

「二酸化炭素排出抑制に資する革新的技術の創出」
平成21年度採択研究代表者

近藤 昭彦

神戸大学大学院工学研究科・教授

海洋性藻類からのバイオエタノール生産技術の開発

§ 1. 研究実施の概要

1. 研究のねらい

食用として商業生産されているスピルリナ *Spirulina platensis* およびその海産種 *Spirulina subsalsa* に加え、微細藻の一種である高耐塩性シネココッカス属種, *Synechococcus* sp. WH8102 株を対象として、海水を用いた半閉鎖系培養施設での大量培養系の確立を目指す。また、システムバイオロジーに基づく改変微細藻の創出を達成するため、当該株における安定した形質転換技術確立するとともに、光合成機能(①光捕集能、②光エネルギーから化学エネルギー(ATP)への変換能、③物質代謝能)や耐塩機構を強化することで、環境変化に適応できるロバストな性質を持ち、増殖速度と CO₂ 固定速度が速く、かつバイオプロダクト高生産能を有する新規微細藻を創製することを目的とする。さらに、細胞表層工学技術を利用して、微細藻デンプン分解酵素を細胞表層に提示したアーミング酵母を作出し、アーミング酵母を用いた藻類デンプンからの糖化・発酵プロセスを確立することにより、高収率かつ低コストなエタノール生産システムを構築することを目的とする。

2. 研究の概要と進捗状況

本年度は、スピルリナの培養における至的条件を検討し、低融点アガロース封入法を用いて、*S. subsalsa* は、塩濃度 35%、光強度 30 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ で最も良く成長することが明らかにした。常温常圧プラズマ(ARTP)の電気と工学特性について研究し、藻類の照射に適するガス組成とそのプラズマ特性を明らかにし、ARTP 操作条件の検討を行った。また、微細藻に含まれる代謝中間物質を網羅的に解析するシステムを構築し、代謝プロファイリングを実施するとともに、¹³C を用いた代謝ターンオーバーの定量化システムの構築に着手した。また、ゲノム情報が明らかな *Synechocystis* sp. PCC6803 を対象に、光合成を含む中枢代謝経路、アミノ酸合成経路、核酸合成経路など 455 の代謝物質と 521 反応を持つ代謝モデルを構築した。¹³C ラベル基質を用いた代謝フラックス解析の文献値との対応を解析したところ、今回構成したモデルによるシミュレーション結果は、データが存在

する従属栄養増殖条件と混合栄養増殖条件の 2 条件において、実験的に得られたフラックスと比較的良好な相関を示すことが見出された。また、代謝経路へ余剰の ATP を生み出すための ATP 産出系遺伝子の強化・制御に着手した。また、ラン藻のフィコビリゾーム内エネルギー移動、フィコビリソーム・クロロフィル間エネルギー移動、クロロフィル間エネルギー移動を測定し、*S. subsalsa* は緑色光を捕集するのに優れている等の結果を得た。

§ 2. 研究実施体制

(1)「近藤昭彦」グループ

① 研究分担グループ長: 近藤 昭彦 (神戸大学、教授)

② 研究項目

- ・藻類のシステムバイオロジー解析
- ・微細藻類からの効率的バイオエタノール生産

(2)「清水浩」グループ

① 研究分担グループ長: 清水 浩 (大阪大学、教授)

② 研究項目

- ・藻類のシステムバイオロジー解析と代謝モデリング

(3)「邢新会」グループ

① 研究分担グループ長: 邢 新会 (清華大学、教授)

② 研究項目

- ・有用微細藻選抜に資する微細藻類新規ゲノム改変技術の開発

(4)「川井浩史」グループ

① 研究分担グループ長: 川井 浩史 (神戸大学、教授)

② 研究項目

- ・海水環境における高増殖・高密度培養の技術開発
- ・形質転換技術の開発

(5)「三宅親弘」グループ

① 研究分担グループ長: 三宅 親弘 (神戸大学、准教授)

② 研究項目

- ・酸素への電子伝達反応の制御
- ・光化学系 I での循環的電子伝達反応の制御

(6)「秋本誠志」グループ

①研究分担グループ長:秋本 誠志 (神戸大学、准教授)

