

**「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」研究  
領域 領域活動・評価報告書  
—平成25年度終了研究課題—**

研究総括 松永 是

1. 研究領域の概要

本研究領域は、藻類・水圏微生物を利用したバイオエネルギー生産のための基盤技術創出を目的とします。藻類・水圏微生物には、高い脂質・糖類蓄積能力や多様な炭化水素の産生能力、高い増殖能力を持つものがあることに着目し、これらのポテンシャルを活かした、バイオエネルギー創成のための革新的な基盤技術の創出を目指します。

具体的には、近年急速に発展したゲノミクス・プロテオミクス・メタボロミクス・細胞解析技術等を含む先端科学も活用し、藻類・水圏微生物の持つバイオエネルギーの生産等に有効な生理機能や代謝機構の解明を進めるとともに、それらを制御することによりエネルギー生産効率を向上させるための研究を対象とします。さらに、バイオエネルギー生産に付随する有用物質生産や水質浄化等に資する多様な技術の創出に関する研究も含まれます。

将来のバイオエネルギー創成につながる革新的技術の実現に向けて、生物系、化学系、工学系などの幅広い分野から新たな発想で挑戦する研究を対象とします。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 9件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「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」領域に設けた選考委員11名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryoku4.html>) の他、将来のバイオエネルギー創成につながる革新的技術の実現に向けて、生物系、化学系、工学系などの幅広い分野から新たな発想で挑戦する研究を重視した。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ2課題を推薦した。

選考	書類選考	面接選考	採択数			
			11件	内訳	3年型	10件(1件)
対象数	88件	28件			11件	内訳

( )内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1)平成22年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・天尾研究者

研究期間が5年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果:  
<http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/index.html>.)

・神田研究者

ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。

## 5. 研究実施期間

平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月(3年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議:6回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 25 年 11 月	評価会開催
平成 26 年 3 月	研究総括による事後評価
平成 26 年 3 月	被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1)外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2)得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 評価結果

### 総論

本研究領域では、海産、淡水産の生物を用いてバイオエネルギー生産を行うための基盤技術の創出を目指す。バイオ燃料(例えばバイオディーゼル、軽油(アルカン、アルケン)、エタノール、メタン、水素等)の産生、もしくはこれらにつながる脂質、糖類等の産生に資する研究を対象とした。さらに、バイオ電池による電気エネルギーへの変換も含む。その実施体制としては、CREST とさきがけの2つのタイプで行っている。本研究領域の目的を達成するためには、様々な分野の研究者の有機的な協働と共に、新進気鋭の研究者の独創的な発想を活かした挑戦的なテーマによる成果が期待される。特に、さきがけ研究では、オリジナリティを大事にした研究成果を強く求めた。各自期間内に多くの成果を取りまとめ、領域研究の進展に寄与したと評価される。今後は、CREST とさきがけの異なる推進体制間におけるコラボレーション(研究協力)、相互の研究成果の情報交換等を通じた、得られた成果の社会還元に向けた取り組みにも積極的に参画して頂きたい。

### 1. 朝山 宗彦 研究者「自己溶菌藻と発現ベクターを組み合わせた有用物質生産・回収による排気 CO<sub>2</sub> ガス再利用資源化のための基盤技術創成」

藻類によるバイオ燃料生産技術の開発では、細胞における目的物質の生産効率が重要であるばかりか、その後の抽出・製造に関する経費削減が実用化に向けた高いハードルとなっている。そこで、自己溶菌藻にバイオ燃料等を高効率で生産させた後、自己溶菌を制御誘導し、低コストで簡単に回収する基盤技術の開発に取り組んでいる。期間内に論文や特許を取りまとめ、研究領域に貢献を果たしたと評価する。今後は、アイデアを大切に、チャレンジ精神を忘れず、実用化を目指して高密度高速培養装置の開発、培養の大規模化及び生産物質の抽出・製造の更なる実証試験に取り組むことを期待する。

### 2. 蘆田 弘樹 研究者「バイオ燃料高生産のための炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成」

光合成炭素固定酵素ルビスコとCO<sub>2</sub>濃縮細胞小器官カルボキシソームの量的強化を行い、エタノールの高生産を目指す研究を行っている。外来性優良ルビスコ過剰発現による炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成に向けた独創的な研究で発展性が期待される。また、論文等の業績などは満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CREST との融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、更なる進展を期待する。

### 3. 小山内 崇 研究者「糖代謝ダイナミクス変化によるラン藻バイオプラスチックの増産」

光合成を行う細菌であるラン藻を用いて、生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHAs)の増

産を行うことを目的に、シグマ因子や転写制御因子に着目し、代謝ダイナミクスを改変したラン藻の作成、さらに、それらを用いた安価で環境に優しいバイオプラスチック生産系の確立を目指した研究を行っている。一期生として、3年の研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、特許出願と論文作成などの業績でも満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CRESTとの融合研究を通じて、未完成的な成果部分の充実を図り、更なる論文成果に繋がることを期待する。また、研究者として、豊かな感性と豊富なアイデアを持つと共に、チャレンジ精神を忘れずに研究を進めていって欲しい。

#### 4. 鞆 達也 研究者「暗所で光合成を行う藻類の創生」

酸素発生型の光合成には、可視光が利用されているのに対して、本研究は、赤外光を用いて光合成を行うことを可能にし、可視光の存在しない暗闇でも酸素発生型光合成を駆動できるようにすることで、新たな光合成エネルギーの創生を目指している。研究期間を通じて、提案課題を実現するための基礎的知見を多くの論文成果と出来たことは、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。さらに独創的で新しいコンセプトを作り進展させ行くことを期待する。また、実用化に向けた進展については、産官学の共同研究などを積極的に推進し、基礎研究の社会還元に向けた取り組みも進めて欲しい。

#### 5. 中村 友輝 研究者「真核藻類のトリグリセリド代謝工学に関する基盤技術の開発」

バイオディーゼルの原料となる油脂トリグリセリドを、藻類を用いて大量生産する新技術の開発を目指した研究を行っている。真核微細藻類のモデルであるクラミドモナスから、油脂合成関連酵素を網羅的に単離し、藻類が油脂生産にすぐれるのかを明らかにするための重要な知見を得た。酵母での藻類油脂合成系の構築藻類由来遺伝子を用いた有用物質技術として酵母での藻類油脂合成系を構築するなど、独創的な研究で発展性が期待される。また、論文などの業績においても満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、国際的視野に立って、藻類、酵母及び植物など幅広い分野で、豊かな感性と豊富なアイデアを活かした研究を推進することを期待する。

#### 6. 蓮沼 誠久 研究者「高増殖性微細藻の合成を目指した微細藻代謝フラックス制御機構の解明」

微細藻の生体システムを制御する物質代謝機構を精密に解析できる新規代謝解析手法の開発により、増殖性を決定する因子を特定し、これを強化することで微細藻由来のエネルギー生産の向上を目指す研究を行っている。3年の研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、特に、動的代謝プロファイリング技術については、更なる進展を期待する。特許出願と論文作成などの業績においても満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、実用化に向けた産官学の共同研究開発などを積極的に推進し、研究成果の社会還元に向けて邁進してほしい。

#### 7. 日原 由香子 研究者「グリコーゲンから油脂へ：シアノバクテリア変異株の代謝改変」

細胞体積が野生株の5倍、細胞あたりのグリコーゲン蓄積量は野生株の10倍にも達するシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の SII0822 転写因子欠損株について、さまざまな酵素遺伝子を欠失・導入して、この株の代謝改変を行い、高蓄積しているグリコーゲンを、脂肪酸に変換し、最終的には油脂として蓄積させる研究を行っている。研究開始当初の想定を超える困難な状況を着実に突破し、論文や特許として成果を取りまとめ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CRESTとの融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、当初の目標についても更なる進展を期待する。

#### 8. 本田 孝祐 研究者「バイオマス高度利活用を志向した人工代謝システムの創出」

微生物の発酵機能を担う代謝酵素群を自由自在に組み合わせ、さまざまな化学品を生産できる人工代謝システムを開発することを目指し、この手法を用いて、第3世代バイオ燃料としての実用化が期待されるブタノールの生産に取り組んでいる。独創的な研究で発展性が期待される提案内容であったが、研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、論文業績などが満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CRESTとの連携研究などを通じて、NADH等の補酵素群の熱安定性の問題などの解決による更なる可能性の追求や、バイオエネルギー関連物質のみならず、ファインケミカル生産などを含め、産業利用可能なレベルへの進展を期待する。

#### 9. 増川 一 研究者「ラン藻の窒素固定酵素ニトロゲナーゼを利用した水素生産の高効率化・高速化」(大挑戦型)

ヘテロシスト型ラン藻のニトロゲナーゼによる水素生産において、ヘテロシスト頻度を増やすことと、ニトロゲナ

一ゼを改変し空気下の水素生産の高速化と高効率化を目指した研究を行っている。窒素固定ラン藻のランダム変異では、分化パターン形成の最新の知見を基にスクリーニング系を上手く工夫し、効果的に多数の目的変異株を得た。水素生産活性の評価は、長期間、高活性を持続させた上で比較し、ヘテロシストの増加により水素生産が増加することを示した。ニトロゲナーゼの改変では、窒素ガス下で高活性が長期間持続することを示し、培養の低コスト化につながる成果を得た。ニトロゲナーゼの発現系を構築し、分子活性を高めるための改変にも挑戦したが、目的変異株の取得には至らなかった。光合成生物を使ったバイオ燃料としての水素生産の研究は、古くからの重要なテーマである。その中で、着実に成果を挙げ、研究領域に貢献を果たしたと評価する。今後は、得られた成果を論文として完成させるとともに、チャレンジ精神を忘れずに研究を進めて行って欲しい。

#### 10. 評価者

研究総括

松永 是 東京農工大学 学長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成26年3月末現在)

石倉 正治 王子ホールディングス株式会社研究開発本部開発研究所バイオエタノール研究室上級研究員

井上 勲 筑波大学生命環境系 教授

大倉 一郎 東京工業大学 名誉教授

大竹 久夫 大阪大学大学院工学研究科 教授

大森 正之 東京大学 名誉教授

嵯峨 直恒 北海道大学大学院水産科学研究院 院長

竹山 春子 早稲田大学理工学術院 教授

田畑 哲之 (財)かずさDNA研究所 所長

民谷 栄一 大阪大学大学院工学研究科 教授

横田 明穂 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 教授

横山 伸也 鳥取環境大学環境学部環境学科 教授

(参考)

件数はいずれも、平成26年3月末現在。

##### (1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	2	49	51
口頭	91	55	146
その他	18	2	20
合計	111	106	217

##### (2) 特許出願件数

国内	国際	計
5	1	6

##### (3) 受賞等

・蓮沼 誠久 研究者

バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究奨励賞 (H25.10.9)

「システムバイオロジー解析に基づく高機能型酵母創製とセルロースエタノール高生産技術開発への応用」

・本田 孝祐 研究者

長瀬科学技術振興財団 長瀬研究振興賞(H25.4.26)

「合成代謝工学によるオンデマンド・バイオプロセスの開発」

天野エンザイム株式会社 第14回酵素応用シンポジウム研究奨励賞(H25.6.14)



「耐熱性酵素モジュールを用いたオンデマンド・バイオプロセスの開発」

(4)招待講演

国際 23 件

国内 30 件



## 別紙

「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」領域  
事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
朝山 宗彦 (兼任)	自己溶菌藻と発現ベクターを組み合わせた有用物質生産・回収による排気 CO <sub>2</sub> ガス再利用資源化のための基盤技術創成 (茨城大学)	茨城大学農学部 教授 (同准教授)	39
蘆田 弘樹 (兼任)	バイオ燃料高生産のための炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成 (神戸大学)	神戸大学大学院人間発達環境学研究科 人間環境学専攻 准教授 (奈良先端科学技術大学院大学 助教)	48
小山内 崇 (専任)	糖代謝ダイナミクス変化によるラン藻バイオプラスチックの増産 (理化学研究所環境資源科学研究センター統合メタボロミクス研究グループ代謝システム研究チーム)	JST さきがけ研究者 (理化学研究所 植物科学研究センター 基礎科学特別研究員)	40
鞆 達也 (兼任)	暗所で光合成を行う藻類の創生 (東京理科大学)	東京理科大学理学部教養学科 准教授 (同上)	49
中村 友輝 (兼任)	真核藻類のトリグリセリド代謝工学に関する基盤技術の開発 (Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica)	中央研究院植物暨微生物學研究所 (Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica) 助研究員 (A. von Humboldt Research Fellow, Department of Plant Developmental Biology, Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research)	40
蓮沼 誠久 (兼任)	高増殖性微細藻の合成を目指した微細藻代謝フラックス制御機構の解明 (神戸大学)	神戸大学自然科学系先端融合研究環 准教授 (同講師)	40
日原 由香子 (兼任)	グリコーゲンから油脂へ: シアノバクテリア変異株の代謝改変 (埼玉大学)	埼玉大学大学院理工学研究科 准教授 (同上)	39
本田 孝祐 (兼任)	バイオマス高度利活用を志向した人工代謝システムの創出 (大阪大学)	大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 准教授 (同上)	52
増川 一 (専任)	ラン藻の窒素固定酵素ニトロゲナーゼを利用した水素生産の高効率化・高速化 (神奈川大学)	JST さきがけ研究者 (神奈川大学光合成水素生産研究所 客員研究員)	39

# 研究報告書

## 「自己溶菌藻と発現ベクターを組み合わせた有用物質生産・回収による排気 CO<sub>2</sub> ガス再利用資源化のための基盤技術創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究者: 朝山 宗彦

### 1. 研究のねらい

糸状性シアノバクテリア ABRG5-3 株は、細胞増殖が早く、炭酸ガス固定能にも優れた新種藻です。また細胞破碎剤添加や超音波などによる物理的な刺激を与えなくても、培養条件に依存して自己溶菌する特徴を有しています。一方、バイオ燃料等有用物質製造に関しては、最近、藻の高生産能が注目されています。本研究では、まず自己溶菌メカニズムを理解することを目的としています。次に藻発現ベクターを構築し、それを利用して遺伝子操作藻を創生し、バイオ燃料等任意の目的物質を藻細胞に高生産させるばかりでなく、生産藻細胞を手間要らずに溶かして、培地中から目的物質を簡単に回収する基盤技術の創成を目指しています。

### 2. 研究成果

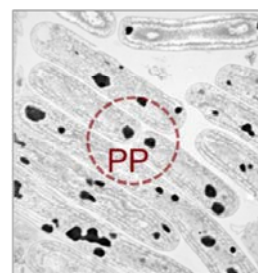
#### (1) 概要

本研究では、新種藻 ABRG5-3 株の特徴である自己溶菌の要因の一端を解明することができました。一方、有用物質生産に関しては、シアノバクテリア藻発現ベクターの構築に成功し、目的物質をシアノバクテリアで高生産することが可能になりました。その一例として、バイオ燃料(飽和炭化水素)高生産株を創生しました。この株を用い、2段階培養法(振とう培養後、静置条件に晒す)により溶菌が簡単に誘導されることを発見しました。これを利用して、溶菌液上澄から手間要らずにバイオ燃料を回収することができるようになりました。

#### (2) 詳細

##### (1) 自己溶菌メカニズム解明

自己溶菌は、まず「初期」過程ではチラコイド内膜系の崩壊、続いて「中期」では細胞間接着点付近に蓄積するポリリン酸(PP, 右図)などリン酸化合物による細胞構造上の歪みの誘導(学術論文 Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013)、そして「後期」では細胞壁が溶菌酵素によって崩壊することが明らかになってきました。このように、自己溶菌は、幾つかの要因が組み合わさって進行するものと思われます。更なる原因究明として、チラコイド膜構造形成に関与する脂質等の成分分析や細胞壁溶菌酵素遺伝子等の同定を試みています。



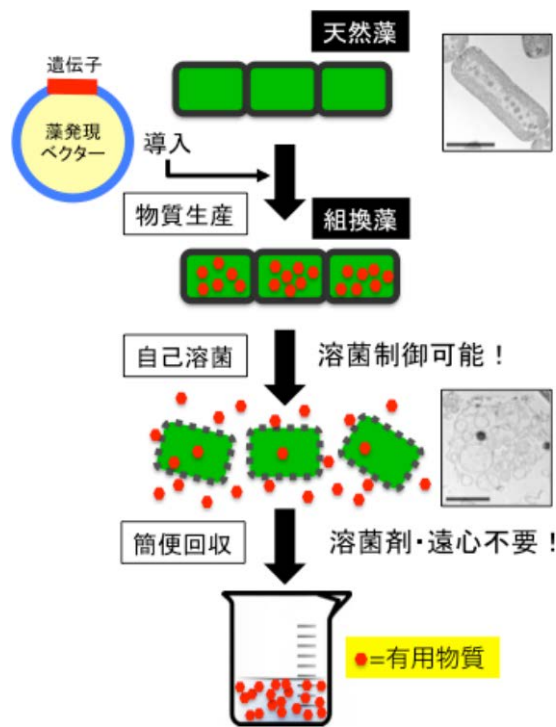
##### (2) シアノバクテリア発現ベクター開発

シアノバクテリアを含むグラム陰性菌を広域宿主とする藻発現(シャトル)ベクター pAM の開発に成功しました(学術論文 Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012)。このベクターの遺伝子発現制

御領域(ECE)は、明暗培養条件に関わらず、目的遺伝子の高効率転写発現と mRNA の安定性が確保されるようにデザインされています。これにより組換ベクターは、接合伝達により様々なシアノバクテリア藻細胞へ導入することができます。

### (3) バイオ燃料高生産藻の創生

バイオ燃料の一種アルカン(飽和炭化水素)を合成する遺伝子群を挿入した組換ベクターをシアノバクテリア細胞に導入し、組換藻 *Synechocystis* 6803\_ALK11 並びに *Limnothrix/Pseudanabaena* 5-3\_ALK11 株を創生しました。両組換株において、2%炭酸ガス(大気中の濃度の約 50 倍)供給培養条件下では、野生株と比較して 5~7 倍程度の目的物質(ヘプタデカン, C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>)の増産が確認されました(特開 2013-198473)。



### (4) 目的物質簡便回収法

緑色蛍光蛋白質(GFP)を過剰蓄積する ABRG5-3 株組換藻を創生し、自己溶菌させた後、培養液上澄より GFP を回収することに成功しました(首都圏北部4大学発新技術説明会, 学術論文 Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012)。更に ABRG5-3 株の自己溶菌誘導因子を検証したところ、振とうから静置への培養条件の切りかえ(2段階培養)をした際、暗黒曝露等も溶菌に相乗効果を与えることが明らかになりました。以上をもとに、バイオ燃料生産藻 5-3\_ALK11 株を自己溶菌させ、培養液上澄よりアルカンの簡便回収が行なえるようになりました(上図, 学術論文投稿準備中)。

## 3. 今後の展開

自己溶菌メカニズムの更なる解明と共に、それを溶菌制御系確立に反映させてゆきたいと考えています。また得られた組換藻を用いて大規模培養に挑戦し、目的物質製造の実用化を図っていきたいと思います。目的物質に関しては、バイオ燃料の他に、バイオプラスチック(PHB)高生産藻の創生にも成功していますが、今後は、他の高付加価値物質の生産にも挑戦したいと思っています。さきがけ本研究で得られた成果が、藻の研究や産業に役に立ち、それを通じて少しでも社会貢献ができればと願っています。

