

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

光合成生物を用いたプロパノール産生技術の開発

2. 研究代表者

鈴木 石根 (筑波大学 大学院生命環境科学研究科 准教授)

3. 研究シーズ探索成果の概要

光合成を行う原核生物のラン藻を宿主に用い、新規バイオ燃料として期待できるプロパノールの生産系をめざした。解糖系・炭酸固定経路(カルビン回路)の中間体ジヒドロキシアセトンリン酸から、1,2-プロパンジオールを経てプロパノールを合成するために必要な5つの酵素遺伝子群の導入を試みた。ところがプロパンジオールからプロパノールを合成する遺伝子の群の導入はついにできなかった。細胞に対する生産物の毒性を評価するため、生育速度を約半分に低下させる1%のプロパノール存在下の条件で遺伝子発現を網羅的に解析したところ、リポタンパク質や硝酸イオンや鉄イオンの取り込み系の遺伝子発現が顕著に上昇していた。また、プロパンジオール合成までの遺伝子群を導入したものについても、通常の培養条件では検出に十分な量のプロパンジオールを合成できなかった。以上のことから代謝経路遺伝子群の導入だけでは、新規産物の合成は容易ではないことが示された。

4. 研究シーズ探索のねらい

本研究はグルコースから、プロパノールあるいはプロパンジオールを生産する代謝経路を、光合成生物ラン藻細胞内に構築し、光エネルギーを利用してバイオ燃料及びバイオマテリアルを高効率に生産するシステムを創出することを目的とする。具体的には細菌の5つの遺伝子をラン藻の染色体中に導入し、新規な代謝経路を創出する。導入した代謝経路を効率的に駆動するため、細胞のプロパノール及びプロパンジオールに対する耐性の増強と、代謝経路の隘路を見出して遺伝的改善を試みる。その他の有用物質の生産も視野に入れ、必要となる基礎情報・基礎理論の蓄積にも努める。

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

1. 代謝系酵素遺伝子のラン藻への導入: 解糖系の中間代謝産物のジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)からメチルグリオキサル、ラクタルデヒド、プロパン 1,2 ジオールを経て、プロパノールから 1-プロパノールに至る代謝経路を構成する 5 つの酵素遺伝子群 (*mgs*, *gldA*, *fucO*, *pduCDE*, *pduQ*) を大腸菌とサルモネラ菌ゲノムから単離し、ラン藻の染色体に導入する。各遺伝子はコード領域とリボソーム結合部位(SD 配列)を PCR によりゲノム DNA より増幅し、いったんプラスミドにクローニングした後、塩基配列を確認して、プロモーターの下流に *fucO-mgs-gldA*, *pduCDE-pduQ* の順にそれぞれ連結させ、共発現させる遺伝子構造を作製した。それぞれの遺伝子群の下流に抗生物質カナマイシンあるいはスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入し、さらに両

端にラン藻 *Synechocystis* 染色体上のニュートラルサイトの配列を付加した。この DNA をラン藻細胞に取り込ませ、相同組換えによって薬剤耐性を獲得した細胞を選別し、期待通り新規代謝系遺伝子が染色体上に導入された株を、PCR により確認した。

2. 最適なプロモーターの選別: 当初、人為的に導入した外来遺伝子の発現を ON/OFF 制御が可能ないように内在性の *PnrtA* プロモーターを試したが、さらに発現量を増し恒常的に遺伝子発現を行わせるために、広く原核生物で用いられている人工的な *Ptrc* プロモーターや、内在性の強発現プロモーターである *PpsbA* プロモーターをもちいた。プロモーターの配列は大腸菌内での発現用のプラスミド、ラン藻のゲノム配列から PCR によりプロモーター領域を増幅した。末端に誘導遺伝子の配列と相同な配列を人工的に付加しておき、*in vitro* で配列特異的に組換えを行う In-Fusion システム (Clontech) を用いて遺伝子群を構築した。