②研究項目

・微細藻の光エネルギー捕集機能の評価と強化

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) 近藤グループ(神戸大学)

研究の目的・方法

微細藻に含まれる代謝中間物質を網羅的に解析するシステムを構築し、野生株、変異バンク株、遺伝子組換え株を代謝レベルでプロファイリングするとともに、安定同位体炭素 ^{13}C を用いて代謝中間体を ^{13}C 標識することにより代謝ターンオーバーを実測することにより、物質生産を律速する代謝反応の特定を目指す。本年度は、微細藻中の水溶性代謝中間物質(糖、糖リン酸、有機酸、アミノ酸等)の存在量を網羅的に解析するシステムを構築するとともに、安定同位体である ^{13}C を用いて細胞内代謝物質を ^{13}C 標識する手法を確立し、 ^{13}C 標識率の経時測定により代謝ターンオーバーを定量化するシステムの構築を目指す。

また、微細藻が産生した多糖類(デンプンなど)からのエタノール生産技術の開発を目標とし、微細藻製デンプンの分解に最適な酵素を選出し、当該酵素を酵母細胞表層に提示発現させることにより、糖化同時発酵によるバイオエタノール生産システムの確立を目指す。本年度はスピルリナ藻ならびに *Synechococcus* 属藻が産生するデンプンの構造を分析し、候補酵素のリストアップに着手する。

本年度の研究結果・進捗状況

「藻類のシステムバイオロジー解析」

S. platensis の代謝中間物質をガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析計(GC-TOF/MS)を用いて網羅的に解析した結果、210 ピークの検出に成功し、検出されたピークのうち計 34 種類の代謝中間物質を同定、定量することができた。 ^{13}C を用いた代謝ターンオーバーの定量化システムの構築に着手した。

(2) 清水グループ(大阪大学)

海洋藻類の有用物質生産宿主としての性能を高度化するためには「オミクスを高度に活用した合理的生産プロセスの探索」が必要である。ゲノムや細胞内の代謝物質の量の情報などをもとに現状の細胞の特徴を把握するとともに、変化を与えることによってそのような改変が行えるかを予測し、また、実際に改変を行った結果を予測と照らし合わせることで、現状の細胞の状態を捉え直し、さらなる改良を加えるための基盤とすることが望まれる。本研究においては、例えば、微細藻の

CO₂ 固定能を変化させるなどといった遺伝子ネットワークに変動を与えた際に、どのように代謝が変化し、有用物質生産能が変化するかを予測するシステムと実際にどのように変化したのかを評価するシステムの構築を目指すこととする。これらのシンセティックバイオエンジニアリングを用いて有用物質生産の能力を飛躍的に高める株を構築することを目的とする。

本年度においては、ゲノムが明らかにされている微細藻である *Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノム情報を基盤として、このモデルに基づき光量や CO₂ 濃度などのさまざまな外的環境や遺伝子を改変した際にどのように代謝変動が起こるかを予測するプラットフォームを構築することを目的としてゲノムスケール代謝モデルの構築を行った。光合成を含む中枢代謝経路、アミノ酸合成経路、核酸合成経路などを含む 455 の代謝物質と 521 反応を持つ代謝モデルを構築した。このゲノムスケール代謝モデルを用いた代謝シミュレーションの結果を検証するために、¹³C ラベル基質を用いた代謝フラックス解析の文献値との対応を解析した。その結果、今回構成したモデルによるシミュレーション結果は、データが存在する従属栄養増殖条件(グルコースを炭素源とする条件)と混合栄養増殖条件(光合成による CO₂ 固定とグルコースの双方を炭素源とする条件)の2条件において、実験的に得られたフラックスと比較的良好な相関を示すことが見出された。今後は、代謝モデルや菌体合成反応のさらなる詳細化によって、環境変動や遺伝子操作による代謝変動について、シミュレーションによる予測精度の向上を目指す。また、微細藻の代謝フラックス変動評価系の構築を目指し、基本的な培養操作について検討を行った。光バイオリアクターのセットアップを行っているところである。

(3) 邢グループ(清華大学)

本研究の目的は新規ゲノム改変装置—常圧常温プラズマ(ARTP)を用いて微細藻類新規ゲノム改変技術を開発することである。本年度はまず ARTP の物理特性と作用パターンを調べるために以下の研究を行った。