## 4. 評価

### (1) 自己評価

自己溶菌メカニズムの解明に関しては、進行過程を「初期」・「中期」・「後期」と捉えた場合、「中期」にあたる時期に ABRG5-3 細胞内にポリリン酸などリン酸化合物の蓄積が溶菌の引き金になっていることを明らかにすることができたことは評価に値します。また「初期」と「後期」に



関与すると思われる本株に特徴的な生体構成分子や遺伝子についても現在新たな知見が得られてきていますので、全容解明に向けて今後更なる研究の発展が期待されます。一方、自己溶菌藻を利用した有用物質生産系に関しては、藻発現ベクターの構築から始まり、バイオ燃料（飽和炭化水素）高生産藻の創生に成功しました。更には簡単に自己溶菌を誘導する培養条件を発見し、実際に溶菌培養液上澄より手間要らずにバイオ燃料を回収できるような基盤技術創成に至ったことは、本研究課題の目標を充分達成できたと言えます。

## (2) 研究総括評価

藻類によるバイオ燃料生産技術の開発では、細胞における目的物質の生産効率が重要であるばかりか、その後の抽出・製造に関する経費削減が実用化に向けた高いハードルとなっている。そこで、自己溶菌藻にバイオ燃料等を高効率で生産させた後、自己溶菌を制御誘導し、低コストで簡単に回収する基盤技術の開発に取り組んでいる。期間内に論文や特許を取りまとめ、研究領域に貢献を果たしたと評価する。今後は、アイデアを大切に、チャレンジ精神を忘れず、実用化を目指して高密度高速培養装置の開発、培養の大規模化及び生産物質の抽出・製造の更なる実証試験に取り組むことを期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Asayama M.  
Overproduction and Easy Recovery of Target Gene Products from Cyanobacteria, Photosynthesizing Microorganisms.  
**Appl. Microbiol. Biotechnol.** (2012) 95:683-695
2. Kitazaki C, Numano S, Takanezawa A, Nishizawa T, Shirai M, Asayama M.  
Characterization of Lysis of Multicellular Cyanobacterium, *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. Strain ABRG5-3.  
**Biosci. Biotechnol. Biochem.** (2013) 77:2339-2347

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.  
発 明 者: 朝山 宗彦  
発明の名称: 自己溶菌能を有するシアノバクテリアを用いた物質の製造及び回収方法  
出 願 人: 茨城大学  
出 願 日: 2011/9/28  
出 願 番 号: 特開 2013-198473 (2013)

### (2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 朝山 宗彦  
溶ける藻を利用したバイオ燃料等の大量生産と回収方法「Overproduction and Easy Recovery of High-Value Products like Biofuel from Autolysed Cyanobacteria」

首都圏北部4大学発新技術説明会 (2012.6.12, JST 東京別館ホール・市ヶ谷)

2. Asayama M, Takanezawa A, Takahashi M, Numano S, Kitazaki T, Nishizawa T, Shirai M.  
Characterization of Auto Cell-Lysis of a Novel Filamentous Cyanobacterium.  
112th General Meeting of American Society of Microbiology (2012.6.16-19, San Francisco)  
Abstract 12-GM-A-840-ASM, Poster Boad I-2366
3. 日経産業新聞(掲載日 2012.7.25 日刊 6 頁)  
「バイオ燃料藻、分離簡単、製造費安く」
4. 朝山 宗彦  
藻類バイオマスの利用「Algal Biomass for Future」  
中国産業創造センター主催 平成 24 年度 第 2 回「環境・エネルギーセミナー：  
二酸化炭素を資源と捉え、その循環を考える」(2013.2.22, ワークピア広島)
5. 本堂彩花、高橋正俊、沼野節子、北崎千富美、長谷川守文、朝山宗彦  
藻類バイオプラスチック PHB 高増産株の創生  
日本農芸化学会 関東支部大会 2013 (2013.11.22, 慶応大学日吉キャンパス)  
ポスター番号 P-03 (要旨集 p16)

# 研究報告書

## 「バイオ燃料高生産のための炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 蘆田 弘樹

### 1. 研究のねらい

近年、化石燃料の将来的な枯渇が大きく懸念されており、エネルギー問題が日々、大きく取り上げられている。次世代におけるエネルギー源確保のための世界動向は、化石燃料に頼らない次世代エネルギー生産へ、特に化石燃料から生物生産エネルギーへと大きな方向転換が行われようとしている。このためのアプローチの一つとして、シアノバクテリアや藻類を利用したバイオ燃料生産に期待が持たれている。これら光合成生物は、光をエネルギー源に、光合成で固定した炭素を直接原料としてバイオ燃料を生産することが可能である。食糧原料と競合しないこと、カーボンニュートラルな燃料生産が可能なることから、次世代エネルギー生産系として期待が持たれている。特に、シアノバクテリアは、生育が速く、高い光合成能力を有することから、バイオ燃料生産ホストとして大いに期待が寄せられている。実際、代謝工学により、バイオ燃料生産代謝を導入することにより、シアノバクテリアを用いた様々なバイオ燃料生産の成功が報告されている。しかしながら、シアノバクテリアを次世代バイオ燃料生産ホストとして確立するためには、さらにバイオ燃料生産性を高め、生産コストを下げるのが課題である。このためには、シアノバクテリアの光合成炭素固定能の強化が必須である。

RuBisCO はカルビンサイクルにおいて、リブロースビスリン酸に  $\text{CO}_2$  を固定するカルボキシラーゼ反応を触媒する光合成炭素固定酵素である。しかし、RuBisCO は  $\text{CO}_2$  固定反応を拮抗的に阻害する  $\text{O}_2$  との反応性により生じるオキシゲナーゼ反応を触媒し、さらに  $\text{CO}_2$  固定反応速度が非常に遅いといった、 $\text{CO}_2$  固定酵素として非効率な酵素特性を有する。これらが原因となり様々な局面において光合成を律速している。本さきがけ研究では、RuBisCO の機能発現機構・機能進化の解明を行い、その結果を基に RuBisCO の機能発現最適化を行うことで、シアノバクテリアの光合成炭素固定能力の強化を目指すことを目的とした。また、得られた成果をシアノバクテリアにおけるバイオ燃料生産増加へ応用することも目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シアノバクテリアの RuBisCO は一般に、 $\text{CO}_2$  親和性が低く、高い  $\text{O}_2$  反応性を示す。このような RuBisCO の酵素学的欠点を補い、RuBisCO の  $\text{CO}_2$  固定反応を最適化するために、シアノバクテリアは細胞内小器官 carboxysome 内に高い  $\text{CO}_2$  濃度環境を作り出し、この中で RuBisCO を機能させている。シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 を用いて、carboxysome における RuBisCO の機能発現機構を解析した結果、carboxysome の形成と形態を RuBisCO が制御していることを明らかにした。さらに、RuBisCO 発現量を人為的に制御し、carboxysome の形態・形成を変化させるすることにより、シアノバクテリアの光合成速度を

増加・低下させるコントロールが可能であることを明らかにした。

本研究では、RuBisCO の進化に着目し、機能そのものを強化するための基礎研究も行った。RuBisCO 機能進化解析から、好熱性シアノバクテリア RuBisCO が常温性シアノバクテリアのものと比較して熱安定性と CO<sub>2</sub> 親和性が高く、進化上、高い機能性を獲得していることを明らかにした。また、非光合成生物の RuBisCO ホモログと RuBisCO との比較解析から RuBisCO の機能発現機構を明らかにした。一方で、アーキアの RuBisCO ホモログは CO<sub>2</sub> 固定能を有し、カルビン回路の原型ともいえる、アーキア型新規 CO<sub>2</sub> 固定回路で機能していることを明らかにした。

上記の成果をシアノバクテリアのバイオ燃料生産能強化へ応用するための研究も行った。*S. elongatus* PCC7942 株に pyruvate decarboxylase (PDC) と alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子を導入した代謝改変エタノール生産株に、RuBisCO 機能強化を施し光合成速度を増加させることで、エタノール生産性を向上することに成功した。

## (2) 詳細

シアノバクテリアは、RuBisCO の CO<sub>2</sub> 固定反応を最適化するために、carboxysome と呼ばれるタンパク質シェルから構成される CO<sub>2</sub> 濃縮細胞小器官を進化させている。無機炭素濃縮機構により carboxysome 内に高 CO<sub>2</sub> 環境を作りだし、この中で RuBisCO を機能させることで、ほとんど O<sub>2</sub> 阻害を受けずに CO<sub>2</sub> 固定を行うことができる。このことから、RuBisCO 機能発現と carboxysome 形成の間には、何らかの相互制御メカニズムがあると予想されるが、これまで明らかにされていなかった。そこで、carboxysome 内における RuBisCO の機能発現機構解明を目指し、RuBisCO 量を増加、または低下させた *Synechococcus elongatus* PCC7942 変異株を作製し、解析した。興味深いことに、RuBisCO 量を2または10倍に増加、または RuBisCO 遺伝子をヘテロに破壊し RuBisCO 量を1/2に低下させた *Synechococcus elongatus* PCC7942 変異株を解析した結果、RuBisCO 量の増加に伴い carboxysome が肥大すること、また、RuBisCO 量低下により carboxysome が減少することが明らかになった。このことから、RuBisCO 合成と carboxysome の形成・形態の間に制御メカニズムが存在すること、さらに、RuBisCO 発現量が carboxysome の形成・形態を制御していることを明らかにした。RuBisCO 量低下株と RuBisCO 量が10倍と過剰に発現している株では生育遅延と光合成活性低下が観察された。これらのことから、RuBisCO が光合成の律速因子であること、また過剰に発現しカルボキシソーム外に局在した RuBisCO は最適に機能発現ができないことを示していた。一方で、RuBisCO 量が2倍に増加している発現株では光合成活性が高くなった。このことにより、シアノバクテリアの光合成の律速段階の一つが RuBisCO の CO<sub>2</sub> 固定反応であることが明らかになった。また、RuBisCO 量を制御することで、光合成能力をコントロールが可能であり、最適な量的強化により、光合成能を増加させることができることを明らかにした。

上記の結果より、RuBisCO の酵素特性そのものの改良もシアノバクテリア光合成能強化に有効であると予想された。CO<sub>2</sub> 固定能や O<sub>2</sub> 反応性などの酵素特性が RuBisCO の機能進化上で大きなバリエーションを示すことから、RuBisCO 機能改良のための方向性を探るため、機能進化に着目した研究を行った。その成果として、好熱性シアノバクテリアである *Thermosynechococcus elongatus* BP1 や地球上で最も高温に適応している *Synechococcus*



*lividus* に常温性 *Synechococcus elongatus* PCC7942 や *Synechococcus sp.* PCC7002 のものと比較して、熱安定性が高く、約 3 倍高い CO<sub>2</sub> 親和性を示す RuBisCO を発見した。この結果から、好熱性シアノバクテリア RuBisCO が常温性のものと比較して、進化上、高い機能性を獲得していることを明らかにした。好熱性シアノバクテリアと常温性 RuBisCO を比較したところ、アミノ酸配列で 95% と非常に高い相同性を示した。このことから、好熱性と常温性 RuBisCO の比較により、数少ない置換されている残基に注目すれば、高機能性に関与する残基を同定できると期待され、実際、これら好熱性 RuBisCO で特異的に保存される残基、構造を見出した。その中でも、small subunit の C 末端 extension が特徴的であった。そこで、常温性 *Synechococcus elongatus* PCC7942 と好熱性 *Thermosynechococcus elongatus* BP1 RuBisCO の large subunit と small subunit をそれぞれ置換したキメラ RuBisCO の大腸菌発現系を構築し、解析を行った。その結果、好熱性シアノバクテリア RuBisCO の酵素特性決定には、small subunit が大きく関与していることが明らかになった。これらのことから、シアノバクテリア RuBisCO の高機能化には、small subunit に着目した分子育種が有効であると期待された。

また、RuBisCO が光合成以外でも機能するよう多様に進化していることに注目し、非光合成生物の RuBisCO ホモログの機能解析を行った。枯草菌の RuBisCO ホモログはメチオニン再生経路においてエノラーゼとして機能しており、この経路における機能、また RuBisCO とホモログの比較解析から、これまで RuBisCO のみを用いた解析からは明らかにすることができなかった光合成 RuBisCO の機能発現に必須な残基・構造を同定した。さらに、非光合成生物であり、生命の起源に近いとされるアーキアが有する RuBisCO ホモログは、どのような分子進化の末に今もなお RuBisCO が効率の悪い CO<sub>2</sub> 固定酵素であるのかを解析する好材料である。解析の結果、アーキアの RuBisCO ホモログは RuBisCO であった。しかしながら、一般的にアーキアは光合成生物の RuBisCO が機能する CO<sub>2</sub> 固定のためのカルビンサイクルを有しておらず、RuBisCO の基質リブローズビスリン酸をリブローズ-5-リン酸から合成するホスホリブロキナーゼ (PRK) を欠失している。本研究により、一部のメタン菌において、アーキア型 PRK を同定した。これらの結果から、アーキアにおいて光合成カルビンサイクル様の RuBisCO と PRK が機能する新規 CO<sub>2</sub> 固定経路の存在が示唆された。アーキアが光合成生物よりも前に出現してきた生物であると考えられていることから、このアーキアの経路がカルビンサイクルの原始経路で、ここで機能する RuBisCO が光合成 RuBisCO の進化的原型であると予想された。RuBisCO の反応生成物解析から、このアーキア RuBisCO の O<sub>2</sub> 反応性が非常に高かったことから、分子進化初期から RuBisCO の O<sub>2</sub> 反応性が既に獲得されていたことが示唆された。

上記の研究成果をシアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産に応用するために、まず、バイオエタノール生産系の確立を行った。これまでの報告を参考に、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 にアルコール発酵菌である *Zymomonas* 由来の pyruvate decarboxylase と NADH 依存型 alcohol dehydrogenase 遺伝子を導入し、培地中にエタノール生産代謝導入株を出発株とし、エタノール生産系の検討・改良を行った。この株を用いた系では、培地中に生産されたエタノールが蓄積することから、回収が容易である利点がある。改良・最適化の結果、光合成で直接合成される NADPH を補酵素に用いる alcohol dehydrogenase を利用することで、エタノール生産量が最適化前の 3~4 倍に増加した。また、

最適に RuBisCO の量的強化を施し光合成能が向上した株を用いてエタノール生産することで、強化前と比較して、エタノール生産量を 1.2 倍に増加させることに成功した。この株では、1 L の培地あたり、2 g 以上のエタノール生産が可能であった。この結果は、RuBisCO 機能強化が、シアノバクテリアにおいてバイオ燃料生産量を増加させる一つの方向性であることを示していた。

### 3. 今後の展開

エタノール生産代謝導入シアノバクテリアの光合成およびエタノール生産量解析から、光合成で固定した炭素の実に 60%がエタノール合成に利用されていた。このため、シアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産を制限する大きな要因の1つは、光合成炭素固定であると結論される。シアノバクテリアのバイオ燃料生産効率を大きく向上させるためには、光合成炭素固定能そのものを強化するブレークスルーが必須である。

本さがけ研究において、シアノバクテリアにおける、RuBisCO による carboxysome 形態・形成制御機構の存在が明らかになったことから、RuBisCO-carboxysome CO<sub>2</sub> 固定複合体形成の人為的制御が可能となった。実際、RuBisCO 量による CO<sub>2</sub> 固定複合体形成制御を介して光合成能を向上させ、バイオエタノール生産量増加に成功した。また、好熱性シアノバクテリアや非光合成 RuBisCO の機能解析の結果から、RuBisCO の機能改良ターゲットとなる構造・残基の同定が可能となった。これらにより、RuBisCO そのものの機能改良または CO<sub>2</sub> 固定複合体としての機能強化の新しい方向性が開けた。

今後は、これら両方向からの RuBisCO 機能発現最適化を行うことで、シアノバクテリアの光合成炭素固定能強化を行い、バイオ燃料高生産可能なシアノバクテリアの創成を目指す。更に RuBisCO を中心とした光合成炭素固定機構が明らかになることで、光合成能の根本的な改良が可能となり、シアノバクテリアで確立されてきている様々なバイオ燃料の生産能増加が期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素 RuBisCO に注目して、この酵素の機能発現最適化によるシアノバクテリアの光合成能強化ならびにこれを利用したバイオ燃料高生産化は、研究のねらい通り、達成できたと考えている。また、将来的な、更なる RuBisCO 機能強化のための材料や方向性も、準備できたと考えている。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。

光合成炭素固定酵素ルビスコとCO<sub>2</sub>濃縮細胞小器官カルボキシソームの量的強化を行い、エタノールの高生産を目指す研究を行っている。外来性優良ルビスコ過剰発現による炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成に向けた独創的な研究で発展性が期待される。また、論文等の業績などは満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果た

したと評価する。今後は、CREST との融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、更なる進展を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kang W, Hong SH, Lee HM, Kim NY, Lim YC, Le LT, Lim B, Kim HC, Kim TY, Ashida H, Yokota A, Hah SS, Chun KH, Jung YK, Yang JK. Structural and biochemical basis for the inhibition of cell death by APIP, a methionine salvage enzyme. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 2014, 111, E54–E61, doi: 10.1073/pnas.1308768111.
2. Nakano T, Ohki I, Yokota A and Ashida H. MtnBD is a Multifunctional Fusion Enzyme in the Methionine Salvage Pathway of Tetrahymena thermophila. PLoS One, 2013, 8, e67385.doi: 10.1371/journal.pone.0067385.
3. Nakano T, Saito Y, Yokota A and Ashida H. Plausible novel ribose metabolism catalyzed by enzymes of the methionine salvage pathway in Bacillus subtilis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013, 77, 1104–1107.
4. Nakano T, Saito Y, Yokota A, Ashida H. His267 is involved in carbamylation and catalysis of RuBisCO-like protein from Bacillus subtilis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 431, 176–80.
5. Ashida H and Yokota A. Increasing photosynthesis/RuBisCO and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. Comprehensive Biotechnology, 2011, 4, 165–176.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会発表

1. 蘆田弘樹、RuBisCO 機能進化研究 ~RuBisCO-like protein の解析を通して、日本光合成学会若手の会第4回セミナー 2011年6月
2. 蘆田弘樹、メチオニン欠乏環境で機能する枯草菌メチオニン再生経路酵素 RuBisCO-like protein と光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素 RuBisCO の比較研究 第84回 日本生化学会大会 シンポジウム 2011年9月
3. Hiroki Ashida, Perspectives of research on increasing photosynthesis in cyanobacteria by overcoming the limitations of CO<sub>2</sub>-fixing enzyme, RuBisCO. 日本化学会第92春季年会 JST さきがけ四領域国際シンポジウム 2012年3月
4. 河野卓成、遠藤千夏子、Mehrotora Sandhya、横田明穂、蘆田弘樹 メタン産生アーキア Methanospirillum hungatei における RuBisCO と PRK を利用した新規 CO<sub>2</sub> 固定回路の解析 日本農芸化学会 2012年度大会 2012年3月
5. 河野卓成、遠藤千夏子、Mehrotora Sandhya、横田明穂、蘆田弘樹 メタン菌における Pre-Calvin cycle の解析 日本 Archaea 研究会 第25回講演会 2012年7月

