 【0086】

（実験1及び2まとめ）

ユーグレナのKATに関し、ワックスエステル合成経路で機能するKATアイソザイムは知られていない。本発明者らは、ワックスエステル合成系で機能するKATアイソザイムを探索するとともに、各KATアイソザイムの役割を明らかにするために研究を進めた。さらにRNAiを用いたノックダウンによりワックスエステル生産量や組成の制御を行い、ユーグレナ

50

が生産するワックスエステルを改変することを目指した。

その結果、ユーグレナESTデータベース上 (TBestDB) で6種のEgKATアイソザイム (EgKAT1~6) の存在を見出した。表11, 表12のように、EgKAT1およびEgKAT2のノックダウンにより、ワックスエステル総量はほとんど変化しなかったが、ワックスエステルが低分子化した。

【0087】

【表11】

#### RNAiによるWE総量の変化

RNAi	WE総量
EgKAT1	変化なし
EgKAT2	変化なし
EgKAT3	コントロール細胞の約30%
EgKAT4	変化なし
EgKAT5	変化なし
EgKAT6	コントロール細胞の約90%

10

20

【0088】

【表12】

#### RNAiによるWE鎖長、WE組成の変化

RNAi	WE鎖長およびWE組成
EgKAT1	C22~26の増加、C27より長鎖の減少
EgKAT2	C23~25の増加、C29より長鎖の減少
EgKAT3	すべて減少、WE組成の変化はなし
EgKAT4	変化なし
EgKAT5	変化なし
EgKAT6	WE組成に大きな変化はなし

30

40

【0089】

このことから、EgKAT1、EgKAT2が中鎖から長鎖のアシルCoA合成に関与することが分かった。

また、EgKAT1、EgKAT2のノックダウンを比較すると、EgKAT1をノックダウンした際、C12、C13の割合がより増加した。このことからEgKAT1がより中鎖側、EgKAT2が長鎖側のアシルCoA合成に寄与していると考えられた。

EgKAT3ノックダウン細胞を低酸素培養したとき、表10及び表11のように、生存率とワックスエステル総量が減少したが、表12のように、ワックスエステル組成はほとんど変化しなかった。このことから、表13に示すように、EgKAT3が短鎖のアシル-CoA合成に関与し、アシルCoA伸長反応における律速段階であると推測された。

50

【 0 0 9 0 】

【表 1 3】

## 各EgKATアイソザイムのWE発酵における役割

	WE 発酵への 寄与	予想される機能
EgKAT1	○	中鎖～長鎖アシル CoA の合成
EgKAT2	○	中鎖～長鎖アシル CoA の合成
EgKAT3	○	短鎖アシル CoA の合成
EgKAT4	×	-
EgKAT5	×	-
EgKAT6	×	-

10

【 0 0 9 1 】

20

EgKAT3のノックダウンにより短鎖アシルCoA合成が抑制された結果、ワックスエステル合成が継続できず、細胞は低酸素状態での酸化還元バランスを保つことが困難となり、生存率が減少したと考えられる。

脂質代謝酵素の代謝制御によるワックスエステル組成の改変というアプローチから、実験2ではEgKAT1の発現抑制がワックスエステルの低分子化に有効であることを明らかとした。ここで、実験1の培養条件によるワックスエステル組成改変のアプローチにおいて、同様にワックスエステル低分子化に有効な因子であった低温でのワックスエステル生産と、EgKAT1ノックダウンを組み合わせることにより、ワックスエステル組成がどのように変化するかを調べた。

その結果、ワックスエステル組成のピークは27・コントロール(対比例2)のC28からC24(実施例2)までシフトしており、2つの異なる低分子化のアプローチを組み合わせることによってワックスエステルのさらなる低分子化に成功した。

以上の結果より、低酸素状態のユーグレナ細胞においてワックスエステル生産量および組成に影響を与える因子を見出した。さらに、複数のアプローチによって見出したこれらの因子を組み合わせることにより、低温特性が大幅に向上したワックスエステル由来燃料を生産することに成功した。

つまり、低酸素状態のユーグレナ細胞において、EgKAT1及び/又はEgKAT2をノックダウンしたユーグレナ細胞を増殖至適条件で培養し、定常期に達した後、低酸素処理を27(対比例2)よりも低く、ユーグレナ細胞の増殖至適温度より低い16で低酸素処理を行うことにより(実施例2)、低温特性が大幅に向上したワックスエステル由来燃料を生産することができた。

30

40

【 0 0 9 2 】

(実験3 ビタミンB<sub>12</sub>量を制限することがユーグレナのワックスエステル発酵に与える影響)

ビタミンB<sub>12</sub>を添加しない培地やビタミンB<sub>12</sub>を通常量より減らした培地でユーグレナを生育させると、細胞が肥大化することが知られている。その理由として、補酵素型ビタミンB<sub>12</sub>を要求するメチオニンシンターゼが葉酸代謝経路において重要な役割を果たしており、葉酸が関与する核酸合成が低下するため、細胞分裂が阻害されることが一因であると考えられている。