3. ガスクロマトグラフィーによるプロパノール定量系の開発: 代謝経路を導入したラン藻のプロパノール生産能を評価するため、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いたアッセイ系を確立した。細胞を超音波により破砕し、抽出液を 10%トリクロロ酢酸 (TCA) 処理することによりタンパク質などの高分子を沈殿させ、遠心分離により除去した。得られた上清を中和し、真空条件で乾燥した。乾固した物質をメタノールに溶解し、GC-2140 (Shimadzu) により分析した。カラムは CP-SIL 5CB (0.32 mm x 50; Varian 製) を用い、Injection port 250°C, カラム温度 50°C (5min)-190°C まで昇温 (7°C/min)、水素炎イオン化型検出器 (FID) は 250°C、スプリットモードで分析した。

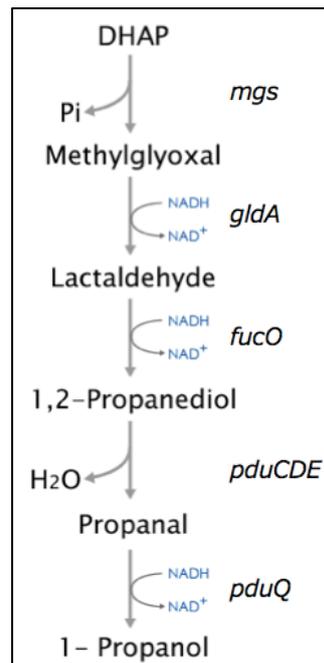


図 1. 1-プロパノールの合成経路。各遺伝子は、大腸菌またはサルモネラ菌から取得する。

5.2 成果

1. 代謝系酵素遺伝子のラン藻への導入: ジヒドロキシアセトンリン酸から 1,2-プロパンジオールまでの変換を触媒する 3 つの酵素メチルグリオキサール合成酵素 (*mgs*)、グリセロール脱水素酵素 (*gldA*)、1,2-プロパンジオール酸化還元酵素 (*fucO*) の各遺伝子は図 2 に示すように、1 つの転写単位として染色体上のニュートラルサイトとして知られる *ndhB* 遺伝子の下流にスペクチノマイシン耐性遺伝子とともに導入した。これは期待する組換えが容易に起こり、安定に維持できた。一方、プロパンジオールからプロパノールを経てプロパノールを合成する 2 つの酵素をコードする、*pduCDE* と *pduQ* は図 2 に示すような順に、カナマイシン耐性遺伝子とともに、同じくニュートラルサイトとして知られる *slr2030* と *slr2031* 遺伝子の間のサイトに導入を試みた。しかしながら得られたカナマイシンに耐性を示すクローンのいずれもが、カナマイシン耐性遺伝子の挿入は認められるものの、*pduCDE-pduQ* 遺伝子は挿入されていなかった。

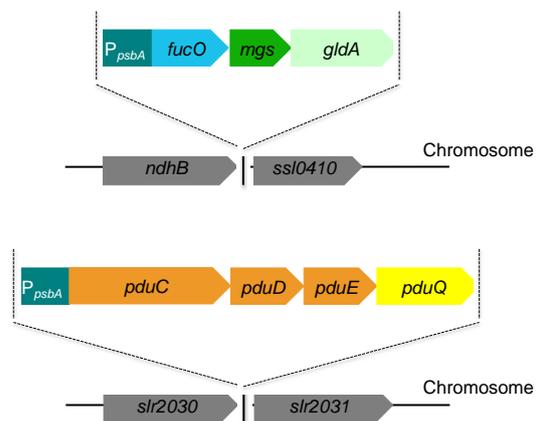


図 2. プロパノール合成系を構成する遺伝子群の構造と挿入を試みた染色体上のニュートラルサイトを示す。実際には *gldA* の下流にスペクチノマイシン耐性遺伝子を、*pduQ* の下流にカナマイシン耐性遺伝子を挿入してあるが、この図では省略した。

