

プログラム名：セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名：合田 圭介

プロジェクト名：超効率バイオ燃料開発の実証評価

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成果)

平成 29 年度

研究開発課題名：

バイオ高分子を高効率に生産する光合成細菌の開発

研究開発機関名：

国立研究開発法人 理化学研究所

研究開発責任者

沼田 圭司

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

高効率にバイオプロダクト、特にバイオプラスチックや繊維材料のような高分子素材を、無尽蔵に存在するバイオマスから生産する細胞・微生物を開発する。光合成細菌は、二酸化炭素の固定化や有機酸からの物質生産に優れているだけでなく、窒素の固定化能も有しており、魅力的なホスト微生物である。これまでの申請者の研究成果から、バイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸

(PHA)を生産する一方で、産業利用されている土壌細菌と比較すると生産性に劣ることが判明している。また、PHAはそのエステル構造から、利用可能な分野が限定されており、アミド構造を有する人工シルクを合成する候補に加える。これらの背景から、本研究では、バイオ高分子であるPHAおよび人工シルクを高効率に生産する光合成細菌を開発することを目指す。

微生物から生産される代表的なバイオプラスチックであるPHAは、*Ralstonia eutropha*という代表的なPHA高生産株により、産業的に生産された実績がある。しかしながら、炭素源として植物油や糖を利用するため、その原料費が最終的なPHA価格の1/3程度を占める結果となっている。また、植物油や糖の国際価格の変動により、PHA価格の安定化が難しいという問題がある。そこで、炭素源の多様化および低価格化を目的とし、二酸化炭素や産業廃液に多く含まれる乳酸や酢酸を炭素源としたPHAの合成手法を確立する。二酸化炭素の固定化能および高分子の生産能という観点から、ホスト微生物として紅色光合成細菌を選択し、光合成を利用したPHA生産系を確立する。今年度は、化学的および物理的に変異を加えた光合成細菌*Rhodovulum sulfidophilum*に対して、FACSを利用し、PHA高生産変異株を細胞レベルで単離することを目的とした。

ポリアミドや人工シルクをはじめとした、主鎖骨格に窒素を含む高分子を微生物により合成するためには、炭素源に加えて窒素源を供給する必要がある。しかしながら、窒素源は農業など幅広い分野で利用され、コスト面で大きな問題となる。そのため、将来的には窒素を安定的に導入可能な微生物生産法が必要とされている。本研究では、窒素固定が報告されている紅色光合成細菌をホスト微生物として利用し、大気中の窒素を固定化する人工シルクの生産系を開発することを目指す。また、海洋性微生物を利用することで、海水の利用および抗生物質を利用しないコンタミの管理など、産業的に好ましい特徴を付与することが可能である。今年度は、シルクを生産可能な光合成細菌を構築するとともに、光合成細菌の窒素および炭素固定化能を定量化することを目指す。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

昨年度、FACSによる細胞へのダメージが問題となっていたが、種々の条件を変更することで、細胞へのダメージは軽減することに成功した。そこで、化学的に変異を加えた光合成細菌*Rhodovulum sulfidophilum*に対して、FACSによりPHAを高生産する細胞群を抽出した。その結果、野生型と比較して、有意差のあるPHA高生産変異株が、単離された。現在は、さらに変異を加え、FACSで再度高生産株を抽出することで、更なる生産性の向上が可能か否か、評価を進めている。

一方で、昨年度、PHAの生産性をラマン顕微により評価する系を構築していたが、重水によりラベルした光合成細菌内部のPHAと光合成細菌の色素体が被るという問題が生じた。暗所で培養することにより、色素体のシグナルを減少させる、もしくは有機溶媒処理により色素体を除くことは可能であったが、目的とした培養条件でないこと、またその後の培養が困難であることから、ラマン顕微を利用した評価を一度、諦めた。しかし、今年度、SRSを利用した結果、高感度でPHAを検出することが可能となり、SRS顕微鏡では、高生産の変異株と野生株の有意差をSRSでも有意に検出できることを確認した。この結果から、PHAを蛍光ラベルする必要なく、SRSによりPHAのラマンシグナルを検出することで、PHA生産細胞の評価が可能であることを明らかにした。同時に、SRS顕微鏡であれば、1ミクロン程度の微生物であっても、十分に評価に足ることを示した。

PHAに加えて、シルク遺伝子の発現も同時に進めている。プロモーターとアミノ酸配列、コドン最適化することで、シルクタンパク質を光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* により発現することに成功した。現在では、さらなる生産性の向上、およびシルク配列の分子量の向上を進めている。また、光合成細菌の窒素および炭素の固定化能を明確にするため、定量的なアッセイ系を構築した。窒素に関しては、ニトロゲナーゼの活性測定、および¹⁵Nラベルを利用した固定化能の評価を進めている。炭素の固定化については、シルクではなく、PHAを利用した系で¹³Cのラベルにより、代謝物から評価する予定である。

2-2 成果

- 光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* に、化学的な手法により、ランダムな変異を加え、その変異体群をFACSによりソートすることで、PHAの生産性に優れた変異体群を抽出することに成功した。この変異体群を培養することで、FACSの結果と同様に、高いPHAの生産性を示すことが確認された。この結果は、本研究課題で目的としている、高生産性細胞の単離が、実現可能であることを示すとともに、FACSエンジニアリングが、光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* のような微生物であっても適用可能であることを明示している。
- 光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* に、クモ糸シルクタンパク質が有する繰り返しアミノ酸配列の一部をコードした遺伝子を導入することで、光合成細菌としてはじめてクモ糸タンパク質を発現することに成功した。この成果は、光合成細菌が有する炭素固定や窒素固定の能力を鑑みると、二酸化炭素や窒素から、シルクタンパク質のような材料を合成できる可能性を示している。

2-3 新たな課題など

セレンディピターを利用するに際して、そのサイズ分解能や感度の観点から、光合成細菌などの微生物には適用が困難である。細胞側を工夫することで、高速に大量の細胞をスクリーニングするシステムを構築する必要がある。

3. アウトリーチ活動報告

理化学研究所一般公開にて、研究内容を紹介した（2017年4月）。