

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

H25 年度 実績報告
----------------

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. 研究実施体制

### (1) 「近藤昭彦」グループ

①研究代表者:近藤 昭彦(神戸大学大学院工学研究科, 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主たる共同研究者:清水 浩(大阪大学大学院情報科学研究科, 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主たる共同研究者:邢 新会(清華大学化工系, 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主たる共同研究者:川井 浩史(神戸大学自然科学先端融合研究環, 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主たる共同研究者:三宅 親弘(神戸大学大学院農学研究科, 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主たる共同研究者:秋本 誠志(神戸大学自然科学系先端融合研究環, 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

**(7) 「張嘉修」グループ**

①主たる共同研究者:張 嘉修(成功大学大学院化学工学専攻, 教授)

②研究項目

- ・高炭水化物生産能を有する微細藻種の単離と大量培養法の確立

## §2. 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 *Arthrospira (Spirulina) platensis* およびその海産種 *Spirulina subsalsa* に加え, *Synechococcus* sp. WH8102 株等のラン藻を対象として, 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に安定した形質転換技術を確認するとともに, 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 CO<sub>2</sub> 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, 今後の見通し

*A. platensis* NIES-39 の低コストな培養技術の開発を目指し, 温室内に設置した培養コンテナで, 太陽光照明により *A. platensis* NIES-39 を培養し, 海水を含む培地・改変 SOT 培地などの培養液, および偏光フィルターを用いた光質の改変が *A. platensis* の細胞増殖に与える影響を検討した. その結果, 希釈 SOT 培地および偏光フィルターを用いても, 通常条件と同等あるいはより高いバイオマス量が得られることが明らかになった. また, 培養空間を効率的に利用するために, *A. platensis* と異なる光波長帯を利用する *S. subsalsa* の特徴を生かした, *A. platensis*・*S. subsalsa* の重層(二層)培養法の検討を行った. その結果, *A. platensis* 培養液を透過した光で *S. subsalsa* を培養できることが明らかになった.

代謝状態を評価するシステムの開発に向け, これまでに構築した代謝フラックス解析手法を用い, トランスクリプトーム解析, メタボローム解析を統合した微細藻類のシステムバイオロジー解析を行った. *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を用い, グルコースを培地に添加した混合栄養条件と, グルコースを添加し光合成阻害剤により光合成を阻害した光従属栄養条件で培養し, <sup>13</sup>C 標識グルコースを用いた代謝フラックス解析, DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析, キャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)を用いたメタボローム解析を行った. 両条件間の代謝フラックスの変化は遺伝子発現レベルより転写後の制御の影響が大きいことが示唆された.

常温常圧プラズマ(ARTP)法による新規ゲノム迅速変異導入技術については, ARTP の発

生特性を数値的にモデルシミュレーションし、プラズマのエネルギー転移メカニズムを解析した。また H25 年度までに作出した代表的スピルリナ変異株の炭酸ガス通気培養と人工海水の影響を調べた。さらに ARTP による海水耐塩性変異体の創出とハイスループットスクリーニングを確立し、耐塩性の持つスピルリナの変異株バンクの構築を試みた。

光合成機能の強化に関しては、ATP 生産系の強化・制御に関わる Alternative electron flow (AEF: 光呼吸, Water-water cycle など) の機能解明を行った。本年度は O<sub>2</sub> 収支とクロロフィル蛍光収率を同時に解析することにより AFM の機能解明を目指した。その結果、O<sub>2</sub> 発生が抑制されている条件下において *Synechocystis* sp. PCC 6803 では、光合成活性を保証できるほど大きな電子伝達活性をもつ AEF が機能していることを明らかになった。

ラン藻の集光機能の強化をめざし、ラン藻 *A. platensis* を異なる光質・光量の単色 LED 下で培養し、「培養光の波長」-「バイオマス量」-「励起エネルギー移動過程」の相関を解析するとともに、海水で培養する際の光捕集・励起エネルギー移動について解析し、電子伝達過程における問題点を検討した。また、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 を標準培地、海水培地、およびそれらの変成培地で培養し、培地に含まれるイオンとラン藻におけるエネルギー移動過程の相関について解析した。また、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 に異なる光質の強光 LED を照射し、過剰な光エネルギーを失活させる機構の解明を行った。今後は、上記の光条件、培地条件に加えて、新たに培地中に含まれる CO<sub>2</sub> 濃度を関数として加え、CO<sub>2</sub> 濃度がラン藻の光捕集、励起エネルギー移動、電子伝達過程に与える影響を検討する。

微細藻からの高効率なバイオエタノール生産を実現するために、ラン藻由来グリコーゲンを糖化可能なアミラーゼを生産する遺伝子組換え酵母の開発を行ってきた。本年度はエタノール生産速度・生産量の向上を目指し、高活性型のアミラーゼ遺伝子発現酵母を新たに作出した。その結果、スピルリナを糖質源とした、エタノール生産量を 1.3 倍向上させることに成功した。今後は本改良株を用いてエタノール生産プロセスの開発を進める。また、本年度はラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 のグリコーゲン生産能を最大化させるため、光強度、CO<sub>2</sub> 濃度、硝酸投与量などの培養条件の最適化を行った。その結果、*Synechococcus* sp. PCC 7002 はこれまでに報告されている藻類によるグリコーゲン生産量・生産速度の最大値を示した。従って、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 は海水を利用し、糖質源を供給できるバイオマスとして期待できる。今後は *A. platensis* に加え、*Synechococcus* sp. PCC7002 を炭素源としたエタノール生産プロセスも開発する。

