

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：花井 泰三
(九州大学大学院農学研究院 准教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

花井 G(九大)が中心となり、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942(以下 PCC7942)内に合成代謝経路の構築を行った。これまでに、イソプロパノール(292mg/L)、1,3-プロパンジオール(1,3-PDO、1220mg/L)、グリセロール(3380mg/L)、乳酸(1230mg/L)、1-ブタノール(245mg/L)、エタノール(138mg/L)を、二酸化炭素から直接的に生産することに成功した。特に、1,3-PDO およびグリセロール生産に関しては、阪大の清水、松田先生からご指導いただいた代謝流束解析を用いて、この生産量が達成された。現在までのところ、シアノバクテリアを用いて、二酸化炭素から直接物質生産する研究は、5.5g/L のエタノールが最高生産量であり、1g/L 以上の生産量を達成することはまれである。本研究では、3 つの物質で 1g/L 以上の生産を達成した。特に、グリセロールは 3g/L を超えた生産量で、我々が知るところでは、二酸化炭素から直接物質生産する研究としては世界第二位となった。

本多 G(名大)は、マイクロ剣山型磁石デバイスと磁性微粒子によるラベリング技術を用いて、シアノバクテリア 1 細胞液中孤立アレイ培養技術を構築し、バイオアルコール生産に有用なシアノバクテリア変異株の迅速な探索を可能にした。シアノバクテリアに特異的なレクチンを用いて、細胞を磁気分離できる磁性ナノ微粒子を作製し、液体培地中で1細胞ずつ孤立させる培養により、高増殖能、イソプロパノール耐性能を有する株の取得に成功した。次に、最もイソプロパノール耐性が高かった SY1043 株の機能解析を、村上 G(神戸大)と行ったところ、SY1043 株はイソプロパノール濃度が 30 g/L の培地中でも増殖することがわかり、その光合成能はイソプロパノール 10 g/L 存在下でも低下しないことがわかった。また、SY1043 株は、エタノール、1-ブタノール、イソブタノール、1-ペンタノールといった各種アルコールに対して高い耐性能をもつことを見出した。さらに、SY1043 のゲノム解析を東京農大の吉川、兼崎先生に依頼し、変異箇所を特定した。花井 G が各々の変異箇所を PCC7942 野生株に導入したところ、一カ所の遺伝子変異により、有機溶媒耐性が獲得されていることが明らかになった。

堀内 G(京工繊)は、様々なフォトバイオリアクターシステムを検討し、花井 G が作成した物質生産株による効率的な生産システムを構築した。まず、PCC7942 野生株とイソプロパノール生産株を用いて、基礎的培養条件の検討を行うとともに LED 光源を用いたフォトバイオリアクターシステムを構築し、低電力で効率的な培養システムを検討した。次に、1,3-PDO 生産株の培養工学的検討を行った。その結果、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。そこで、生産菌のみならず、生産菌を単体に固定し、エアリフトバイオリアクターを用いて、連続運転および繰り返し回分培養を検討した。最後に、乳酸生産菌を用いたところ、約 2 週間の培養で最大 1400mg/L の乳酸が生産された。

村上 G は、花井 G が構築した各種アルコール生産株、本多 G が PCC 7942 への UV 照射突然変誘発と一細胞孤立培養法により選抜したアルコール高耐性株について、光合成色素組成、光合成酸素発生能、増殖特性などについての解析を行い、将来のシアノバクテリアによりバイオアルコール生産性向上の基盤となる結果を得た。

福崎 G(阪大)は、花井グループが作成するイソプロパノール生産株の生産性拡大に必要な代謝情報を提供するための技術基盤を開発した。具体的には、遺伝子改変による代謝変化を俯瞰的にとらえ、注目すべき代謝物を選定するため、特に重要である中心代謝(カルビン回路、解糖系、糖新生、ペントースリン酸回路、TCA 回路等)について、ターゲット(目標あり)およびノンターゲット(目標なし)の代謝物プロファイリング法を確立した。今回開発された手法を用いて、シアノバクテリア野生型株である PCC7942 株を解析し、アセチル CoA を出発点とするアルコール生産において、ピルビン酸からアセチル CoA への経路がボトルネックとなり得るという重要な知見を得た。さらに、花井 G が作成した株のメタボローム解析を実施し、代謝律速ポイントの発見に貢献した。また、上記成果を用いて安定同位体標識実験を基盤とする代謝動態解析法の一つである代謝ターンオーバー解析のための GC-QqQ-MS 及び LC-QqQ-MS を用いた同位体分配率測定システムを確立するとともに、当該システムを用いて花井 G が作成した株を解析し、代謝律速経路の特定に資する情報を提供した。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 合成代謝経路の構築

概要: シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (以下 PCC7942) 内に合成代謝経路の構築を行った。これまでに、イソプロパノール (292mg/L)、1,3-プロパンジオール (1,3-PDO, 1220mg/L)、グリセロール (3380mg/L)、乳酸 (1230mg/L) を、二酸化炭素から直接的に生産することに成功した。この方法で、1g/L を達成する研究例はとて少なく、グリセロールの生産量は、我々の知るところ、世界第二位の生産量である。

この研究内容は、本 CREST の課題に直接関与し、シアノバクテリアを用いた二酸化炭素からの物質生産に大きな進歩をもたらせたものと考えている。本研究結果は、二酸化炭素からの直接物質生産において、世界的に見ても例の少ない、1g/L を達成し、グリセロール生産については、我々の知る限り、世界第二位の生産量を達成している。イソプロパノール生産に関しては論文準備中、1,3-PDO に関しては *Metabolic Engineering* 39, 192 (2017) に報告済み、乳酸生産に関しては *Journal of Bioscience and Bioengineering* 124, 54 (2017) に報告済み、グリセロールの生産に関しては、論文投稿中である。

2. シアノバクテリア細胞孤立培養法の開発

概要: 同一液体培地中でシアノバクテリアを 1 細胞ずつ孤立培養する技術を開発した。この技術は、乾燥や寒天成分による増殖阻害といった一般的な寒天培地上でのコロニー単離培養の問題点を解決できる培養法であり、シアノバクテリアに本技術を用いることでコロニー形成率は 5% から約 80% にまで大幅に向上した。細胞の孤立、培養、回収まで効率的に可能な技術は独創性も高く、変異株スクリーニングを行う優れた基礎研究と考えられる。

この研究は、本 CREST で構築した物質生産するシアノバクテリア株に、紫外線照射下などで変異を加えた場合、高効率で生産性向上に関与する株をスクリーニング可能とする全く新しい方法である。具体的には、下記に示す、生産物であるアルコール耐性能を持つ株の取得に成功している。Biotechnology reports 4, 151 (2014) および Biotechnology and Bioengineering 113, 112 (2016) にて報告済みである。

3. シアノバクテリア有機溶媒体株の取得とその原因遺伝子の解明

概要: 開発したシアノバクテリア液中孤立アレイ培養法を用いて、30g/L のイソプロパノール含有培地中でも生育できる高耐性株 SY1043 を獲得した。SY1043 株は、野生株に比べて、非常に高い有機溶媒耐性能を保持していた。SY1043 株は、エタノール、1-ブタノール、イソブタノール、1-ペンタノールといった各種アルコールに対して高い耐性能をもつことを見出した。これらの特性は、一つの遺伝子の変異であることを明らかにした。

この研究で得られた SY1043 株を、シアノバクテリアによるバイオアルコール生産の宿主細胞として用いることで、バイオアルコール生産効率が大きく向上する可能性があり、本 CREST で構築したアルコール生産株の生産向上に直接関連する研究である。広いアルコール耐性を有するシアノバクテリア株は少ない。また、このような特性が一つの遺伝子の一遺伝子置換によって起こっていること明にした点も、非常に興味深い。この変異が、他の種の株でも有効であることが確認できれば、シアノバクテリアのアルコール生産に、非常にインパクトの高い研究結果である。この研究は、SY1043 の取得と特性については *Biotechnology and Bioengineering*, 114, 1771 (2017)、原因遺伝子の特定に関しては投稿準備中である。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 合成代謝経路導入シアノバクテリアに対するメタボローム解析法の開発

概要: 物質生産のためのプラットフォームが整っているシアノバクテリア 3 種について、広範囲の代謝物(約 80 種)の絶対量を正確に測定することに成功した。本研究において開発された手法は、広範囲の代謝経路を標的とした定量法としては比較的簡便であり、また測定精度も高いため、大規模メタボローム解析手法のイノベーションに貢献できると予想される。

この研究は、本 CREST で構築する物質生産するシアノバクテリア株を作成・改変する際に必要となる代謝物プール量を正確に得るための研究であり、本 CREST の内容に直接関連するものである。繰り返しとなるが、本研究において開発された手法は、広範囲の代謝経路を標的とした定量法としては比較的簡便であり、また測定精度も高いため、大規模メタボローム解析手法のイノベーションに貢献できると予想される。本研究内容は、Metabolites 4, 499 (2014)にて報告済み。

2. フォトバイオリアクターによるシアノバクテリアを用いた物質生産

概要: 様々なフォトバイオリアクターシステムを検討し、代謝経路導入シアノバクテリアによる効率的なバイオアルコール生産システムを構築することを目的として幅広い検討を行った。特に、LED 光源を用いたフォトバイオリアクターシステムを構築し、低電力で効率的なシアノバクテリア培養システムとシアノバクテリアを担体に固定化した連続培養などを検討した。

この研究は、本 CREST で構築した物質生産するシアノバクテリア株を、実用化を目指してスケールアップする際に必要となるバイオリアクターに関する基礎的データを蓄積し、問題点を明らかにするために行った。シアノバクテリアなどを用いたバイオリアクターに関する研究例は存在するが、合成代謝経路を導入したシアノバクテリアを用いたバイオリアクターに関する研究例は少なく、菌体の開発や改良にフィードバックできる情報が得られる貴重な研究結果となった。これらの研究結果は、堀内 G によって、生物工学会などで発表されている。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「花井」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
花井 泰三	九州大学農学研究院	准教授	H24.10～
濱田 浩幸	同上	助教	H27.4～
澤 稔彦	同上	博士研究員(特任助教)	H26.4～H28.3
田附 常幸	同上	博士研究員(特任助教)	H24.10～H25.12
広川 安孝	同上	博士研究員(特任助教)	H25.4～H29.3