6. Hiroki Ashida, Evolutional and functional diversity of RuBisCO and RuBisCO-like proteins. Japanese-Finnish Seminar 2012, Sep. 2012
7. 蘆田弘樹、食糧問題解決に期待される光合成微生物の CO<sub>2</sub> 固定酵素ルビスコが持つポテンシャル 日本化学会第93回春季年会 (2013)、アドバンス・テクノロジー・プログラム 2013年3月
8. 河野卓成、遠藤千夏子、横田明穂、蘆田弘樹 アーキアが有する phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析 日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月
9. 蘆田弘樹、向川佳子、小林知佑、横田明穂 シアノバクテリアを用いたエタノール生産のための代謝改変 日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月
10. 河野卓成、遠藤千夏子、横田明穂、蘆田弘樹 アーキアが有する光合成カルビンサイクル酵素 phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析 日本 Archaea 研究会 第26回講演会 2014年7月
11. 蘆田弘樹 光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素ルビスコの基礎研究とその成果を用いた応用研究 東京大学生産技術研究所第1回応用化学セミナー 2014年7月
12. Takunari Kohno, Chikako Endo, Akiho Yokota and Hiroki Ashida. Enzymatic analysis of archaeal homologues of phosphoribulokinase, a key enzyme in the photosynthetic Calvin cycle. 30th of the Gordon conference of Archaea: Ecology, Metabolism and Molecular Biology. July 2014
13. 蘆田弘樹 ラン藻を用いたエタノール高生産を目指したルビスコ機能強化研究 第4回藻類バイオ燃料生産技術研究会 2014年9月
14. 蘆田弘樹 光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素ルビスコの機能進化を探る 第27回インターゲノミクスセミナー 2014年12月
15. 蘆田弘樹、向川佳子、横田明穂 シアノバクテリアにおける RuBisCO 発現量によるカルボキシソーム形成制御機構 日本農芸化学会 2014年度大会 2014年3月
16. 河野卓成、遠藤千夏子、木津奈津子、木村浩之、溝端栄一、井上豪、松村浩由、横田明穂、蘆田弘樹アーキア型 phosphoribulokinase の機能解析 日本農芸化学会 2014年度大会 2014年3月

#### 著作物

1. 蘆田弘樹 シアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産技術の開発 藻類オイル 開発研究の最前線、株式会社エヌ・ティー・エス、2013年、pp149-161
2. シアノバクテリアの光合成能を利用したバイオ燃料生産 生物工学会誌、2013年、91巻、6号、pp352



# 研究報告書

## 「糖代謝ダイナミクス改変によるラン藻バイオプラスチックの増産」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 小山内 崇

### 1. 研究のねらい

本研究では、光合成をする細菌ラン藻(シアノバクテリア)を用いて、バイオプラスチックであるポリヒドロキシ酪酸(PHB)を増産することを目的とした。PHBは、ラン藻などの細菌が合成するポリエステルであり、生分解性を有することが知られている。ラン藻を用いて二酸化炭素からPHBを合成することにより、将来的に脱化石燃料に通じる環境技術の創出へとつなげることを大きな目標にしている。

ラン藻を始めとする微細藻類を用いた物質生産は、世界的に熾烈な競争となっている。目的物質を増やすためには、目的物質を合成する酵素の活性を増大させることが直接的な方法である。しかし、この方法では、細胞内の代謝バランスが崩れて細胞の増殖が悪くなることや、基質が枯渇して酵素活性に見合った目的物質の増加が見られないなど、様々な問題がある。そこで本研究では、局所的な酵素活性の増大ではなく、代謝全体、特に有機化合物の元となる炭素の代謝を大きく変える手法を開発し、PHBなどの有用原料を増産するという新しい方法論の開発を目的とした。

過去の研究から、細菌の基本転写装置であるRNAポリメラーゼシグマ因子SigEが、炭素の代謝、特に糖異化を正に制御することが明らかになっていた。他の光合成生物同様に、ラン藻の代謝は、大気中の二酸化炭素を固定して多糖類(主にグリコーゲン)を合成する糖の「同化」と、合成した多糖類を分解して、炭素源やエネルギー源とする糖の「異化」に大別される。糖異化にはグリコーゲン異化や、解糖系、酸化的ペントースリン酸経路などが含まれ、SigEが糖異化に関与する酵素遺伝子の転写を幅広く促進することが明らかになっていた。

本研究では、このSigEを始めとする転写制御因子を利用することにより、グリコーゲンなどの分解を促進し、炭素源の流れをPHBへと向けた。この手法を「糖代謝ダイナミクスの改変」と名付け、ラン藻の代謝改変とPHB生産における新手法を開発した。また、この方法では、炭素やエネルギーの代謝を大きく変えるため、PHBの生産以外にも幅広く応用できる可能性がある。本研究では、研究の過程でPHBと水素の生産が関連していることが明らかになり、PHB以外の物質、特に水素の生産手法の開発についても研究対象とした。さらにSigEだけでなく、他の転写因子も解析をすることで、SigEとは異なる形で、代謝やPHB生産を制御するメカニズムを明らかにした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、主に淡水性ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて研究開発を行った。特に、RNAポリメラーゼシグマ因子 SigE や窒素応答性レスポンスレギュレーター Rre37 など、

ラン藻の転写制御因子を中心に解析を行った。これらの転写制御因子の遺伝子を改変することにより、ラン藻の糖代謝を大きく変え、目的物質であるポリヒドロキシ酪酸(PHB)を増産することに成功した。PHB は、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の一種で生分解性のポリエステルである。他の細菌同様、ラン藻は窒素欠乏時にPHBを合成することが知られている。ラン藻ではこれまでに、PHB 生合成酵素遺伝子の転写制御因子は見つかっていなかった。SigE、または、Rre37 タンパク質を、ラン藻細胞内で増加させることにより、PHB 合成酵素の転写やタンパク質量が増加することが分かり、両タンパク質が、PHB 合成酵素遺伝子の転写制御因子であることを明らかにした。また、SigE に関しては、PHB や糖代謝だけでなく、細胞のサイズや光合成、また、水素生産にも関係することが分かった。特に SigE タンパク質を増加させることで、嫌気条件での水素生産量が、野生株の2倍に増加することが分かった。このように、本研究では、代謝の制御因子を明らかにしていくことで、バイオプラスチックの増産に新手法をもたらすとともに、水素といった他の有用物質の生産方法も開発することができた。

これらの研究成果は、原著論文として国際誌で発表された他、特許出願、プレスリリース、新聞報道などによっても、一般社会に公開された。

## (2) 詳細

本研究では、ラン藻が窒素欠乏時に合成するポリエステルである PHB の増産を目指した。研究は、淡水性非窒素固定型ラン藻である *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて行った。

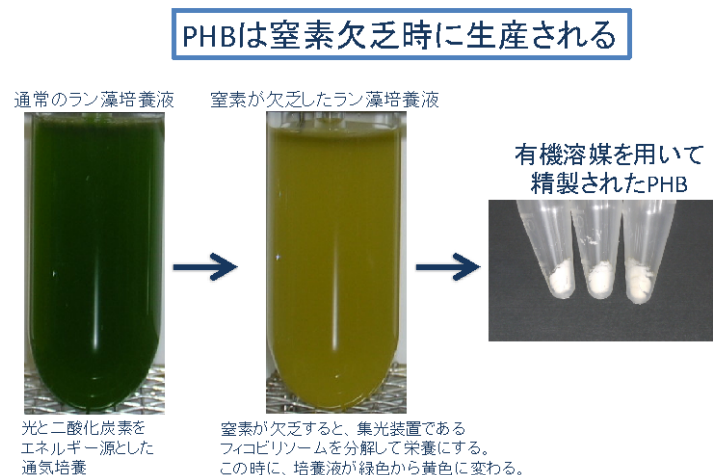


図1 ラン藻 *Synechocystis* の培養液および精製された PHB

研究テーマ A「RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE による糖代謝制御機構の解明と PHB 増産」  
発表論文 Osanai et al. 2011, *J. Biol. Chem.*; Osanai et al. 2013, *DNA Res.*

過去の研究から、*Synechocystis* の *sigE* 欠損株では、グリコーゲン異化、解糖系、酸化的ペントースリン酸経路などの糖異化酵素遺伝子群の転写が減少することが明らかになっていた。

本研究では、光合成反応中心タンパク質 PsbAII の遺伝子のプロモータを利用することで、SigE タンパク質量を増やした SigE 過剰発現株を構築した。SigE 過剰発現株を解析したところ、グリコーゲン異化酵素や酸化的ペントースリン酸経路の酵素の mRNA およびタンパク質量が増加することが分かり、グリコーゲン量が約2~3割減少することが明らかになった。キャピラリー電気泳動マスマスペクトロメトリーによるメタボローム解析を行ったところ、アセチル CoA やクエン酸など、糖異化下流の代謝産物が増加することが分かった。これらの結果より、SigE を過剰発現することによって、糖異化が包括的に促進されることが明らかになった(Osanai et al. 2011, *J. Biol. Chem.*)。

SigE 過剰発現株を用いてトランスクリプトーム解析を行った結果、PHA 合成酵素である PhaC と PhaE の遺伝子が、SigE の制御下にあることが示唆された。そこで、SigE 過剰発現株を用いて、PHB 合成に関与する4つ酵素(PhaA, B, C, E)の遺伝子発現を調べたところ、mRNA およびタンパク質量が変化することが分かった。窒素欠乏時の PHB 量を比較したところ、SigE の過剰発現によって、PHB 量が 2.5 倍に増加することが明らかになった。一方、分子量や化学組成など、PHB の質は変化しなかった。これまでにラン藻では、PHA 合成酵素遺伝子の転写制御因子は見つかっておらず、本研究によって、ラン藻における最初の PHA 合成酵素遺伝子の転写制御因子の発見となった(Osanai et al. 2013, *DNA Res.*)。

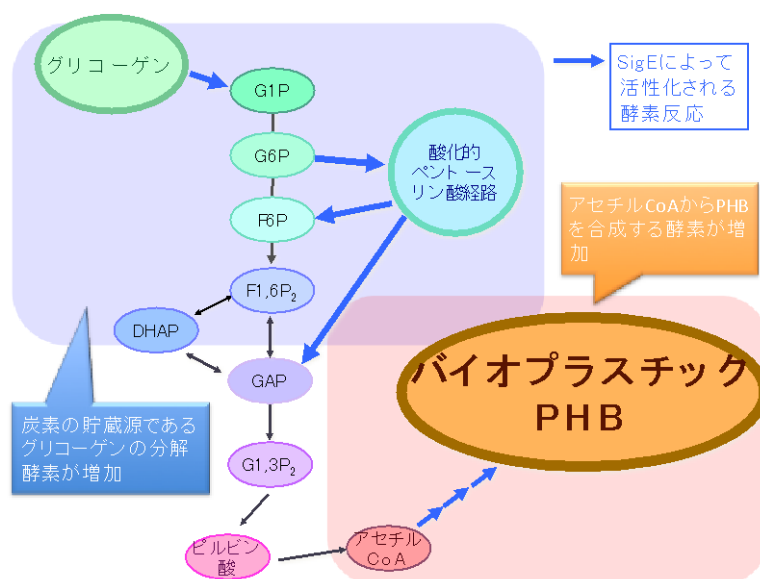


図2 SigE による糖代謝制御と PHB 増産のモデル図

SigE は、グリコーゲン異化、酸化的ペントースリン酸経路、PHB 合成などに関与する酵素遺伝子の発現を包括的に促進することが分かった。

研究テーマ B「窒素欠乏時のラン藻の代謝変化とレスポンスレギュレーターRre37 による PHB 増産」

発表論文 Osanai et al. 2014, *Environ. Microbiol.*; Osanai et al. 2014, *Plant Physiol.*

過去の研究から、レスポンスレギュレーターRre37 は、SigE と同様に、窒素欠乏時に転写

が誘導されることが知られていた。*rre37*欠損株を用いた過去の解析から、Rre37は、グリコーゲン異化や解糖系など、SigEとは違った形で *Synechocystis* の糖代謝に関与することが知られていた。

本研究において、Rre37 過剰発現株を構築し、トランスクリプトーム解析を行ったところ、グリコーゲン異化や解糖系、PHB 合成およびアミノ酸代謝に関与する酵素遺伝子の発現が増加していることが明らかになった。特に Rre37 過剰発現によって、通常培養条件下でのグリコーゲン量が野生株の 10 分の 1 に減少した。また、Rre37 過剰発現によって、特に PhaA および PhaB の発現が増加することが分かった。窒素欠乏時の PHB 量を調べたところ、Rre37 過剰発現によって、野生株(対照株)の2倍に増加した。また、SigE との二重過剰発現を行ったところ、野生株の3倍に増加することが明らかになった

(Osanai et al. 2014, *Plant Physiol.*)

窒素欠乏条件で培養したラン藻から抽出したPHB量の比較

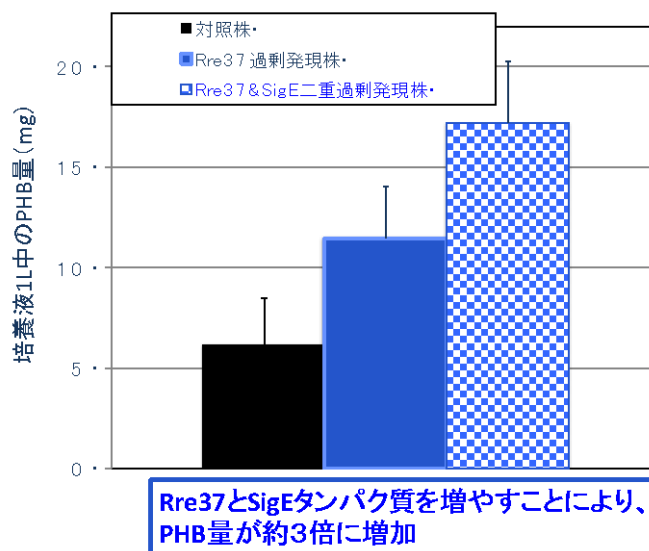


図3 窒素欠乏時の Rre37 過剰発現株および Rre37&SigE 二重過剰発現株の PHB 量

また、本研究では、野生株や Rre37 過剰発現株を用いて、詳細なメタボローム解析を行った。その結果、ラン藻における代謝の新事実が明らかになってきた。野生株の窒素欠乏時のメタボロームデータを検討したところ、リン酸基が多いヌクレオチドほど、より大きく減少するという法則が見出された。また、還元力 NADH と NADPH の量を測定したところ、NADPH/NADH 比が窒素欠乏によって減少することが分かった。さらに窒素欠乏4時間後では、窒素を多く含むアミノ酸が減少するのに対し、それ以外のアミノ酸はすべて増加するという変化が起こった。このように、窒素欠乏になったラン藻は、炭素や窒素代謝産物をダイナミックに再分配することが示された(Osanai et al. 2014, *Environ. Microbiol.*)。

さらに Rre37 過剰発現株のトランスクリプトームおよびメタボローム解析により、Rre37 が TCA 回路(クエン酸回路)とオルニチン回路(尿素回路)の遺伝子を制御することが明らかになった。これらのデータを統合すると、TCA 回路とオルニチン回路の“ハイブリッド回路”



が窒素欠乏下で出現する可能性が示唆された。この回路では、1サイクルあたり2分子のアンモニア分子が同化されるため、窒素欠乏時に、一過的にこのハイブリッド回路が活性化されることは、生理学的に重要と思われる(Osanai et al. 2014, *Plant Physiol.*)。

このように本研究では、PHB 増産に転写制御因子を利用するという新しい手法を開発するとともに、ラン藻の代謝における法則を見つけるなど、基礎研究においても重要な知見を提供した。

研究テーマ C「SigE 過剰発現株における代謝、光合成、細胞の形態など多様な表現型と水素の増産」

発表論文 Osanai et al. 2013, *Plant J.*

SigE を解析する過程で、SigE 過剰発現株では様々な変化が起こることが明らかになった。SigE 過剰発現によって、細胞の直径が約 1.6 倍に増加することが分かった。また、SigE 過剰発現で、通常培養条件下での光合成活性および呼吸活性が 1、2 割減少した。さらに、トランスクリプトーム解析の結果より、水素の生産に関与するヒドロゲナーゼ遺伝子の発現が、SigE 制御下にあることが分かった。ラン藻は特に嫌気条件下で水素を生産することが知られている。そこで嫌気条件下の水素生産量を調べたところ、明暗条件ともに、SigE 過剰発現によって、水素生産量が約 2 倍に増加することが明らかになった。このように SigE は、好気・窒素欠乏条件では PHB の生産を、嫌気条件では水素の生産を促進するというユニークな因子であることが示された。

### 3. 今後の展開

本研究では、SigE や Rre37 を改変することで、特に糖異化が促進され、バイオプラスチックである PHB が増加することが分かった。一方で、現在の PHB 生産系では、二酸化炭素を炭素源としており、培養液あたりの PHB 生産量は、糖を炭素源とした従属栄養細菌よりも二桁以上低い。今後はさらなる代謝改変を行い、二酸化炭素からでも糖由来の PHB 生産に匹敵する技術を開発することが重要である。また、本研究では PHB の量を増やすことに主題をおいたが、PHB の分子量を増大させることや、別の PHA を合成することなど、PHA の質を変え、高機能化させることも重要である。また、SigE が水素生産にも関与することが明らかになり、バイオプラスチックと水素という一見関係のない物質が、なぜ同じ因子によって制御されているかという疑問を明らかにする必要がある。これにより、応用面ではバイオプラスチックと水素の同時生産という、生物特有のユニークな物質生産系の構築が可能となるかもしれない。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本研究によって、SigE および Rre37 という2つのタンパク質が、ラン藻の代謝改変および PHB 増産に有用であることを示すことができた。また、SigE は、嫌気条件で水素の生産にも関与するというユニークな結果を得ることが出来た。さらに、メタボローム解析を組み合わせることで、ラン藻の代謝制御機構についても一部解明が出来たと考えている。現在投稿中の論文を除いても、5本の論文(国際誌)を筆頭著者として発表し、また、2件の特許出願を行うことが

出来た。

一方で、現時点での PHB 生産量については、まだまだ社会実装からはほど遠い。我々の系では炭素源として糖を用いず、二酸化炭素のみから PHB を合成しているので、生産量が低いのは当然ではあるが、今後は糖を炭素源とした PHB 生産に匹敵するレベルの PHB 生産ラン藻系を構築していきたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

光合成を行う細菌であるラン藻を用いて、生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の増産を行うことを目的に、シグマ因子や転写制御因子に着目し、代謝ダイナミクスを改変したラン藻の作成、さらに、それらを用いた安価で環境に優しいバイオプラスチック生産系の確立を目指した研究を行っている。一期生として、3年の研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、特許出願と論文作成などの業績でも満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、未完成な成果部分の充実を図り、更なる論文成果に繋がることを期待する。また、研究者として、豊かな感性と豊富なアイデアを持つと共に、チャレンジ精神を忘れずに研究を進めていって欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. **Takashi Osanai**, Akira Oikawa, Miyuki Azuma, Kan Tanaka, Kazuki Saito, Masami Yokota Hirai, and Masahiko Ikeuchi. Genetic engineering of the group 2 sigma factor SigE widely activates the expressions of sugar catabolic genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* (2011) **286**, 30962–30971.
2. **Takashi Osanai**, Keiji Numata, Akira Oikawa, Ayuko Kuwahara, Hiroko Iijima, Yoshiharu Doi, Kan Tanaka, Kazuki Saito, and Masami Yokota Hirai. Increased bioplastic production with an RNA polymerase sigma factor SigE during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* (2013) **20**, 525–535.
3. **Takashi Osanai**, Ayuko Kuwahara, Hiroko Iijima, Kiminori Toyooka, Mayuko Sato, Kan Tanaka, Masahiko Ikeuchi, Kazuki Saito, and Masami Yokota Hirai. Pleiotropic effect of *sigE* over-expression on cell morphology, photosynthesis and hydrogen production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.* (2013) **76**, 456–465.
4. **Takashi Osanai\***, Akira Oikawa\*, Tomokazu Shirai, Ayuko Kuwahara, Hiroko Iijima, Kan Tanaka, Masahiko Ikeuchi, Akihiko Kondo, Kazuki Saito, and Masami Yokota Hirai. Capillary electrophoresis-mass spectrometry reveals the distribution of carbon metabolites during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Environ. Microbiol.* (2014) **16**, 512–524 (\*Equally contributed).
5. **Takashi Osanai**, Akira Oikawa, Keiji Numata, Ayuko Kuwahara, Hiroko Iijima, Yoshiharu Doi, Kazuki Saito, and Masami Yokota Hirai. Pathway-level acceleration of glycogen catabolism by

response regulator Rre37 in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Physiol.* (2014) DOI: 10.1104/pp.113.232025

(2)特許出願

研究期間累積件数:3件

国内出願

1.

