

「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」

H26 年度
実績報告書

平成23年度採択研究代表者

小俣達男

名古屋大学大学院生命農学研究科
教授

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と改良
 - ・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応用生物学科、講師)
- ② 研究項目
 - ・*Synechococcus* sp. PCC 7002 と *Synechocystis* sp. PCC 6803 からの脂肪酸放出株の作製
 - ・脂肪酸排出機能をもつ膜輸送体の導入による脂肪酸生産性の向上

(3)「池田」グループ(理化学研究所)

- ① 主たる共同研究者:池田 和貴 ((独)理化学研究所統合生命医科学研究センター・メタボローム研究チーム、上級研究員)
- ② 研究項目
 - ・ラン藻の脂肪酸生産株の脂質メタボローム解析

(3)「若山」グループ(慶應義塾大学)

- ① 主たる共同研究者:若山 正隆 (慶應義塾大学先端生命科学研究所、特任助教)

② 研究項目

- ・主要代謝中間体のメタボローム解析と遺伝学的アプローチによる脂肪酸生産性の向上

§ 2. 研究実施の概要

我々の研究チームは、ラン藻(シアノバクテリア)を用いて、バイオ燃料の材料となる物質を大量生産することを目指している。このような研究では従来、燃料となる物質を細胞内部に蓄積させるのが一般的であったが、この方式では大量生産のために「容れ物」である細胞も大量につくる必要があり、生産コストの削減が困難である。そこで、本研究では、細胞の内部に目的生産物を貯めるのではなく、細胞をなるべく増やさずに生産物を外部に継続的に放出させることで、生産コストの引き下げを目指している。

藻類ではバイオ燃料の原料として様々な物質の生産が試みられているが、我々は遊離脂肪酸(以下 FFA と略)の大量生産を目指している。FFA の生産は大腸菌やラン藻での先行研究によって基本的な方法が確立しており、また細胞外に漏出しやすいとされているからである。H24 年度までに遺伝子操作によって基本的な FFA 放出株を作製し、H25 年度には、窒素源を制限して細胞の増殖を抑制し、光強度を高めるとともに CO₂ の供給量を増やして光合成を促進し、より多くの FFA の生産を試みた。このようにして、実用化のために必要な生産速度の約 30% の生産速度を得ることができたが、さらなる生産速度の向上を目指して光を強くすると、光合成色素であるクロロフィルが分解されて細胞は死滅した。このような条件では、細胞内に高濃度の FFA が蓄積したので、①光合成が盛んになった結果 FFA の生産速度が上がり、②FFA の細胞外への漏出が追いつかなくなり、③細胞内に過剰の FFA が蓄積したことで生育阻害が起こった、と推定した。しかし、H26 年度に詳しく調べた結果、①の推定は誤りで、光合成が盛んになって FFA 生産が増えたのではなく、強光条件下では細胞に多量に存在する膜脂質から FFA が積極的に切り出されることがわかった。このような強光への応答が起こる理由は不明であるが、実用的観点から見た場合、単純に光を強くするだけで FFA が増産できることがわかったのは、朗報であった⁽¹⁾。ただ、上記の②と③は正しく、強光下では FFA の蓄積の結果、細胞が弱って生産が継続できないという問題は残った。

②と③の問題を解決するため、H25 年度には細胞表層部の最外層に密に存在する糖鎖を削ることで細胞から FFA が漏れやすくすることに成功し、これにより実用化のために必要な生産速度の約 50% の生産速度を得ることができたが、FFA の大半は依然として細胞内にとどまっていた。一方、H25 年度に FFA 放出株の中から選別した「強光条件でも死なない変異株群」の遺伝子解析を H26 年度に進めた結果、FFA を外へ放出する活性をもつ排出型輸送体の遺伝子を同定することができ、その発現量が増えることで FFA の放出が若干増えていることがわかった。この輸送体をさらにたくさん発現させて FFA 排出の飛躍的増大を狙ったところ、一過的には排出活性が高まるものの細胞の生育はかえって悪くなった。ラン藻は光合成のための細胞内膜系をもっているため、輸送体タンパク質を過剰発現すると細胞膜だけでなく細胞内膜系にもとりこまれて有害になる例が知られている。そこで、細胞膜へのみ特異的にタンパク質を運ぶためのアミノ酸配列を探索し、新規に発見した Nitr2 タンパク質の N 末端部分が有効であるとの結果を得た⁽²⁾。今後はこれらの材料を活用して細胞からの FFA の排出をさらに効率化して生産量を向上させる計画である。

【主要論文】

- (1) Nobuyuki Takatani, Kazuhide Use, Akihiro Kato, Kazutaka Ikeda, Kouji Kojima, Makiko Aichi, Shin-ichi Maeda and Tatsuo Omata, “Essential role of acyl-ACP synthetase in acclimation of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 to high-light conditions”, *Plant and Cell Physiology*, in press.
- (2) Shin-ichi Maeda, Mineko Konishi, Shuichi Yanagisawa and Tatsuo Omata, “Nitrite transport activity of a Novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts”, *Plant and Cell Physiology*, Vol. 55, No 7, pp.1311-1324, 2014 (DOI: 10.1093/pcp/pcu075)