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

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
本多 裕之	名古屋大学工学研究科	教授	H24.10～H29.3
清水 一憲	同上	准教授	H26.6～H29.3

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

②「堀内」グループ

研究参加者c

氏名	所属	役職	参加時期
堀内 淳一	京都工芸繊維大学 工芸科学研究科	教授	H24.10～H29.3
熊田 陽一	同上	准教授	H27.4～H29.3
小西 正朗	北見工業大学	准教授	H24.10～H28.3

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

②「村上」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
村上 明男	神戸大学内海域環境 教育研究センター	准教授	H24.10～H29.3

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

②「福崎」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
福崎英一郎	大阪大学工学研究科	教授	H24.10～H29.3

中山 泰宗	崇城大学	准教授	H24.10～H29.3
-------	------	-----	--------------

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)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

村上グループ:CREST 同領域の他チーム(小俣達男)との共同研究でシアノバクテリアの窒素栄養の取り込みに関与する輸送体遺伝子の同定を行った。その結果、外環境中の窒素栄養濃度の変動に応答した輸送体タンパク質の機能発現の抑制・活性化調節についての知見が得られた(Maeda et al. 2015)。

名古屋大学・本多グループが主導で作製したイソプロパノール耐性株などの変異株についてはその原因となっている変異を特定するために、東京農業大学の吉川教授を介して、同大学の生物資源ゲノム解析センターで解析を行った。

1,3-PDO 生産に関して pseudovitamin B12 の定量が重要な要素となることが考えられた。以前にシアノバクテリアでの同物質の定量を学術論文にて報告していた、東京農業大学の谷岡助教のもとで定量方法を習得した。

代謝流束解析方法の1つである Flux Balance Analysis (FBA) については、大阪大学の清水教授、松田教授を始めとする研究室の方々にご教授いただき、解析結果の解釈に関わる助言など研究への協力をいただいている。

異動に伴い研究チーム外となった崇城大学の中山准教授、北見工業大学の小西准教授には、メタボローム解析について、バイオリアクターを用いた培養工学的な検討についての助言をいただいている。

1-ブタノール生産については、UCLA の James C. Liao 教授、National Chiao Tung University の Ethan Lan 助手から、指導いただいた。

福崎グループが、メタボローム解析技術を Mathuw Chang 准教授(シンガポール国立大学)、Eriko Takano 教授(University of Manchester)、福居俊昭教授(東京工業大学)に提供している。

§3 研究実施内容及び成果

3. 1 合成代謝経路導入シアノバクテリアの構築と最適化(九州大学 花井グループ)

(1)研究実施内容及び成果

- ・合成代謝経路導入シアノバクテリアによる物質生産

イソプロパノールの生産

外来遺伝子の導入が比較的容易であり、物質生産の宿主に広く用いられている *S. elongatus* PCC 7942 を用いた。合成代謝経路を構成する遺伝子群は、遺伝子の導入により表現型に影響を及ぼさないとされる遺伝子座(Neutral siteと呼ばれる)に導入した。大腸菌において構築済みであったイソプロパノール生産系(*thl*, *atoAD*, *adc*, *sadh*)を、PCC 7942 株のゲノムに導入することでイソプロパノール生産株の構築を行った(図 3-1,1)。

生産経路の構築に関しては当初の計画よりも早く達成することができ、生産系構築に関しての成果が学術論文に掲載された。生産株は光合成条件下ではイソプロパノールを生産することが

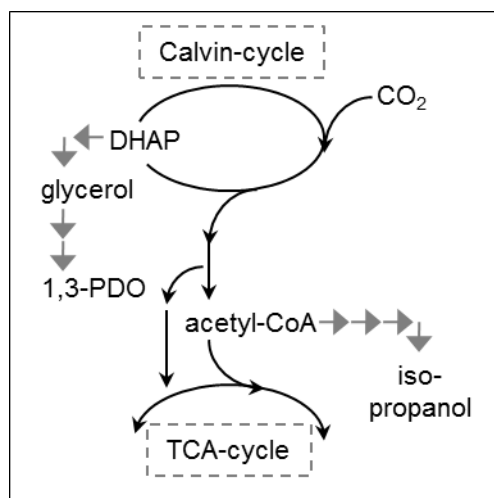


図 3-1,1 合成代謝経路の導入
(イソプロパノール、1,3-PDO)

できなかったが、培養後、嫌気・暗条件へと移行することにより、生産することが確認された (26.5 mg/L)。また、光合成条件下であっても酢酸を添加することで生産は可能であった。

嫌気・暗条件では当然光合成は行われず、イソプロパノールは細胞内の貯蔵物質 (主にグリコーゲン) から生産されていると考えられた。そのため、生産に使用する細胞の培養時期を検討したところ、定常期前期の細胞が生産に適していることが明らかとなった。また、嫌気・暗条件下での培養では副産物として酢酸の生産が見られたため、再度光合成条件下に戻すことで、嫌気・暗条件下で生産した酢酸を利用し、146 mg/L のイソプロパノール生産に成功した (図 3-1,2)。

これまでの研究結果より、酢酸の存在がイソプロパノール生産に大きく影響することが明らかとなった。また、大阪大学・福岡グループの代謝解析より、酢酸添加時に細胞内の Acetyl-phosphate 濃度が大幅に増加していることが明らかとされた (未発表)。そこで、Acetyl-CoA から Acetyl-phosphate への変換反応を触媒するホスホトランスアセチラーゼ酵素遺伝子 (*pta*) を導入した。pta 導入株は光合成条件下において酢酸生産が確認され、さらにイソプロパノール生産株へと導入することで、明・好気条件下でイソプロパノールの生産についても確認することができた (33 mg/L)。

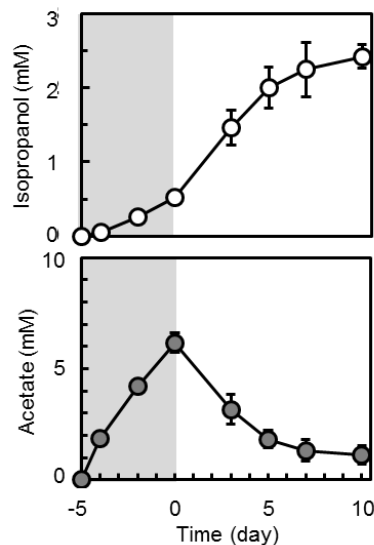


図 3-1,2 イソプロパノール生産
図中灰色部分は暗・嫌気条件、白色部分は光合成条件を示す。

1.3-プロパンジオールの生産

イソプロパノール生産系の構築が当初の計画よりも早く進んだため、シアノバクテリアにおいて代謝流束が大きいとされている Calvin 回路の代謝物を出発物質とすることで高い生産性が達成できるものと考え、DHAP を出発物質とした 1,3-PDO 生産系の構築を前倒して開始することができた。構築した 1,3-PDO 生産株は光合成条件下において、目的生産物質である 1,3-PDO、また中間代謝産物であるグリセロールの生産が確認された (図 3-1,3)。

1,3-PDO 生産経路において *dhaB* がコードする glycerol dehydratase は、ビタミン B12 要求性であることが知られており、大腸菌に同経路を導入した際の 1,3-PDO 生産にはビタミン B12 の逐次添加が必要であるとされている。しかしながら、本研究で構築した株においては、ビタミン B12 の添加による 1,3-PDO 生産性の変化は確認されなかった。*Synechocystis* sp. PCC 6803 を始め幾つかのシアノバクテリアにおいてはビタミン B12 と構造の類似した pseudovitamin B12 を合成することが知られており、おそらく PCC 7942 株内性の pseudovitamin B12 が代替物質として機能したのと考えられた。

通気培養時の CO₂ 濃度を室内の空気 (およそ 0.04%) から 1% に上げることで 1,3-PDO の生産量が向上した。グリセロールが増殖挙動に影響されずに生産され続けたのに対して、1,3-PDO は定常

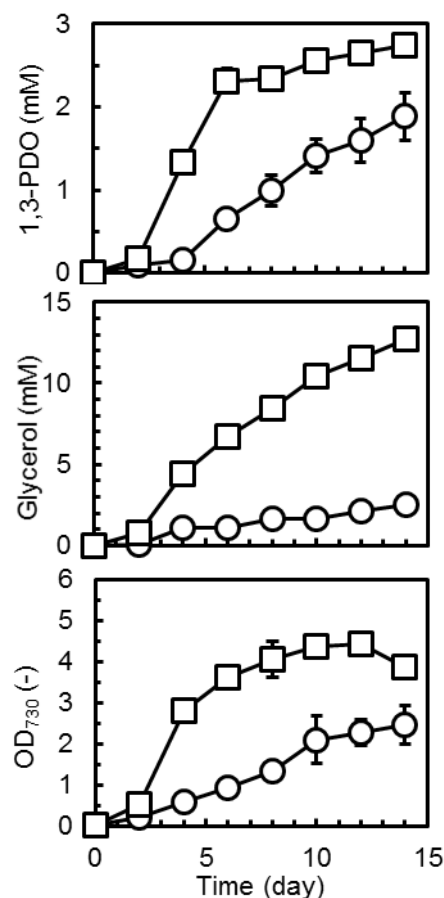


図 3-1,3 1,3-PDO 生産
○ : 0.04% CO₂ 通気、□ : 1% CO₂ 通気

期に入ることによって生産速度が大きく低下した。細胞内の pseudovitamin B12 量は定常期に大きく減少することが *Synechocystis* sp. PCC 6803 において報告されており、glycerol dehydratase の活性低下に伴い、1,3-PDO の生産速度が低下したのではないかと考えられた。培地成分の濃度を検討したところ、リン酸濃度を上げることで増殖期の延長が見られた。増殖期の延長に伴って、1,3-PDO 生産量の向上に成功した (425 mg/L の 1,3-PDO と 1250 mg/L のグリセロール)。

