

プログラム名： セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名： 合田 圭介

プロジェクト名： 超効率バイオ燃料開発の実証評価

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 28 年度

研究開発課題名：

バイオ高分子を高効率に生産する光合成細菌の開発

研究開発機関名：

国立研究開発法人理化学研究所

研究開発責任者

沼田 圭司

# I 当該年度における計画と成果

## 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

高効率にバイオプロダクト、特にバイオプラスチックや繊維材料のような高分子素材を、無尽蔵に存在するバイオマスから生産する細胞・微生物を開発する。光合成細菌は、二酸化炭素の固定化や有機酸からの物質生産に優れているだけでなく、窒素の固定化能も有しており、魅力的なホスト微生物である。これまでの申請者の研究成果から、バイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を生産する一方で、産業利用されている土壌細菌と比較すると生産性に劣ることが判明している。また、PHAはそのエステル構造から、利用可能な分野が限定されており、アミド構造を有する人工シルクを合成する候補に加える。これらの背景から、本研究では、バイオ高分子であるPHAおよび人工シルクを高効率に生産する光合成細菌を開発することを目指す。

微生物から生産される代表的なバイオプラスチックであるPHAは、*Ralstonia eutropha*という代表的なPHA高生産株により、産業的に生産された実績がある。しかしながら、炭素源として植物油や糖を利用するため、その原料費が最終的なPHA価格の1/3程度を占める結果となっている。また、植物油や糖の国際価格の変動により、PHA価格の安定化が難しいという問題がある。そこで、炭素源の多様化および低価格化を目的とし、二酸化炭素や産業廃液に多く含まれる乳酸や酢酸を炭素源としたPHAの合成手法を確立する。二酸化炭素の固定化能および高分子の生産能という観点から、ホスト微生物として紅色光合成細菌を選択し、光合成を利用したPHA生産系を確立する。今年度は、FACSを利用し、PHA高生産細胞を単離するシステムを構築することを目的とした。

ポリアミドや人工シルクをはじめとした、主鎖骨格に窒素を含む高分子を微生物により合成するためには、炭素源に加えて窒素源を供給する必要がある。しかしながら、窒素源は農業など幅広い分野で利用され、コスト面で大きな問題となる。そのため、将来的には窒素を安定的に導入可能な微生物生産法が必要とされている。本研究では、窒素固定が報告されている紅色光合成細菌をホスト微生物として利用し、大気中の窒素を固定化する人工シルクの生産系を開発することを目指す。また、海洋性微生物を利用することで、海水の利用および抗生物質を利用しないコンタミの管理など、産業的に好ましい特徴を付与することが可能である。今年度は、シルクを生産可能な光合成細菌を構築するとともに、光合成細菌の窒素および炭素固定化能を定量化することを目指す。

## 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

### 2-1 進捗状況

PHAの生産性をラマン顕微により評価する系を構築していたが、重水によりラベルした光合成細菌内部のPHAと光合成細菌の色素体が被るといった問題が生じた。暗所で培養することにより、色素体のシグナルを減少させる、もしくは有機溶媒処理により色素体を除くことは可能であったが、目的とした培養条件でないこと、またその後の培養が困難であることから、ラマン顕微を利用した評価を諦めた。一方で、FACSを利用した分取は予想以上に上手く機能した。PHAを蓄積した光合成細菌を蛍光試薬でラベル化し、FACSにより分取した。実際、PHAを多く蓄積していることが予想される、高い蛍光強度および大きな細胞サイズを示す一群を単離することに成功している。しかし、分取した細胞の生育速度が、FACSを通す前の細胞と比べ、極端に遅くなるという問題が生じている。現在、FACSによる細胞

へのダメージを軽減するべく、培地の変更や実験手順の短縮化を進めている。この FACS によるダメージ問題を解決するまでは、他の装置による分取はペンディングにする予定である。

シルク遺伝子の発現も同時に進めている。3種類のプロモーターを利用し、同一のアミノ酸配列の発現に取り組んでいるが、容易には発現しない。光合成最近のレアコドンを取り除くとともに、一般的に発現を難しくする、N末端やC末端の配列をシルク配列から除き、シルクの繰り返し配列のみからなる配列を利用しているが、これまでのところ高効率では発現していない。発現条件の最適化を今後とも続けるとともに、他のシルクのアミノ酸配列も検討する予定である。

光合成細菌の窒素および炭素の固定化能を明確にするため、定量的なアッセイ系を構築している。一般的に用いられているガスクロマトグラフィーによるニトロゲナーゼの活性測定、および<sup>15</sup>Nラベルを利用した固定化能の評価を行う。これまでに、ガスクロマトグラフィーによるニトロゲナーゼの活性測定系は構築できており、次年度以降、測定を開始する。<sup>13</sup>Cの固定化については、シルクではなく、PHAを利用した系で開始する予定である。

## 2-2 成果

- 本研究で用いる海洋性の光合成細菌の中でも、硫黄化合物を培養に必要としない紅色非硫黄細菌の単離法を確立した。具体的には、海水から窒素制限を行わない培地条件にて、光合成細菌を培養し、主にカラーセレクションする手法である。最終的には、NMR および GC/MS による再確認が必要であるが、新規の海洋性紅色非硫黄細菌を得るためには、効率的な手法である。
- PHA 生産性が高い *Rhodovulum sulfidophilum* の PHA 合成酵素の生化学的解析を行った。その結果、光合成細菌において超高分子量の PHA が合成される原因が、PHA 合成酵素の高い活性と、低い発現量に由来するものであることが示唆された。また、この成果は、光合成細菌が有する PHA 合成酵素の生化学的特性を明らかにした、はじめての報告である。

## 2-3 新たな課題など

FACS を利用した *Rhodovulum sulfidophilum* および *Ralstonia eutropha* H16 の分取条件を確立した。幾つかの条件は、すでに最適化されている。しかしながら、細胞へのダメージが予想され、そのダメージ軽減を目的とした新規プロトコールが求められている。

## 3. アウトリーチ活動報告

理化学研究所一般公開にて、研究内容を紹介した（2016年4月）。