

「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

H24 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 基本的な脂肪酸放出株である POP (Platform for Oil Production) 株の平成24年度末までの作製を目指した。POP 株では、硝酸イオン輸送体遺伝子 *nrtABCD* の除去、長鎖アシル ACP 合成酵素遺伝子 *aas* の破壊、ACP チオエステラーゼ遺伝子 *tesA* の導入をはじめ都合 6 個の遺伝子(あるいは遺伝子クラスター)を操作するが、それぞれの効果を調べられるよう、最終形態以外の様々な変異の組み合わせをもつ株の作製を行った。

進捗状況 POP 株を含めて 16 種類の変異株を作製し、*aas* の破壊と *tesA* の導入がそれぞれ、遊離脂肪酸の細胞からの放出を誘導し、かつ相加的に効果をもつことを確認した。また窒素応答性プロモーターにより *tesA* の発現を制御することで脂肪酸生産量を調節できることを確認した。*nrtABCD* の欠損を利用して窒素を制限した場合、細胞あたりの脂肪酸放出量はやや増えたが、細胞の増殖が抑制されたために体積あたりの脂肪酸生産量は減少した。

今後の見通し 来年度は当初計画通り、POP 株を出発材料として細胞外に、より多く脂肪酸を放出する株を順遺伝学的、逆遺伝学的手法を組み合わせて作製してゆく。

(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を構築をする。このため、平成 24 年度末までに *Synechococcus elongatus* PCC 7942 と同様の方法で POP 株の作製を目指した。また、先行研究や他のグループの研究結果と比較するため、一般に用いられている *Synechocystis* sp. PCC 6803 についても POP 株の作製を開始した。

進捗状況 *Synechococcus* sp. PCC7002 での ACP 合成酵素遺伝子 *aas* の破壊と ACP チオエステラーゼ遺伝子 *tesA* の導入により、遊離脂肪酸を放出する株を作製できた。しかし、硝酸イオン輸送体遺伝子 *nrtP* の破壊に手間取っており、POP 株の作製は達成できていない。*Synechocystis* sp. PCC 6803 については *aas* の破壊までを行い脂肪酸の放出を確認した。

今後の見通し *Synechococcus* sp. PCC7002 での計画が遅れている原因に形質転換効率の低さがあるので、この原因の解明をしつつ POP 株の作製を急ぐ。現在までに脂肪酸を放出させることには成功しているので、細胞内外の脂質、脂肪酸の分子種解析を進め、脂肪酸の細胞内動態を明らかにして増産に向けての基盤とする。

(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)、(2-2)において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24年度は、新たに導入した LC-TOF MS/MS を用いて大規模な脂質メタボローム探索システムを確立し、PCC7942 株や PCC7002 株由来の形質転換株の細胞内外に存在する脂質代謝物の網羅的な同定を進めた。

進捗状況 網羅的な脂質代謝物の探索の結果、各種の形質転換株の細胞内外から、約 250 分子種の遊離脂肪酸 (FFA), phosphatidylglycerol (PG), lysoPG, MGDG, MGMG, DGDG, DGMG, SQDG, SQMG, chlorophyll, pheophytin などを MS/MS により同定した。また、窒素条件、CO₂ 濃度、光強度の影響により変動する代謝物や未知物質についても探索を進め、構造解析に取り組んでいる。

今後の見通し 上記2株から派生した強光耐性株の中から脂肪酸生産量の増大したものを探索し、その代謝特性を明らかにすることを目指す。また、脂質メタボロームの解析技術に関しては、平成24年度に確立した高網羅的な探索手法をベースに、未同定脂質の解析を進め、脂質データベースの拡充を行う。

(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。平成 23 年度は次世代シーケンサーによる解析技術の基礎としてゲノム再解析技術に習熟して、使用している *S. elongatus* PCC7942 株の遺伝的背景を明らかにしたので、平成 24 年度はトランスクリプトーム解析の技術修得を目指した。

進捗状況 小俣らは過去の研究で、*S. elongatus* PCC7942 株について、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を DNA マイクロアレイ法によって得ているので、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を行って結果を比較した。当初、mRNA の精製から cDNA 配列の増幅の段階の効率が悪く、再現性に問題があったが、mRNA の抽出方法を検討した結果、従来の結果と整合性のある結果を得ることができた。また、中部大学で使用している *Synechococcus* sp. PCC7002 の株についてゲノム再解析を行って遺伝的背景を確認した。

今後の見通し 現段階では、マイクロアレイ解析と比べた場合、低発現強度の遺伝子群でバックグラウンドのシグナルレベルが高い傾向がある。来年度はこれを抑制しつつ、脂肪酸生産がトランスクリプトームに与える影響を解析する。