構築した生産系では、中間代謝産物であるグリセロールが蓄積しており、グリセロール以降の後半経路が 1,3-PDO 生産における律速段階となっている。そこで、Glycerol 以降の経路を制御するプロモータを発現強度の強いものへと変更することで生産量の向上を試みた。シアノバクテリアでの物質生産に広く使用されていた Ptrc プロモータとこれまで使用してきた PLlacO1 プロモータの転写強度を比較すると約 100 倍強いことが明らかとなったため、実際に生産系に使用することとした。DHAP から Glycerol を PLlacO1 プロモータ、Glycerol から 1,3-PDO を Ptrc プロモータにて制御した株は、より多くの 1,3-PDO を生産することが確認された。さらに、1,3-PDO 生産が増殖連動型であることに注目し培地組成の検討を行なったところ、リン酸濃度を 2 倍とすることで生産量を更に向上させることに成功した。最終的に、1,3-PDO 生産量は 1220 mg/L となった。

1,3-PDO 生産に関しては、同じ領域の CREST メンバーである大阪大学の清水、松田先生のグループと共同研究を行い、代謝流束解析による遺伝子破壊候補の決定を行った。Knoop らの発表した PCC 7942 株の 589 遺伝子を対象としたゲノムスケールモデルを利用し、これらの遺伝子を破壊した際の代謝流束のシミュレーションを行った。その結果、呼吸鎖、光化学系 I 循環的電子伝達経路、二酸化炭素取り込みに関与する NDH1 複合体の破壊が、1,3-PDO 生産向上に最も寄与するとの結果が得られた。NDH1 複合体は、その構成タンパク質の種類によって、前述の機能や局在する場所が異なると報告されているので、それぞれの機能を示す代表的なタンパク質の遺伝子を破壊した 5 種類の 1,3-PDO 生産株を作成し、生産を試みた。

その結果、呼吸鎖、光化学系 I 循環的電子伝達経路に関与する NDH1-F1 破壊が、最も 1,3-PDO の生産向上に寄与することが明らかとなった。特に、1,3-PDO 生産経路の中間生産物であるグリセロールの生産株を作成し、NDH1-F1 を破壊した場合は、3380 mg/L のグリセロールを生産した。この生産量は、二酸化炭素と光を用いた組換えシアノバクテリアによる物質生産としては、エタノールに次ぐ二番目の生産量である。

1,3-PDO のシアノバクテリアによる生産は、特許に報告例があるが、有機溶媒抽出で濃縮し、小さいピークが報告されているだけである。合成代謝経路を導入したシアノバクテリアを用いて、CO₂ から直接物質生産する研究例は多くあるが、1 g/L 以上の生産を達成しているものは数例しかなく、我々のグリセロール生産量は、我々が知る限り世界第二位の値である。

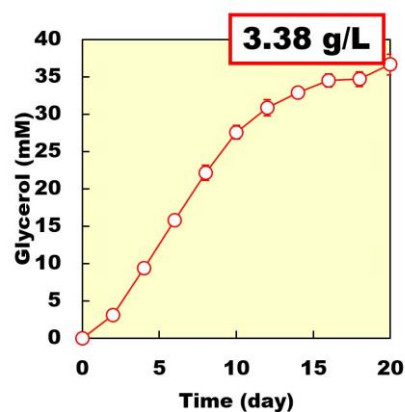


図 3-1,4 グリセロール生産

乳酸の生産

微生物で乳酸を生産する際には、通常、解糖系のピルビン酸から生産されるが、シアノバクテリアでは Calvin サイクルの代謝流束が高いと考えられるので、Calvin サイクルの代謝物の一つである DHAP を出発材料とする物質生産には利用されていない全く新規な代謝経路を試みた。その結果、大腸菌由来の *mgsA* と PCC 7942 株由来の *gloAB* を組み合わせることで、D-乳酸の生産が確認でき

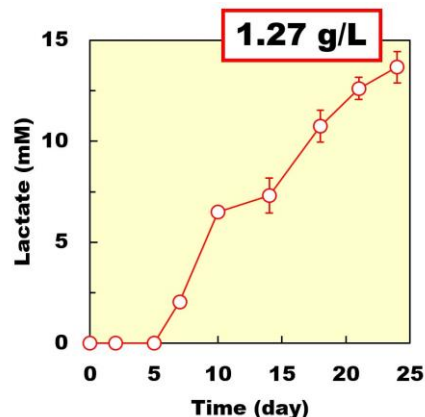


図 3-1,5 乳酸生産

た。また、乳酸のシンポーターである *lldP* の導入と培地の pH 制御により、生産量の向上に成功した。その結果、光と炭酸ガスから、1270 mg/L の D-乳酸生産に成功した。

3. 2 変異株の効率的探索・分離法の確立(名古屋大学 本多グループ)

(1)研究実施内容及び成果

バイオアルコール生産に有用な変異株を取得するための効率的な 1 細胞培養技術の開発し、その技術を用いて実際に有用変異株の取得を行った。シアノバクテリア特異的な磁気ラベルを目指し、細胞外膜に存在する糖を認識するレクチンを修飾した磁性微粒子 (Magnetic Cationic Liposome, MCL) を作製した。これを付着させた磁気ラベル化細胞を、2cm×2cm あたり 6400 本のピラーを有する鉄製剣山状デバイスを用いて磁力でアレイ状にパターンニングし、液体培地中での孤立培養方法を確立した。結果として、マンノース特異的なレクチンである LCA (レンズマメレクチン) を MCL に修飾することで細胞の磁気ラベル・アレイ化を行い、1 スポット上 1 細胞からのコロニー形成に成功し、MCL を添加しない通常液体培養と同程度の増殖を確認した (図 3-2.1)。従来法である寒天固体培養のコロニー形成率が 4.8 %であったのに対し、細胞アレイでは 78.4 %と明らかに高いコロニー形成率を達成した (図 3-2.1)。さらに、野生株と抗生物質耐性株を細胞アレイ上、抗生物質存在下で培養し、増殖差も確認されたことから、細胞アレイを用いて細胞の違いを増殖で評価できることを示した。最後に、細胞アレイで形成されたコロニーをマニピュレーターでピックアップ (図 3-2.1) し、その後の培養にも成功しており、変異株スクリーニングの一連の流れを細胞アレイで達成可能であることを示唆した。

次に、開発した変異株スクリーニング技術を用いて、イソプロパノール耐性変異株のスクリーニングを試みた。短波長紫外線 (UVC) 照射による変異誘導とイソプロパノール存在下での集積培養を 2 度行い、その中からイソプロパノール存在下で増殖が速い変異株を 6 株単離培養した (SY1041 株-SY1046 株)。その中で最も増殖が速かった SY1043 株の解析を詳細に行った。野生株 (WT) は 3g/L 以下のイソプロパノール存在下でしか増殖しないのに対し、SY1043 株は 30g/L のイソプロパノール存在下でも増殖可能であった (図 3-2.2)。他のアルコールに対する耐性の評価も行った結果、エタノール、イソブタノール、1-ブタノール、ペンタノールに対して野生株よりも高い耐性能を持つことが明らかになった (図 3-2.2、表 3-2.1)。

さらに、イソプロパノールストレスと活性酸素種 (ROS) との関係に注目し、SY1043 株の耐性メカニズムの解明を目指した。まずイソプロパノールストレスにより細胞内 ROS 量が増加するかどうか調べた。その結果、高濃度イソプロパノール存在下で、WT の細胞内 ROS レベルが上昇することがわかった (図 3-2.3a)。一方、SY1043 株では上昇しなかった。そこでイソプロパノールストレス耐性メカニズムについて 2 つの仮説を立て、検証した (図 3-2.3b)。仮説①: SY1043 株では産生した ROS が除去されることで、ROS 濃度が変化しなかった。仮説②: 細胞膜の組成変化でイソプロパノールが細胞内に流入しなくなったことで、ROS 濃度が変化しなかった。仮説①を検証するために、メチルビオロゲン培地に添加することで細胞内 ROS 濃度を増加させ、その時の細胞増殖を WT と SY1043 で比較した。その結果、ROS に対する耐性は WT と SY1043 で大きな差が見られなかった (図 3-2.3c)。次に、仮説②を検証するために、イソプロパノール存在下における WT と SY1043 の膜透過性の違いを、蛍光分子の取り込み量を比較することで明らかにした。その結果、高濃度イソプロパノール存在下で培養した SY1043 株の蛍光分子の取り込み量が WT と比較して有意に低いことが分かった (図 3-2.3d)。これらの結果、仮説②が支持されたことから、SY1043 株は外部からのイソプロパノール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。

加えて、変異箇所同定と耐性機構解明を目指し、全ゲノムシーケンス解析を行った。その結果、4 箇所の遺伝子配列に変異が入っていることが明らかとなった。これら 4 箇所の遺伝子変異それぞれを、野生株の PCC7942 株に導入したところ、1 箇所の遺伝子変異で、SY1043 株とほぼ同等の有機溶媒耐性を示すことが明らかとなった。