発明者: 小山内崇 平井優美 斎藤和季 沼田圭司  
発明の名称: 藍藻においてプラスチック原料および関連物質を生産する方法  
出願人: 独立行政法人理化学研究所  
出願日: 2013/3/14  
出願番号: 特願 2013-52208

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会口頭発表

国際会議

- (1) Takashi Osanai, Akira Oikawa, Miyuki Azuma, Kan Tanaka, Masahiko Ikeuchi, Kazuki Saito, Masami Yokota Hirai “Engineering of cyanobacterial carbon metabolism with a group2 sigma factor SigE.” The 3<sup>rd</sup> International Conference on Biobased Polymers. Beijing, China, October, 2011 (招待講演).
- (2) Takashi Osanai, Akira Oikawa, Miyuki Azuma, Kan Tanaka, Masahiko Ikeuchi, Kazuki Saito, Masami Yokota Hirai “Engineering of sugar catabolism with modified transcriptional regulators in *Synechocystis* sp. PCC 6803.” Microalgal Products: From Metabolic Fundamentals to Promising Applications, Binational Seminar Germany – Japan, Freiburg–Munzingen, Germany, October–November, 2011 (招待講演).
- (3) Takashi Osanai “Using transcriptional regulators for metabolic engineering of cyanobacteria” 1<sup>st</sup> Korea–Japan Microalgae Symposium. Daejeon, Korea, October, 2013.
- (4) Takashi Osanai “Genetic engineering of the transcriptional regulators for bioplastic and hydrogen production In *Synechocystis* sp. PCC 6803. International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, March, 2014 (招待講演).

国内会議

- (1) 小山内崇 桑原亜由子 飯嶋寛子 斎藤和季 平井優美 窒素欠乏下におけるシアノバクテリア電子伝達のスイッチングについて 日本植物生理学会年会 京都産業大学 京都 2012年3月
- (2) 小山内崇 及川彰 沼田圭司 豊岡公德 佐藤繭子 桑原亜由子 飯嶋寛子 土肥義治 斎藤和季 平井優美 転写制御因子の解析を中心としたシアノバクテリア糖代謝の理解と制御 日本生物工学会年会 神戸国際会議場 兵庫 2012年10月
- (3) 小山内崇 糖異化グローバルレギュレーターを利用したラン藻バイオプラスチックの増産



第7回メタボロームシンポジウム 慶応義塾大学鶴岡キャンパス 山形 2012年10月(招待講演)

- (4) 小山内崇 代謝グローバルレギュレーター改変によるラン藻 PHB の増産 若手研究会「新規材料創製を目指した合成生物学」理化学研究所(和光) 埼玉 2012年11月(招待講演)
- (5) 小山内崇 沼田圭司 及川彰 桑原亜由子 飯嶋寛子 齊藤和季 平井優美 転写制御因子を用いたラン藻の代謝と光合成の改変 日本ゲノム微生物学会年会 神戸国際会議場 兵庫 2013年3月
- (6) 小山内崇 転写制御因子を中心としたラン藻の光合成代謝工学と物質生産 2013年植物科学シンポジウム コクヨホール 東京 2013年12月(招待講演)
- (7) 小山内崇 及川彰 沼田圭司 飯嶋寛子 桑原亜由子 齊藤和季 平井優美 Metabolic engineering using a nitrogen-responsive response regulator in cyanobacteria 日本植物生理学会年会 富山大学 富山 2014年3月

#### 著作物

- (1) 小山内崇 ラン藻によるバイオプラスチックおよび水素生産のための基礎技術開発 月刊クリーンエネルギー2014年1月号 日本工業出版株式会社
- (2) 小山内崇 ラン藻の代謝改変によるバイオプラスチック増産 化学と生物 日本農芸化学会 印刷中

#### プレスリリース

- (1) 2013年7月9日 独立行政法人理化学研究所、窒素欠乏時のラン藻の代謝を網羅的に解析し、代謝の矛盾を解消 (Osanai et al. 2014 Environ. Microbiol.の論文について)
- (2) 2013年7月16日 JST・理研共同発表 ラン藻が作るバイオプラスチックの増産に成功 代謝経路を制御する新手法 (Osanai et al. 2013 DNA Res.の論文について)
  - i. 日刊工業新聞 2013年7月17日 理研、ラン藻由来のバイオプラを代謝制御で2.5倍増産
  - ii. 化学工業日報 2013年7月17日 理研 藍藻からバイオプラ 遺伝子改良で収量向上
  - iii. 日経産業新聞 2013年7月18日 バイオプラの作製量2.5倍に 理化学研が新技術
  - iv. フジサンケイビジネスアイ 2013年11月13日 ラン藻のバイオプラスチック生産量2.5倍に
- (3) 2013年9月11日 理研発表 ラン藻の水素生産量を2倍以上増加させることに成功  
ー水素とバイオプラスチックの生産は同じタンパク質「SigE」が制御ー (Osanai et al. 2014 Plant J.の論文について)
  - i. 化学工業日報 2013年9月20日 藍藻の水素生産量を倍増 理研、遺伝子改変で実現
- (4) 2014年2月17日 理研発表 ラン藻のバイオプラスチック生産が3倍増  
ーバイオプラスチック生産の新規因子「Rre37」の発見と代謝制御機構の解明ー (Osanai et al. 2014 Plant Physiol.の論文について)
  - i. 日刊工業新聞 2014年2月24日 理研、ラン藻遺伝子を改変しバイオプラ生産量を3倍に増やすことに成功

# 研究報告書

## 「暗所で光合成を行う藻類の創生」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 鞆 達也

### 1. 研究のねらい

生物エネルギー創生の中核を為す光合成反応は、可視光に吸収極大を位置するクロロフィル、とりわけクロロフィル *a* を光エネルギー変換に用いるように進化してきた。地表に到達する太陽光エネルギーは光合成産物の酸素由来のオゾン層により紫外線の大部分はカットされており、その極大は可視領域にある。しかし、エネルギー分布を見てみると近赤外領域のエネルギー量は可視領域とほぼ同等である。このため近赤外(低エネルギー)領域を光合成反応に用いることができれば、新しいエネルギーが創生可能になる。光合成細菌もバクテリオクロロフィルを用い低エネルギー側に吸収帯をもつが、電子供与体として無限にある水を用いることができない。近年、クロロフィル *a* よりも低エネルギー側に吸収極大をもつ新奇クロロフィルをもつ酸素発生型光合成生物が発見された。この新奇クロロフィルの光合成反応機構を解明し、応用することで新たな光による光合成エネルギーの創生が可能になる。

これは、新奇クロロフィルを光合成・人工光合成に組み込むことにより、可視光よりも低エネルギー側の光源で光合成反応が行えることを意味する。例えば、既存のクロロフィル *a* 型の光合成生物を透過した光の利用、太陽光の届かない深海においても熱水鉱床などの熱源があればそこに近赤外光が含まれており光合成利用可能になること、工場などの熱源の存在するところで可視光を使わずにエネルギー創生が可能になる等の系の創生が考えられる。私のさきがけ研究では、より低エネルギー領域を吸収する新奇クロロフィルを用いて、これまで酸素発生型光合成反応に使用されていなかった領域の光を用いて光合成エネルギーを創生することを目的とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

クロロフィル *a* よりも低エネルギー側に吸収極大をもつクロロフィル *d* を光合成色素としてもシアノバクテリアより、光エネルギー変換を担う光化学系複合体を単離・精製し、その機構解明を行った。光合成光化学反応において、水を電子供与体として用いることが持続可能な光合成エネルギー変換につながるが、可視光に吸収極大をもつクロロフィルより、低いエネルギーをもつ新奇クロロフィルがどうやって足りないエネルギーを補償しているかが不明であった。この制御機構を各電子伝達成分の電位を調べることにより明らかにした。また、これを制御するための方法の一つを明らかにした。また、光合成は希薄なエネルギーを濃縮して反応中心と呼ばれる電荷分離を担うクロロフィルに伝える必要があるが、その効率的な伝達機構を明らかにした。エネルギー創生において水素生産を目的とする人工光合成系の作成にとりかかり、その足場となる系の作成を行った。



## (2) 詳細

### (1) 低エネルギーで光エネルギー変換が可能な仕組み

光合成光化学系複合体は希薄なエネルギーを濃縮するために、光捕集を担うアンテナクロロフィルを結合したタンパク質が多数存在する。光合成光化学系 II の詳細な機能を明らかにするためには、それらアンテナクロロフィルを取り除き、最小の電荷分離能をもつ複合体を単離・精製することにより解析可能になる。高等植物においては、ホウレンソウ等から光化学系 II 反応中心複合体と呼ばれる最小の電荷分離能をもつ複合体が単離精製され、光化学系の電荷分離の原理解明に大きな貢献があった。一方、シアノバクテリアから化学系 II 反応中心複合体の単離精製の報告はその生化学的困難さ故、本さきがけ研究者の報告を含め、2-3報程度しか報告がない。本研究ではこの生化学的困難さを伴う、シアノバクテリアの中でも、クロロフィル *d* を主要色素としてもつ種から光化学系 II 反応中心複合体を単離・精製し(図 1) その低エネルギー光利用を明らかにしたとくに特色がある。



図 1 クロロフィル *d* を主要色素とするシアノバクテリアの光化学系 II 単離精製標品の電気泳動図 (lane 1:marker, lane 2:光化学系 II, lane 3: 光化学系 II 反応中心複合体)

光化学系においてクロロフィルが電荷分離を担うとき、その基底状態と励起状態のエネルギー差はクロロフィルの吸収帯のエネルギーに相当する。クロロフィル *d* を主要色素としてもつシアノバクテリアにおいて電荷分離を担うとされる反応中心クロロフィルはクロロフィル *d* であることを、本さきがけ研究者らは既に明らかにしてきたが、その足りない電位をどうやって補償しているかの謎は残されたままであった。本さきがけ研究において単離精製した光化学系 II 反応中心標品を用いて、その電子伝達成分の電位を直接滴定することにより、その仕組みをあきらかにした。その結果、電荷分離を担うクロロフィルの電位は変えずに、還元側の初期電子受容体および第二次電子受容体の電位をクロロフィルのエネルギー差に応じてシフトさせることにより、制御していることを見いだした。これは、光合成生物が進化の過程で得た、水をも酸化する高電位形成のための水分解側(酸化側の)電位は変えてはならないという、水分解の普遍的原理をも明らかにしたことになる(1,2)。この模式図を図2に示す。クロロフィル *d* の他の性質は、クロロ

フィル *a* とほぼ同じであることも報告した(3)。

また、この原理を応用することにより、電荷分離をになうクロロフィル種が変わったとしても、酸化側の電位は変化させることなく、還元側の電子伝達成分の電位をクロロフィルの種に応じてシフトさせれば、より低エネルギーの光でも持続可能な光合成エネルギーの創生ができる原理を見いだした。

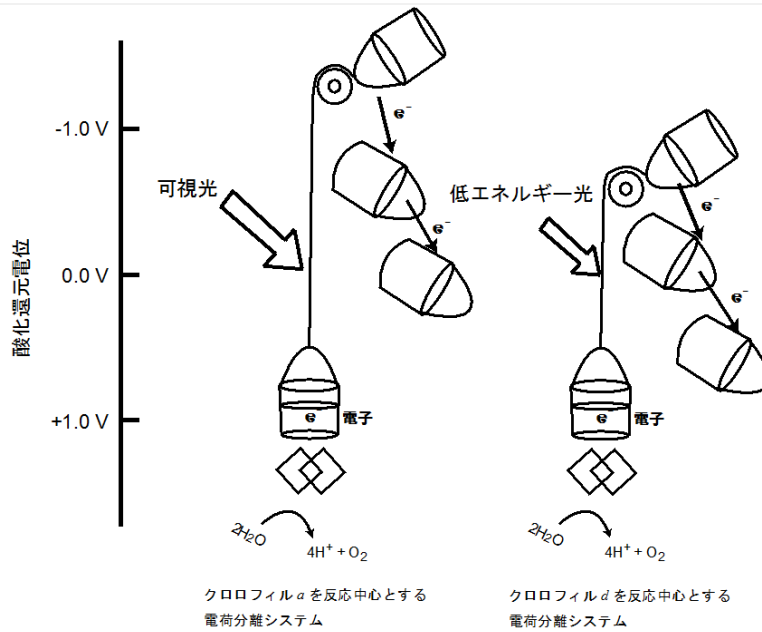


図2 低エネルギー光を用いて酸素発生型光合成を行う模式図

## (2) 電位の制御

光化学系 II の還元側の電位の制御は酸化側に位置する表在性タンパク質によって調節可能なことを明らかにし、低エネルギー利用のための電位調整の方法の一つを明らかにした。光合成生物、とりわけ藻類の光合成には非常に多様性があることが特色である。水分解反応を安定化する、光化学系 II 複合体の表在性タンパク質にも多様性があることを明らかにしているが、紅藻や珪藻に存在する新奇表在性タンパク質の影響と構造・機能を明らかにしたことにより、これら新奇表在性タンパク質の結合により、電位が正側にシフトすることを見いだした(4,5)。これらを利用して新奇クロロフィルでの光エネルギー変換が可能になると考えられる。

## (3) アンテナ色素の光エネルギー利用の効率化

近年発見された、より低エネルギーに吸収極大があるクロロフィル*f*を持つシアノバクテリアのエネルギー移動機構を明らかにした(投稿中)。このシアノバクテリアは近赤外光で培養することにより、クロロフィル*f*を蓄積することに特徴がある。クロロフィル*f*の役割や局在部位についての報告は現在までにない。このシアノバクテリアの細胞を液体窒素温度において時間分解蛍光を測定したところ、クロロフィル*a*からクロロフィル*f*への励起エネルギー移動は励起後数 ps 以内に生じることが明らかとなった。これはクロロフィル*f*がクロロフィル*a*と近接していることを意味する。蛍光帯の解析により red クロロフィルと呼ばれているクロロフィルとエネルギーを共役していることが示唆された。このクロロフィル*f*からクロロフィル*a*へのアップヒルなエネルギー移動が生じていることにより、近赤外光下でも十分な光合成が可能になっていることが明らかとなった。また、珪藻の集光性タンパク質の光エネルギー移動システムを fs-ps レベルで明らかにした。光合成は過剰な光が生じると活性酸素等のラジカルが生じ生体を損傷する危険性がある。これを回避するために、過剰なエネルギーを熱として消失する機構の存在が必須になる。とりわけ、二次共生藻類は代謝回転をはやめることと、このエネルギー消光システムが発達していることにより効率的に光を利用していることを明らかにした(6,7)。

この結果は、新奇クロロフィルにおける光合成において応用可能であり、効率の良いエネルギー変換機構の創生につながる。

#### (4)人工光合成系の創生

光合成のエネルギー移動効率および電子伝達の効率は通常光において 100%に近い理想的な反応である。電子伝達において、最終的に NADPH のような還元力が得られるが、この代わりにプロトン還元することによって水素生産が可能になる。水素は代表的な次世代エネルギーの一つであり、自然の光合成系を応用した人工光合成の創生はエネルギー供給において火急の課題である。光化学系複合体を金粒子に結合させることにより、電子の授受を行いそれをヒドロゲナーゼや Pt 触媒を用いることにより、水素生産が可能になる。そのためには、分子を配向させて結合させることが必要になるが、まずは水分解系を担う光化学系 II 複合体を遺伝子改変により標識を付加し、金粒子と相互作用により結合させることに成功した。現在、光化学系 I のタンパク質を改変または、電子伝達成分を人工的に入れ替えて分子配線することにより電子を取り出す系の開発を進めている。

### 3. 今後の展開

クロロフィル *f* をもつシアノバクテリアより、光化学系 I および II を単離・精製することにより、クロロフィル *f* の正確な局在位置と低エネルギー利用機構を分光学的手法を用いて解析する。室温における。クロロフィル *f* からクロロフィル *a* へのアップヒルなエネルギー移動原理を確立することにより、それを応用したクロロフィル *f*、クロロフィル *d*、クロロフィル *a* を組み合わせた光合成系を作製することにより、どのような光質でも光合成エネルギー生産可能な生物・反応系の創生を行う。

酸素発生型光合成反応において低エネルギー光利用可能な原理を明らかにした。また、それに必要な電位を制御する方法を見いだした。これらを組み合わせ、低エネルギー光を用いた人工光合成を含むエネルギー変換系の作製を行う。また、クロロフィル環の C2 位および C3 位をフォルミル基に置換することにより、吸収極大がさらに低エネルギー側にシフトする知見を得るので、そのクロロフィルの新規合成を化学的および酵素学的に行う。化学的に得られた新規クロロフィルを既存の光化学系に結合させるとともに基盤や金粒子に結合させ人工光合成系の開発を進める。クロロフィル *f*、クロロフィル *d*、クロロフィル *a* を組み合わせた光合成系を作製することにより、光合成による新しいエネルギーの創生を行う。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

既存のクロロフィル *a* と比較して低エネルギー領域に吸収極大をもつ新奇クロロフィルの光合成反応は還元側の電位を調節することにより、クロロフィル種が変わっても水分解反応を維持できる根本原理を明らかにした。光合成タンパク質を金粒子・基盤等に結合させ電子を取り出す基盤技術の創生は完成が近い。一方、遺伝子改変を行い、より低エネルギー側に吸収極大をもつクロロフィルの開発はその遺伝子の同定が進まなかったことにより当初の計画より遅れている。クロリン環に化学合成により  $\pi$  電子を導入し吸収を長波長シフトさせる方法を試みたが、期待したほどの低エネルギーシフトは実現できなかった。引き続き、より低エネルギーに吸収極大を位置するクロロフィルの合成遺伝子的手法・化学的手法により続けていく。本研究

で得た成果および途中経過を、より一層加速し研究を進めていき、藻類による新しいエネルギー創生を行う。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

