

「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 24 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

花井 泰三

九州大学大学院 農学研究院・准教授

合成代謝経路構築によるシアノバクテリアのバイオアルコール生産

§1. 研究実施体制

(1)「花井」グループ

① 研究代表者:花井 泰三 (九州大学大学院農学研究院、准教授)

② 研究項目

・合成代謝経路導入シアノバクテリアの構築と最適化

(2)「本多」グループ

① 主たる共同研究者:本多 裕之 (名古屋大学大学院工学研究科、教授)

② 研究項目

・目的生産物質高生産・高耐性株のハイスループット選択

(3)「堀内」グループ

① 主たる共同研究者:堀内 淳一(北見工業大学工学部、教授)

② 研究項目

・目的生産物質高生産・高耐性株のハイスループット選択

(4)「村上」グループ

① 主たる共同研究者:村上 明男(神戸大学・内海城環境教育研究センター、准教授)

② 研究項目

・合成代謝経路導入シアノバクテリアの増殖法の検討

(5)「福崎」グループ

① 主たる共同研究者: 福崎 英一郎 (大阪大学大学院工学研究科、教授)

② 研究項目

・合成代謝経路導入シアノバクテリアのメタボローム解析

§2. 研究実施内容

花井グループは、シアノバクテリアにバイオアルコール生産関連遺伝子を導入することでバイオアルコール生産合成代謝経路を構築し、メタボローム解析結果を利用し、シミュレーションを行うことで、生産速度向上のための最適化を行うことを目標としている。このため、*Synechococcus elongatus* PCC7942 にバイオアルコール生産合成代謝経路を構築した。通常の培養条件下では、バイオアルコールは生産できなかったものの、菌体を濃縮し、培養条件を変えることで、炭酸ガスと光から少量のバイオアルコール生産が確認できた。今後は、導入する遺伝子の最適化、既存の酵素破壊などによる生産向上を試みる。

本多グループでは、磁性微粒子ラベリング技術を用いた1藻類細胞アレイを作製し、バイオアルコール高生産、高耐性を持つ変異藻類を迅速に探索するシステム構築を目的としている。このため、疎水・親水領域がパターンニングされたスライドガラスを用い、培養液を親水性領域に塗布し、ドデカンを重層することで、シアノバクテリア *S. elongatus* PCC7942 の孤立培養を行った。培養条件を種々検討することで、炭酸ガスを炭素源とする絶対独立栄養増殖が可能なドデカン重層1細胞液滴培養法の構築に成功した。しかし、この方法は、使用する株の炭酸ガス感受性や溶媒感受性の影響を大きく受け、変異株のスクリーニングでは培養法に適した株が選択されるという“培養方法のバイアス”がかかることが判明した。そこで次に、我々が独自に開発し細胞磁気ラベルが可能な MCL (Magnetite Cationic Liposome、磁性ナノ微粒子埋包リポソーム)を用い、PCC7942 培養液と混和させたところ、PCC7942 の直接磁気ラベルが可能であることが判明した。そこで、剣山状デバイスを使った細胞アレイの作製を試みたところ、PCC7942 細胞の孤立アレイ培養に成功した。この培養における藍藻の増殖速度は通常の寒天平板培地よりも少なくとも 3~4 倍程度速いことを確認した。今後は、引き続き MCL 磁気ラベル細胞アレイを用い、藻類1細胞アレイ構築に適した剣山状デバイスの試作や磁気分離法との組み合わせによる効率的な変異株探索・分離システムの構築を試みる。

堀内グループでは、LED 光源を用いたフォトバイオリアクターシステムを構築し、低電力で効率的なシアノバクテリア培養システムを構築することを目的としている。本年度は、シアノバクテリア特有の色素組成に合わせた LED 照射システムによる効率的培養法を構築し、さらに太陽光と LED 照射を併用した連続培養可能な培養システムの構築を行った。今後は、LED 光源を内蔵した振とう培養機を導入し、シアノバクテリア *S. elongatus* PCC7942 の増殖と LED 照射との関連についての検討、外部照射型 LED を備えた光合成培養システムを構築し、シアノバクテリア *S.*

elongatus PCC79421を用いた基礎的な培養条件の検討、すなわち増殖特性に及ぼす光強度と炭酸ガス濃度の影響について検討をおこなう。

村上グループでは、合成代謝経路を構築したシアノバクテリアについての増殖とバイオアルコール生産を効率化する目的のため、本研究課題で中心に用いている *S. elongatus* PCC7942 株の他、候補となる単細胞性シアノバクテリアについて系統保存株を入手し、維持培養体制を作った。これらの野生株について、至適増殖条件の検討、および光合成活性の測定のため、新たに培養装置や活性測定装置を組み立てた。従来から使われている培養光源や培地組成などの見直しも進め、最新の LED 光源を採用した。今後は、有機酸などの基質を培地に添加する効果、あるいは温度、光、通気攪拌などの条件の検討し、装置の改良を進める予定である。

福崎グループは、組換えシアノバクテリアにおける代謝摂動の概観をとらえ、特に注目すべき代謝物を選定するため、ターゲット(目標あり)およびノターゲット(目標なし)の代謝物プロファイリングから得られたメタボロームデータより予測モデルの構築を行うことを目的としている。予測モデルの構築は潜在構造投影 (Projection to Latent Structures; PLS) 教師あり回帰分析により行い、注目された代謝物とバイオアルコール生産能力との関係を解明する。また、これら代謝物プロファイル解析と平行し、炭素代謝の主要経路や当該経路の活性化状態の把握のため、より直接的かつ簡便な代謝動態の観測を目的とした安定同位体アプリケーションの開発も重要となる。

これら代謝プロファイル解析と、メタボロミクスデータから得られる予測モデル、および安定同位体追跡による代謝動態情報を総合的に評価することにより、バイオアルコール生産シアノバクテリアの代謝解析を行う。

また、代謝物プロファイル解析や代謝動態解析に必要なメタボロームデータを得るためには、標的代謝物を正確に同定し、精密に定量する技術が必要となる。本研究において標的としている高極性代謝物において上記の条件を満たすため、イオンペア試薬と LC 三連四重極質量分析 (LC-QqQ-MS)を用いた分析系を最適化 (MRM パラメータの決定など)し、シアノバクテリアの代謝物産物の一斉分析が可能である事を確認した。加えて、実際のシアノバクテリア培養サンプルを用いて、安定したデータを得るためのシアノバクテリアのサンプル回収及び代謝産物抽出メソッドの検討も行った。

現在、安定同位体標識実験を基盤とする代謝動態解析法の一つである代謝ターンオーバー解析のための GC-QqQ-MS 及び LC-QqQ-MS を用いた同位体分配率測定を目的とする分析系の構築を行っており、トランスジェニックシアノバクテリアにおける生産性向上に資する各種メタボロミクス技術の開発を行っている。