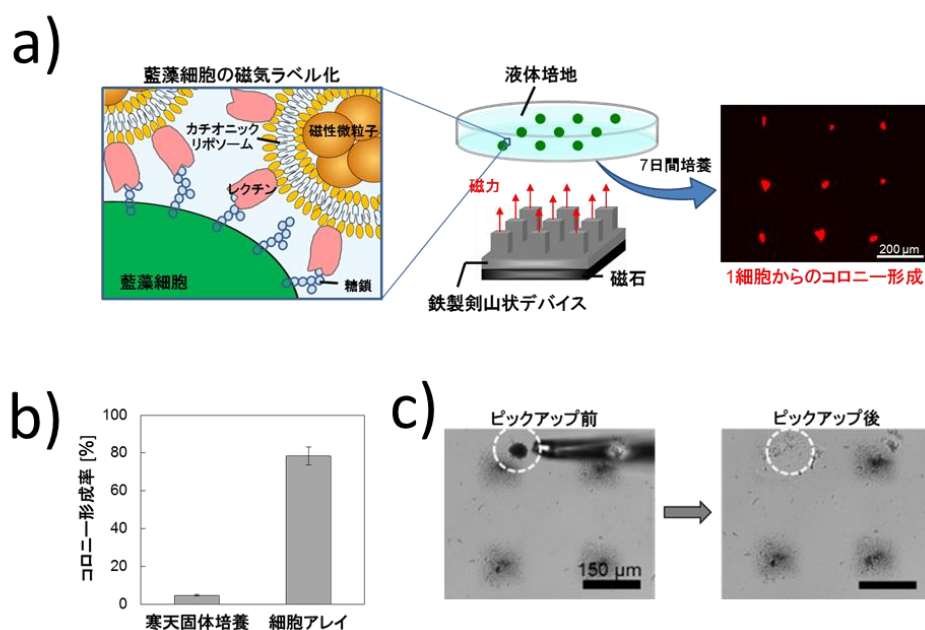


図 3-2.1 a) 磁気細胞アレイ培養法の概要, b) 各培養法でのコロニー形成率, c)コロニーピックアップの様子

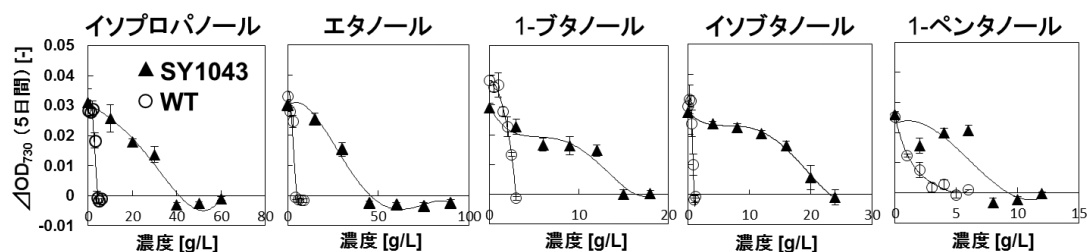


図 3-2.2 各種アルコール存在下での SY1043 株の増殖

表 3-2.1 各アルコールに対する野生株と取得した変異株の耐性評価

アルコール	増殖可能な最大濃度[g/L]	
	野生株	取得した耐性株
エタノール	2.5	22.5
イソプロパノール	1.0	15.0
イソブタノール	0.0	2.5
1-ブタノール	0.5	1.0
ペンタノール	0.25	0.5

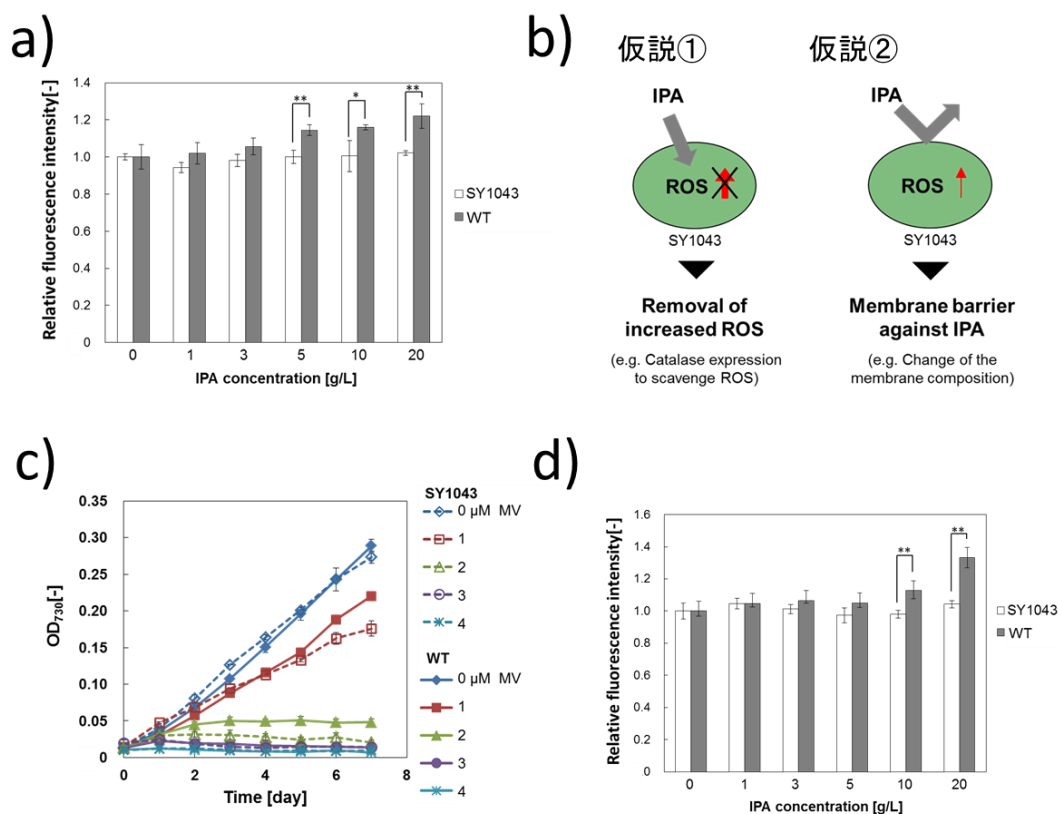


図 3-2.3 イソプロパノールストレス耐性メカニズムと ROS の関係 a) イソプロパノール添加により誘導される細胞内 ROS 量、b) 耐性メカニズムの仮説、c) メチルビオロゲンによる ROS の強制誘導と細胞増殖、d) イソプロパノール添加による細胞膜透過性変化

3. 3 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

(京都工芸繊維大学 堀内グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本研究項目では、様々なフォトバイオリアクターシステムを検討し、花井グループが構築した、イソプロパノール、1,3-PDO および乳酸生産シアノバクテリアを用いた効率的なバイオアルコール生産システムを構築することを目的とし幅広い検討を行った。

平成 24 年度は、主に、LED 光源を用いたフォトバイオリアクターシステムを構築し、低電力で効率的なシアノバクテリア培養システムを構築することを目的とした。シアノバクテリア特有の色素組成に合わせた LED 照射システムによる効率的培養法を構築した。

平成 25 年度は、LED 照射システムによるイソプロパノール効率的生産を目指し、PCC7942 株およびイソプロパノール生産株を用い様々な培養条件における培養実験を試みた。その結果、赤色及び青色 LED 光源を内蔵した振とう培養機を導入し、PCC7942 株の増殖特性を検討したところ、青色および両波長の光を供給した場合は良好な増殖が得られたが、赤色光源を利用した場合は増殖が抑制されることが明らかになった。また、供給する光の波長により、細胞の吸収スペクトルが大きく異なる結果となった。イソプロパノール生産株を用いて、同様の検討を行った結果、増殖後、嫌気条件下において微量のイソプロパノール生産が認められた。さらに、外部照射型 LED を備えた光合成培養システムを構築し、PCC7942 株を用いた基礎的な培養条件の検討をおこなったところ、青色及び赤色波長の光を供給することにより良好な培養が可能で、ジャー培養を用いたイソプロパノール生産の

可能性が示された。

平成 26 年度は、LED 照射システムにより効率的に培養を行ったイソプロパノール生産株を用い、イソプロパノール生産実験を試みた。その結果、外部照射型 LED を備えた光合成培養システムを用いても、菌体の大量培養は達成したが、培養中に増殖と連動したイソプロパノール生産は確認されなかった。一方、培養した細胞中には著量のグリコーゲンの蓄積が認められた。このため、これらの細胞を回収し、嫌気条件化で反応させたところイソプロパノールの生産が確認された。その後、培地条件および光照射条件を検討したところ、増殖を制限した培地において、暗条件を適用することで最大 22mg/L のイソプロパノールを確認した。

平成 27 年度は、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。まず外部照射型 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、赤および青色 LED を用い $100\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ の光強度で速やかな増殖が確認された。また、増殖に連動した 1,3-PDO 生産が確認され、一週間の培養で約 0.69 mM の 1,3-PDO が蓄積された。このような増殖と連動した物質生産特性は、生産性の大幅な向上が期待できるプロセスの連続化を可能にするものであり、プロセス構築の観点から有用な特性である。一方、回分培養において、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。蓄積されたグリセロール濃度は 1,3-PDO 濃度の 2 倍以上に達する 1.5mM であった。

この結果に基づき、1,3-PDO の連続生産を検討することとし、バイオリアクターとしてエアリフト型バイオリアクターを採用した。エアリフトバイオリアクターは、上昇塔内にエアを供給することで上昇塔内外に密度差を生じさせ、その密度差により培養液の循環を行うリアクターで、物質移動特性に優れ、所要攪拌動力が少なく、装置内のせん断応力が小さく、装置構造がシンプル、藻類の培養に実績があり、固定化菌体と相性が良いなどの特性を持つ。そこで、まず、エアリフトバイオリアクターを用いグロースキャビネット内で 30℃、通気 1 vvm、蛍光灯光源強度 $50\pm 10\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ の条件で回分培養を行ったところ、良好な増殖と 1,3-PDO 生産が確認され、エアリフトバイオリアクターによるシアノバクテリアの安定的培養が可能になったことが明らかになった。その後、一日 1 回一定量の培養液を引き抜き、同量の培地を供給する半連続培養および連続的に培養液供給と引抜きを行う連続培養を行い、約 1 月にわたる連続生産を達成した。1,3-PDO 濃度は、約 1.5mM、生産性は $0.1\text{mM}/\text{L}\cdot\text{day}$ 程度であった。

浮遊菌体を用いて連続生産を行う場合、希釈率がその微生物の最大比増殖速度を超えると washout が生じるため生産性の向上には限界があるが、固定化菌体を用いることにより改善が期待される。そこで、次に菌体の固定化を検討することとした。固定化とは生体触媒を担体中または担体上に固定化し不溶化する技術で、菌体を固定化することにより、培養液と独立にバイオリアクター中に維持することが可能となる。シアノバクテリアの固定化条件を検討したところ、4-10g/L のアルギン酸ソーダを用いて良好な固定化を行うことが明らかになり、エアリフトバイオリアクターによる固定化担体を用いる菌体増殖と 1,3-PDO 生産を確認した。

