

「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24年度採択研究代表者

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
 - ・合成代謝経路導入シアノバクテリアのバイオリクターによる物質生産

(4)「村上」グループ

- ① 主たる共同研究者:村上 明男 (神戸大学 内海域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. 研究実施の概要

花井グループは、シアノバクテリア(主に *Synechococcus elongatus* PCC 7942)にバイオアルコール生産関連遺伝子群を導入することでバイオアルコール生産株を構築し、他グループからの知見および方法論を用いて培養条件等の最適化を行い、バイオアルコールの生産を行うことを目標としている。昨年度までに構築したイソプロパノール生産株を好気・明条件下で培養し、その後、嫌気・暗条件に移行させることで、イソプロパノール生産を行った。その際、培養および生産条件の検討により、イソプロパノールの最大生産量は 150 mg/L となり、株を構築した際の生産量の 6 倍近い値を得ることができた(図1)¹⁾。また、新たな生産物として DHAP を出発物質とした 1,3-PDO の生産の検討を開始し、光合成条件下での生産に成功した。

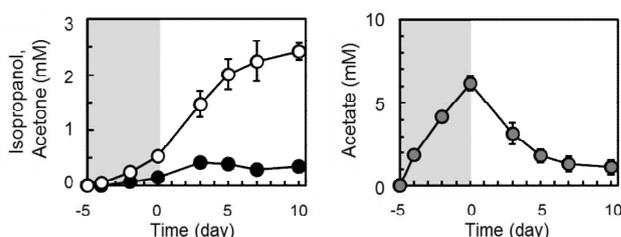


図1 組換え *S. elongatus* PCC 7942 を用いた
イソプロパノール生産

左) ○: イソプロパノール, ●: アセトン
グラフ内灰色の部分は、嫌気・暗条件、白色の部分
は好気・明条件での培養を示す。

本多グループは、磁性微粒子ラベリング技術を用いた 1 細胞孤立アレイ培養技術を構築し、高増殖能、イソプロパノール耐性能・高生産能を有するシアノバクテリア変異株を迅速に探索することを目的としている。本年度は、シアノバクテリアを磁気分離できる磁性ナノ微粒子を作製し、液体培地中で1細胞ずつ孤立させる培養により²⁾、高増殖能、イソプロパノール耐性能を有する株の取得に成功した。また、この培養技術を応用し、イソプロパノール高生産能を有する株取得のための探索系構築にも取り組んでいる。

堀内グループは、LED 光源を用いたフォトバイオリ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し、組換えシアノバクテリアによるイソプロパノール生産を実現することを目的としている。本年度は、前年度までの研究結果に基づき LED 照射システムにより効率的に培養を行ったシアノバクテリア *S. elongatus* PCC 7942 イソプロパノール生産株を用い、イソプロパノール生産実験を試みた。

- 1) 外部照射型 LED を備えた光合成培養システムを用いて *S. elongatus* PCC 7942 の大量培養を達成したが、培養中に増殖と連動したイソプロパノール生産は確認されなかった。一方、培養した細胞中には大量のグリコーゲンの蓄積が認められた。
- 2) そこで 1)の細胞を回収し、嫌気・暗条件下で反応させたところイソプロパノールの生産が確認された。その後、培地条件および光照射条件を検討したところ、増殖を制限した培地において

暗条件を適用することで最大 22 mg/L のイソプロパノールを確認した。

- 3) 2)の実験中に培養液中に酢酸が蓄積されたことから、酢酸添加がイソプロパノール生産に及ぼす影響を検討したところ、酢酸添加がイソプロパノールの生産を促進することが明らかとなった。

村上グループは、イソプロパノール合成代謝経路を導入したシアノバクテリア *S. elongatus* PCC 7942 株等について、細胞の生理状態や増殖特性などにおける代謝経路導入に伴う影響を解析し、これらの株の至適増殖条件を明らかにすることを目的としている。そのため、細胞の生理状態の指標となる細胞の分光特性の測定および光合成活性のパラメータについて解析を進めている。イソプロパノール合成代謝経路導入に伴い、高光強度(光飽和)下での最大光合成活性は、野生株(親株)に比べて有意な低下が見られた。一方、低光強度(光律速)下での光合成反応における光利用効率は若干低下したものの、培養時の光強度下での光合成活性は野生株とほぼ同じであることが明らかとなった。

福崎グループは、シアノバクテリアのメタボロミクス解析を行い、バイオアルコール生産性向上のための遺伝子改変ターゲットの探索、培養条件の最適化を行うための知見を得ることを目的としている。安定同位体による標識を行うことでシアノバクテリアの細胞内代謝物の絶対定量法を確立した³⁾。株間の比較を行うことにより、各種物質の生産に適した種の推定を行った。

【主要論文】

(1)

Yasutaka Hirokawa, Iwane Suzuki, Taizo Hanai, “Optimization of isopropanol production by engineered cyanobacteria with a synthetic metabolic pathway”, Journal of Bioscience and Bioengineering, Epub ahead
(DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.005)

(2)

Sayuri Arai, Mina Okochi, Taizo Hanai, Hiroyuki Honda, “Micro-compartmentalized cultivation of cyanobacteria for mutant screening using glass slides with highly water-repellent mark”, Biotechnology Reports, vol. 4, pp.151–155, 2014
(DOI:10.1016/j.btre.2014.10.003)

(3)

Yudai Dempo, Erika Ohta, Yasumune Nakayama, Takeshi Bamba and Eiichiro Fukusaki, “Molar-Based Targeted Metabolic Profiling of Cyanobacterial Strains with Potential for Biological Production”, Metabolites, vol. 4, No. 2, pp.499-516, 2014
(DOI: 10.3390/metabo4020499)