1) アルゴン(Ar)ガスを使った ARTP の特性

この部分の研究では、多くの ARTP 操作条件下で Ar I 695.5 nm線の発射強度の空間分布について調べた。操作条件として、アルゴンガスの流速とラジオ周波数(RF)電源の出力の変化、個体保護シリンダーと底板の有無の影響である。実験の結果によると、アルゴンガスの流速とラジオ周波数(RF)電源の出力を増加すれば、Ar 線の発射強度も増加した。同じように個体保護シリンダーもプラズマにかなりな影響を与えた。個体保護シリンダーは外部空気の進入を防止でき、他の操作条件が同じ場合、Ar 線の発射強度を高める効果があった。これらの条件は実際の微藻類のゲノム変異を行う際に重要な参考となっている。

2) ヘリウム(He)ガスを使った ARTP のモデル解析

ARTP を実際の微生物変異に用いるときに、プラズマの強度分布や影響因子をモデルでシミュレーションすることが必要である。この部分の研究では、プラズマの発生に係る各種のイオン、電子、分子などを含んだ一次元数学モデルを作成した。モデル式は質量転換方程式、エレクトロンエネルギーの転換方程式、ポテンシャル方程式などから構成した。この一次元数学モデルは ARTP 装

置の電圧と電流密度の変化をよく表現できた。また、ARTP の電荷密度、平均電子温度、電子とイオンの分布を正しく描いた。

3) ARTP による *Spirulina platensis* の処理方法の確立

ARTP を用いて、スピルリナを変異するために、操作条件を確立する必要がある。この部分の研究では、*S. platensis* を He ガスと He-O₂ ガスを使った ARTP で処理する条件を検討した。He ガスを使った ARTP で処理した場合、*S. platensis* は 5 秒以上の処理で螺旋構造が切れて短くなったが、生存率が 20 秒まで 60% 以上保たれ、60 秒の処理で 20% 以下となった。He-O₂ ガスを使った ARTP はプラズマを放出する時にオゾンも発生し、He ガスを使った ARTP で処理したものより同じ処理時間で細胞の生存率が低下した。この結果から、ARTP の操作条件を変化することによって、*Spirulina platensis* の形態と生存率が大きく影響され、次年度の変異体の選抜を行う研究に重要な基礎となっている。

(4) 川井グループ(神戸大学)

「海水環境における高増殖・高密度培養の技術開発および形質転換技術の開発」

研究対象種の1つである海産種 *Spirulina subsalsa* の系統的位置を 16S rRNA を遺伝子マーカーとして解析した。その結果、*S. subsalsa* は、密ならせん形状を示し、海水程度の塩分環境に生育する種が属するクレードに含まれ、真の *Spirulina* 属の種であることが明らかとなった。*S. subsalsa* は、基物に付着して生育する特性を持つことから、サスペンションカルチャーに対する吸光測定法を用いた growth rate の取得が困難である。この問題を解決するため、低融点アガロース(ゲル化温度: 8–17°C) 中に封入・培養し、継続的に生物量を測定する方法を確立し、この方法を用いて、*S. subsalsa* の至適塩濃度および光強度の検証をおこなった。その結果 *S. subsalsa* は、塩濃度 35%、光強度 30 μmol S⁻¹ m⁻² で最も良く成長することが明らかとなった。一方、*S. subsalsa* の無菌化を試みたが、本株は無菌化により、その成長が著しく低下することから、その成長に混生する細菌が形成する生理活性物質の関与が強く示唆された。成長促進に関与する細菌および生理活性物質の同定を目的に、現在まで、DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法を用いて数種の細菌の同定を完了した。*Spirulina* の高増殖・高密度培養系の確立をめざし、培養環境の整備を行い、さらにエアレーション・震盪・攪拌法による予備実験を開始した。また、*S. subsalsa* の光合成関連遺伝子情報を取得するため、EST データ解析を実施した。また、*Spirulina platensis* の大量培養を行い、近藤グループ、秋本グループの解析に提供したほか、単細胞シアノ細菌の *Synechococcus*、*Synechocystis* の全ゲノム解析株を入手し、培養を行い、秋本チームの解析に提供した。