平成 28 年度は、前年度までの経過を踏まえた 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 D-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。そこで、まず、1,3-PDO を用いエアリフトバイオリアクターによる 1,3-PDO の連続生産を検討した。最初、回分培養を行い、その後連続運転に移行し、最初希釈率 0.05day^{-1} で運転を行い、その後、希釈率を 0.075day^{-1} 、 0.01day^{-1} に順次増加させた。その結果、約 40 日間、希釈率 0.075 の条件で安定した運転を行うことができ、1,3-PDO 濃度は約 1.5mM となった。その後、45 日目に希釈率を 0.10 に増加させると急激な 1,3-PDO 濃度の減少が観察され、約 60 日で 1,3-PDO 生産はほぼ停止した。この結果の再現性を確認するため、同様の条件で再実験を行ったところほぼ同様の現象が確認された。この培養後期における 1,3-PDO の現象は菌株の変異または遺伝子の脱落によると考えられたことから、連続プロセス化には菌株の遺伝的安定性が重要と考えられた。次に、前年度の検討に基づき固定化したシアノ

バクテリアを用い、エアリフトバイオリアクターシステムにより連続運転を行った。その結果、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。そこで、繰り返し回分培養による 1,3-PDO 生産を検討したところ、3 バッチ(約 30 日間)は安定した繰り返し回分培養が達成され、1.0-1.3mM の 1,3-PDO が生産された。しかし、さらに、繰り返し回分培養を継続すると、菌体増殖そのものは高く維持されたものの、4 バッチ目に 1,3-PDO 生産が急激に減少し、5 バッチ目ではほぼ生産が停止し、菌株の遺伝的変異が生じたと考えられた。

最後に、新たに花井グループにより構築された D-乳酸生産株である TA3335 株および TA3504 株を用いて基礎的培養条件について検討を行った。TA3335 株は PCC7942 株にカルビンサイクルの中間体 DHAP からメチルグリオキサル(MG)合成を担う *msgA* 遺伝子を導入した株で、TA3504 株はさらに細胞外へ乳酸を排出する乳酸トランスポーター *lldP* を組み込んだ株である。中間代謝物である MG は細胞毒性を持つことが知られている。種々の条件でフラスコ培養を行ったが概ね 200-1400mg/L の D-乳酸生産が行われ、本菌を用いて炭酸ガスからの D-乳酸の直接生産が可能になったことが明らかになった。培養 pH により乳酸生産性が影響を受けることから、現在炭酸ガス供給による pH-stat に基づく培養システムの検討を進めている。



培養開始時



培養22日目

図 3-3,1 エアリフト型バイオリアクタ

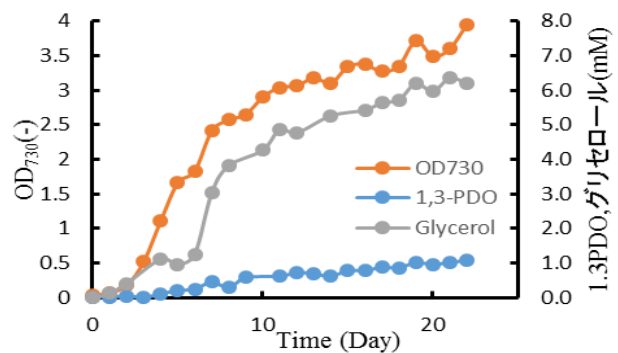


図 3-3,2 エアリフト型バイオリアクターによる半連続培養による 1,3-PDO 生産

3. 4 合成代謝経路導入シアノバクテリアの増殖法の検討(神戸大学 村上グループ)

(1)研究実施内容及び成果

バイオアルコール生産を目的としたシアノバクテリア細胞への合成代謝経路の導入は、細胞増殖の基盤となる光合成エネルギー代謝系にも何らかの影響を間接的・直接的に与える。また、シアノバクテリアによるアルコール生産が実用化段階になった際は、培養コストが大きな課題となる。従って、各種改変株の増殖特性の解明や光合成能の定量化は重要な課題である。本研究では、花井グループが作成した合成代謝経路導入株および本多グループが選抜したイソプロパノール耐性株の増殖を最適化することを目的として、光合成関連のパラメータを定量的に示す解析を進めた。

シアノバクテリア PCC7942 株の培養は BG11 培地を用い、20-25℃で行った。培養光源としては白色蛍光灯(上方照射)あるいは白色 LED(下面照射)を用いた(光強度:20-40μmol

photons/m²/sec)。500 mL 三角フラスコに被せ式シリコ栓を組み合わせ、旋回振盪(約 100 rpm)による攪拌培養を行った。細胞の増殖過程は、一定時間毎にサンプリングした細胞懸濁液(約 3 mL)を、『積分球-ファイバーマルチチャンネル分光システム』で測定した生体吸収スペクトルにより追跡した。可視域全域の生体吸収スペクトルからは、増殖に伴う光合成色素(クロロフィル)量の増加、代謝改変や培養条件による光合成色素(クロロフィル、フィコビリン、カロテノイド)間の量的(量比)変動や培養条件に応答した環境順化などの情報が読み取れる。また、一部の株については生体蛍光スペクトル測定を行い、光合成色素の機能性や光化学反応中心 I/光化学反応中心 II 量比への影響なども確認した。光合成電子伝達活性は、細胞懸濁液を用いた溶存酸素濃度の経時変化(光合成酸素発生活性)の光強度依存性について測定した。また、暗所での呼吸活性も同時に測定した。『光強度—光合成酸素発生速度曲線』を精度と再現性を担保して計測するため、高感度のクラーク型マイクロカソード電極とカスタムメイドのガラス製恒温チャンバーを採用した。吸収スペクトル測定システムおよび溶存酸素濃度測定システムは、本 CREST 研究の目的に合致するよう設計し、自作部品なども用いて当研究室内で組み立てた。

アルコール等の生産株の解析

花井グループが作製したイソプロパノール生産株(2株)、1,3-PDO 生産株(2株)、乳酸生産株(アセチル CoA 増強株)(3株)について培養条件を検討した。野生株、イソプロパノール生産株、乳酸生産株の白色光下での増殖速度は、光強度 20-40μmol photons/m²/sec 付近が最大であった。また、イソプロパノール生産株と 1,3-PDO 生産株では、生体吸収スペクトルより光化学系 II の主要アンテナ色素であるフィコシアニンのクロロフィルに対する相対含量の低下が認められ、代謝経路改変に伴う影響と推測された。光強度—光合成活性の解析では、いずれの株も光律速条件下(<100μmol/m²/s)での光合成活性(光合成光利用効率)には有意な差異は認められず、弱光条件(20-40μmol/m²/s)下での増殖速度の測定結果と合致している。一方、光飽和条件(>300μmol photons/m²/sec)での最大光合成活性は、解析した株間で有意な差が認められ、イソプロパノール生産株(2 株)は野生株の 50%まで低下したのに対して、1,3-PDO 生産株および乳酸生産株は 20-30%の低下に留まった。しかし、株間で最大光合成活性の差が見られたものの、これらの合成代謝経路導入株の通常の弱光条件下での増殖には大きな影響は与えないものと判断された。

イソプロパノール耐性株の解析

本多グループが UV 変異誘発とアレイ状孤立培養法による選抜で取得したイソプロパノール耐性株(SY1043:野生株が増殖不能な 10 g/L のイソプロパノール存在下で増殖可能)について解析した。通常の培養条件下では、耐性株は細胞サイズの伸長とカロテノイド含量の増加が確認された。次に 10 g/L のイソプロパノール存在下で培養したところ、耐性株、野生株ともに細胞サイズの顕著な伸長が見られた。また、野生株ではイソプロパノール添加によりカロテノイド含量の増加が示された。

通常の培養条件で増殖させたイソプロパノール耐性株の最大光合成活性は、野生株の約 50%と大幅な低下を示した。その一方で、耐性株ではイソプロパノール(10 g/L)添加 72 時間後までは、イソプロパノールを加えない場合と同程度の光合成活性を維持し、増殖速度も維持した。それに対して、野生株ではイソプロパノール添加後 72 時間後の光合成活性は 1/5 まで大きく低下し、増殖は完全に停止した。しかし、イソプロパノール添加後、暗所でインキュベートした場合

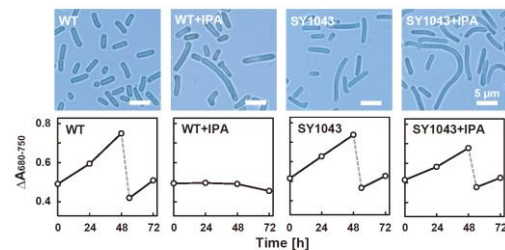


図 3-4.1 野生株とイソプロパノール耐性株の細胞形態と増殖曲線

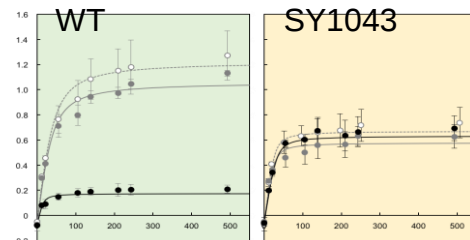


図 3-4.2 野生株とイソプロパノール耐性株の光強度-光合成活性

には、野生株においても光合成活性の低下は認められなかった。また、野生株の生体吸収スペクトルにはイソプロパノールによる影響が現れていないことから、少なくとも光合成アンテナ色素系へ与える影響は限定的であると考えられる。従って、イソプロパノール(10 g/L)は野生株においても致死的な作用を与えるのではなく、光合成反応によって変換されたエネルギーが細胞増殖には使われないことなどが示唆される。これらの解析結果は、本多グループが中心に作成した共著論文の中で報告している(Arai et al. 2017)。関連して、耐性株の酸化ストレス耐性能の解析を methyl viologen を用いて行ったところ、野生株より耐性が低いことが示された。

3. 5 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(大阪大学 福岡グループ)

