

「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

| |
|----------------|
| H23 年度 実績報告 |
|----------------|

小俣達男

名古屋大学大学院生命農学研究科・教授

ラン藻の硝酸同化系変異株を利用した遊離脂肪酸の高効率生産系の構築

§1. 研究実施体制

(1)「小俣」グループ(名古屋大学)

① 研究代表者:小俣 達男 (名古屋大学大学院生命農学研究科、教授)

② 研究項目

- ・*Synechococcus elongatus* PCC 7942 からの脂肪酸放出株の作製
- ・ラン藻の脂肪酸生産株のトランスクリプトーム解析

(2)「愛知」グループ(中部大学)

① 主たる共同研究者:愛知 真木子 (中部大学応用生物学部、講師)

② 研究項目

- ・*Synechococcus* sp. PCC 7002 からの脂肪酸放出株の作製

(3)「池田」グループ(慶応義塾大学)

① 主たる共同研究者:池田 和貴 (慶応義塾大学先端生命科学研究所、特任助教)

② 研究項目

- ・ラン藻の脂肪酸生産株のメタボローム解析

§ 2. 研究実施内容

(2-1) *Synechococcus elongatus* PCC 7942 からの脂肪酸放出株の作製

研究のねらい 全体計画では、基本的な脂肪酸放出株である POP (Platform for Oil Production) 株を平成24年度末までに作製する予定である。POP 株は計6種類の遺伝子(あ

るいは遺伝子クラスター)の操作により作製するが、平成23年度には高親和性硝酸イオン能動輸送体 *NRT* と長鎖アシル *ACP* 合成酵素遺伝子 *aas* の二重欠損株の作製を目指した。また別途作製した「光合成のダウンレギュレーションを部分的に阻害した変異株」の窒素欠乏に対する応答を調べて平成25年度から実施する「窒素制限下での脂肪酸高生産株のスクリーニング」のための基礎情報の取得を目指した。

進捗状況 野生型の *PCC7942* 株では *aas* 遺伝子が容易に破壊できたのに対し、*NRT* 欠損株からは *aas* 遺伝子を完全に除けていない。野生株由来の *aas* 遺伝子破壊株の増殖を種々の条件下で比較検討した結果、アンモニアを加えて窒素過剰にすると改善されたので、現在、アンモニア存在下で *NRT* 欠損株からの *aas* 遺伝子の除去を試みている。

今後の見通し これまでに得られている結果は、脂質代謝を攪乱することが窒素同化に対しても大きな影響を及ぼすことを示唆している。そこで、窒素代謝や光合成に対する *aas* 遺伝子破壊の影響を調べつつ、次の段階であるアシル *ACP* チオエステラーゼ遺伝子 *tesA* の導入へと慎重に作業を進める。

(2-2) *Synechococcus* sp. *PCC 7002* からの脂肪酸放出株の作製

研究のねらい ラン藻類には、他生物が増殖しにくい特殊な環境(高 pH、高温、高塩濃度など)に適応した種類が多くあり、将来はそれぞれの特長を生かして開放系で脂肪酸生産を行うことが望ましい。そこで本研究項目では、ラン藻類全般に普遍的に有効な脂肪酸高生産株作製スキームの開発を目指して、*Synechococcus* sp. *PCC7002* に対して(2-1)と同様の操作で脂肪酸生産系の構築を目指す。平成 23 年度末までにその最初の段階として、高親和性 *NRT* の欠損株の作製を目指した。

進捗状況 *Synechococcus* sp. *PCC7002* の高親和性 *NRT* をコードする *nrtP* 遺伝子に外来の遺伝子カセットを挿入した変異株を作製中である。

今後の見通し *nrtP* に導入した遺伝子カセット上には **negative selection** のマーカーとなる条件致死的な自殺遺伝子 *sacB* があるので、*nrtP* の破壊を確認した後、*sacB* をネガティブマーカーにして外来遺伝子カセットとともに *nrtP* の ORF の大半を除去するための形質転換を実施する。その後は項目(2-1)の結果を参考にしながら *aas* 遺伝子の破壊と *tesA* の導入を進める。

(2-3) ラン藻の脂肪酸生産株のメタボローム解析

研究のねらい 本研究項目の目的は、上記(2-1)と(2-2)において実施する遺伝子操作の各段階において、細胞内外の有機酸、アミノ酸、脂肪酸などを網羅的に解析し、所期の効果が得られているか否かを検証し、さらに代謝流束解析によって、脂肪酸生産量の増大に必要な遺伝子操作を予測することであるが、平成23年度はまず、ラン藻細胞からの代謝物の抽出法や分析条件等の測定法の最適化を目指した。

進捗状況 本研究では細胞外に放出されて水系と混在する脂肪酸の生産性を問題にするので、

細胞内外の水溶性代謝物と脂質、脂肪酸などの脂溶性物質を定量的・系統的、かつ簡便に分離抽出するためのプロトコルの確立を目指して種々の条件を検討中である。

今後の見通し サンプルの調製方法が確定でき次第、(2-1)で作製した *aas* 遺伝子破壊株に適用して、遊離脂肪酸生産量に対する窒素条件、CO₂ 濃度、光強度の影響を解析し、最適条件を明らかにする。

(2-4)ラン藻の脂肪酸生産株のトランスクリプトーム解析

研究のねらい 本研究項目の目的は、上記(2-1)、(2-2)において実施する遺伝子操作の各段階において、形質転換体のトランスクリプトーム解析を次世代シーケンサーSOLiD によって効率的に行い、標的遺伝子の発現量の変化や他の遺伝子への波及効果を解析し、(2-3)のメタボローム解析の結果と合わせ、脂肪酸増産のために抑制すべき遺伝子群と活性化すべき遺伝子群を明らかにすることである。次世代シーケンサーは、平成25年度から実施予定の「突然変異部位のゲノム解析による同定」にも用いるため、今年度はより基礎的な技術であるゲノム再解析技術への習熟をまず目指した。

進捗状況 実際に研究に用いるラン藻株のゲノム情報を取得するため、小俣グループが保有している *S. elongatus* PCC7942 株のゲノムの再解析を実施して、データベースに登録されている配列との差異を把握した。次に *S. elongatus* PCC7942 株から別途取得した突然変異株集団をモデル系として「突然変異部位のゲノム解析による同定」を試み、塩基の置換、挿入、脱落を十分な精度と効率で検出できることを確認した。現在、トランスクリプトーム解析のための条件検討を行っている。

今後の見通し *S. elongatus* PCC7942 株では、CO₂の欠乏および充足状態の細胞のトランスクリプトーム情報が DNA マイクロアレイ法によって得られているので、これを参照データとして SOLiD を用いたトランスクリプトーム分析の条件を決定し、作製済みの *aas* 変異株と平成24年度に作成する *tesA* 導入株に適用して遺伝子操作の効果・影響を明らかにする。愛知グループが使用している *Synechococcus* sp. PCC7002 の株についてはゲノム再解析により、ゲノム配列を把握する。