また、ビタミンB<sub>12</sub>はメチルマロニルCoAムターゼの補酵素としても機能している。メチ

50

ルマロニルCoAムターゼはスクシニルCoAとメチルマロニルCoAの相互変換反応を触媒する酵素である。この酵素は、従来プロピオン酸を炭素源として細胞が生育する際に、プロピオン酸をプロピオニルCoAに変換後、コハク酸まで代謝する経路内で機能することが知られてきた。

また、代謝予測からこの経路の逆向き反応、つまりコハク酸からプロピオニルCoAを生成する経路に寄与することも示唆されているが、実験的な証明はされてこなかった。プロピオニルCoAはワックスエステルの奇数鎖アシル基原料として重要な化合物であるため、ビタミンB<sub>12</sub>の細胞内量はワックスエステル代謝に大きく影響するのではないかと考えた。

本実験では、培地中のB<sub>12</sub>量を制限することがユーグレナのワックスエステル発酵に与える影響を解析した。

【0093】

( (方法) )

材料および実験方法に関して、以下に記載のない部分は、実験1及び2と同様の方法で行った。

・ユーグレナの培養方法

従属栄養培地として、表1のKoren-Hutner培地(KH培地)を用いた。ビタミンB<sub>12</sub>制限KH培地(B<sub>12</sub>-limited培地)は従来のKH培地中に含まれるB<sub>12</sub>を1/10量に調製した。500ml容坂口フラスコに、pHを5.0に調整した150mlのKH培地を分注し、121℃、15分のオートクレーブにより滅菌した。この培地に、4~5日間程度の培養で定常期に達したユーグレナ(通常KH培地:15~20×10<sup>6</sup>cells/ml、B<sub>12</sub>-limited培地:6~8×10<sup>6</sup>cells/ml)を1ml接種し、24時間の連続光照射条件下、27℃で振盪培養した。

【0094】

( (結果) )

・ビタミンB<sub>12</sub>制限による生育への影響

KH培地(コントロール)またはB<sub>12</sub>-limited培地で振盪培養を行い、培養日数ごとに細胞を回収して細胞数を実験1((方法))の「・細胞数の測定および生存率測定」に示した方法で測定した。

測定結果を、図17に示す。図17の結果より、ビタミンB<sub>12</sub>制限培地での生育により、定常期での細胞数はコントロールの約50%となった。

また、細胞体積を測定したところ、ビタミンB<sub>12</sub>制限培養4日目の細胞の細胞体積はコントロールの同日の細胞と比較して約2倍に増加していた。

【0095】

・ビタミンB<sub>12</sub>制限によるパラミロン分解への影響

好気状態で対数増殖期後期まで生育させたユーグレナ細胞を、27℃、16時間低酸素処理し、0時間または24時間後に細胞の貯蔵パラミロン量を実験1((方法))の「・パラミロンの抽出・定量」に示した方法で測定した。

測定結果を、図18に示す。図18の結果より、ビタミンB<sub>12</sub>制限は好気状態での細胞内パラミロン蓄積量を増加させた(コントロール細胞の約5倍)。また、このときコントロール細胞との体積差は2倍程度であったことから、細胞体積の差以上にビタミンB<sub>12</sub>制限細胞は多量のパラミロンを細胞内に蓄積していることが明らかとなった。27℃低酸素処理を行うと、パラミロンは両細胞内でもともに分解されていた。

【0096】

・ビタミンB<sub>12</sub>制限によるワックスエステル発酵への影響

好気状態で4日間生育させたユーグレナ細胞(コントロール、ビタミンB<sub>12</sub>制限細胞)を27℃で低酸素処理し、24時間後に細胞を回収後、ワックスエステルを抽出し、測定した。

ワックスエステルの総量を、図19に、鎖長ごとのワックスエステル量を、図20に示す。

図19のように、ビタミンB<sub>12</sub>制限により細胞あたりのワックスエステル総量は増加した(通常KH培地の約1.4倍)。この増加は、細胞体積の増加によるものである。また、図

10

20

30

40

50

20のように、ビタミンB<sub>12</sub>制限により、奇数鎖ワックスエステル量（C27、C29）が減少し、奇数鎖ワックスエステルの占める割合は約5.5%となった。

【0097】

・脂肪酸組成、脂肪アルコールの変動

「・ビタミンB<sub>12</sub>制限によるワックスエステル発酵への影響」で得た粗抽出ワックスエステルを精製、ケン化し、脂肪アルコールと脂肪酸を獲得した。さらに脂肪酸はメチル化し、脂肪酸メチルエステルとした。得られた脂肪アルコールと脂肪酸メチルエステルをGCにより分析した。

結果を、図21，図22に示す。図21，図22に示すように、ビタミンB<sub>12</sub>制限により奇数鎖脂肪酸・脂肪アルコールの割合が大きく減少した（全体の約5.5%）。

10

【0098】

（（実験3まとめ））

本実験では、培地中のビタミンB<sub>12</sub>量を通常KH培地の1/10に制限した際、低酸素状態のワックスエステル発酵におよぼす影響を調査した。

本実験では、ビタミンB<sub>12</sub>制限は好気状態の生育に影響を与えていた。定常期の細胞数が減少し（通常KH培地の約50%）、細胞内パラミロン量が増加した。ビタミンB<sub>12</sub>制限細胞を低酸素処理すると、通常KH培地での低酸素処理と比べて、ワックスエステル総量は増加し（通常KH培地の約1.4倍）、奇数鎖脂肪酸・脂肪アルコールの割合が大きく減少していた（全体の約5.5%）。