(1)研究実施内容及び成果

合成代謝経路導入シアノバクテリアにおける細胞内代謝解析のためのメタボロミクス技術を開発した。シアノバクテリアを用いたバイオアルコール生産において、カルビン回路、解糖系、糖新生、ペントースリン酸回路、TCA 回路を含む中央代謝経路の理解は重要である。シアノバクテリアにおける代謝摂動の概観をとらえ、特に注目すべき代謝物を選定するため、ターゲット(目標あり)及びノンターゲット(目標なし)の代謝物プロファイリングから得られたメタボロームデータより予測モデルの構築を行った(図 3-5.1)。具体的には、高極性代謝物を網羅的に解析するために、イオンペアクロマトグラフィー条件ならびに、LC 三連四重極質量分析(LC-QqQ-MS)を用いた分析系を最適化(MRM パラメータの決定など)し、シアノバクテリアの代謝物産物の一斉分析のための実用的システムを開発した。さらに代謝物生産性能の予測モデルの構築はメタボローム情報を説明変数、代謝物生産性能を応答変数として潜在構造投影(Projection to Latent Structures; PLS)(教師あり回帰分析)により行い、注目されたメタボローム情報と標的代謝物生産能力との関係を解明した。これら代謝プロファイル解析と、メタボロミクスデータから得られる予測モデル情報を総合的に評価することにより、合成代謝経路導入シアノバクテリアの代謝解析実施のための方法論を確立した。今回開発された手法を用いてシアノバクテリア野生型株である、PCC7942 株を解析し、アセチル CoA を出発点とするアルコール生産において、ピルビン酸からアセチル CoA への経路がボトルネックとなり得るという重要な知見を得た。さらに、花井グループが作成した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を実施し、代謝律速ポイントの発見に貢献した。また、代謝物プロファイル解析や代謝動態解析に必要なメタボロームデータを得るためには、標的代謝物を正確に同定し、精密に定量する技術も開発した。加えて、実際のシアノバクテリア培養サンプルを用いて、安定したデータを得るためのシアノバクテリアのサンプル回収及び代謝産物抽出メソッドの検討も行った。また、これら代謝物プロファイル解析と平行して、炭素代謝の主要経路や当該経路の活性化状態の把握のため、より直接的且つ簡便な代謝動態の観測を目的とした安定同位体アプリケーションの開発を行った。前期成果を発展させて、安定同位体標識実験を基盤とする代謝動態解析法の一つである代謝ターンオーバー解析のための GC-QqQ-MS 及び LC-QqQ-MS を用いた同位体分配率測定システムを確立するとともに、当該システムを用いて花井グループが作成した合成代謝経路導入シアノバクテリアを解析し、代謝律速経路の特定に資する情報を提供した。

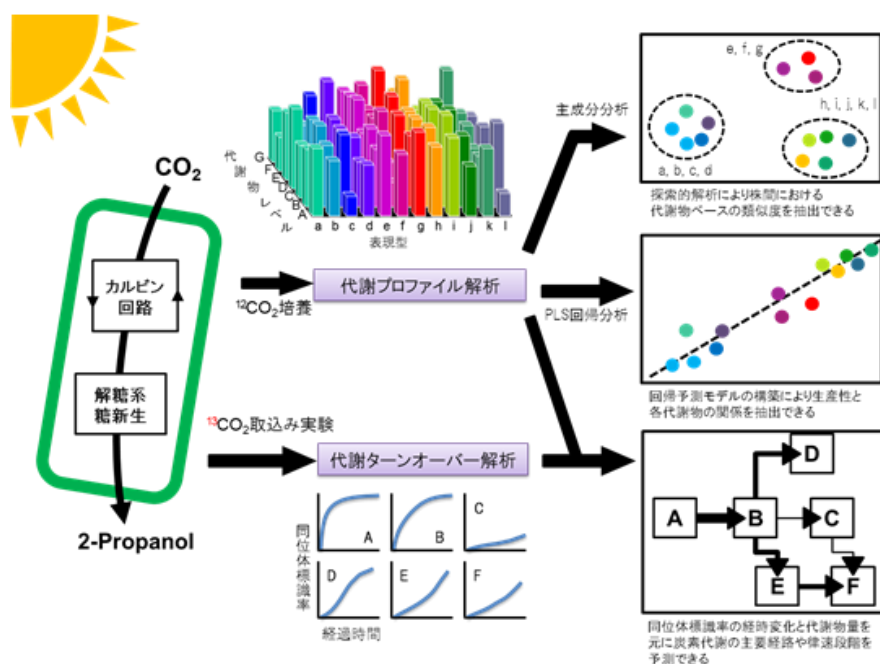


図 3-5.1 合成代謝経路導入シアノバクテリアのメタボローム解析技術

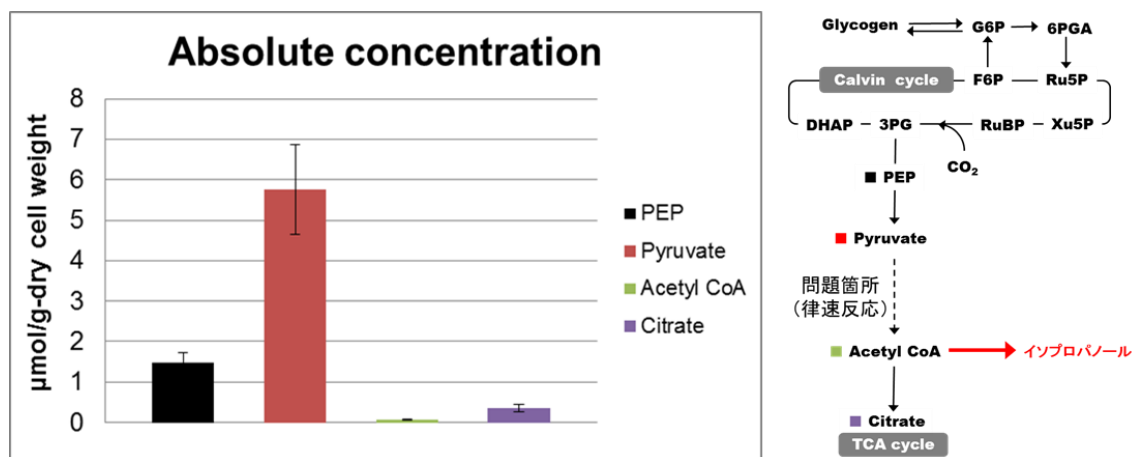


図 3-5.2 シアノバクテリアのメタボローム解析結果

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 12 件)

1. Tamami Kusakabe, Tsuneyuki Tatsuke, Keigo Tsuruno, Yasutaka Hirokawa, Shota Atsumi, James C.Liao, Taizo Hanai, “Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light”, Metabolic engineering, vol. 20, pp.101-108 (2013), doi: 10.1016/j.ymben.2013.09.007
2. Yudai Dempo, Erika Ohta, Yasumune Nakayama, Takeshi Bamba and Eiichiro Fukusaki, “Molar-Based Targeted Metabolic Profiling of Cyanobacterial Strains with Potential for Biological Production”, Metabolites, vol. 4, pp.499-516 (2014), doi: 10.3390/metabo4020499

3. Sayuri Arai, Mina Okochi, Taizo Hanai, Hiroyuki Honda, "Micro-compartmentalized cultivation of cyanobacteria for mutant screening using glass slides with highly water-repellent mark", *Biotechnology Reports*, vol. 4, pp.151-155 (2014), doi: 10.1016/j.btre.2014.10.003
4. Yasutaka Hirokawa, Iwane Suzuki, Taizo Hanai, "Optimization of isopropanol production by engineered cyanobacteria with a synthetic metabolic pathway", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 119, pp.585-590 (2015), doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.005
5. Sayuri Arai, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Taizo Hanai, Hiroyuki Honda, "A single cell culture system using lectin-conjugated magnetite nanoparticles and magnetic force to screen mutant cyanobacteria", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 113, pp.112-9 (2016), doi: 10.1002/bit.25707
6. Yasutaka Hirokawa, Yuki Maki, Tsuneyuki Tatsuke, Taizo Hanai, "Cyanobacterial production of 1,3-propanediol directly from carbon dioxide using a synthetic metabolic pathway", *Metab Eng.* Vol. 34, pp.97-103 (2016), doi: 10.1016/j.ymben.2015.12.008
7. Sayuri Arai, Kayoko Hayashihara, Yuki Kanamoto, Kazunori Shimizu, Yasutaka Hirokawa, Taizo Hanai, Akio Murakami and Hiroyuki Honda, "Alcohol-tolerant mutants of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 obtained by single-cell mutant screening system", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 114, pp.1771-1778 (2017), doi: 10.1002/bit.26307
8. 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*, vol. 123, pp.39-45 (2017), doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.07.005
9. 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*, vol. 39, pp.192-199 (2017), doi: 10.1016/j.ymben.2016.12.001
10. 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*, vol. 124, pp.54-61 (2017), doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.016
11. Yasutaka Hirokawa, Shingo Matsuo, Hiroyuki Hamada, Fumio Matsuda, Taizo Hanai, "Metabolic engineering of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for improvement of 1,3-propanediol and glycerol production based on in silico simulation of metabolic flux distribution", *Microbial cell factories*, vol. 16, pp.212-223 (2017), doi: 10.1186/s12934-017-0824-4
12. Yasutaka Hirokawa, Yu Kanesaki, Sayuri Arai, Fumiko Saruta, Kayoko Hayashihara, Akio Murakami, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda, Hirofumi Yoshikawa, Taizo Hanai, "Mutations responsible for alcohol tolerance in the mutant of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (SY1043) obtained by single-cell screening system", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press, doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.11.012

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 村上明男、電子授受反応を主導する光合成色素、*生物工学会誌*、91 巻、7 号、pp.376-380、2013
2. 鶴野圭吾・広川安孝・花井泰三、合成代謝経路を導入した大腸菌およびシアノバクテリアによるイソプロパノール生産、*日本エネルギー学会誌*、vol. 93、No. 7、pp.586-593、2014
3. 傳寶雄大、福崎英一郎、メタボロミクス技術開発と高解像度表現型解析への応用、*日本薬学会構造活性相関部会・ニュースレター* (1 October, 2016) SAR News No.31, pp1-8
4. 花井泰三、合成生物学の現状、*農業と経済*、vol. 83、pp126-127、2017

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 2 件、国際会議 2 件)

1. 村上明男(神戸大)、光合成色素が主導する光誘起電子授受反応、シンポジウム“日本から発信する、エネルギー革新省エネ型炭素固定とe-バイオの融合”、第64回日本生物工学会大会、神戸国際会議場(神戸市)、2012年10月23-26日
2. 花井泰三(九州大)、合成代謝経路と人工遺伝子回路による物質生産、合成生物シンポジウム、神戸大学統合研究拠点コンベンションホール(神戸市)、2014年10月3日
3. Yasutaka Hirokawa(九州大)、Taizo Hanai(九州大)、Engineering synthetic pathways in cyanobacteria for chemical production directly from carbon dioxide and light、iBioP、Haeundae Grand Hotel(大韓民国)、2016年12月17日
4. 本多裕之(名古屋大学)、Development of Magnetic Force-Based Cell patterning(磁力を用いた細胞パターンニング法の開発)、2017 KSBB Spring Meeting(2017年韓国生物化学工学会春季大会)、Gyeongju(慶州市大韓民国)、2017年4月6日

