

「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」

平成 24 年度採択研究代表者

H28 年度 実績報告書

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(京都工芸繊維大学工芸科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・合成代謝経路導入シアノバクテリアを用いたバイオリア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、二酸化炭素と光を利用した、イソプロパノール(IPA)、1,3-プロパンジオール(1,3-PDO)、D-乳酸の生産に成功してきたが、今年度は、これらの生産量の向上を試みた。特に、1,3-PDO の生産では、プロモータの変更と培養条件の最適化で、1.22g/L の生産に成功した。また、新規な乳酸生産経路を導入することで、1.27g/L の乳酸生産に成功した。シアノバクテリアを用いて、二酸化炭素と光から物質生産する研究で、1g/L を超える報告例は非常に少ない。

本多グループは、液中1細胞孤立アレイ培養技術を用いて、シアノバクテリアの優良変異株のスクリーニングとその性質調査を行っている。本年度は、昨年度までにスクリーニングに成功した有機溶媒耐性変異株、SY1043株の耐性機構を調べた。その結果、ワイルドタイプ(WT)ではIPAストレスにより細胞内ROS量が増加するが、ROS除去能に関してはWT株とSY1043株で差異はなく、蛍光分子を用いた膜透過性を調べたところ取り込みが有意に低く、SY1043株IPAの取り込み量を減少させることで耐性を向上させていることが示唆された。

堀内グループは、効率的なシアノバクテリア培養システムを構築するため、バイオリクターによる研究を行っている。本年度は、1,3-PDO 生産の効率化を更に進めるとともに、新たに構築された乳酸生産シアノバクテリアを用いた培養工学的検討を行った。エアリフトバイオリクターによる1,3-PDOの連続生産を検討したところ、約40日にわたる連続生産が可能であったが、培養後期に菌株の変異または遺伝子の脱落による生産性の減少が認められた。次に、高い希釈率で連続運転を行い生産性の向上を図るため、固定化担体を用いたエアリフトバイオリクターシステムにより連続運転を行ったところ、良好な菌体増殖が確認されたが、やはり連続運転に伴い1,3-PDO 生産が減少した。また、乳酸生産シアノバクテリアを用いて基礎的培養条件について検討を行ったところ、約2週間の培養で最大1.4g/Lの乳酸が生産され、本株により炭酸ガスからのD-乳酸生産が可能なが示された。

村上グループは、花井グループが作成した合成代謝経路導入株・代謝遺伝子破壊株、本多グループが作成したIPA耐性株などを対象に、細胞の増殖特性や光合成生理について定量的な評価を行った。多くの変異株では、弱光条件下での光合成には影響がほとんど見られないものの、強光条件下での光合成活性は野生株の60-80%に留まることが示された。細胞内の代謝バランスの変化が、変異株の光合成能力にも影響を与えるものと考えられる。IPA耐性株では、野生株が増殖できない高濃度のIPAを添加しても、光合成活性が維持されることが明らかになった。この結果は、シアノバクテリアのアルコール毒性の解明やアルコール耐性株の活用にも示唆を与える。

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ってきた。今年度は、この提案に基づき、炭酸固定経路である Calvin 回路から Acetyl-CoA へとつながる新たな経路を構築し、CoA の供給を補う酵素遺伝子を導入した。その結果、この株の細胞内 Acetyl-CoA 量は向上し、この遺伝子改変株に IPA 生産経路を導入した株では、IPA 生産量が向上することが確認された。

【主要論文】

1. Yasutaka Hirokawa, Yuki Maki, Taizo Hanai, "Improvement of 1,3-propanediol production using an engineered cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* by optimization of the gene expression level of a synthetic metabolic pathway and production conditions", *Metabolic Engineering*, 39, 192-199, 2017
2. Yasutaka Hirokawa, Yudai, Dempo, Eiichiro Fukusaki, Taizo Hanai, "Metabolic engineering for isopropanol production by an engineered cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, under photosynthetic conditions", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123, 39-45, 2017
3. Yasutaka Hirokawa, Ryota Goto, Yoshitaka Umetani, Taizo Hanai, "Construction of a novel d-lactate producing pathway from dihydroxyacetone phosphate of the Calvin cycle in cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press (Available online 18 March 2017)
4. Sayuri Arai, Kayoko Hayashihara, Yuki Kanamoto, Kazunori Shimizu, Yasutaka Hirokawa, Taizo Hanai, Akio Murakami, Hiroyuki Honda, "Alcohol-tolerant mutants of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 obtained by single-cell mutant screening system", *Biotechnology and Bioengineering*, in press (Available online 18 March 2017)