発現のためのプロモーターは内在性のもの、広くバクテリアでの発現に用いられているものを複数試したが、いずれも期待取りの結果にはならなかった。挿入部位についても *slr2030* の下流だけでなく、上記の *ndhB* の下流、*slr0846-sll0822* も試してみたが、結果は同様であった。その原因の詳細については明らかにできていないが、サルモネラ由来の DNA 配列にラン藻の染色体でタンパク質をコードする以外の何らかの予期しない影響を発揮してしまうか、これらが発現することにより細胞内の主要な代謝が大きく妨げられる可能性が予想された。サルモネラのプロパンジオール代謝系は細胞質に局在する特殊なタンパク質構造体の中に局在して機能することが知られている。代謝産物が細胞に害を及ぼす場合や揮発性の高い物質を用いる反応の場合、時として反応物を物理的に分けし他の細胞機能に対する影響を最小限とするか、揮発性化合物の濃度を保つために用いられる仕組みである。ラン藻は細胞質に蓄積した HCO_3^- をカルボキシゾームと呼ばれるタンパク質性の構造体中で、カーボニックアンヒドラーゼの作用により CO_2 とし、その CO_2 を初期炭酸固定酵素である Rubisco により有機物へ固定している。サルモネラのプロパンジオール利用系の構造体の殻タンパク質は、ラン藻のカルボキシゾームの殻タンパク質とアミノ酸配列に相同性があり、導入した *pdu* 遺伝子産物がラン藻のカルボキシゾームに影響した可能性は否定できない。この問題を解決するためには、アミノ酸配列を変更しないで DNA 塩基配列を変更した人工 DNA 配列を作製するか、同じ酵素をコードする遺伝子群をサルモネラ以外の微生物から取得して導入することが考えられる。また、タンパク質構造体を構成する殻タンパク質遺伝子とともに発現することも助けになるかもしれない。

2. ガスクロマトグラフィーによるプロパノール定量系の開発: プロパノール、プロパンジオールの定量同定は、FID を検出器に用いたガスクロマトグラフにより行った。この条件でプロパノール、プロパンジオールの分離と定量が可能であり、野生型の細胞の粗抽出液と標準品を混合して GC に供したところ、内在性の化合物のピークとは合致しないことを確かめた。