20

【0099】

本発明者らは、ビタミンB<sub>12</sub>はメチルマロニルCoAムターゼの補酵素であり、本酵素が奇数鎖脂肪酸合成の出発物質を合成する反応にて作用すると予測し、B<sub>12</sub>制限はワックスエステル発酵での奇数鎖脂肪酸合成に影響を与えると推測していた。

本実験を行ったことにより、実際にビタミンB<sub>12</sub>制限により、奇数鎖脂肪酸・脂肪アルコールの割合が減少することが明らかになった。ビタミンB<sub>12</sub>はワックスエステル発酵において奇数鎖脂肪酸を合成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。培地成分を制限することによってワックスエステル組成を改変することは、コストを抑えて目的用途にあったバイオ燃料を作り出すという観点から、非常に有効であることが分かった。

【0100】

（実験4 低温条件（16℃）, ビタミンB<sub>12</sub>欠乏条件及びEgKAT1のノックダウンとの組合せによる影響の検討）

30

本実験では、低温条件（16℃）によるワックスエステルの低分子化、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏による奇数鎖脂肪酸・脂肪アルコールの割合減少、EgKAT1のノックダウンによるワックスエステルの低分子化をそれぞれ組み合わせた場合のワックスエステル組成変化について検討した。

（（方法））

材料および実験方法は、実験1～3と同様の方法を用いて行った。

（（結果））

・RNAiによるEgKAT1 mRNA発現抑制効果の確認

EgKAT1のノックダウンを行った細胞およびコントロール細胞を、好気状態で4日間生育させ、同様に半定量RT-PCRによってEgKAT1 mRNA発現量を調べた。結果を、図23に示す。図23に示すように、EgKAT1 mRNAの発現が抑制されていることが確認された。

40

【0101】

・ワックスエステル量の変化

4日間27℃でKH培地で振盪培養した細胞を27℃（対比例3）、16℃（実施例3）で24時間低酸素処理し、細胞内ワックスエステルを解析した。同様の試験を、EgKAT1ノックダウン細胞についても行った（対比例4，実施例4）。また、同様の試験を、KH培地の代わりにB<sub>12</sub>-limited培地を用いて行った（対比例5，実施例5）。

結果を、図24に示す。図24の結果より、低温（16℃）下で低酸素処理を行った際のワックスエステル量は、他の条件（EgKAT1ノックダウン、B<sub>12</sub>制限）との組み合わせの場

50

合も含め（実施例 3 ~ 5）、減少していた。EgKAT1 ノックダウンはワックスエステル量には大きな影響は及ぼさなかった。

ビタミンB<sub>12</sub>の制限では、細胞体積の変化（B<sub>12</sub>制限で約2倍に増加）とほぼ同等で、10<sup>6</sup>細胞あたり約2倍量となった。

#### 【 0 1 0 2 】

・ワックスエステル組成の変化

図 2 5 に、各因子の組み合わせによる各炭素鎖長別ワックスエステル量のグラフを示す。

図 2 5 A のように、コントロール細胞を用いた27 低酸素処理時（対比例 6）において、C28であったワックスエステル組成ピークが、図 2 5 A のEgKAT1のノックダウン細胞を用いた27 低酸素処理時（実施例 6）ではC26がワックスエステル組成ピークとなり、更に、EgKAT1のノックダウン細胞を用いた16 低酸素処理時（実施例 8）では、C24がワックスエステル組成ピークとなっていた。

このように、低温処理とEgKAT1のノックダウンとの組合せ（実施例 8）により、ワックスエステル組成ピークが、C28から、C24にシフトした。

#### 【 0 1 0 3 】

また、図 2 5 C において、コントロール細胞を用いたビタミンB<sub>12</sub>欠乏条件における27 低酸素処理時（対比例 7）において、ワックスエステル組成ピークはC28であったが、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏条件とEgKAT1のノックダウンを組合せた結果（実施例 9）、C26がワックスエステル組成ピークとなった。

また、図 2 5 C において、C28が大部分を占めていたコントロール細胞を用いた27 ・ビタミンB<sub>12</sub>制限（対比例 7）と比べて、図 2 5 D のコントロール細胞を用いた16 ・ビタミンB<sub>12</sub>制限（実施例 10）では、C24・C26のワックスエステル量が増加していた（全体の約66%）。ビタミンB<sub>12</sub>制限と16 低温処理の組合せ（実施例 10）により、ワックスエステル組成ピークはC26となった。

さらに、ビタミンB<sub>12</sub>制限と16 低温処理にEgKAT1のノックダウンを組合せると（実施例 11）、図 2 5 D に示すように、C24がワックスエステル組成ピークとなった。

#### 【 0 1 0 4 】

・EgKAT1のノックダウンと低温低酸素処理による脂肪酸画分、脂肪アルコール画分組成の変化

4日間27 で振盪培養した細胞を、27、16 で24時間低酸素処理し、細胞内ワックスエステルを実験 1 に示す方法により抽出し、精製とケン化を行った。脂肪酸はメチル化を行い、実験 1 に示す方法により脂肪酸、脂肪アルコールを解析した。