② 口頭発表 (国内会議 13 件、国際会議 4 件)

1. Taizo Hanai(Kyushu Univ.), Synthetic pathway for C3 or C4 alcohol production, Japan-UK meeting, Kyoto, April 12, 2013
2. 花井泰三(九州大)、合成代謝経路を導入した微生物によるアルコール生産、WSフォーラム、福岡、2013年11月28日
3. 花井泰三(九州大)、遺伝子組換え微生物を用いたイソプロパノール生産、化学工学会第45回秋季大会、岡山、2013年9月16-18日
4. 花井泰三(九州大)、イソプロパノール生産合成代謝経路による物質生産、細胞を創る会、鶴岡、2013年11月14-15日
5. 広川安孝(九州大)・日下部珠美・田附常幸・鶴野圭悟・花井泰三・James C. Liao・Shota Atsumi、合成代謝経路を導入したシアノバクテリアによるイソプロパノール生産、らん藻の分子生物学2013、木更津、2013年11月23日
6. 木立幸大(北見工大)、小西正朗(北見工大)、堀内淳一、田附常幸(九大院)、広川安孝(九大院)、花井泰三(九大院)、村上明男(神戸大院)、LED光源を用いた合成代謝経路を導入した藍藻によるバイオアルコール生産、第24回化学工学・粉体工学研究発表会(2015.1.30-31)
7. Horiuchi, Jun-ichi (Kyoto Inst. Tech.), Kumada, Yoichi (Kyoto Inst. Tech.), Konishi, Masaaki (Kitami Inst. Tech.), Hanai, Taizo (Kyushu Univ.), Hirokawa, Yasutaka (Kyushu Univ.), Murakami, Akihiko (Kobe Univ.), Isopropanol production by metabolically engineered cyanobacteria using a photobioreactor with LED irradiation, Global Strategies for Algal Biomass for Bioenergy and Biorefinery (# 407), Pacifichem 2015 (2015.12.15-20)
8. 新井小百合、清水一憲、本多裕之、(名古屋大学)、藍藻変異株スクリーニングのための磁性微粒子を用いた1細胞孤立アレイ培養技術の開発、2015年度日本生物工学会中部支部例会
9. 沢稔彦、廣川安孝、小山内 崇、小川敦司、花井泰三(九州大学)、Riboswitch制御でのシアノファージ由来 Sigma factor によるシアノバクテリアの糖代謝改変、第22回日本生物工学会九州支部宮崎大会、2015年12月5日
10. 松尾真吾(九州大学)、広川安孝(九州大学)、吉川勝徳(大阪大学)、松田史生(大阪大学)、戸谷吉博(大阪大学)、清水浩(大阪大学)、花井泰三(九州大学)、Synechococcus elongatus PCC 7942による1,3-propanediol生産性向上のための代謝フラックスバランス解析、第22回日本生物工学会九州支部宮崎大会、2015年12月5日
11. 後藤僚太、広川安孝、梅谷剛崇、田附常幸、花井泰三(九州大学)、Synechococcus elongatus PCC 7942におけるカルビンサイクルからの乳酸生産、第22回日本生物工学

会九州支部宮崎大会、2015 年 12 月 5 日

12. Yasutaka Hirokawa, Taizo Hanai, Photosynthetic chemical production by engineered cyanobacteria, YABEC、2016 年 10 月 28 日
13. Horiuchi, Jun-ichi (Kyoto Inst. Tech.), Kumada, Yoichi (Kyoto Inst. Tech.), Konishi, Masaaki (Kitami Inst. Tech.), Hanai, Taizo (Kyushu Univ.), Hirokawa, Yasutaka (Kyushu Univ.), Murakami, Akihiko (Kobe Univ.)、Biochemicals production by genetically engineered cyanobacteria using photobioreactors, AIChE2016, San Francisco, USA 2016.11.18
14. 高井 あまね, 熊田 陽一, 堀内 淳一、合成代謝経路導入シアノバクテリアを用いた D-乳酸の効率的生産、第 19 回化学工学会学生発表会、2017 年 3 月 4 日
15. 花井泰三、合成生物学と代謝工学に基づいた物質生産のための細胞設計、化学工学会第 49 回秋季大会、2017 年 9 月 22 日
16. 花井泰三、合成生物学を利用した微生物による物質生産、メタボロームシンポジウム、2017 年 11 月 14 日
17. 花井泰三、広川安孝、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、農芸化学会 大会シンポジウム、2018 年 3 月 18 日

③ ポスター発表 (国内会議 31 件、国際会議 10 件)

1. 新井小百合(名古屋大)、山本修平、大河内美奈、本多裕之(名古屋大)、藍藻変異株のスクリーニングに向けた微小液滴培養、2012 年度化学工学会秋季大会、東北大学、2012 年 9 月 12 日
2. 新井小百合(名古屋大)、大河内美奈、花井泰三、本多裕之(名古屋大)、磁性微粒子を用いた藍藻のアレイ状孤立培養技術の開発、2013 年度化学工学会秋季大会、岡山大学、2013 年 9 月 17 日
3. 木立幸大(北見工大)、小西正朗(北見工大)、堀内淳一(北見工大)、田附常幸(九州大)、広川安孝(九州大)、花井泰三(九州大)、村上明男(神戸大)、LED 光源を用いた *Synechococcus elongatus* の培養特性、第 23 回化学工学・粉体工学研究発表、北海道大学(札幌市)、2014 年 2 月 1 日
4. Yasutaka Hirokawa (Kyushu Univ.), Tamami Kusakabe (Kyushu Univ.), Tsuneyuki Tatsuke (Kyushu Univ.), Keido Tsuruno (Kyushu Univ.), Shota Atsumi, James C. Liao, Taizo Hanai (Kyushu Univ.), Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production, International conference on Algal Biomass, Biofuels, and Bioproducts, Santa Fe, NM, USA, 15-18 June, 2014
5. Ryota Kohata (Hokkaido Univ.), Yuuki Akiyama (Hokkaido Univ.), Akio Murakami (Kobe Univ.), Yuichi Fujita (Nagoya Univ.), Hisashi Ito (Hokkaido Univ.), Ayumi Tanaka (Hokkaido Univ.), Ryoichi Tanaka (Hokkaido Univ.), “Mosaic distribution of the genes encoding tetrapyrrole biosynthesizing enzymes in bacteria”, International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP 8), Istanbul, Turkey, June 22-27, 2014
6. Yudai Dempo, Erika Ohtaa, Yasumune Nakayama, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki (Osaka univ.) “Metabolic characterization of three cyanobacterial strains by molar-based metabolic profiling”, 10th International Conference of the Metabolomics Society, Tsuruoka, Japan, June 23-26, 2014
7. Rio Yamanaka (Himeji-Dokkyo Univ.), Kaoru Nakayama (Kobe Univ.), Masahiko Murakami (Nihon Univ.), Akio Murakami (Kobe Univ.), “Highly selective synthesis of cinnamyl alcohol by cyanobacteria as photobiocatalysts” Biocatalysis, Gordon Research Conference, Changing Paradigms in Catalysis, Bryant University, Smithfield, RI, USA, July 6-11, 2014
8. 広川安孝(九州大)・花井泰三(九州大)、合成代謝経路導入シアノバクテリアによる isopropanol 生産の最適化、第 66 回日本生物工学会、札幌コンベンションセンター(札幌市)、2014 年 9 月 9-11 日
9. 牧佑紀(九州大)・広川安孝(九州大)・田附常幸(九州大)・花井泰三(九州大)、合成

- 代謝経路を用いた *Synechococcus elongatus* PCC 7942 による 1,3-propanediol 生産、第 66 回日本生物工学会、札幌コンベンションセンター(札幌市)、2014 年 9 月 9-11 日
10. 新井小百合(名古屋大)、大河内美奈、花井泰三(九州大)、本多裕之(名古屋大)、レクチン修飾磁性微粒子を用いた藍藻のアレイ状孤立培養技術の開発、第 66 回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター.札幌.2014 年 9 月 9-11 日
 11. 木立幸大(北見工大)、小西正朗(北見工大)、堀内淳一(北見工大)、田附常幸(九州大)、広川安孝(九州大)、花井泰三(九州大)、村上明男(神戸大)、LED 光源を用いた遺伝子組換え *Synechococcus elongatus* の増殖特性、第 66 回生物工学会大会、札幌コンベンションセンター(札幌市)、2014 年 9 月 9-11 日
 12. 木立幸大(北見工大)、小西正朗(北見工大)、堀内淳一(北見工大)、田附常幸(九州大)、広川安孝(九州大)、花井泰三(九州大)、村上明男(神戸大)、LED 光源を用いた *Synechococcus elongatus* の培養特性、化学工学会第 46 回秋期大会、九州大学・伊都キャンパス(福岡市)、2014 年 9 月 17-19 日
 13. Sayuri Arai (Nagoya Univ.), Mina Okochi, Taizo Hanai, Hiroyuki Honda (Nagoya Univ.), Single cell culture with array format for cyanobacteria screening、名古屋大学リーディング大学院プログラム成果発表会、野依記念学術交流館、名古屋、2014 年 12 月 18 日
 14. Sayuri Arai (Nagoya Univ.), Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Taizo Hanai (Kyushu Univ.), Hiroyuki Honda (Nagoya Univ.), “A single cell culture system for cyanobacteria using magnetic force-based cell patterning”, 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, Kyoto, June 8-10, 2015
 15. Yudai Dempo, Yasumune Nakayama, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki (Osaka univ.) “Stable isotope-assisted analysis for cyanobacterial TCA cycle by integrating multiple analytical systems”, 11th International Conference of the Metabolomics Society, San Francisco, USA, June 29 – July 2, 2015
 16. 新井小百合、藍藻変異株スクリーニングのためのアレイ状孤立培養技術の開発、2015 年度生物工学会若手研究者のつどい、2015/7/11-12
 17. Yudai Dempo, Stable Isotope-Assisted Analysis for Cyanobacterial TCA Cycle by Integrating Multiple Analytical, Biological and Chemical Methods for Selective Catalysis, 2015/9/1
 18. 北村 孝章・堀内 淳一・熊田 陽一・小西 正朗・木立 幸大・広川 安孝・花井 泰三・村上 明男、LED 光源を用いた遺伝子組換え *Synechococcus elongatus* によるバイオアルコール生産、第 47 回化学工学会秋季大会、2015/9/1
 19. 傳寶 雄大、クロマトグラフィー質量分析を用いた一次代謝産物一斉分析法の検討、第 9 回メタボロームシンポジウム 2015、2015/10/1
 20. 傳寶 雄大、藍藻における TCA サイクルの動態代謝プロファイリング技術の開発、第 67 回 日本生物工学会大会、2015/10/26-28
 21. 渡部和幸・金本優紀・新井小百合・清水一憲・本多裕之・広川安孝・花井泰三・村上明男、藍藻イソプロパノール耐性株の光合成特性、第 67 回 日本生物工学会大会、2015/10/26-28
 22. 新井小百合、磁気細胞パターンニングによる孤立培養技術を用いた藍藻有用変異株のスクリーニング、第 67 回 日本生物工学会大会、2015/10/26-28
 23. 広川安孝、花井泰三、合成代謝経路導入シアノバクテリアによる光合成条件下での iso-propanol 生産、第 67 回 日本生物工学会大会、2015/10/26-28
 24. 久保武史、広川安孝、花井泰三、写調節因子 *crr37* 導入による *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の代謝流束改変、第 67 回 日本生物工学会大会、2015/10/26-28
 25. Sayuri Arai (Nagoya Univ.), Use of Lectin-Conjugated Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force to Screen Mutant, 2015 AIChE Annual Meeting, 2015/11/8-13
 26. 広川安孝、牧佑紀、久保武史、後藤僚太、花井泰三、合成代謝経路導入シアノバクテリアによる有用物質生産、藍藻の分子生物学 2015、2015/11/16