酸素発生型の光合成には、可視光が利用されているのに対して、本研究は、赤外光を用いて光合成を行うことを可能にし、可視光の存在しない暗闇でも酸素発生型光合成を駆動できるようにすることで、新たな光合成エネルギーの創生を目指している。研究期間を通じて、提案課題を実現するための基礎的知見を多くの論文成果と出来たことは、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。さらに独創的で新しいコンセプトを作り進展させ行くことを期待する。また、実用化に向けた進展については、産官学の共同研究などを積極的に推進し、基礎研究の社会還元に向けた取り組みも進めて欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Suleyman I. Allakhverdiev, Tohru Tsuchiya, Kazuyuki Watabe, Akane Kojima, Dmitry A. Los, Tatsuya Tomo, Vyacheslav V. Klimov, and Mamoru, Redox potentials of primary electron acceptor quinone molecule ( $Q_A$ )<sup>-</sup> and conserved energetics of photosystem II in cyanobacteria with chlorophyll *a* and chlorophyll *d*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108, 8054-8058
2. Tatsuya Tomo, Suleyman I. Allakhverdiev, Mamoru Mimuro, Constitution and energetics of photosystem I and photosystem II in the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*, J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. B, 2011, 104, 333-340
3. Tatsuya Tomo, Hayato Kusakabe, Ryo Nagao, Hisashi Ito, Ayumi Tanaka, Seiji Akimoto, Mamoru Mimuro, Shigetoshi Okazaki, Biochim. Biophys. Acta, 2012, 1817, 754-759
4. Chihiro Uno, Ryo Nagao, Hiroyuki Suzuki, Tatsuya Tomo, Takumi Noguchi, Structural Coupling of Extrinsic Proteins with the Oxygen-Evolving Center in Red Algal Photosystem II As Revealed by Light-Induced FTIR Difference Spectroscopy, Biochemistry, 52, 5705-5707
5. Ryo Nagao, Michihiro Suga, Ayako Niikura, Akinori Okumura, Faisal Hammad Mekky Koua, Takehiro Suzuki, Tatsuya Tomo, Isao Enami, Jian-Ren Shen, Crystal Structure of Psb31, a Novel Extrinsic Protein of Photosystem II from a Marine Centric Diatom and Implications for Its Binding and Function, Biochemistry, 2013, 52, 6646-6652
6. Ryo Nagao, Makio Yokono, Seiji Akimoto and Tatsuya Tomo, High Excitation Energy Quenching in Fucoxanthin Chlorophyll *a/c*-Binding Protein Complexes from the Diatom *Chaetoceros gracilis*, J. PHYS. CHEM. B, 2014, 117, 6888-6895
7. Ryo Nagao, Shuji Takahashi, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Katsuyoshi Nakazato, Tatsuya Tomo, Comparison of oligomeric states and polypeptide compositions of fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein complexes among various diatom species,

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会・シンポジウム招待講演

○International Conference "Photosynthesis Reserch for Sustainability", CURRENT TOPICS OF CHLOROPHYLL-D DOMINATED CYANOBACTERIAL PHOTOSYSTEMS, Azerbaijan, 2011年7月24-30日

○Phototsystem reaction by using near infrared light, JST-PRESTO International Joint Symposium on Photo-Science Leading to a Sustainable Society: Environment, Energy, Functional Materials, Hiyoshi, Kanagawa, Japan, 2012年3月25日～3月28日

○International meeting"Photosynthesis Research for Sustainability - 2013", Redox regulation of photosystem II with a focus on newly chlorophyll, Azerbaijan, 2013年6月5日～9日

○1st Korea-Japan Microalgae Symposium, Low photon-energy utilization by cyanobacteria, Daejeon, Korea, 2013年10月10日～10月12日

国内学会・シンポジウム招待講演

○第54回日本植物生理学会, クロロフィル *d*を主要色素としてもつシアノバクテリアの光化学系II反応機構, 2013年3月21日～3月23日

○第85回日本生化学会, クロロフィル *d*を主要色素としてもつシアノバクテリアの光合成について, 2012年12月14日～12月16日

○植物科学シンポジウム「植物科学最先端研究への期待」, 低エネルギー光による光合成光エネルギー変換, 2012年12月3日

プレスリリース

「近赤外線を用いて水を分解する詳細な光合成メカニズムを解明」日経産業新聞、日刊工業新聞、科学新聞(2011年5月)



# 研究報告書

## 「真核藻類のトリグリセリド代謝工学に関する基盤技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究者: 中村 友輝

### 1. 研究のねらい

真核藻類は、その高い脂質備蓄能力から、バイオディーゼルの原料となるトリグリセリド (TAG) 生産の材料として注目されている。これまでの研究から、真核藻類は種間で脂質組成の多様性が大きいことや、ある種の真核藻類では特に高い脂質蓄積が見られることなどが分かっている。また窒素欠乏などのストレスがクラミドモナス等の真核藻類において TAG 蓄積の増大をもたらすことなどが分かっている。しかしこうした一過的なストレス条件は、細胞の増殖を妨げ脂質収量の減少をもたらすことや、条件の管理に困難が伴うことなどから、バイオエネルギー創成への応用に向けた課題は少なくない。近年、クラミドモナスにおけるゲノムの解読が完了し、これまで困難とされてきた形質転換系等の遺伝学的ツールも急速に確立しつつある。また、これに伴い真核藻類における脂質代謝の分子生物学的知見も徐々に得られつつある。こうした現状から、真核藻類の TAG 代謝を分子レベルで研究する基盤は今やようやく整いつつあると言える。クラミドモナス等の真核藻類では、生化学、細胞生物学に加えて今や分子遺伝学的アプローチも可能で、さらに脂質備蓄能力に優れるため、脂質代謝学の研究には特に格好の材料といえる。しかもそれらの基礎的理解は昨今高まりつつある藻類でのバイオエネルギー創成に貢献する点で、研究の意義も一段と大きい。

以上の経緯から、本研究は真核藻類のモデル生物であるクラミドモナスにおいて TAG 代謝のメカニズムを分子レベルで包括的に理解し、その知見を踏まえて代謝スイッチング、人工マイクロ RNA やリピドミクス等の革新技术を組み合わせ、TAG の量および質を自在に改変する代謝工学の基盤を創出することを目指した。まず、順遺伝学的アプローチによる変異体の網羅的スクリーニングと逆遺伝学的アプローチによる候補遺伝子のノックアウトにより、クラミドモナスが油脂をどのように合成・備蓄しているかを、分子レベルで明らかにすることを目指した。次に、その知見をもとに、独自の「代謝スイッチング」や分子デザイン、リピドミクスなどの先端技術と確立された分子生物学、生化学的解析法を駆使して、任意の質と量をもつ油脂を自在に生産する技術の確立を目標とした。さらには、こうした脂質代謝改変技術が植物など他のモデル光合成生物でも適用できるか検討した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

まず、クラミドモナスにおける脂質合成酵素遺伝子等の網羅的スクリーニングから、TAG 合成酵素であるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)をコードすると考えられる機能未知の遺伝子ファミリーを単離した。酵母の TAG 合成欠損株における発現解析から、このうち DGTT2 と呼ばれる遺伝子は野生株酵母の 10 倍近い量の TAG を蓄積できるこ

とがわかった(原著論文1)。次に、酵母の脂質代謝を改変することで、培養条件により乾燥菌体重量の 50%–150%にあたる多量の油脂を生産する方法を作り出した(論文投稿中)。さらに、こうした脂質代謝改変技術を植物に適用した。植物の組織のうち花が脂質の合成、備蓄に優れていることを明らかにし(原著論文2)、組織特異的な脂質代謝改変技術により花芽の一部で脂質代謝を改変し、開花時期を制御することに成功した(原著論文3)。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A:「藻類油脂合成酵素群の単離」

真核微細藻類のモデルであるクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)から、TAG 合成酵素であるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)をコードすると考えられる機能未知の遺伝子を網羅的に単離した。遺伝子配列解析の結果、クラミドモナスは I 型 DGAT を1つ(DGAT1)、II 型 DGAT を5つ(DGTT1-5)もつことがわかり、種子植物や動物、酵母などに比べて多数の II 型候補遺伝子をもつことがわかった。

### 研究テーマ B:「酵母での藻類油脂合成系の構築」

ポリメラーゼ連鎖反応によりクラミドモナスのジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ候補遺伝子の各々を増幅した。これらを、TAG 合成を欠損した出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の変異体  $\Delta dga1 \Delta o1$  に導入して酵素タンパク質発現させることで、酵母の中で TAG の生産を回復することができるかを調べた。その結果、DGTT2を導入すると、酵母が通常の約 10 倍に近い量の油脂を生産することがわかった。蓄積した油脂の組成分析を行ったところ、DGTT2 が生産した油脂は酵母の野生株が生産する油脂と同じ品質を持つことがわかった。

### 研究テーマ C:「代謝スイッチング法による藻類油脂大量生産技術基盤の構築」

DGTT2 の形質転換による酵母での油脂生産量をさらに向上させるため、酵母の脂質代謝を人為的に改変した。油脂合成と細胞膜を構成する膜脂質の合成は共通の前駆体に由来しているため、まず膜脂質生合成の鍵酵素の機能を欠損させ、代謝の流れを油脂合成に転換した。さらに、この代謝の逆反応を触媒する酵素を欠損させ、油脂生産の前駆体となる物質であるジアシルグリセロールが蓄積しやすいようにした。その結果、培養条件により乾燥菌体重量の 50%–150%にあたる多量の油脂が生産できるようになった。この酵母は野生株と比べて生育速度が約半分に減少し、細胞が肥大化を起こして内部に大量の脂質滴を蓄積していることがわかった。

### 研究テーマ D:「脂質代謝改変技術の植物への応用—脂質改変による開花制御」

多細胞生物である植物は細胞や組織の分化が進んでおり、脂質代謝改変は酵母や緑藻に比べ、より複雑になると考えられる。しかしながら、植物で脂質代謝改変を行うことは有用物質生産や炭素固定能の向上に資する。そこで、シロイヌナズナを材料とし、脂質備蓄能の高い花器官に特異的な脂質代謝改変技術を開発することを目指した。花における脂質の機能は不明な点が多いが、我々は、開花制御を司るフロリゲンタンパク質が脂質結合性モチーフを持っていることに着目し、脂質の変化がフロリゲン—脂質の結合を介して開花制御に関与するという仮説を立てた。まず、フロリゲンが脂質分子に結合するかどうかを、種々の脂質分子種について調べたところ、リン脂質 phosphatidylcholine(PC)に特異的に結合することがわ

かった。そこで、花芽のうちフロリゲンが作用する部位でのみ脂質代謝改変を行い PC 量を増加させると花は早咲きになり、逆に減少させると花は遅咲きになった。この影響はフロリゲンを欠損すると顕著にみられなくなった。さらに、PC 分子種は昼夜で変動していることがわかり、不飽和度の高い夜の分子種は飽和度の高い昼の分子種と比べてフロリゲンとの結合が弱いことがわかった。そこで、脂質代謝改変を行い日中に夜の分子種を増加させると花は遅咲きになった。以上の結果から、フロリゲンは日周変動を示す PC と結合することにより開花時期を制御していることが明らかとなった。

### 3. 今後の展開

本研究から、クラミドモナスの油脂合成酵素遺伝子が油脂蓄積に優れた機能性をもつことが世界に先駆けて明らかとなった。また、ほぼ同時期にアメリカの研究グループにより、DGTT2 がシロイヌナズナの葉においても大量の油脂を蓄積させることが独立に発見された。今後、こうした機能性に優れた藻類の遺伝子リソースを整備することで、これらの特性を生かした新たな代謝工学的手法の確立と、革新的な有用物質生産技術の開発が国際的に期待される。

また、本研究で開発を進めた代謝改変技術は高等植物でも適用できることが分かった。特に、脂質とフロリゲンが相互作用し、脂質の改変により開花時期を変えることができたことは基礎研究と応用の両面で画期的な発見であり、こうした知見をもとに脂質改変から開花を制御する技術が花き産業や有用作物の分子育種、また有用物質やバイオエネルギーの生産に貢献することが期待できる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本研究により、クラミドモナスに存在する油脂合成酵素が網羅的に単離された。これらのうち、DGTT2 が油脂合成における機能に優れていることがわかり、遺伝子形質転換技術を用いて酵母に多量の油脂を蓄積させることが可能となった。藻類由来遺伝子のこうした高い機能性は、なぜ藻類が油脂生産にすぐれるのかを明らかにするための重要な知見となるとともに、藻類由来遺伝子を用いた有用物質技術を構築するための新たな手掛かりとなる。

代謝改変の方法論は多細胞生物である高等植物でも適用することができ、脂質—フロリゲンの結合を基軸とした開花制御の新たなモデルと、脂質改変により開花時期を制御する技術開発の可能性が提示できた。このことは基礎と応用の両面で重要な知見であるといえる。

藻類での応用については、遺伝子改変技術の開発が他のモデル生物に比べて遅れていることや種間での多様性が大きいことなどもあり、技術開発の上でまだ課題が多く残されている。今後、引き続きこの点に取り組み、種々の藻類で油脂が高生産できる技術基盤の確立を目指したい。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

バイオディーゼルの原料となる油脂トリグリセリドを、藻類を用いて大量生産する新技術の開発を目指した研究を行っている。真核微細藻類のモデルであるクラミドモナスから、油脂合成関連酵素を網羅的に単離し、藻類が油脂生産にすぐれるのかを明らかにするための

重要な知見を得た。酵母での藻類油脂合成系の構築藻類由来遺伝子を用いた有用物質技術として酵母での藻類油脂合成系を構築するなど、独創的な研究で発展性が期待される。また、論文などの業績においても満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、国際的視野に立って、藻類、酵母及び植物など幅広い分野で、豊かな感性と豊富なアイデアを活かした研究を推進することを期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Chun-Hsien Hung, Ming-Yang Ho, Kazue Kanehara and Yuki Nakamura. Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* (2013) 587(15):2364–2370.
2. Yuki Nakamura, Fernando Andres, Kazue Kanehara, Yu-chi Liu, Peter Dörmann and George Coupland. Arabidopsis florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. *Nature Communications* (2014) in press
3. Yuki Nakamura, Norman Z. W. Teo, Guanghou Shui, Christine H.L. Chua, Wei-Fun Cheong, Sriram Parameswaran, Ryota Koizumi, Hiroyuki Ohta, Markus R. Wenk, and Toshiro Ito. Transcriptomic and lipidomic profiles of glycerolipids during Arabidopsis flower development. *New Phytologist* (2014) in press

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 著作物

- Nakamura Y\*. (2013) NPC: non-specific phospholipase Cs in plant functions. In "Phospholipases in Plant Signaling (Wang, X ed)" Springer-Verlag Berlin Heidelberg, in press
- Nakamura Y\*. (2013) Galactolipid biosynthesis in flowers. *Botanical Studies*, 54:29.
- Nakamura Y\*. Assaying Plant Phosphatidic Acid Phosphatase Activity. In "Plant Lipid Signaling Protocols (Munnik T and Heilmann I, eds)" *Methods in Molecular Biology* 1009:233–240, Springer, 2013
- Nakamura Y\*. (2013) Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog Lipid Res* 52:43–50.

#### 国際学会招待講演

- Nakamura Y. Lipid metabolic switching to alter lipid levels in algae and plants. 4th International Singapore Lipid Symposium (Singapore, 2012年3月)
- Nakamura Y. Meristem maintenance by phospholipid biosynthesis. 第28回中華植物学会

- 大会及 2012 Symposium on Innovative Plant Sciences (Taipei, 2012 年 12 月)
- Nakamura Y. Phospholipids function in coordinating reproductive processes. Gordon Research Conferences 2013, Plant Lipids, Metabolism & Function (Galveston, TX, 2013 年 1 月)
  - Nakamura Y. Membrane lipid remodeling in response to phosphate starvation. 1st International Symposium on Root Systems Biology (Taipei, 2013 年 9 月)

プレスリリース

「脂質が開花時期を制御することを発見」(仮題) プレス発表準備中



# 研究報告書

## 「高増殖性微細藻の合成を目指した微細藻代謝フラックス制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 蓮沼 誠久

### 1. 研究のねらい

ラン藻や微細藻をバイオエネルギー生産系として利用するためには、増殖の遅さと細胞密度の低さ、光合成産物の生産効率の低さ、光合成産物からエネルギー物質への変換効率の低さ、を解決することが不可欠である。本研究では、メタボロミクスや代謝フラックス観測技術を核とする網羅的代謝解析システムを構築し、第一に増殖、第二に糖質エネルギー生産を制御する代謝メカニズムの解明を目指した。さらには、有用藻合成のための代謝改変戦略を立案し、高増殖能・高生産能を有する藻株を取得することにより、本システムの有用性を立証することとした。本研究では遺伝子組換え技術が確立されたラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いた。

藻株の生産性を向上させるための手段としては、遺伝子組換えを用いた酵素活性の増強/阻害により、物質代謝系を促進させることを思いつく。しかしながら、これまでの研究で、大幅な増殖能の向上や物質生産能の向上に至ることはなかった。その理由として、物質代謝系が、細胞増殖に必要な様々な代謝産物を適切な配分で生み出すためのネットワークを形成し、中間代謝物質を配分する速度を厳密に調節していることが挙げられる。生物の代謝系を人為的に改変し、目的の形質を付与するためには、物質代謝の流れ(フラックス)を理解し、フラックスを律速する要因を的確に制御する必要がある。しかしながら、ラン藻や微細藻で、代謝ネットワークを形成する中間代謝物質の動的な変動を観測した例は無く、律速要因を同定することができなかった。その理由としては、中間代謝物質が微量で不安定であり、なおかつ極性が高いために従来の分析手法での定量が困難であったことが挙げられる。

そこで本研究では、ラン藻の中枢代謝に位置する中間代謝物質を一斉に分析する、メタボロミクス技術を確認することとした。次に、合成・分解を繰り返す中間代謝物質のターンオーバーを観測するための、in vivo  $^{13}\text{C}$  標識技術を確認し、これらを組み合わせることで、ネットワークレベルでの代謝フラックス観測が可能な、動的代謝プロファイリング技術を開発することとした。光合成は、光強度や  $\text{CO}_2$  濃度等の外的環境に左右される。本研究では、培養環境により光合成に摂動を与え、物質代謝の変化を動的代謝プロファイリング技術で解析することで、増殖や物質生産の律速因子を特定することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

光合成代謝能力の強化は、藻類の増殖性、物質生産性を向上させる最も有効な手段の一つであり、炭酸同化速度の促進は重要な課題である。なかでも Rubisco 等による  $\text{CO}_2$  固定反応に始まり、代謝産物(糖質、タンパク質、脂質等)の生産にいたる物質代謝経路の改変は藻類の生産性の向上に欠かせない課題である。しかしながら、藻類では代謝物レベルの知見は

乏しく、生合成される代謝物の種類や量(代謝プロファイル)については限られた情報しか得られていない。ましてや *in vivo* の代謝反応速度については未知である。したがって、代謝フラックスを制御する酵素反応は不明である。その最大の理由として、中間代謝物質の細胞内蓄積量や生合成速度が実測されていないことが挙げられる。

本研究では、メタボローム解析技術を用いて中間代謝物質を網羅的に定量するとともに、ラン藻特有の代謝フラックスを実測可能なシステムを構築することに成功した。定常的に光合成するラン藻細胞に、炭素流入の基点である  $\text{CO}_2$  に同位体標識を施した  $^{13}\text{CO}_2$  を取り込ませて中間代謝産物を同位体標識し、 $^{13}\text{C}$  標識率の経時変化を観測することにより、合成・分解を繰り返す中間代謝物質のターンオーバー速度を定量化することに成功した。*In vivo*  $^{13}\text{C}$  標識法をメタボローム解析技術と組み合わせることにより、中間代謝物のターンオーバーを網羅的に解析することが可能となり、代謝ネットワークの定量的理解が可能となった。動的代謝プロファイリング技術は炭酸同化速度を直接観測できる手法であり、光合成能の評価において極めて有用であることを示した。

ラン藻の増殖速度は光強度や  $\text{CO}_2$  濃度、窒素源濃度等の影響を受ける。本研究では、培養環境の変動により細胞増殖に摂動を与え、その際の物質代謝の変化を解析した。その結果、細胞増殖と関連のある、代謝物質を見出すことに成功した。また、ラン藻は糖質エネルギーとして有用なプラットフォーム化合物であるグリコーゲンを蓄積するが、増殖と細胞内グリコーゲン含有量は必ずしも相関しない。例えば、グリコーゲンを高蓄積させるためには、細胞を窒素源欠乏条件に追い込むことが効果的である。そこで本研究では、ラン藻の窒素代謝にも着目し、培地中の窒素源濃度が細胞増殖やグリコーゲン生産に及ぼす影響を調べることで、グリコーゲンを高生産する方法を代謝工学の観点から明らかにした。

