

「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22年度採択研究代表者

H23 年度
実績報告

早出 広司

東京農工大学大学院工学研究院 教授

シアノファクトリの開発

§1. 研究実施体制

(1) 農工大グループ(研究機関別)

- ① 研究代表者: 早出 広司 (東京農工大学大学院工学研究院・生命機能科学部門・教授)
- ② 研究項目
 - ・シアノファクトリの開発

§ 2. 研究実施内容

I. 合成情報伝達系が組み込まれた海洋合成シアノバクテリアホストの開発

【制御用リボレギュレータ・リボスイッチの開発】

大腸菌で広く用いられているリボソーム結合部位が *Synechocystis* sp. PCC6803 で翻訳能が低いことから、シアノバクテリア用のリボソーム結合部位を利用したリボレギュレータの開発を行った。利用したリボレギュレータは大腸菌内でも機能することから、リボレギュレータは大腸菌内での動作を指標にデザイン・改良を行った。

更にデザインしたリボレギュレータを用いることで、海洋シアノバクテリア培養の制御に用いる凝集因子 Antigen43 の発現を厳密に制御することができた (Fig. 1)。また、細胞溶菌酵素系である Holin および

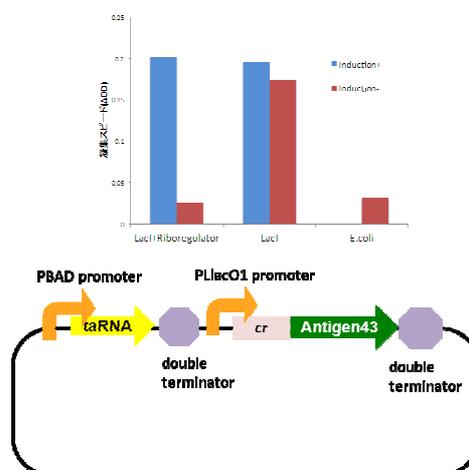


Fig. 1 Riboregulator による凝集制御

Endolysin についても、同様に厳密な発現制御が可能であった。さらに、設計したリボレギュレータ・リボスイッチが海洋シアノバクテリアの培養温度である 30℃でも正しく機能することが確認された。

現在、海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp.、*Synechocystis* sp.において、転写制御が行われているフィコシアニンなどのプロモータ下流下にリボスイッチを配置させ、かつ緑色蛍光蛋白質をモデル翻訳産物としてその翻訳開始領域にリボレギュレータを導入することで、同翻訳産物の発現制御が行えることを指標にその開発を進めている。すでにリボレギュレータによる翻訳抑制が *Synechocystis* sp. PCC6803 でも機能することを確認した。今後は抑制された mRNA の翻訳活性化に関して検討する。

【緑色光センシングによる自動凝集・溶菌プロセスの開発】

Synechocystis sp.由来の緑色光センシングドメインをクローニングし、その配列を決定した。

現在、緑色光センサの性能を評価するために、転写産物として緑色蛍光蛋白質を用いた検証に着手している。また、自動凝集・溶菌に用いる Antigen43、Holin および Endolysin については、これらを海洋シアノバクテリア内に導入し、その発現と活性について検証する予定である。

【青色光センサ蛋白質を用いる情報伝達系の構築】

シアノバクテリアを含む原核生物において青色光を刺激として転写を制御するセンサ系を候補として、シアノバクテリアにおいて機能する青色光センサキメラ蛋白質の構築に着手した。具合的には、*Bacillus subtilis* 由来 YtvA の LOVドメインと *Bradyrhizobium japonicum* 由来 FixL のヒスチジンキナーゼドメインとの間でキメラ蛋白質を構築し、その挙動について大腸菌で検証を行った。現在、キメラ蛋白質のバリエーションを増やすとともに、海洋シアノバクテリアへの導入・検証を目指して作業に着手している。

II. バイオ燃料関連化合物生産用の合成オペロンの開発

【合成オペロンの設計および発現ベクターの構築】

PHB をモデルバイオ燃料関連化合物とし、PHB 生産菌である *Cupriavidus* 属、及び *Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノム情報より β -ketothiolase, Acetoacetyl-CoA-reductase, PHB synthase 遺伝子を抽出し、合成オペロンの設計・構築を行った。また、近年明らかにされたシアノバクテリア由来の炭化水素合成関連酵素である Acyl-ACP Reductase および Aldehyde Decarbonylase の遺伝子について、*Synechococcus elongatus* PCC7942 の遺伝子データを元に設計・合成を行い、PHB 合成オペロンと同様に、アルカン合成オペロンを構築した。これらの合成オペロンをシアノバクテリア内で複製が確認されている pKT230、及び高コピープラスミド X に導入し、PHB 及びアルカン合成関連酵素の発現ベクター構築を完了した。

【海洋シアノバクテリア多重遺伝子導入法の開発】

ホスト株として、*Synechocystis* sp. PCC6803、*Synechococcus* sp. PCC 7002、及 3 %の NaCl を含む BG-11 培地で生育が良好な農工大株 (*Synechococcus* sp. NKBG 15041c 株) を選択した。NKBG 15041c 株においては、エレクトロポレーション法による遺伝子導入条件の検討、及び抗生物質濃度等の培養条件を検討し、10kb 以上のプラスミドベクターを導入できる条件を確立した。

【炭化水素合成シアノバクテリアのゲノム解析】

東京農工大学保有のカルチャーコレクション(海洋シアノバクテリア)に対して炭化水素生産能を評価した。NKBG 042902 株、NKBG 1222 株、NKBG 031401 株から Heptadecane、また NKBG 15041c 株から 1,15 Hexadecadiene および 1-Nonadecene の生産が確認された。

これらの株のうち特徴的な炭化水素生産能を示した NKBG 15041c 株について、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析、ORF 同定、遺伝子予測を行った。

ドラフトシーケンスデータより NKBG 15041c 株のゲノム長が約 3.2 Mbp、また 3224 個の ORF が同定された。さらにアルカン生産能を示さない *Synechococcus* sp. PCC7002、及び他の近縁種との比較ゲノム解析により NKBG 15041c 株に特徴的な炭化水素生産に関連する酵素群の探索を行っている。

Ⅲ. バイオ燃料関連化合物高効率抽出用イオン液体プロセスの開発

【PHB 抽出用イオン液体プロセスの開発】

Synechocystis sp. PCC6803 をモデルとして、含塩湿潤状態の藻体を穏和な条件下で溶解することのできるイオン液体を探索した。その結果、アルキルイミダゾリウムリン酸誘導体を用いた時に、藻体が常温で速やかに溶解することが明らかとなり、同誘導体为本目的において優れた溶媒であることが確認された。さらに、上記イオン液体中に溶解した藻体成分と PHB の混合物に貧溶媒を添加することで、PHB を選択的に回収することにも成功した(回収率 97%)。

現在、イオン液体の構造最適化を進めるとともに、予備実験の結果を踏まえ、イオン液体中からの PHB 回収とイオン液体のリサイクルを高効率に行うプロセスの構築を目指している。