- 27.北村 孝章・堀内 淳一・熊田 陽一・花井 泰三・広川 安孝・村上 明男、エアリフトバイオリクターを用いた合成代謝経路導入シアノバクテリアによる 1,3PDO の高効率生産、化学工学会 第 81 年会、2016/3/13
- 28.北村孝章(京都工繊大院)、堀内淳一(京都工繊大院)、熊田陽一(京都工繊大院)、小西正朗(北見工大)広川安孝(九大院)、花井泰三(九大院)、村上明男(神戸大院)、LED 光源を用いた遺伝子組換え *Synechococcus elongatus* によるバイオアルコール生産、化学工学会第 47 回秋季大会、2015 年 9 月 9-11 日
- 29.Horiuchi J, Kumada Y, Hanai T, Murakami A, Konisi M, Hashi R, Kitamura T, (Kyoto Inst Tech), Bioalcohol production by metabolically engineered cyanobacteria using photobioreactor, *Metabolic Engineering* 11, 2016.6.26-30
- 30.Yasutaka Hirokawa, Taizo Hanai (Kyushu Univ), Iso-propanol production by engineered cyanobacteria, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Metabolic Engineering* 11, 2016.6.26-30
- 31.端 瞭太, 堀内 淳一, 熊田 陽一, 広川 安孝, 花井 泰三, 村上 明男、固定化フォトバイオリクターを用いた遺伝子組換えシアノバクテリアによる 1,3 プロパンジオールの効率的生産、化学工学会 第 48 回秋季大会、2016/9/7
- 32.北村 孝章, 堀内 淳一, 熊田 陽一, 広川 安孝, 花井 泰三, 村上 明男、遺伝子組換えシアノバクテリアを用いたエアリフト型バイオリクターによる 1,3PDO の連続生産、化学工学会 第 48 回秋季大会、2016/9/7
- 33.端 瞭太, 堀内 淳一, 熊田 陽一, 広川 安孝, 花井 泰三, 村上 明男、固定化フォトバイオリクターを用いた合成代謝経路導入シアノバクテリアによる 1,3 プロパンジオールの効率的生産、第 68 回日本生物工学会大会、2016/9/30
- 34.林原加代子・広川安孝・花井泰三・村上明男、藍藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 代謝改変株の増殖特性と光合成特性、第 68 回生物工学会大会、2016/9/28-30
- 35.端瞭太・堀内淳一・熊田陽一・広川安孝・花井泰三・村上明男、固定化フォトバイオリクターを用いた合成代謝経路導入シアノバクテリアによる 1,3 プロパンジオール生産、第 68 回生物工学会大会、2016/9/28-30
- 36.広川 安孝, 牧 佑紀, 花井 泰三、プロモーター変更による合成代謝経路導入シアノバクテリアの 1,3-propanediol 生産性向上、第 68 回生物工学会大会、2016/9/28-30
- 37.山下 泰一, 広川 安孝, 花井 泰三、合成代謝経路を導入した *Synechocystis* sp. PCC 6803 による isopropanol 生産、第 68 回生物工学会大会、2016/9/28-30
- 38.Arai, S., Shimizu, K., Okochi, M., Hanai, T., Honda, H (Nagoya Univ), Screening of Valuable Cyanobacteria Mutants Using Magnetic Force-Based Cell patterning, IBS2016, 2016.10.7-10
- 39.傳寶 雄大, 福崎英一郎、ワイドターゲットメタボロミクスに資する同位体希釈定量法の開発、第 10 回メタボロームシンポジウム 2016、2016/10/19
- 40.端 瞭太, 堀内 淳一, 熊田 陽一, 広川 安孝, 花井 泰三, 村上 明男、フォトバイオリクターを用いた遺伝子組換えシアノバクテリアによる 1,3 プロパンジオールの高効率、化学工学会 第 82 年会、2017/3/7
- 41.岡本 諒太、広川 安孝、ATP 消費系の導入による *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の代謝改変、第 68 回生物工学会大会、2017/9/11-14

(4)受賞・報道等

①受賞

- RSC Integrative Biology Poster Award
(Sayuri Arai, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Taizo Hanai, Hiroyuki Honda, “A single cell culture system for cyanobacteria using magnetic force-based cell patterning”, 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, Kyoto, June 8-10, 2015)
- 日本生物工学会中部支部 支部長賞, 新井小百合, “藍藻変異株スクリーニングのため

の磁性微粒子を用いた 1 細胞孤立アレイ培養技術の開発”, 2015 年度日本生物工学会中部支部例会, 名古屋, 2015 年 9 月

- Annual Research Award, 新井小百合, 名古屋大学博士課程教育リーディングプログラム, 名古屋, 2017 年 1 月
- 平成 27 年度日本生物工学会功績賞(福崎英一郎)

(5)成果展開事例

①実用化に向けての展開

本 CREST と関与は少ないが、NEDO プロジェクト「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」研究開発項目③「高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」の一部として、「シアノバクテリアによる物質生産に関する代謝および生産条件に関する知識ベースの構築」のテーマが H29-32 の期間で採択され、シアノバクテリアによる物質生産の文献情報のデータベース化とそのデータの確認作業を実験により行う内容の研究を行っている。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 25 年 2 月 6-7 日	理科特別授業	淡路市立岩屋中学校	35人	中学 3 年生を対象に藻類の光合成について講義した(村上グループ)
平成 26 年 1 月 14 日	理科特別授業	淡路市立岩屋中学校	35人	中学3年生を対象に藻類の光合成について講義した(村上グループ)
平成 26 年 5 月 13 日	海産藻類の ワークショップ	神戸大学・内海環境教育研究センター	12人	藻場観察・採集・標本製作・同定

§ 6 最後に

研究目標などから見た達成度および得られた成果の意義等の自己評価

当初の研究目的は、シアノバクテリア内に合成代謝経路を構築し、細胞内のアセチル CoA を利用した物質生産を行う予定であった。当初より、アセチル CoA を利用するイソプロパノール生産を計画しており、生産は早期に成功したが、生産量は期待したレベルではなかった。生産量を上げるために、様々な努力を行い、生産量を当初の 11 倍に増加させることができたが、シアノバクテリアの物質生産の一つの目標値である 1 g/L には未だ届いておらず、この部分に関してはさらなる改良が必要であると考えている。しかしながら、研究開始直後から、領域代表からの提案で、細胞内のアセチル CoA にこだわらない物質生産を模索したところ、カルビン回路の構成要素である DHAP から二つの物質は 1 g/L、グリセロールは 3 g/L の生産量を達成することができたのは、非常に意義深く、大変満足できる結果となった。

今後の研究の展開

ATP や NADPH のバランスが、細胞代謝に与える影響が大きいこと明らかになったことや、シアノファージや調節因子の影響も明らかになったので、今後は現在までの知見を統合化し、さらなる生産量の向上を目指したい。また、特に、明・暗条件における遺伝子発現制御、代謝制御に関する知見を統合的に理解する研究が必要である。

代表者としてのプロジェクト運営について

5 年というプロジェクトは、一つの大きな問題を解決するためには短い、非常に長いと感じた。プロジェクト開始時には、シアノバクテリアによる二酸化炭素からの物質生産のテーマは、とても新しく、不明なことも多かったが、世界中で研究が進められ、多くのことが明らかになった。また、我々の研究を進める上で、当初では予想できないようなことも明らかになった。本プロジェクトでは、チームの構成員に恵まれた。チームは大変よい雰囲気、各構成員は相互に連携して研究を進めることができた。チームの構成員は、それぞれ当初計画していた研究を進めるだけでなく、このように変化の大きな状況にみんなが柔軟に対応し、ここまでの結果を得ることができた。研究費は、研究を重点的に進めるために、当初の計画通り、適切に、物品費と人件費に多く使用した。

その他

シアノバクテリアによる物質生産に関して、ある程度の知見を得られたと思う反面、さらに不明なことが、明らかにしたい様々な事項が現れた。今回のプロジェクトでは、世界的な結果と比較して、遜色ない結果が得られたが、今後もこの分野で世界と勝負ができるよう、努力を続けていきたい。