図 2 6 に脂肪酸組成の解析結果、図 2 7 に脂肪アルコール組成の解析結果を示す。

#### 【 0 1 0 5 】

図 2 6 A のように、27 において、コントロール細胞（対比例 6）及びEgKAT1ノックダウン細胞（実施例 6）では、それぞれ、C14、C13が脂肪酸組成のピークであったが、低温処理とEgKAT1のノックダウンを組合せることにより（実施例 8）、図 2 6 B のように、C12へと脂肪酸組成ピークがシフトした。

脂肪アルコールについても同様に、図 2 7 A で、27 コントロール（対比例 6）の脂肪アルコール組成のピークがC14であったのに対し、低温処理とEgKAT1ノックダウンの組合せにより（実施例 8）、図 2 7 B のように、C12が脂肪アルコール組成のピークとなった。

ビタミンB<sub>12</sub>欠乏コントロール細胞（対比例 7）ではC14が脂肪酸組成のピークであったが、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏とEgKAT1のノックダウンを組合せたところ（実施例 9）、図 2 6 C のように、C12が脂肪酸組成のピークとなった。ビタミンB<sub>12</sub>欠乏とEgKAT1のノックダウンに低温処理を加える（実施例 11）と、図 2 6 D のように、C12の割合がさらに増加した。脂肪アルコールの組成も脂肪酸と似た傾向を示した。

#### 【 0 1 0 6 】

本実験では、ワックスエステル組成に変化を与える因子の中から、次の3つの因子につ

10

20

30

40

50

いて着目した。すなわち、

- 1：低温条件（16℃）での低酸素処理によるワックスエステルの低分子化
- 2：EgKAT1のノックダウン細胞低酸素処理によるワックスエステルの低分子化
- 3：ビタミンB<sub>12</sub>制限細胞の低酸素処理による奇数鎖脂肪酸・脂肪アルコール減少である。

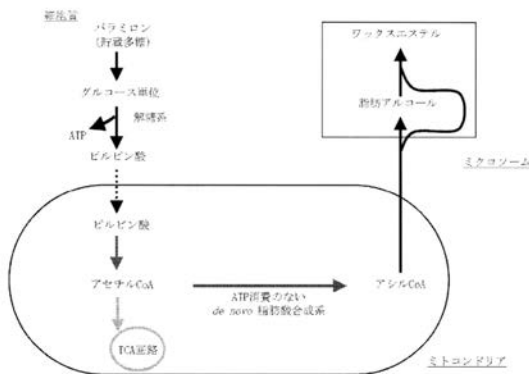
これらの3つの因子について、組合せ実験を行った際、それぞれの特徴を併せ持ったワックスエステルが生産されると推測した。そこで、本実験では、各因子を組み合わせ、ワックスエステル組成におよぼす影響を解析した。

ワックスエステルの低分子化を引き起こす2つの因子（低温条件、EgKAT1ノックダウン）を組合せた際（実施例8～実施例10）、ワックスエステル組成ピークはそれぞれの因子を単独で行った場合（実施例6，実施例7，対比例7）のC26から、C24へとシフトし、ワックスエステルの更なる低分子化が起きた。このことから、低温条件、EgKAT1のノックダウンによるワックスエステル低分子化は異なるメカニズムによって起こっており、組合せることで相加効果がうまれることがわかった。

ビタミンB<sub>12</sub>制限とEgKAT1のノックダウンを組合せた際（実施例9）、ビタミンB<sub>12</sub>制限のみ（対比例7）でのワックスエステル組成ピークであるC28から、C26にピークがシフトした。さらに、上記3種の因子を組み合わせた際（実施例11）、ワックスエステル組成ピークはC24となった。

低酸素処理にビタミンB12制限を組み合わせることにより（対比例7，実施例9～実施例11）、偶数鎖の脂肪酸・アルコールを選択的に得ることができた。さらに、低分子化を引き起こす因子を組合せることで（実施例8～実施例11）、C12とC14の割合が変化したワックスエステルの獲得が可能であると分かった。また、培地成分を制限することはコスト削減に有用であり、ワックスエステルを低コストで改変する手段になると期待される。

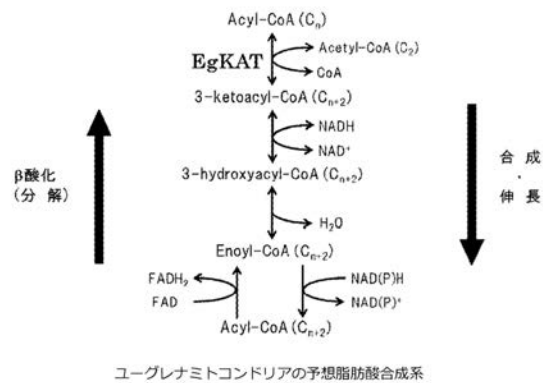
【図1】



低酸素状態での予想ユーグレナWE生産経路

Inui, H et al. (1982) : Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. FEBS LETTERS, 150 (1) , 89-93.

