

「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 22 年度採択研究代表者

H25 年度 実績報告

早出 広司

東京農工大学大学院工学研究院
教授

シアノファクトリの開発

§ 1. 研究実施体制

(1)「早出」グループ

- ① 研究代表者:早出 広司 (東京農工大学大学院工学研究院、教授)
- ② 研究項目
 - ・シアノファクトリの開発

§ 2. 研究実施の概要

藍藻を用い、バイオ燃料化合物を作らせ、外部刺激でバイオ燃料化合物回収を行うプロセス、シアノファクトリの開発を目指し、1) 緑色光で溶菌可能な藍藻の構築、2) RNA を利用した遺伝子発現制御系の構築、3) 海洋藍藻中でのポリヒドロキシ酪酸 (PHB)、アルカン等のバイオ燃料関連化合物の生産系の改良を行った。また、4) 生産されたバイオ燃料関連化合物を抽出するための、イオン液体の開発を行った。

ファージ由来の溶菌遺伝子を、改良を行った緑色光に応答するプロモーターの下流に導入し、培養を行ったところ、緑色光に応じて成長が止まり、藍藻内部のタンパク質が培地中に漏出することが観察された。集菌後に様々な溶媒で処理したところ、緑色光非照射下では溶菌が観察されなかったのに対し、緑色光を照射することで溶菌が観察され、脆弱な藍藻の調製が可能であることを示した。このシステムを用いることで、バイオ燃料関連化合物を生産後、緑色光を照射することで細胞を脆弱にし、集菌後にバイオ燃料関連化合物を容易に藍藻中から回収することが可能となる。

バイオ燃料関連化合物を生産するためには、各種遺伝子の発現調整が重要である。当プロジェクトでは、RNA の構造および二本鎖形成を予測可能であるという特長に着目し、RNA を利用した遺伝子発現制御ツール、リボレギュレーターを構築した。構築したリボレギュレーターは設計に利用した大腸菌のみならず藍藻内においても機能し、遺伝子発現を制御することに成功した。RNA は計算的手法を基に、分子内構造および分子間構造の安定性を予測することが出来る。この計算結果を基にし、様々なリボレギュレーターをデザインすることで、遺伝子発現能を任意に調整出来る事が期待できる。またグリコーゲン合成遺伝子の翻訳を阻害する RNA を設計し評価したところ、PHB 生産が 2 倍まで上昇した。これらの RNA ツールは、今後のバイオ燃料生産の最適化に向けて有用なツールになると期待できる。

また藍藻成分を溶かし、PHB を溶かさないうイオン液体をデザインし、藍藻内に産生された PHB の約 98% の回収に成功した。また、減圧ろ過後の濾液を回収、乾燥することで、イオン液体のリサイクルできることも確認できた。上述した溶菌システムと組み合わせることで、より少ないイオン液体を用いて抽出が可能になると考えられ、より低エネルギーバイオプロセスの実現が期待できる。

また PHB を溶解可能なイオン液体の探索も同時に行ったところ、安息香酸アニオンを有するイオン液体が低温で PHB を溶解することを見出した。同様にアルカンやスターチに対しても溶解可能なイオン液体の設計に成功した。

以上示したように、シアノファクトリ開発に向けて様々な要素技術の開発に成功した。これらの技術を組み合わせることで、低エネルギーバイオプロセスの構築が期待出来る。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

1. Koichi Abe, Kotone Miyake, Mayumi Nakamura, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, “Engineering of a green-light inducible gene expression system in *Synechocystis* sp. PCC6803”, *Microbial biotechnology*, 7(2), 177–183, 2014 (DOI: 10.1111/1751-7915.12098)
2. Kotone Miyake, Koichi Abe, Stefano Ferri, Mitsuharu Nakajima, Mayumi Nakamura, Wataru Yoshida, Katsuhiko Kojima, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, “A green-light inducible lytic system for cyanobacterial cells”, *Biotechnology for biofuels*, 7(56), 2014 (DOI:10.1186/1754-6834-7-56)
3. Tomoko Yoshino, Toru Honda, Masayoshi Tanaka, Tsuyoshi Tanaka, “Draft Genome Sequence of Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain NKBG15041c”, *Genome announcement*, 1(6), e00954-13, 2013 (DOI: 10.1128/genomeA.00954-13)
4. Koichi Abe, Yuta Sakai, Saki Nakashima, Masataka Araki, Wataru Yoshida, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Design of riboregulators for control of cyanobacterial (*Synechocystis*) protein expression”, *Biotechnology letters*, 36(2), 287–294, 2013 (DOI 10.1007/s10529-013-1352-x)
5. Yuta Sakai, Koichi Abe, Saki Nakashima, Wataru Yoshida, Stefano Ferri, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Improving gene regulation ability of small RNAs by scaffold engineering in *Escherichia coli*”, *ACS Synthetic biology*, 3(3), 152–162, 2014 (DOI: 10.1021/sb4000959)
6. Yukinobu Fukaya, Hiroyuki Ohno, “Phosphonium phosphonate-type zwitterion/water mixture showing variable hydrogen bonding ability as a function of temperature”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 14941–14944, 2013 (DOI: 10.1039/C3CP52178H)
7. Shohei Saita, Yuki Kohno, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Ionic liquids showing phase separation with water prepared by mixing hydrophilic and polar amino acid ionic liquids”, *Chemical Communication*, 49, 8988–8990, 2013 (DOI: 10.1039/C3CC45302B)

8. Yoritsugu Ito, Yuki Kohno, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Design of Phosphonium-Type Zwitterion as an Additive to Improve Saturated Water Content of Phase-Separated Ionic Liquid from Aqueous Phase toward Reversible Extraction of Proteins”, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18350–18361, 2013 (DOI:10.3390/ijms140918350)
9. Yukinobu Fukaya, Hiroyuki Ohno, “Hydrophobic and polar ionic liquids”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 4066–4072, 2013 (DOI: 10.1039/C3CP44214D)

(3－2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数 (国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数 (国内 1 件)