

「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」

H27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(京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科、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

(4)「村上」グループ

- ① 主たる共同研究者:村上 明男(神戸大学・内海地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的としている。これまで、嫌気・暗条件での培養を必須としていたイソプロパノール生産に関して、光合成条件下で酢酸を生産するように新たに遺伝子導入を行うことで、同条件におけるイソプロパノール生産に成功した。また、昨年度より開始した 1,3-PDO 生産に関して最大生産量 3.8 mM (0.29 g/L)を達成した¹⁾。中間代謝産物である Glycerol の蓄積が顕著に見られており、現在は生産経路の改変による生産量向上を目指している。

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、液体培地中で1細胞ずつ孤立させる培養法で取得したイソプロパノール耐性能を有する株の解析に取り組んだ。また、この培養技術と生産物質検出技術を組み合わせ、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だ。

堀内グループは、花井グループが新たに構築した 1,3-プロパンジオール(1,3-PDO)生産株を用いた 1,3-PDO 生産の培養工学的検討を行った。

- 1) 外部照射型 LED を備えた光合成培養システムを用いたフラスコ培養により増殖及び 1,3-PDO 生産特性を検討したところ、速やかな増殖と増殖に連動した 1,3-PDO 生産が確認され、連続プロセス構築の可能性が示唆された。一方、1,3-PDO 合成の中間代謝物であるグリセロールの高濃度の蓄積が認められた。
- 2) 1)の結果に基づき、エアリフトバイオリクターによる 1,3-PDO の連続生産を検討することとし、先ずエアリフトバイオリクターによる回分培養を行ったところ良好な増殖と 1,3-PDO 生産を確認した。その後、半連続培養および連続培養を行い約1か月にわたる連続生産を達成した。
- 3) エアリフトバイオリクターによる連続プロセスの効率化を進めるため、菌体の固定化を検討することとし、シアノバクテリアの固定化条件を検討したところ、アルギン酸ソーダを用いて良好な固定化を行いうることが明らかになり、固定化担体を用いる菌体増殖と 1,3-PDO 生産を確認した。

村上グループは、合成代謝経路を構築したシアノバクテリア株の増殖特性、およびイソプロパノールなどのアルコール生産における至適条件を明らかにすることを目的としている。このため、細胞の生理状態を反映する分光特性や光合成活性の各種パラメータについて、合成代謝経路導入に伴う影響を定量的に解析している。本年度は、生産するアルコールによる細胞の増殖阻害の要因やアルコール耐性を示す変異株の耐性機構を中心に解析を行った。その結果、イソプロパノールによる野生株の増殖阻害には、光合成系、特に、光化学系 II 反応中心の光誘起電子伝達活性の失活が関与すること、耐性株ではこの失活が起きにくくなっていることが明らかになった。

福崎グループは、代謝プロファイル解析の結果を基に Acetyl-CoA 供給量を増加するための新規代謝改変方法の提案を行なった。炭酸固定経路である Calvin 回路から Acetyl-CoA へとつながる経路を構築するとともに、CoA の供給を補うことで物質生産性の向上につながることを期待される。

【主要論文】

1. Yasutaka Hirokawa, Yuki Maki, Tsuneyuki Tatsuke, Taizo Hanai,
“Cyanobacterial production of 1,3-propanediol directly from carbon dioxide using a synthetic metabolic pathway”, *Metabolic Engineering*, vol. 34, pp.97-103, 2016.
2. Sayuri Arai, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Taizo Hanai, Hiroyuki Honda,
“A single cell culture system of cyanobacteria using lectin-conjugated magnetite nanoparticles and magnetic force”, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.113, pp.112-119, 2016.