## (2) 詳細

### ① ラン藻動的代謝プロファイリング技術の開発

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 に最適化したメタボロミクス技術を確立し、質量分析装置を用いて水溶性一次代謝物(糖リン酸, 糖ヌクレオチド, 有機酸, アミノ酸, 補酵素等)の蓄積量を網羅的に定量するシステムを構築した。また、 $^{13}\text{CO}_2$  を用いた *in vivo* 安定同位体標識法を開発し、中間代謝物質の  $^{13}\text{C}$  標識率を経時的に観測することによりターンオーバー速度を定量化することに成功した(図1)。メタボロミクスと *in vivo*  $^{13}\text{C}$  標識法を組み合わせることにより、細胞内の炭素代謝フローを観測可能な動的代謝プロファイリング技術を開発した。本技術を用いて、窒素源制限下における *Synechocystis* sp. PCC6803 の代謝変動を観測し、グルコース 1 リン酸が ADP-グルコースに変換される代謝反応がグリコ

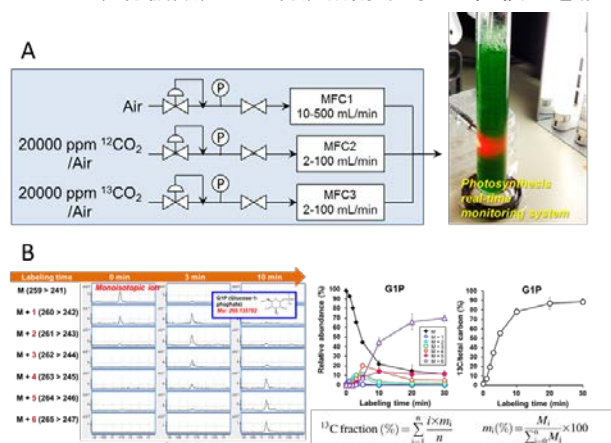


図1 *in vivo*  $^{13}\text{C}$  標識システム(A)と、グルコース1リン酸のターンオーバー観測結果(B)

ーゲン生合成経路の律速段階であることを実験的に初めて確かめた。また、炭素原子の分配を理解することにより、グリコーゲンを構成する炭素骨格がタンパク質の分解産物によることを明らかとした。

## ② ラン藻動的代謝プロファイリング技術を用いた炭素代謝制御機構の解析

十分な光照度条件下において、*Synechocystis* sp. PCC6803 の増殖は CO<sub>2</sub> 濃度と正の相関を示す。本研究では、細胞への CO<sub>2</sub> 流入量を増大させることで炭素の供給を満たしていき、それに

応じてターンオーバー速度を増加させない代謝物質を捉えることにより炭素フローの律速点を探索することとした。①で開発した動的代謝プロファイリング技術を用いて、CO<sub>2</sub> 流入量とターンオーバー速度の関係を解析したところ、還元的ペントースリン酸回路、糖リン酸代謝経路の中間代謝物質が CO<sub>2</sub> 流入量依存的なターンオーバー速度の増加を示したのに対し、ピルビン酸のターンオーバー速度が CO<sub>2</sub> 流入量非依

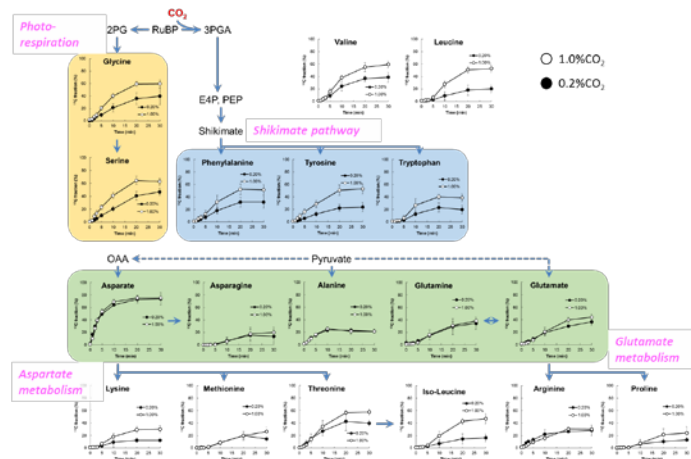


図 2 0.2%および 1.0% CO<sub>2</sub> 条件下における <sup>13</sup>C 標識率の経時変化

存的であることを見出した。また、ピルビン酸を前駆体とする

アミノ酸のターンオーバー速度も CO<sub>2</sub> 流入量依存的であることが明らかとなり(図 2), ピルビン酸を基質とする代謝反応が炭素フローのボトルネックとなっている可能性が示唆された。DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、CO<sub>2</sub> 濃度の増大に伴う CCM 遺伝子の発現誘導とともに、ピルビン酸代謝関連遺伝子の発現抑制が確認され、動的代謝解析を裏付ける結果が得られた。

## ③ 遺伝子工学的的手法による高増殖性ラン藻の作出とバイオエネルギー生産

光合成電子伝達系で酸素の光還元を触媒するタンパク質を高蓄積させることにより、高い細胞増殖能と高い糖質エネルギー生産能を向上させた株を作出することに成功した(図 3)。1% CO<sub>2</sub>, 100 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 条件下で培養した藻体の動的代謝プロファイリングを行ったところ、還元的ペントースリン酸回路や有機酸生合成経路の中間代謝物質のターンオーバー速度が形質転換体で増加していることが明

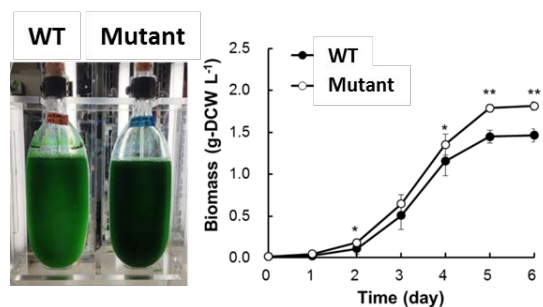


図 3 野生株と形質転換株の藻体密度の比較

らかとなった。従来、藻類では二酸化炭素の同化を直接観測することが不可能であったが、本研究は炭素同化を観測するだけでなく、その速度を定量化することで光合成速度を評価することを可能にした世界で初めての例である。本研究を通して代謝プロファイリング技術の有用性を実証することができた。

### 3. 今後の展開

本研究により、ラン藻の細胞内代謝を網羅的に観測するだけでなく、代謝変動を動的に捉えることが可能となり、代謝物の合成・分解や炭素の分配に関する情報を取得することが可能になった。また、動的代謝プロファイリング技術は光合成能の評価において有用な手法であることを明らかとした。速度論的な代謝情報の取得は代謝ネットワークの制御に関連する因子の推定に有効であり、取得した情報を基にさらなる光合成能の向上が期待できる。また、遺伝子リソースが豊富で、形質転換技術が整備されたラン藻は合成生物学的研究の実践に優れたホストであり、今後は、バイオ燃料や化学品原料など様々な物質生産への応用が期待できる。一方で、動的代謝プロファイリング技術は株や種を選ばないため、緑藻や珪藻等への適用も可能である。近年、耕作地の限界と将来的な水資源の枯渇を克服するため、水生バイオマス利用への期待が高まっている。今後は、藻類の代謝制御機構の解明をさらに進めるとともに、様々な水生バイオマスを有効利用する工学的技術開発を展開していきたいと考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本研究では、ラン藻の細胞内代謝を網羅的に観測するだけでなく、代謝変動を動的に捉えることができ、炭素の分配に関する情報を取得することが可能な、新規代謝解析システム、「動的代謝プロファイリング技術」を構築することができた。本技術を用いて、細胞増殖時にボトルネックとなる炭素同化反応を見出すことに成功し、グリコーゲン生合成の律速反応を同定することができた。また、遺伝子工学的手法により、高増殖性とグリコーゲン高生産性を両立する藻株を作出することに成功し、動的代謝プロファイリング技術を用いることで組換え株の炭酸同化能の向上を観測することができた。本研究を通して、動的代謝プロファイリング技術が光合成能の評価において有用であり、合理的な代謝改変を実現するための革新的な解析ツールであることを示すことができた。当初の研究目標を達成することができた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

微細藻の生体システムを制御する物質代謝機構を精密に解析できる新規代謝解析手法の開発により、増殖性を決定する因子を特定し、これを強化することで微細藻由来のエネルギー生産の向上を目指す研究を行っている。3年の研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、特に、動的代謝プロファイリング技術については、更なる進展を期待する。特許出願と論文作成などの業績においても満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、実用化に向けた産官学の共同研究開発などを積極的に推進し、研究成果の社会還元に向けて邁進してほしい。



## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文) 発表

1. Hasunuma T, Kikuyama F, Matsuda M, Aikawa S, Izumi Y, Kondo A. Dynamic metabolic profiling of cyanobacteria glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *Journal of Experimental Botany*. 2013, 64, 2943–2954.
2. Izumi Y, Aikawa S, Matsuda F, Hasunuma T, Kondo A. Aqueous size-exclusion chromatographic method for the quantification of cyanobacterial native glycogen. *Journal of Chromatography B*. 2013, 930, 90–97.
3. Joseph A, Aikawa S, Sasaki K, Teramura H, Hasunuma T, Matsuda F, Osanai T, Hirai MY, Kondo A. Rre37 stimulates accumulation of 2-oxoglutarate 1 and glycogen under nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters*. 2014, 588, 466–471.
4. Joseph A, Aikawa S, Sasaki K, Matsuda F, Hasunuma T, Kondo A. Increased biomass production and glycogen accumulation in *apcE* gene deleted *Synechocystis* sp. PCC 6803. *AMB Express*. In press
5. Aikawa S, Izumi Y, Matsuda F, Hasunuma T, Chang JS, Kondo A. Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresource Technology*. 2012, 108, 211–215
6. Aikawa S, Joseph A, Yamada R, Izumi Y, Yamagishi T, Matsuda F, Kawai H, Chang JS, Hasunuma T, Kondo A. Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. *Energy and Environmental Science*. 2013, 6, 1844–1849.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 近藤昭彦, 蓮沼誠久, 三宅親弘  
発明の名称: 微細藻の生育機能を増強する方法  
出 願 人: 国立大学法人神戸大学  
出 願 日: 2013/10/8  
出 願 番 号: 特願 2013-211446

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 蓮沼誠久, ラン藻動的代謝プロファイリング技術の開発と応用, ラン藻の分子生物学 2013, かずさ DNA 研究所, 2013/11/22–23
2. 蓮沼誠久, in vivo <sup>13</sup>C 標識法によるラン藻動的代謝プロファイリング技術の開発, 第 28 回つくば藻類・プロティストフォーラム, 筑波大学, 2013/10/28
3. 蓮沼誠久, メタボローム解析による次世代バイオ燃料生産のための微細藻代謝改変戦略の導出, 微細藻類研究会 2013, 基礎生物学研究所, 2013/6/13–14
4. 蓮沼誠久, シアノバクテリアのシステムバイオロジー解析とバイオリファイナリーへの応用, 日本光合成学会若手の会 第 6 回セミナー, 名古屋大学, 2013/6/1



5. Tomohisa Hasunuma, Development of microalgal cell factories based on systems biology approach, 1<sup>st</sup> Korea-Japan Microalgae Symposium, Taejon, Korea, 2013/10/10-12
6. 蓮沼誠久, 微細藻バイオリファイナリーに資する動的代謝プロファイリング解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム「第二世代バイオ燃料研究の潮流と最先端オミクス解析の活用による新展開」, 東北大学, 2013/3/26
7. Tomohisa Hasunuma, Metabolic profiling analysis of *Synechocystis* sp. PCC6803 cultivated under nitrogen depleted condition, 日本化学会第 92 春季年会 JST さきがけ四領域国際シンポジウム, 東京, 2012/3/26-27

#### 受賞

1. バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究奨励賞

#### 著作物

1. 蓮沼誠久, リサイクルバイオテクノロジーの最前線, 第 1 編, 第 1 章, 微細藻類・シアノバクテリアからのバイオエタノール生産, シーエムシー出版, 57-65 (2013)
2. 蓮沼誠久, 近藤昭彦, 藻類ハンドブック, 第 3 章, 第 5 節 3, システムバイオロジー技術, エヌティーエス, 535-540 (2012)
3. 蓮沼誠久, 近藤昭彦, 微細藻類によるエネルギー生産と事業展望, 第 17 章, バイオリファイナリーへの微細藻類の展開, シーエムシー出版, 137-143 (2012)

#### 総説

1. 蓮沼誠久, 藍川晋平, 和泉自泰, 近藤昭彦, 微細藻類によるバイオリファイナリー, 生物工学会誌, 89(4), 181-183 (2011)

# 研究報告書

## 「グリコーゲンから油脂へ:シアノバクテリア変異株の代謝改変」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究者: 日原 由香子

### 1. 研究のねらい

私はこれまで、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の転写因子に関して研究を進める過程で、SII0822 転写因子欠損株では、細胞体積が野生株の 5 倍、細胞あたりのグリコーゲン蓄積量が野生株の 10 倍にも達することを見出した。「器が大きく素材に富む」この SII0822 欠損株をプラットフォームとした代謝改変により、高蓄積しているグリコーゲンを脂肪酸・油脂に変換できないか、というのが本研究の狙いである。

SII0822 は、シアノバクテリアに特有な cyAbrB 転写因子ファミリーに属している。これまでにゲノムの全塩基配列が解読されたシアノバクテリアの全てが複数コピーの cyAbrB 遺伝子を保持することから、この転写因子のシアノバクテリアにおける重要性が示唆される。*Synechocystis* sp. PCC 6803 は 2 コピーの *cyabrB* 遺伝子を持つが、そのうちの 1 つ sII0359 は生存に必須であり、完全な欠損株を得ることはできなかった。そこで SII0822 欠損株について表現型解析を進めたところ、SII0822 が通常大気条件下で窒素代謝関連遺伝子の転写活性化に働くこと、高 CO<sub>2</sub> 条件下で無機炭素取り込み関連遺伝子の転写抑制に働くこと、これらの遺伝子上流制御領域へ直接結合することなどが明らかになった。これらの結果は、SII0822 は代謝制御の鍵となる重要な転写因子であることを示しており、この転写因子の発現量や機能を制御することにより、シアノバクテリアをプラットフォームとした高効率な物質・エネルギー生産系の確立が可能なのではないかと考えた。SII0822 が代謝をどのように制御しているのかの情報は皆無であったため、本研究においては、まず SII0822 欠損株について、異なる栄養条件下で光合成活性測定や代謝解析を行い、その代謝特性を明らかにすること(研究テーマA)、そして得られた情報にもとづき、適切な代謝改変を行って脂肪酸・油脂を高生産すること(研究テーマB)を2本の柱として解析を進めた。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の SII0822 欠損株の代謝産物量や光合成・呼吸活性などを詳細に調べ、cyAbrB 転写因子がシアノバクテリアの代謝制御に不可欠であることを世界で初めて解明した(研究テーマA)。次に SII0822 欠損株の代謝解析によって得られた知見に基づき、5 項目の代謝改変を個別に行ったところ、脂肪酸生合成経路の増強、トリアシルグリセロール(TAG)の細胞内蓄積、遊離脂肪酸の細胞外放出に成功し、SII0822 欠損株は野生株に比べて、脂肪酸の高生産が可能であることが明らかとなった(研究テーマB)。今後 5 項目の代謝改変を統合することにより、更なる生産性の向上が期待される。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「SII0822 転写因子欠損株の生理学的解析」 (発表論文2)

異なる栄養条件下で培養した野生株および SII0822 欠損株について、ノーザン解析により炭素・窒素代謝関連遺伝子の発現レベルを調べると同時に、光合成活性測定およびキャピラリー電気泳動-質量分析(CE-MS)により各種代謝活性の評価を行った。

光独立栄養条件下では、SII0822 欠損株は、野生株と同等以上の光合成活性を示すこと、

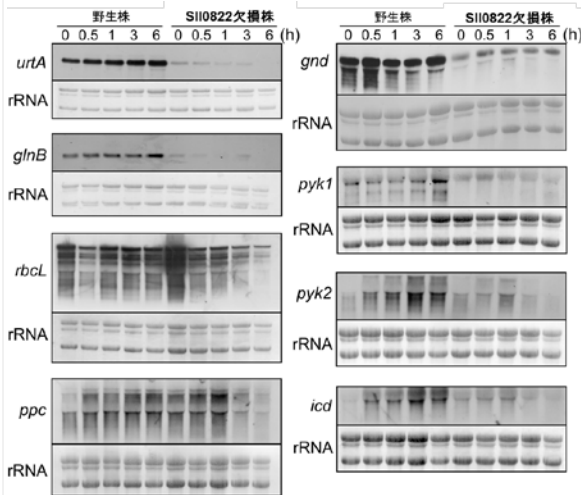


図1 光独立栄養条件から光混合栄養条件にシフト時の遺伝子発現変動

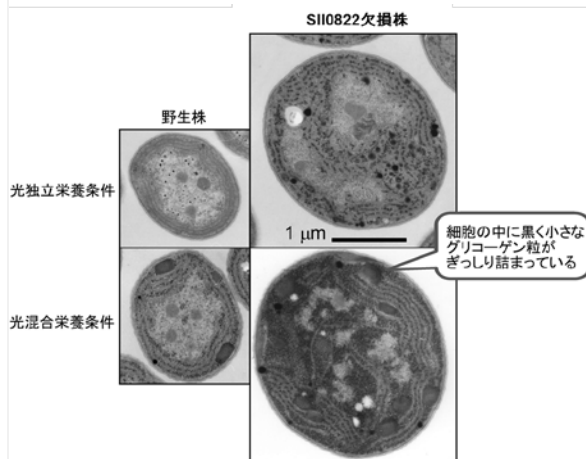


図2 異なる栄養条件下での電子顕微鏡写真

窒素代謝・糖代謝関連遺伝子の発現レベルが低いこと、糖リン酸が野生株より高蓄積している一方、糖異化経路でより下流に位置するピルビン酸や 2-オキソグルタル酸といったいくつかの重要な中間体量が少ないことが明らかになった。これらの結果より、SII0822 欠損株では CO<sub>2</sub> 固定が活発に行われている一方、解糖系下流部分の活性が低く、結果として余剰糖がグリコーゲンとして蓄積している可能性が示された。

培地にグルコースを添加し、光合成と糖代謝の両者が活発に行われる光混合栄養条件下では、SII0822 欠損株が厳しい増殖阻害を受けることを見出した。この条件下の SII0822 欠損株では、糖異化、CO<sub>2</sub> 固定、窒素同化等に関連する遺伝子群の発現レベルが野生株に比べて顕著に低く(図1)、細胞内にグリコーゲンが高蓄積し(図2)、CO<sub>2</sub> 固定活性の大きな低下が観察された。このことは、栄養条件の変動に応答しての遺伝子発現制御、ひいては代謝活性の制御に SII0822 転写因子が必須であることを示している。

SII0822 遺伝子欠損株で蓄積量の少ないピルビン酸および 2 オキソグルタル酸を培地に添加したところ、光混合栄養条件下での増殖の改善が観察された。特に 2 オキソグルタル酸を添加した場合には、SII0822 欠損株は光独立栄養条件下と同様な増殖を示した。この条件下において、