(5) 三宅グループ(神戸大学)

研究の目的

物質生産増強を目的とした代謝経路改変において、エネルギーのトレード・オフを制御することを目的とする。具体的には、炭素代謝での物質変換に関わるエネルギー化合物 ATP の供給能の増

強を目標とする。そこでは、光合成生物の生命維持(成長維持)に要求される ATP 量の確保を保証し、物質生産のための代謝経路への余剰の ATP を生み出すための ATP 産出系の強化・制御を行う。

本年度の研究実施項目

ATP 供給機能をもつオルタナティブ・エレクトロン・フローである The Water-Water Cycle (WWC)とチラコイド膜光化学系 I 循環的電子伝達反応(CEF-PSI)の制御を目的に、その強化を目標とした発現量調節を行う。本研究では、分子生物学的手法による、WWC および CEF-PSI 律速遺伝子の目的藻類への導入発現、そして生理学的手法を用いた形質転換体の評価、さらに物理化学的手法を用いた律速因子の活性発現メカニズムの解析を主な手法とする。

1) 酸素への電子伝達反応の制御: *Synechocystis* PCC 6803 株より、NADH-O₂ oxidoreductase (NOR)をコードする遺伝子のクローニングに着手した。

2) 光化学系Iでの循環的電子伝達反応(CEF-PSI)の制御: *Synechocystis* PCC 6803株より、フェレドキシンをコードする遺伝子のクローニング

(6) 秋本グループ(神戸大学)

微細藻をパルスレーザーで光励起した後、微細藻の光化学系を構成する各色素から発せられる蛍光の強度変化を時間の関数として観測することにより、エネルギー移動・電子移動などの光合成初期過程について検討を行い、大量培養に向けての問題点を明らかにし、改善を試みることを目的とする。

本年度は、藍藻 *Spirulina platensis*、藍藻 *Spirulina subsalsa*、藍藻 *Synechococcus* sp.

PCC7942、藍藻 *Synechococcus* sp. PCC73109、藍藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 について、フィコビリゾーム内エネルギー移動、フィコビルン・クロロフィル間エネルギー移動、クロロフィル間エネルギー移動を測定した。*S. subsalsa* は緑色光を捕集するのに優れているなど、各藍藻を特徴付ける結果が得られた。現在、各エネルギー移動過程の解析を行い、詳細について検討中である。

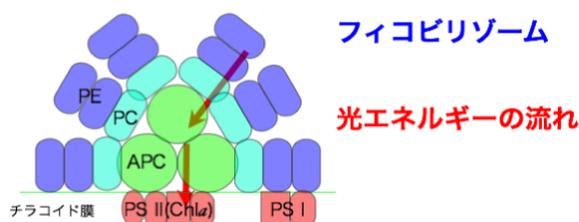


図1 藍藻が持つ集光性アンテナ装置、フィコビリゾーム。フィコビリゾームにより集められたエネルギーは、チラコイド膜内にあるクロロフィルを経由し、反応中心へと移動する。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Guo Li, Pei-Si Le, He-Ping Li, Cheng-Yu Bao, Effects of the shielding cylinder and substrate on the characteristics of an argon radio-frequency atmospheric glow discharge plasma jet, Submitted to Journal of Applied Physics (in Revision)

2. He-Ping Li, Li-Yan Wang, GuoLi, Pei-Si Le, Hong-Xin Zhao, Xin-Hui Xing, Cheng-Yu Bao, Manipulation of lipase activity by the helium radio-frequency atmospheric-pressure glow discharge plasma jet. *Plasma Processed and Polymers*, in reviewing
3. Li-Yan Wang, Hong-Xin Zhao, Guo Li, Xin-Hui Xing, He-Ping Li and Cheng-Yu Bao. Atmospheric-pressure, glow discharge plasma jet can create diverse breakage points of mononucleotides and oligonucleotides. *APL*, In submission (2010)
4. Yuan Lu, Liyan Wang, Kun Ma, Guo Li, Chong Zhang, Hongxin Zhao, Qiheng Lai, He-Ping Li and Xin-Hui Xing, Use of an atmospheric-pressure low-temperature plasma for mutagenesis of *Enterobacter aerogenes* to enhance hydrogen production. *JAM.*, In reviewing