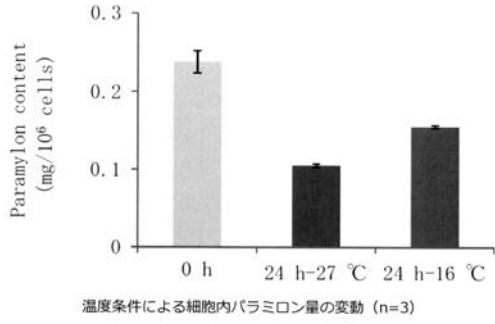
【図2】



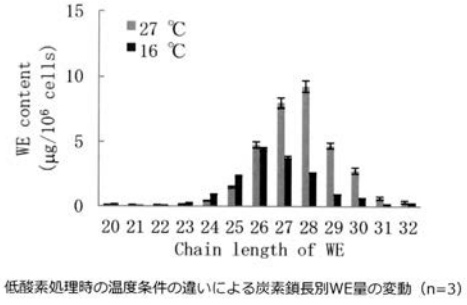
10

20

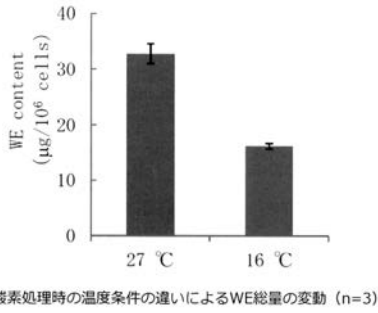
【 図 3 】



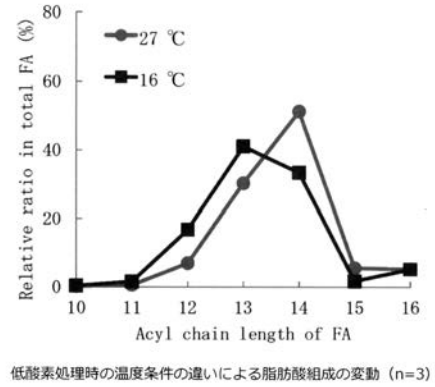
【 図 5 】



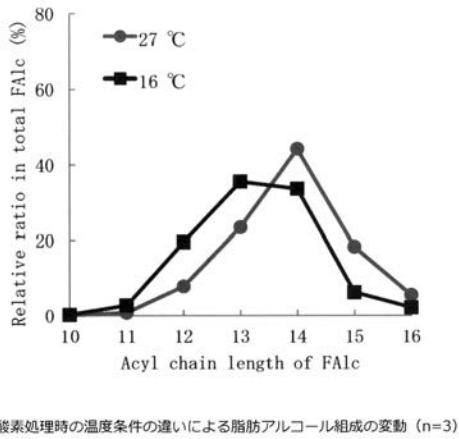
【 図 4 】



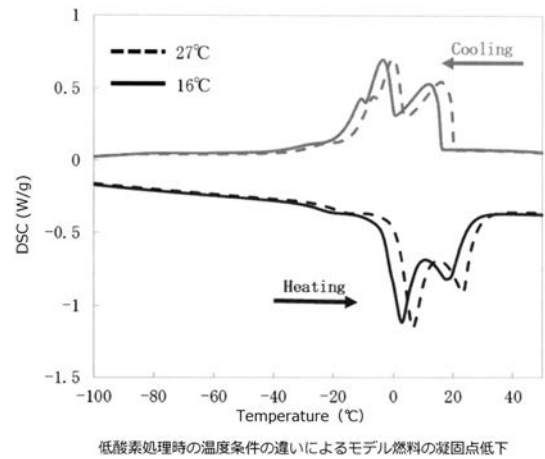
【 図 6 】



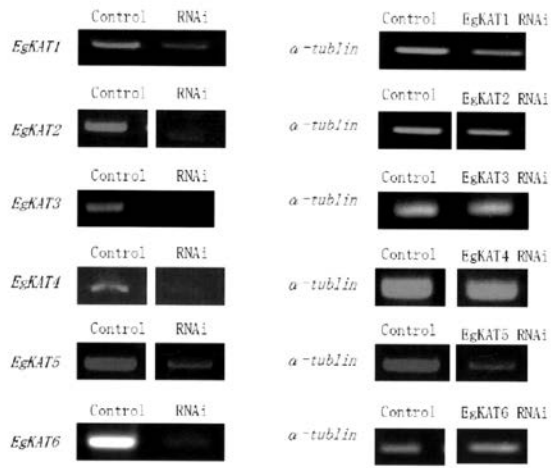
【 図 7 】



【 図 8 】

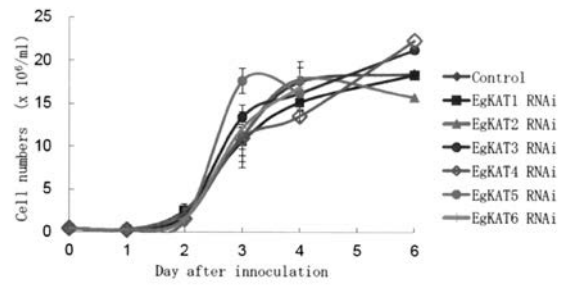


【 図 9 】



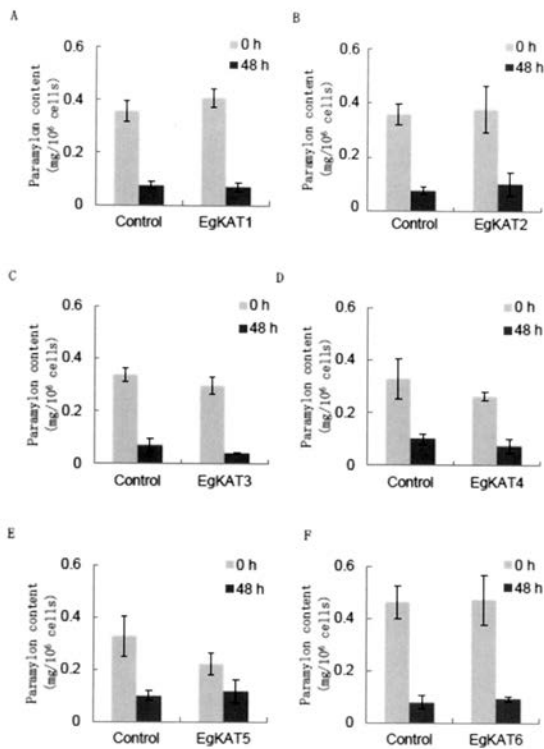
半定量RT-PCRによるKAT mRNA発現抑制効果の確認

【 図 10 】



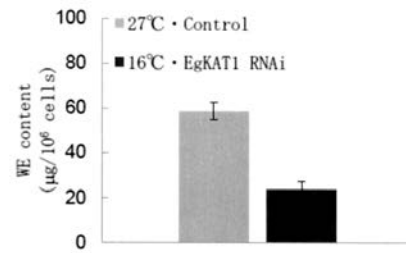
好気状態におけるRNAi後ユーグレナ細胞の増殖曲線および生存率 (n=3)

【 図 11 】



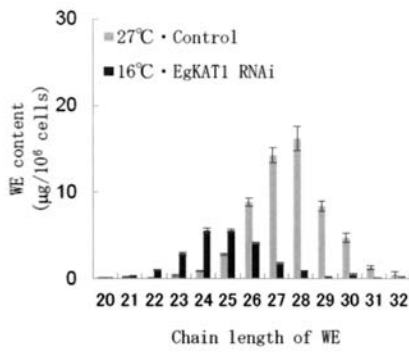
低酸素 0時間、48 時間曝露後の細胞内パラミロン量 (n=3)