野生型と *FucO-mgs-gldA* 遺伝子を導入した細胞からの抽出液を分析したが、プロパンジオールに対応するピークは得られなかった。

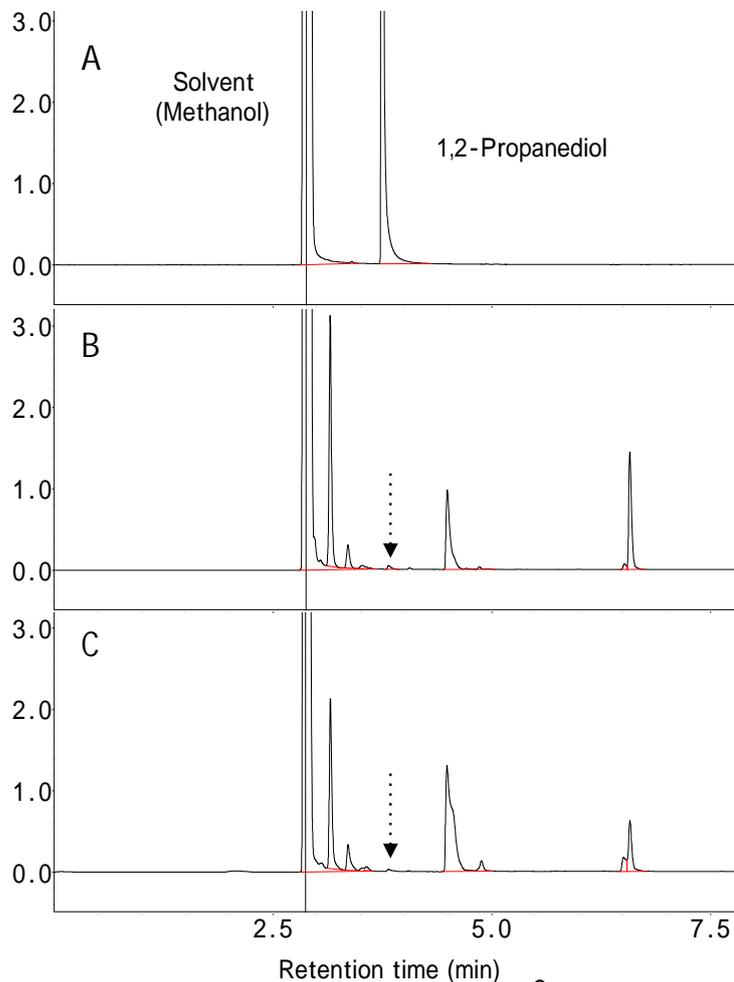


図3. 細胞抽出液の額クロマトグラフィーによる解析。A. 1,2-プロパンジオール標準品。B. 野生型。C. 遺伝子導入を施した細胞。

6. 自己評価

予想以上に当初の目標を達成するのは困難であった。当初、一群の代謝酵素遺伝子を導入すれば新たな代謝経路が機能するのではないかと考えていたが、なかなかそうはならないことがわかった。特に *pduCDE-pduQ* 遺伝子の導入は、繰り返し試みたり様々な発現強度のプロモーターを検討し比較したが、とうとう導入すらできなかった。遺伝子導入ができて機能しないというものであったならば、いろいろな試行錯誤ができたと思われるが、その配列自体することが何らかの未知の機構により細胞にマイナスの効果を及ぼすために、導入できないとなると抜本的な改善を試みなければならず、時間が不足した。ラン藻類への遺伝子の導入には約1ヶ月が必要で、1年という期間ではそう何度もトライできるわけではなく成功できなかった。

今回めざしたような新規な代謝経路の構築は、単なる遺伝子の導入にとどまらず、代謝経路全体のバランスの改変が必要なのであろうと改めて感じた。代謝経路の導入にかかわらず、代謝フローを人為的に改変するための基礎的知見の蓄積が、この種の研究の達成のためには不可欠な気がした。今後はシミュレーションを含め様々な手段を検討して、複数遺伝子による代謝改変の機構を構築する必要があると考える。

7. PO の見解

微細藻類にプロパノール耐性を賦与してプロパノールを産出させるという挑戦的な研究である。果たして耐性がつくのか等、不確実性は大きいことは採択時から予想されたが、成功した場合のインパクトの大きさに鑑みて本研究が着手された。

残念ながら、誰にも予想できないステップがボトルネックとなり、かつ対処の方法が極めて限られていたため、結果として遺伝子導入自体がうまくいかず、当初の計画通りには進まず、プロパノールを生産できる光合成生物を見いだすことはできなかった。プロパノールの細胞毒性評価を遺伝子発現解析により評価するという挑戦はしているものの、プロパノールの生産を直接確認するには到っていない。しかし、可能性を示す結果は得られているなど、重要な知見を得ている。

1年間という研究期間では出現したボトルネックを突破するには至らなかったものの、研究の方針自体の妥当性は十分にあったように思われる。遺伝子導入の問題点、プロパノール及びプロパノール生産の有無を精度良く測定できる方法の開発など、課題は明確化されており、更なるチャレンジが期待される。

8. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) 口頭発表

学会

国内 1件, 海外 1件(発表予定, 2011年3月)

・ T. Kotyajima, Y. Shiraiwa, I. Suzuki, A novel approach for the production of

propanol in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. The 1st Asia Oceania Algae Innovation Summit, Dec. 13 and 14 (2010), Tsukuba, Japan.

- ・ I Suzuki, T Kotajima, Y Shiraiwa, A Novel Approach for the Production of Propanol in Photosynthetic Organism, Keystone Symposia, "Biofuels", Mar. 1 – 6 (2011), Singapore. (Accepted)

その他

国内 0件, 海外 0件

(4) その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

なし