CO<sub>2</sub> 固定、呼吸、窒素同化等の顕著な活性化が観察されたことから、SII0822 欠損株の光混合栄養条件下での致死原因が代謝活性の停滞によることが強く示唆された。光混合栄養条件下では各種代謝活性が低下する一方、光合成電子伝達活性は維持されるため、おそらく還元力の供給過剰により生育阻害が引き起こされると考えられる。また、光混合栄養条件下では 2 オキソグルタル酸がシグナル物質として細胞内代謝に広汎な影響を与え得ることが本研究により新たに示された。

以上の結果より、SII0822 は、炭素・窒素代謝の停滞を防いで円滑に進行させる調節に関与しており、変動する栄養条件下での生存に不可欠な転写因子であることが明らかになった。

### 研究テーマB「脂肪酸・油脂の高生産に向けての代謝改変」

SII0822 欠損株においては、CO<sub>2</sub> 固定活性に対して各種代謝活性が不活発であり、結果として余剰糖がグリコーゲンとして高蓄積していることが明らかとなった。そこで、この知見に基づ

き、以下の 5 項目を代謝改変の戦略として研究を進めた(図3)。

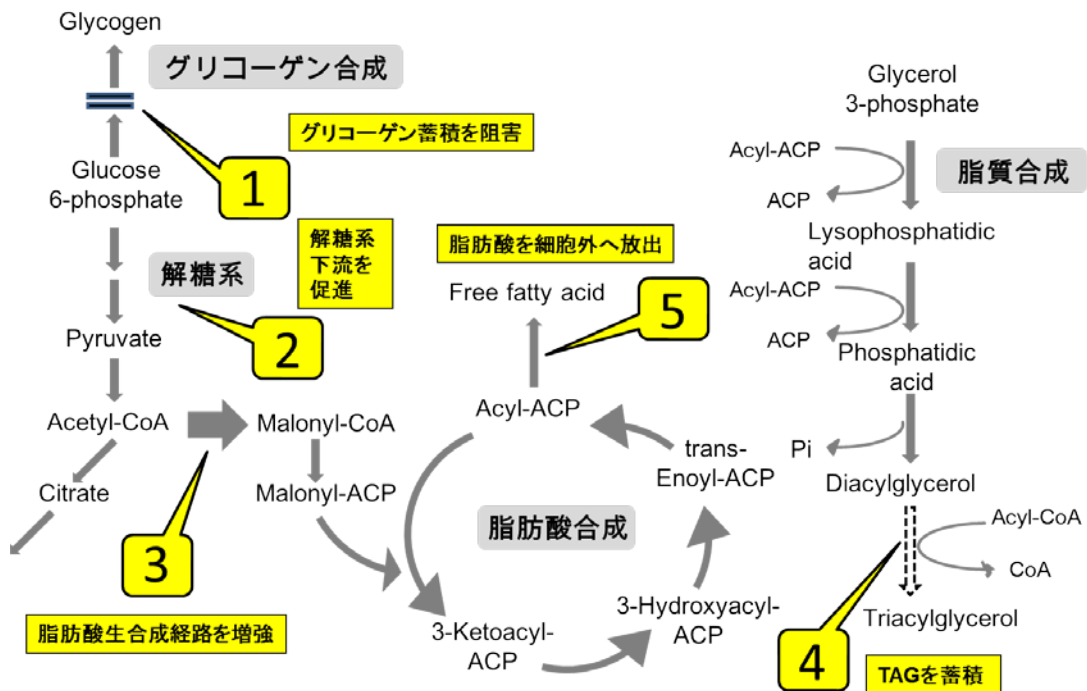


図3 代謝改変の戦略

1. グリコーゲンの蓄積を阻害し、余剰糖を異化経路へ回す。2. SII0822 欠損株で停滞していると考えられる解糖系下流を促進する。3. アセチル CoA からマロニル CoA への変換を促進することにより脂肪酸合成経路を増強する。ここまでの代謝改変で増産された脂肪酸を、4. TAG として細胞内に蓄積、または、5.遊離脂肪酸として細胞外へ放出させる。

代謝改変の試みを始めた当初は、SII0822 欠損株の形質転換効率が低いため、形質転換体を得られないという問題に直面し、研究の進行が大幅に遅れたが、形質転換効率の改善に効果があると報告されていた、エキソヌクレアーゼをコードする *recJ* 遺伝子の破壊により、形質転換効率を約 140 倍向上させることができた。以下、5つの項目の個別の達成状況を記す。

1. グリコーゲン合成経路の鍵酵素 ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子の破壊を行ったところ、野生株バックグラウンドでは完全破壊株が得られ、グリコーゲンの蓄積も検出されなくなったが、SII0822 欠損バックグラウンドでは完全破壊株が得られず、グリコーゲン量も全く減少しなかった。他の代謝改変と組み合わせて行っても遺伝子破壊の進行は観察されなかった。次に、グリコーゲン分解酵素 glycogen phosphorylase の条件誘導によるグリコーゲンの強制的分解を試みたが、ゲノム上に導入した *Pspac-glgP* 遺伝子のコピー数が増加せず、IPTG 誘導してもグリコーゲン量は減少しなかった。以上の結果から、グリコーゲン蓄積は SII0822 欠損株の生存に必須であると考えられる。

2. SII0822 欠損株では、糖異化関連遺伝子の転写活性化に関与しているシグマ因子をコードする *sigE* 遺伝子の発現レベルが低い。このことから、SigE の過剰発現により糖代謝を促進することができるのではないかと考え、*PpsbA2* プロモーターを用いて恒常的高発現株を作製した。この株について代謝解析を行ったところ、解糖系下流の産物量が増加し、SII0822 欠損株で蓄積量の多い乳酸が減少するなど、糖代謝の促進効果が認められたが、グリコーゲン量の減少や脂肪酸量の増加は観察されなかった。



3. 脂肪酸生合成経路の鍵酵素をコードする *accBCDA* を *PpsbA2* プロモーターに連結して恒常的に過剰発現させた。この株の脂質解析を行ったところ、*accBCDA* 過剰発現により脂肪酸生合成経路が増強されること、SII0822 欠損バックグラウンドで増強効果がより顕著であることが明らかになった。SII0822 欠損株に対して過剰発現を行った場合、脂質分子種の中では MGDG (1.7 倍) の増加が顕著であり、膜脂質中の脂肪酸分子種の中では、パルミチン酸 (1.4 倍)、オレイン酸 (2.6 倍) の増加が顕著であった。

4. 条件誘導プロモーター *Pspac* に *Acinetobacter* sp. ADP1 由来の *wax-dgaT* 遺伝子を連結して発現させたところ、野生株バックグラウンドにて、IPTG 濃度依存的な TAG の蓄積を検出した。薄層クロマトグラフィーにて中性脂質を展開後、スポットをかき取り定量を行ったところ、TAG の蓄積量は全膜脂質の 5%ほどであることが明らかになった。

5. アシル ACP シンテターゼ遺伝子を破壊し、チオエステラーゼ遺伝子を導入することで脂肪酸分泌生産能を付与した結果、菌体外に放出される脂肪酸量が、SII0822 欠損バックグラウンドでは野生株に比べて 1.5~2 倍に向上することを見出した。

### 3. 今後の展開

本研究において SII0822 欠損株が野生株に比べて脂肪酸の高生産が可能な株であることが明らかになった。現段階では、この株に高蓄積しているグリコーゲンを炭素源として脂肪酸生合成系へ供給することが出来ていない。今後は、それにも関わらず、なぜ野生株に比べて高生産が可能なのか、生理学解析によって明らかにすると同時に、グリコーゲン量を減少させ、余剰糖を炭素源とした物質生産を行う方策を考えていく必要がある。これらが達成できた暁には、SII0822 の改変による代謝の人為的制御、および欠損株を用いての物質生産は、高効率なエネルギー・物質生産を達成する上での有力な手段となると期待される。また、本研究では TAG 合成酵素の条件誘導により、野生株バックグラウンドで TAG の蓄積に成功した。今後は更なる代謝改変により、この株における TAG 蓄積量の増加を試みると同時に、未だポジティブな結果の得られていない SII0822 欠損株について、TAG の蓄積条件を検討していく予定である。

*cyAbrB* 転写因子はシアノバクテリアの種内に広く保存されているため、SII0822 欠損株を用いた物質生産技術を確立することができれば、将来的には *Synechocystis* 以外の有用種の代謝改変にも、その技術を応用することができると期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

さきがけ研究期間内に、SII0822 転写因子が各種代謝経路の活性制御に重要な役割を果たしていることを明らかにし、SII0822 欠損株を物質生産プラットフォームとして使用していくための基礎的な知見を取得した。またこれらの知見に基づいて実際に代謝改変を行い、脂肪酸合成系の増強、および遊離脂肪酸の細胞外への排出等に関して、SII0822 欠損株が野生株に比べ高生産が可能な系であることを明らかにした。以上の点から SII0822 欠損株を用いた応用研究の導入段階までを達成することができたと考える。現段階では、この株に高蓄積しているグリコーゲンを炭素源として脂肪酸生合成系へ供給することが出来ていない。この株の長所を最大限に生かすためには、余剰糖を脂肪酸・油脂生産の原料とすることが必須であるため、今後はグリコーゲン量を減少させる方策を見つけ出し、結果の得られている代謝改変と統合することが最重要課題であると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

細胞体積が野生株の 5 倍、細胞あたりのグリコーゲン蓄積量は野生株の 10 倍にも達するシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の SII0822 転写因子欠損株について、さまざまな酵素遺



伝子を欠失・導入して、この株の代謝改変を行い、高蓄積しているグリコーゲンを、脂肪酸に変換し、最終的には油脂として蓄積させる研究を行っている。研究開始当初の想定を超える困難な状況を着実に突破し、論文や特許として成果を取りまとめ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CREST との融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、当初の目標についても更なる進展を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. Muramatsu M, Hihara Y. Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. J Plant Res. 2012, 125(1), 11–39.   |
| 2. Kaniya Y, Kizawa A, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Kaneko Y, Nishiyama Y, Hihara Y. Deletion of the transcriptional regulator cyAbrB2 deregulates primary carbon metabolism in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. Plant Physiol. 2013, 162(2), 1153–1163. |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 招待講演

- 2011/10/30–11/3 “cyAbrB transcriptional regulators and their physiological roles”  
The 6th German–Japanese Binational Seminar “Microalgal Products: From Metabolic Fundamentals to Promising Applications”
- 2013/3/22 「シアノバクテリアの順化応答と転写因子」  
第54回日本植物生理学会年会シンポジウム「進化的視点からシグナル伝達系を考える—シアノバクテリアから高等植物まで」
- 2013/11/20 「シアノバクテリアを用いた油脂生産系の構築」  
第1回 SUPER FORUM シンポジウム
- 2013/11/22 「cyAbrB 転写因子と代謝制御」  
ラン藻の分子生物学 2013
- 2013/11/30 「小さな藻類から大きなパワーを引き出す」  
埼玉大学・戸田市連携講座
- 2013/12/16–18 “Significance of the cyAbrB2 transcriptional regulator in metabolic regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803”  
Indo–Japanese Workshop, supported by DST–JSPS
- 2014/3/7 “Key transcriptional factors of light–harvesting and metabolic regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803”  
1st International Workshop of Cyanofactory

#### プレスリリース

- シアノバクテリアの代謝を制御する転写因子の働きを解明 —エネルギー・物質生産への応用に期待— (2013年5月)  
<http://www.saitama-u.ac.jp/announce/20130507-2.pdf>

# 研究報告書

## 「バイオマス高度利活用を志向した人工代謝システムの創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 本田 孝祐

### 1. 研究のねらい

本研究では、好熱性微生物が有する耐熱性酵素群をモジュール化し、これらを任意に組み合わせることで、有用物質生産に特化した人工代謝経路を試験管内で再構成する新たな手法の開発に取り組んだ。

代謝とは、すべての生物が有する能力であり、外部から取り込んだ物質を、タンパク質や脂質など自分自身の体を構成する様々な分子に変換する(同化代謝)、あるいは体を動かすためのエネルギー性物質へと変換する(異化代謝)ための能力と定義づけることができる。細胞の中には、これらの変換反応を触媒する酵素タンパク質が数千種類も含まれ、複雑な代謝反応の担い手となっている。特に生物的多様性に富む微生物は、ユニークな代謝酵素の宝庫であり、人類は古来これらを発酵食品生産などに利用してきた。近年では、この発酵技術をさらに発展させ、バイオ燃料などの有用物質生産に利用しようという試みも活発となっている。一方、発酵技術による物質生産では、われわれが目的とする物質以外にも、微生物が生育に必要とする様々な物質が副産物として生産される。目的物質の生産に必要な代謝酵素だけを微生物から取り出して、試験管内で「人工代謝経路」を再構成することができれば、原理上、副産物を伴わない効率的な発酵生産が可能となるが、数千種類にもおよぶ生体内の酵素の中から必要な酵素だけを選択的に取り出すには、多大な手間とコストがかかることがネックとなってきた。

本研究では、この問題を解決する方策として、温泉などに生息する好熱性微生物(50～90℃程度の高温で生育可能な微生物)に着目した。まず、遺伝子組換え技術を用いて、これらが有する耐熱性の代謝酵素を、常温でしか生育できない中温性微生物の中で生産させる。これらの組換え微生物を50～90℃程度に加熱することで、中温性微生物由来の代謝酵素群は熱で不活化し、好熱性微生物に由来する耐熱性酵素のみが活性を保った状態となる。こうして作成した「熱処理組換え微生物」をモジュールとして組み合わせれば、有用化学品生産に特化した人工代謝経路を簡単に構築することが可能となる。本研究では、次世代バイオ燃料として注目されるブタノールの生産を具体的ターゲットとし、人工代謝経路の構築とそのパフォーマンスを検証することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、異なる好熱性微生物に由来する合計16種類の耐熱性酵素を組み合わせた人工代謝経路を構築し、グルコース(ブドウ糖)を原料に次世代バイオ燃料として注目を集める1-ブタノールを試験管内で生産させることに成功した。構築した代謝経路は、古くからアセトン・ブタノール発酵菌として知られる *Clostridium acetobutyricum* の1-ブタノール生産経路を模

做してデザインされたものである。しかし、天然型経路を構成する酵素反応には、細胞外環境では動作困難なものも複数含まれることから、必要に応じてこれらの反応をバイパスさせるなど人為的なデザイン変更を施した。各種好熱性微生物のゲノム情報等を参考に、人工経路のモジュールとなりうる耐熱性酵素群を選択し、これらを個別に大腸菌内で過剰発現させた。得られた組換え大腸菌の細胞に 60～70℃程度の熱処理を施すことで、宿主である大腸菌に由来する中温性酵素群を不活化させた。こうして耐熱性酵素だけが活性を保持した触媒モジュールを調製するとともに、これらを組み合わせることで人工代謝経路を構築した。また、今回の研究では、人工経路内での代謝の流れ(流束)を、吸光度測定をベースにリアルタイムで測定する手法を開発することで、所望の代謝流束(すなわち目的物質の生産速度)を達成するのに必要な酵素濃度を実験的に最適化することを可能とした。この結果、生産速度 8.2  $\mu\text{mol/l/min}$ 、対グルコース収率 82% (mol/mol)という生産効率で 1-ブタノールの試験管内生産に成功した。この生産効率は、発酵プロセスを用いたこれまでの世界最高水準に比肩しうる値であった。

また、同様の方法論に基づき、酵素モジュールの組み合わせを任意に変えることによって、1-ブタノールのほか、乳酸、リンゴ酸等の化学品を選択的に生産することにも成功している。これは、本法がバイオ燃料に限定されない様々な化学品にオンデマンドに適用可能であることを示すものである。

## (2) 詳細

### (2-1) ATP 非生産性キメラ型解糖系の構築とその利用

試験管内での酵素反応では、各反応に必要なエネルギーや酸化・還元力の供給源となる補酵素(ATP や NADH 等)を外から添加する必要がある。一般にこれら補酵素群は高価な化合物であるため、物質生産を目的とした酵素反応の利用を考える場合、これらの消費と再生をバランスさせ、その利用効率を高めることが非常に重要となる。本研究では、一般的な解糖系(Embden-Meyerhof 経路、EM 経路)の一部の酵素反応を超好熱性アーキアに見られる変形EM経路のそれらと入れ替えることによりATP/ADPの消費と再生がバランスした(すなわちATPを生産しない)キメラ型EM経路を構築することに成功した(図1)。さらに構築したキメラ経路にリンゴ酸/乳酸デヒドロゲナーゼなどの酵素をカップリングさせることでグルコースからの乳酸およびリンゴ酸を選択的に生産させることに成功した(研究成果 1、2)。

### (2-2) 人工代謝経路を用いたグルコースからの 1-ブタノール生産

上記のキメラ経路をさらに伸長し、16 種類の耐熱性酵素を用いて次世代バイオ燃料として注目を集める 1-ブタノールの生産に取り組んだ。天然の 1-ブタノール生産経路を構成する酵素反応の一部については、好熱菌に由来する耐熱性酵素が見出されていなかったり、大腸菌等の異種宿主内での組換え発現が困難であるものも含まれる。そこで、本研究では、天然の 1-ブタノール生産経路には含まれない酵素反応を適宜組み込んだ人工経路をデザインすることで、これらの問題を回避した(図2)。

例えば、解糖系の最終産物であるピルビン酸からアセチル CoA への変換は、通常、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体とよばれる酵素複合体によって触媒されるが、本酵素複合体は極

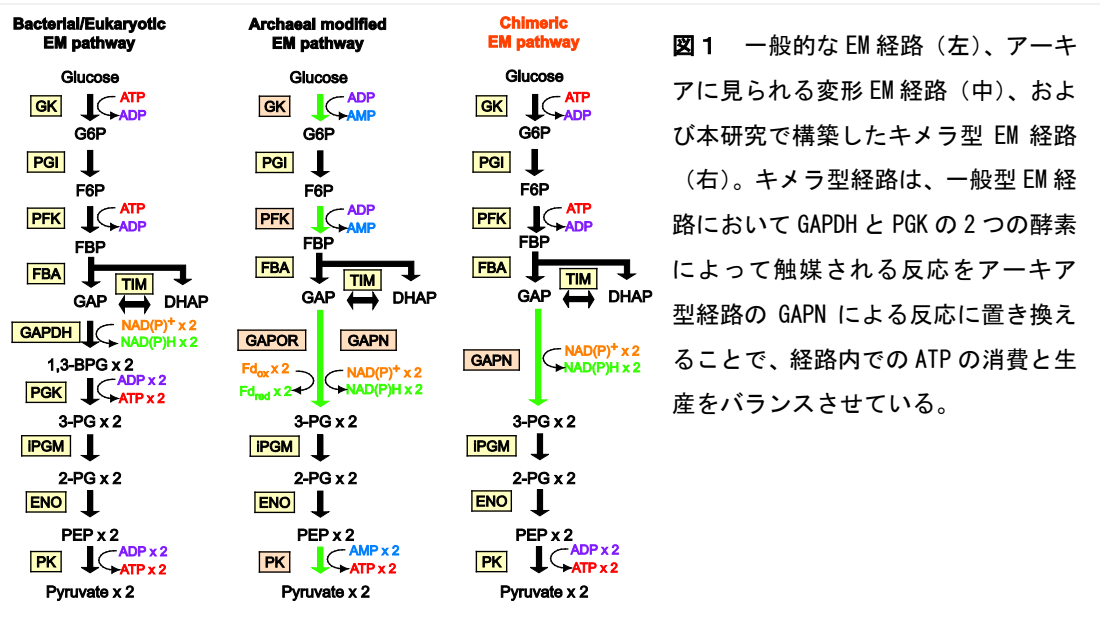
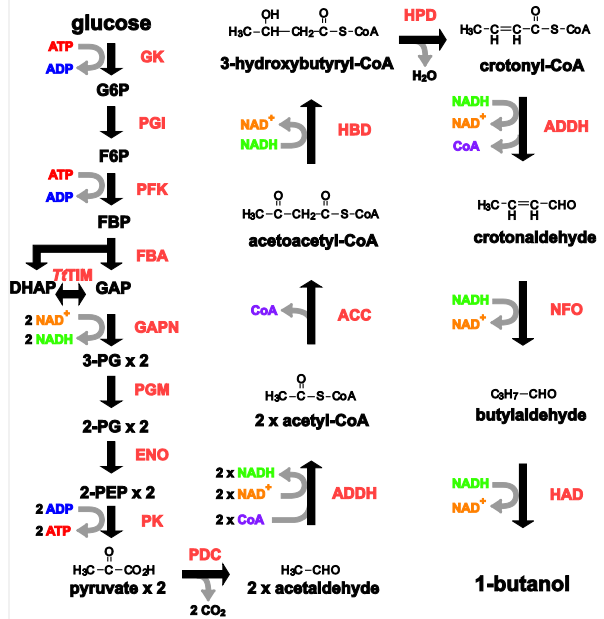