【 図 12 】



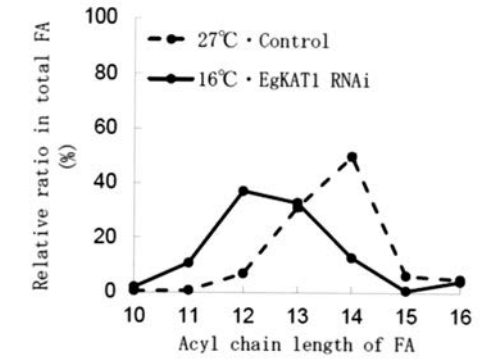
低温処理とEgKAT1ノックダウンの組み合わせによるWE総量の変動

【 図 1 3 】



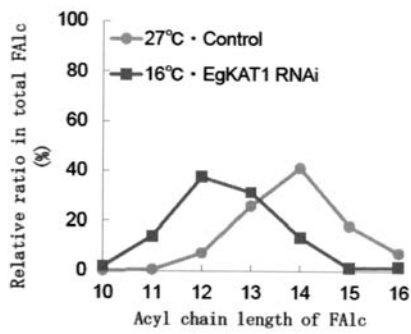
低温処理とEgKAT1ノックダウンの組み合わせによる炭素鎖長別WE量の変動

【 図 1 4 】



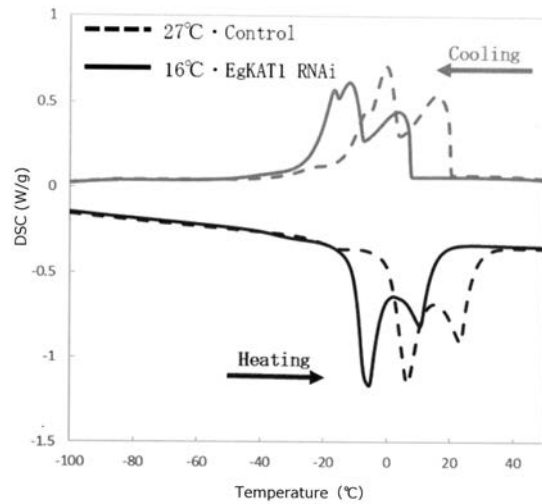
低温処理とEgKAT1ノックダウンの組み合わせによる脂肪酸組成の変動

【 図 1 5 】



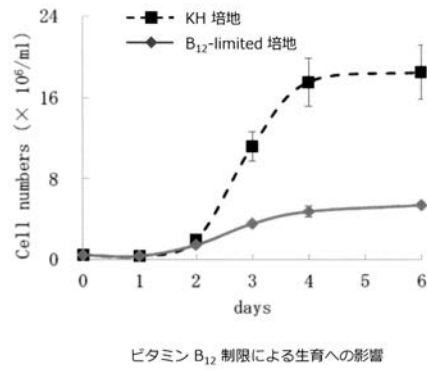
低温処理とEgKAT1ノックダウンの組み合わせによる脂肪アルコール組成の変動

【 図 1 6 】

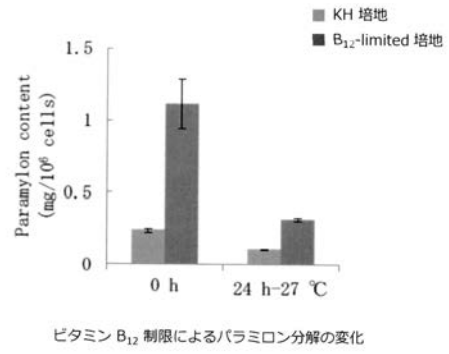


低温処理とEgKAT1ノックダウンの組み合わせによるモデル燃料の融点・凝固点変動

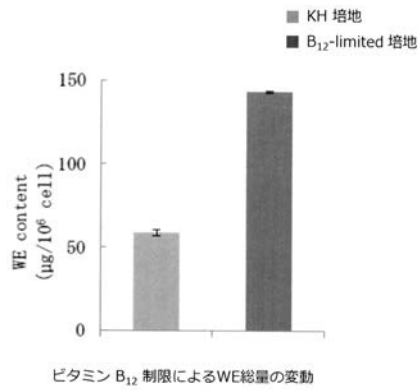
【 図 1 7 】



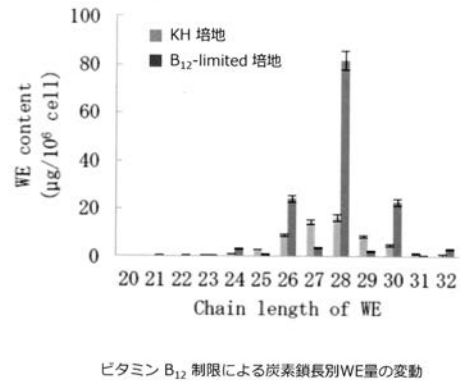
【 図 1 8 】



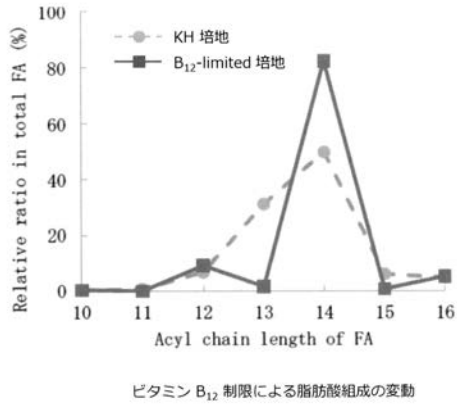
【 図 1 9 】



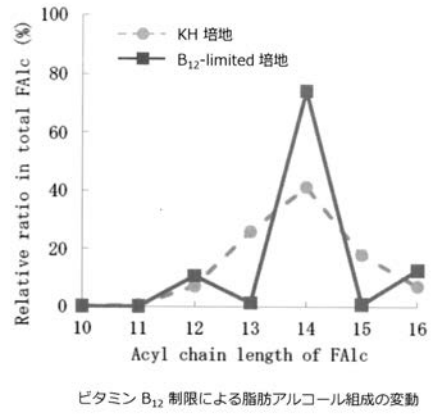
【 図 2 0 】



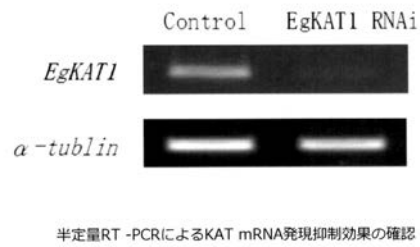
【 図 2 1 】



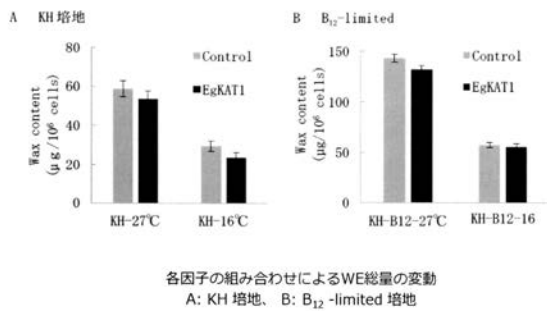
【 図 2 2 】



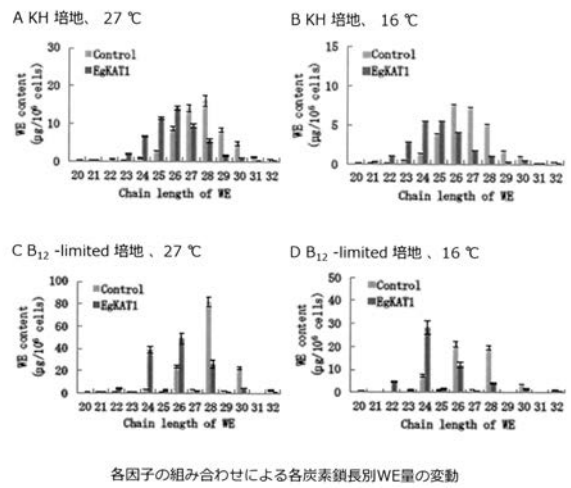
【 図 2 3 】



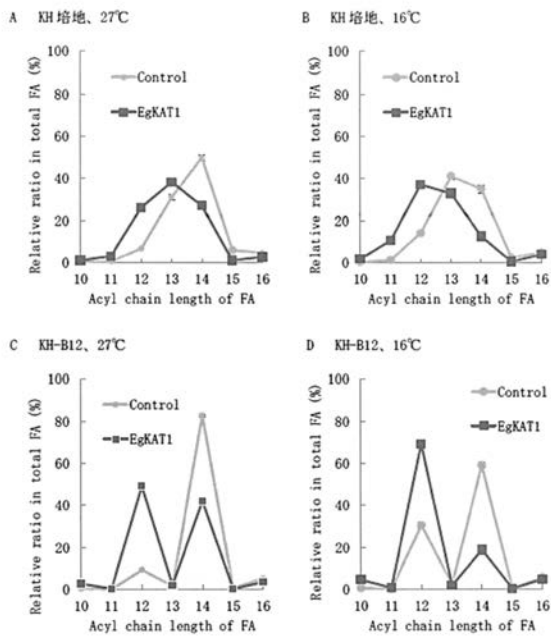
【 図 2 4 】



【 図 2 5 】

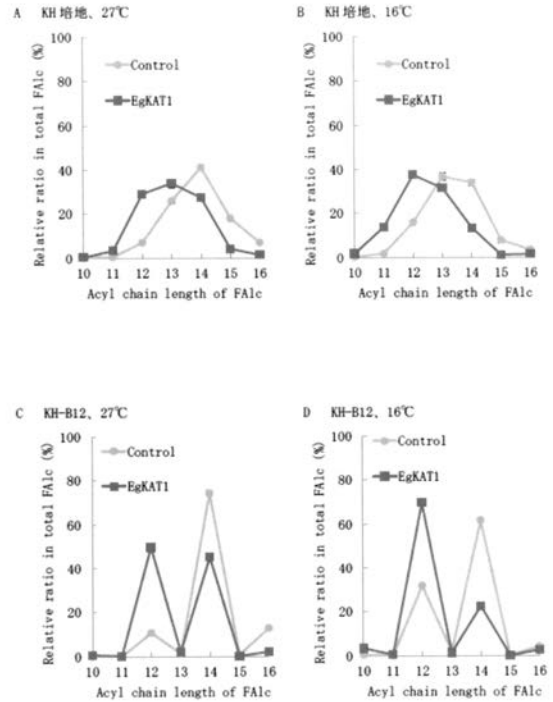


【 図 2 6 】



各因子の組み合わせによる脂肪酸組成の変動

【 図 2 7 】



各因子の組み合わせによる脂肪アルコール組成の変動

【 手続 補正 書 】

【 提出 日 】 平成 29 年 1 月 13 日 (2017.1.13)

【 手続 補正 1 】

【 補正 対象 書類 名 】 明細書

【 補正 対象 項目 名 】 0 0 6 3

【 補正 方法 】 変更

【 補正 の 内容 】

【 0 0 6 3 】

- 半定量 PCR

合成した cDNA を鋳型として、表 4 ~ 表 6 の条件で半定量 PCR を行った。半定量用 PCR プライマーとして、表 6 に示すプライマー (上の行から順に配列番号 1 ~ 12) を用いた。また、反応後の確認は 1% ゲルを用いたアガロースゲル電気泳動により行った。

【 手続 補正 2 】

【 補正 対象 書類 名 】 明細書

【 補正 対象 項目 名 】 0 0 6 7

【 補正 方法 】 変更

【 補正 の 内容 】

【 0 0 6 7 】

また、ハウスキーピング遺伝子として  $\beta$ -チューブリンを採用した。 $\beta$ -チューブリン cDNA 断片の増幅には表 7 の配列番号 13, 14 のプライマーを用い、18 サイクルの反応により行った。

【 手続 補正 3 】

【 補正 対象 書類 名 】 明細書

【 補正 対象 項目 名 】 0 0 6 9

【 補正 方法 】 変更

## 【補正の内容】

## 【0069】

## - 二本鎖RNA（以下dsRNA）の作製

逆転写により獲得したcDNAを用い、両端にT7配列を付加したEgKAT cDNA部分断片をPCRにより増幅、精製した。精製後のcDNA断片500ngもしくは1 $\mu$ gをT7転写反応に用いた。T7転写反応以降はMEGAscript（登録商標）RNAi Kit（Applied Biosystems）を用いて各EgKATに対応するdsRNAを作製した。

dsRNA用プライマー（上の行から順に配列番号15～26）を、表8に示す。

---

フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 健吾

神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユ  
ーグレナ内

Fターム(参考) 4B064 AD85 CA08 CA19 CC06 CC12 CC24 DA20

4B065 AA83X AB01 AC14 BA01 BB31 BC03 BC14 CA13 CA60

4H013 BA02 CE03