図1 一般的なEM経路(左)、アーキアに見られる変形EM経路(中)、および本研究で構築したキメラ型EM経路(右)。キメラ型経路は、一般型EM経路においてGAPDHとPGKの2つの酵素によって触媒される反応をアーキア型経路のGAPNによる反応に置き換えることで、経路内でのATPの消費と生産をバランスさせている。

めて複雑な高次構造を有し、異種宿主内での機能的発現の報告例は見られない。そこで、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ADDH)と呼ばれる二種類の酵素反応により、これをバイパスすることによって、天然型経路と同等の変換反応を試験管内でも動作させることに成功した(研究成果4)。また *Clostridium acetobutyricum* の1-ブタノール生産経路における中間体のひとつであるクロトニル CoA は、ブチリル CoA レダクターゼ(BCD)と呼ばれる酵素により二重結合の飽和化を受け、ブチリル CoA に変換され、次いでアルデヒドデヒドロゲナーゼによる還元反応でブタノール前駆体であるブチルアルデヒドへと変換される。しかし、このうち BCD は極めて酸素感受性の強い酵素であり、試験管内の反応でこれを利用するには困難が伴う。そこで、まずアルデヒドデヒドロゲナーゼによるクロトニル



ル CoA の還元的脱 CoA 反応を実施し、新たに得られた中間体であるクロトニルアルデヒドを旧黄色酵素(NFO)と呼ばれる酵素で飽和化することによりブチルアルデヒドを得る新たな経路をデザインした。最終的にデザインされた人工代謝経路の流束(すなわち 1-ブタノール生産速度)を吸光度測定を用いてリアルタイムに測定し、経路構築に必要な各酵素の濃度を実験的に最適化することで、グルコースから1-ブタノールへの試験管内変換反応に成功した(研究成果5)。

図2 本研究で構築した1-ブタノール生産のための人工代謝経路



### 3. 今後の展開

本研究では、耐熱性酵素をモジュールとした試験管内での人工代謝経路構築技術を確立するとともに、本法を用いて 1-ブタノールをはじめとする各種の代謝産物を選択的に作りわけること成功している。本法の魅力のひとつは、モジュールである耐熱性酵素を自在に組み合わせることで、様々な有用化学品をオンデマンドで作りに出せる点にある。一方、本研究で示された物質生産システムの力価は、生産速度と収率の点では既存の発酵プロセスを凌駕するものであった反面、一部の補酵素(NADH、NADPH など)の高温条件下での不安定性などが原因で長時間にわたる物質生産には適さず、結果的に得られた生産物濃度は、実用化には不十分な値にとどまっている。この問題は同時に、「高温環境下で生育する好熱菌たちはいかにして、これら補酵素群の持続的利用を可能にしているのか？」という基礎的疑問を投げかけるものでもある。今後、好熱菌における補酵素安定化メカニズムの解明など、本研究の遂行により新たに顕在化した課題をクリアすることで、人工代謝経路による物質生産プロセスのフィージビリティを向上させていくことが必要となろう。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

一連の研究を通じて、耐熱性酵素をモジュールとした試験管内での人工代謝経路構築という新たな方法論を確立することができた。本技術の魅力のひとつはモジュールである耐熱性酵素を自在に組み合わせることで、様々な有用化学品をオンデマンドで作りに出せるポテンシャルを有する点にある。今後、高付加価値な化学品にターゲットを定めることによって比較的近い将来の産業利用も可能であると考えている。

一方、バイオ燃料などのバルクケミカルへの応用を考えた場合、現時点で得られている生産物濃度などの値は、産業利用可能なレベルに比べ、未だ大きな隔たりのあるものと言わざるを得ない。しかし、補酵素群の熱安定性の問題など、今後、本技術のフィージビリティを向上させるために取り組むべき要素技術が本プロジェクトの遂行により具体化された点は非常に重要であると認識している。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

微生物の発酵機能を担う代謝酵素群を自由自在に組み合わせ、さまざまな化学品を生産できる人工代謝システムを開発することを目指し、この手法を用いて、第3世代バイオ燃料としての実用化が期待されるブタノールの生産に取り組んでいる。独創的な研究で発展性が期待される提案内容であったが、研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、論文業績などは満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CREST との連携研究などを通じて、NADH 等の補酵素群の熱安定性の問題などの解決による更なる可能性の追求や、バイオエネルギー関連物質のみならず、ファインケミカル生産などを含め、産業利用可能なレベルへの進展を期待する。



## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Ye Xiaoting, Kohsuke Honda, Takaaki Sakai, Kenji Okano, Takeshi Omasa, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Hisao Ohtake Synthetic metabolic engineering—a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. *Microbial Cell Fact.* 2012, 11, 120.
2. Ye Xiaoting, Kohsuke Honda, Yumi Morimoto, Kenji Okano, Hisao Ohtake Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering. *J. Biotechnol.* 2013, 164, 34–40.
3. Pham Huynh Ninh, Kohsuke Honda, Yukako Yokohigashi, Kenji Okano, Takeshi Omasa, Hisao Ohtake Development of continuous bioconversion system using thermophilic whole-cell catalyst. 2013, 79, 1996–2001.
4. Borimas Krutsakorn, Takashi Imagawa, Kohsuke Honda, Kenji Okano, Hisao Ohtake Construction of an *in vitro* bypassed pyruvate decarboxylation pathway using thermostable enzyme modules and its application to *N*-acetylglutamate production. *Microbial Cell Fact.* 2013 12, 91
5. Borimas Krutsakorn, Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Takashi Imagawa, Xiaoyu Bei, Kenji Okano, Hisao Ohtake *In vitro* production of *n*-butanol from glucose. *Metab. Eng.* 2013, 20, 84–91

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### ・学会発表

1. Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Kenji Okano, Hisao Ohtake Construction of a chimeric glycolysis pathway by synthetic metabolic engineering. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS). Sep 18, 2012, Daegu, Korea
2. Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Kenji Okano, Hisao Ohtake Synthetic metabolic engineering –A novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. Society of Biotechnology Japan, International Symposium on Green Growth. Oct 26, 2012, Kobe, Japan
3. Kohsuke Honda Butanol production through *in vitro* synthetic metabolic pathway. Sep 26, 2013 Enzyme Engineering XXII, Toyama, Japan.

#### ・受賞

4. 本田孝祐 「耐熱性酵素モジュールを用いたオンデマンド・バイオプロセスの開発」 第 14 回酵素応用シンポジウム研究奨励賞(主催:天野エンザイム株式会社)2013 年 6 月 14 日

#### ・報道/プレスリリース

5. 「試験管内でバイオ燃料合成」2013 年 10 月 3 日 朝日新聞 朝刊 21 面

# 研究報告書

## 「ラン藻の窒素固定酵素ニトロゲナーゼを利用した水素生産の効率化・高速化」

研究タイプ: 大挑戦型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 増川 一

### 1. 研究のねらい

水素は、将来のクリーンな再生可能エネルギーとして燃料電池などでの利用が期待されます。水素発生する生物の多くは低酸素濃度条件を必要としますが、一部のラン藻の光合成系・窒素固定酵素ニトロゲナーゼ系を利用した水素生産は、酸素存在下でも可能で、水素を高濃度まで蓄積できます。これらの長所は、粗放型で経済的な大規模水素生産を行うのに適していると考えられますが、現状の屋外での(光→水素)エネルギー変換効率は、最高でも0.1%(空気 + 2% CO<sub>2</sub> 気相下)に過ぎません。本研究は、ラン藻がニトロゲナーゼを酸素失活から保護するために異型細胞ヘテロシストを形成することに着目し、ヘテロシストの形成頻度を増やすことにより、酸素存在下の水素生産性向上を目指します。さらに、ニトロゲナーゼのアミノ酸置換変異により、低コストな窒素ガス気相下で高い水素生産活性を長期間持続させる、及び酵素の分子活性を高めることを目指します。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、糸状性窒素固定ラン藻でヘテロシスト形成する *Ababaena* PGC 7120 株を材料として、ヘテロシスト形成頻度を増大させるために、次の 2 通りの方法で変異株作成を行った。(i) 他のラン藻株での研究成果を利用した *patN* 遺伝子破壊株、および(ii) *hetR* 遺伝子のランダム変異株を作成した。それぞれの変異株でヘテロシスト形成頻度は増大し、水素生産性を向上させることに成功した。

ニトロゲナーゼによる水素生産活性は、窒素ガス存在下で急速に低下する。高い活性を維持させるために、しばしば Ar ガスが用いられるが、高コストである。このため本研究では、ニトロゲナーゼの活性中心部位近傍のアミノ酸残基置換変異株から選抜した 2 株を用いて、窒素ガス気相下で比較的高い水素生産性が 3 週間にわたって持続することを示し、培養気相コスト削減につながる成果を得ることができた。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「ヘテロシスト形成頻度の増大と水素生産性の向上」

ヘテロシストは、ニトロゲナーゼを酸素失活から保護することができ、ニトロゲナーゼ活性が発現する場(細胞)である。その形成頻度がある程度増加すれば、ラン藻の水素生産性が向上することが期待される。また、ニトロゲナーゼ反応(水素生産)に必要な還元力は、栄養細胞が通常の光合成により合成する糖質の供給に依存しているため、ヘテロシストは連続せず、栄養細胞に隣接したパターンで形成されることが重要である。そこで本研究では、ヘテロシストがフィラメントに沿って一定間隔を置いて形成され、かつその頻度が増大するような変異株を作成するため、次の 2 通りの方法で行った。(i) 他のラン藻株での研究成果を利用した *patN* 遺伝子破壊、および(ii) ヘテロシスト形成の活性化因子である *hetR* 遺伝子のランダム変異導入により、上記の表現型を示すヘテロシスト頻度増大株を作成することができた。

(i) *patN* 遺伝子破壊株では、(空気 + 5% CO<sub>2</sub>) 通気下で、水素生産の最大活性が親株と比べて同程度であったが、より長く持続する傾向が見られた。さらに、同気相条件下で細胞あたりの色素濃度の低下が見られたので、培養液のクロロフィル濃度が高い条件、または強光条件下で、水素生産性の顕著な増大が見られた。この結果から、*patN* 遺伝子破壊株では、濃度の高いカルチャーにおいて光利用効率が向上し、強光阻害が軽減されたと示唆された。



図 1. *patN* 破壊株のヘテロシスト分化。

ヘテロシストは alcian blue で染色されている。ヘテロシストは、通常 10-20 細胞に一つの割合で形成されるが、*patN* 破壊株では、ヘテロシスト間隔が短くなっている。

(ii) *hetR* 遺伝子へランダム変異を導入し、変異の選抜を行い、ラン藻のヘテロシスト形成頻度が増加した変異株を多数得ることに成功した。ランダム変異の選抜は、ヘテロシスト形成の抑制因子 PatS による活性化因子 HetR の阻害が軽減される変異選抜を進めた結果、活性化因子 HetR 内に 21 種類、抑制因子 PatS 内に 10 種類のアミノ酸残基置換変異を同定した。同定した *hetR* 変異を *Anabaena* の染色体へ導入後、15 種類の HetR アミノ酸残基置換変異株(一重交差相同組換え株)を作成でき、ヘテロシスト形成頻度が有意に増大した変異株を複数単離した。これらの変異株の中から、ヘテロシストが親株より少し高い頻度で、一定間隔を置いて形成される HetR 変異株を 4 種類選び、より詳細に調べた。その際、変異株のゲノム上の *hetR* 遺伝子周辺構造を親株のゲノム構造と同じにし、遺伝子発現を正常にするため一重交差株から二重交差株を作成し、これらを用いた。変異株のヘテロシスト頻度は、親株と比べて約 1.7 倍まで増大し、水素生産速度及びニトロゲナーゼ活

性(アセチレン還元活性)の最大値は約 2 倍まで増大した。5 日間に亘る水素生産の速度は、約 30%向上することがわかりました。

これらの結果から、ヘテロシスト分化の活性化因子である HetR の活性レベルをランダム変異導入により制御することで、ヘテロシスト形成を一定間隔のパターンで、その頻度を増大させ、さらに様々なヘテロシスト頻度を示す変異株を作成できることに初めて成功しました。藻類を用いたランダム変異による改良の成功例は、非常に少なく、本研究成果は窒素固定ラン藻では世界で初めての成功例である。

#### 研究テーマ B「ニトロゲナーゼのアミノ酸残基置換変異株による窒素ガス気相下での持続的水素生産」

窒素ガス気相下では、窒素栄養が充足されるとニトロゲナーゼ活性が急速に低下するため、活性は持続しない。Ar 気相下ではニトロゲナーゼ活性がある程度持続するが、コストがかかる。培養気相コスト削減のため、ニトロゲナーゼの活性中心近傍のアミノ酸残基置換変異株から、窒素ガス気相下で水素生産活性が低下しにくい 2 株を選び、それらの活性持続性について評価した。ニトロゲナーゼ変異株は、窒素ガス気相下で、親株の Ar 気相下の水素生産性と同程度の比較的高い水素生産性が 3 週間にわたって持続した。また、この変異株の窒素ガス気相下の生産性は、Ar 気相下の生産性よりも有意に増大していた。この変異株は、僅かながら窒素固定能を持つことが示唆されたので、変異ニトロゲナーゼにより固定された僅かな窒素栄養が、高活性の持続性向上に寄与したと考えられる。

### 3. 今後の展開

本研究では、ヘテロシスト形成頻度の増加による水素生産性向上、およびニトロゲナーゼのアミノ酸残基置換変異株による窒素ガス気相下での 3 週間にわたる持続的水素生産に成功した。今後、これら 2 つの変異(ヘテロシスト形成頻度増大変異とニトロゲナーゼのアミノ酸残基置換変異)を組み合わせることにより、窒素ガス気相下での水素生産性と活性持続性の更なる向上が期待できる。また、本研究で、ヘテロシスト形成の活性化因子 HetR の変異と共に、抑制因子 PatS の変異も複数同定することができたので、今後、抑制因子 PatS 変異によるヘテロシスト形成頻度の増大を試みる。さらに、HetR と PatS を標的とした 2 回目、3 回目のランダム変異をさらに進め、持続的な水素生産に最適なヘテロシスト頻度を見出し、水素生産能力の高いラン藻株の作出を目指す。窒素固定ラン藻 *Anabaena* PCC 7120 株においてランダム変異導入系を確立し、その有効性を初めて示すことができたので、ニトロゲナーゼやその他の水素生産に関わる代謝系に対して、この変異法による改良を展開する。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

さきがけ研究期間では、*Anabaena* で新たにランダム変異導入系を確立し、HetR への変異導入だけで、これまで難しかったヘテロシスト分化をある程度自由に制御することができるようになった。当初の目的であった、ヘテロシスト形成を一定間隔のパターンを保ちつつ、その頻度を増大させることに成功し、さらに様々なヘテロシスト頻度を持つ株を多数作成することができた。数日間に亘り高い水素生産活性が持続するように、培養気相中の窒素ガス濃度を検討し、持続的な水素生産の評価系を確立した。この評価系により初めて、ヘテロシスト頻度増大

株の水素生産性が優れていることを明らかにすることができた。藻類では数少ないランダム変異による改良成功例であり、その方法の有効性を示すことができたことは重要な成果であると考えられる。

また、ヘテロシスト頻度増大株で、CO<sub>2</sub> 通気により、細胞当たりの色素濃度の低下が見られる変異株では、高濃度の培養液における光利用効率の向上、および強光阻害の軽減が示唆され、これらの培養条件で水素生産性が顕著に増大するという有利な点を明らかにすることができた。今後、この変異株の色素分析と水素生産性増大との関連を明らかにする必要がある。

ニトロゲナーゼの分子活性向上のためのランダム変異による改変は、ニトロゲナーゼ発現系は構築できたが、変異株のスクリーニング系の工夫が必要で、今後の課題である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

ヘテロシスト型ラン藻のニトロゲナーゼによる水素生産において、ヘテロシスト頻度を増やすことと、ニトロゲナーゼを改変し空気下の水素生産の高速化と高効率化を目指した研究を行っている。窒素固定ラン藻のランダム変異では、分化パターン形成の最新の知見を基にスクリーニング系を上手く工夫し、効果的に多数の目的変異株を得た。水素生産活性の評価は、長期間、高活性を持続させた上で比較し、ヘテロシストの増加により水素生産が増加することを示した。ニトロゲナーゼの改変では、窒素ガス下で高活性が長期間持続することを示し、培養の低コスト化につながる成果を得た。ニトロゲナーゼの発現系を構築し、分子活性を高めるための改変にも挑戦したが、目的変異株の取得には至らなかった。光合成生物を使ったバイオ燃料としての水素生産の研究は、古くからの重要なテーマである。その中で、着実に成果を挙げ、研究領域に貢献を果たしたと評価する。今後は、得られた成果を論文として完成させるとともに、チャレンジ精神を忘れずに研究を進めて行って欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, H. Sakurai, R. P. Hausinger “Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and water” AMBIO 2012, 41:169-173
2. H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue “Photobiological Hydrogen Production: Bioenergetics and Challenges for its Practical Application” Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews 2013, 17, 1-25

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 【国際会議 招待講演】

- ・Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and



water. H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, H. Sakurai, and R. P. Hausinger  
JSP-RSAS Joint Conference “Capturing the Sun” (2011), Sweden  
・Creating Anabaena PCC 7120 mutants with increased heterocyst frequency to increase  
photobiological hydrogen production. H. Masukawa  
18th International Congress on Nitrogen Fixation (2013), Miyazaki, Japan

【著作物】

- ・増川一、北島正治、櫻井英博、井上和仁、ラン藻の窒素固定酵素ニトロゲナーゼを利用した大規模な水素生産構想、「微細藻類によるエネルギー生産と事業展開」、竹山春子 監修、執筆分 第Ⅱ編 第10章、シーエムシー出版 (2012.7)
- ・増川一、井上和仁、櫻井英博、ラン藻の光生物的水素生産性向上に向けたヘテロシスト形成頻度の増大、第 64 回日本生物工学会大会(創立 90 周年記念大会) トピックス集 (2012.10)
- ・増川一、櫻井英博、シアノバクテリア及び微細藻類による光水素生産、水素エネルギーシステム 2013, 38(1), 27-32