また、エタノール生産用の炭水化物の供給量を強化することを目的として台湾での新規藻株の単離を行った。また当該株を用いたバイオエタノール生産技術を開発した。本年度は

*Scenedesmus obliquua* CNW-N の初期植菌量が炭水化物生産速度に及ぼす影響を調べ、植菌量の最適化により炭水化物生産量を従来比で 1.7 倍向上させることに成功した。次に、*S. obliquua* CNW-N の糖化条件を検討し、*S. obliquua* CNW-N の加水分解物から理論収率の 98%でエタノールを生産することに成功した。今後は培養環境や培養法、培養装置などを最適化し、単離した藻種に適した半閉鎖系フォトバイオリアクターによる屋外培養法を開発する。また、糖化後発酵によるエタノール生産プロセスによりエタノール生産を行い、上記培養法によるバイオエタノール生産性を評価する。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### 論文詳細情報(国内)

なし

##### 論文詳細情報(国際)

- 1 Yoshihiro Izumi, Shimpei Aikawa, Fumio Matsuda, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo, “Aqueous size-exclusion chromatographic method for the quantification of cyanobacterial native glycogen”, *Journal of Chromatography B*, 2013, 930, 90-97. (DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.04.037)
- 2 Ancy Joseph, Shimpei Aikawa, Kengo Sasaki, Hiroshi Teramura, Tomohisa Hasunuma, Fumio Matsuda, Takeshi Osanai, Masami Yokota-Hirai, Akihiko Kondo, “Rre37 stimulates accumulation of 2-oxoglutarate and glycogen under nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, *FEBS Letters*, 2014, 588, 466-471. (DOI: 10.1016/j.febslet.2013.12.008)
- 3 Ancy Joseph, Shimpei Aikawa, Kengo Sasaki, Fumio Matsuda, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo, “Increased biomass production and glycogen accumulation in *apcE* gene deleted *Synechocystis* sp. PCC6803”, *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 2014, 4, 17. (DOI: 10.1186/s13568-014-0017-z)
- 4 Mingyue Fang, Lihua Jin, Chong Zhang, Yinyee Tan, Peixia Jiang, Nan Ge, He-Ping Li, Xin-Hui Xing, “Rapid mutation of *Spirulina platensis* by a new mutagenesis system of atmospheric and room temperature plasmas (ARTP) and generation of a mutant library with diverse phenotypes”, *PLoS ONE*, 2013, 8, e77046. (DOI: 10.1371/journal.pone.0077046)
- 5 Ryo Nagao, Makio Yokono, Seiji Akimoto, Tatsuya Tomo, “High excitation energy quenching in fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein complexes from the diatom *Chaetoceros gracilis*”, *Journal of Physical Chemistry B*, 117, 2013, 6888–6895. (DOI: 10.1021/jp403923q)
- 6 Seiji Akimoto, Makio Yokono, Shimpei Aikawa, Akihiko Kondo, “Modification of energy transfer processes in the cyanobacterium *Arthrospira platensis* to adapt to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy”, *Photosynthesis Research*, 117, 2013, 235–243. (DOI: 10.1007/s11120-013-9830-5)

- 7 Muhammad Arba, Shimpei Aikawa, Kenta Niki, Makio Yokono, Akihiko Kondo, Seiji Akimoto, “Differences in excitation energy transfer of *Arthrospira platensis* cells grown in seawater medium and freshwater medium, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy”, *Chemical Physics Letters*, 588, 2013, 231–236. (DOI: 10.1016/j.cplett.2013.10.031)
- 8 Mie Araki, Seiji Akimoto, Mamoru Mimuro, Tohru Tsuchiya, “Artificially acquired chlorophyll *b* is highly acceptable to the thylakoid-lacking cyanobacterium, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421”, *Plant Physiology and Biochemistry*, in press. (DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.01.006)
- 9 Seiji Akimoto, Makio Yokono, Erina Yokono, Shimpei Aikawa, Akihiko Kondo, “Short-term light adaptation of a cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, proved by time-resolved fluorescence spectroscopy”, *Plant Physiology and Biochemistry*, in press. (DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.01.007)
- 10 Seiji Akimoto, Ayaka Teshigahara, Makio Yokono, Mamoru Mimuro, Ryo Nagao, Tatsuya Tomo, “Excitation relaxation dynamics and energy transfer in fucoxanthin-chlorophyll *a/c*-protein complexes, probed by time-resolved fluorescence”, *Biochimica et Biophysica Acta*, in press. (DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.02.002)
- 11 Shih-Hsin Ho, Akihiko Kondo, Tomohisa Hasunuma, Jo-Shu Chang, “Engineering strategies on improving the CO<sub>2</sub> fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation”, *Bioresource Technology*, 143, 2013, 163-171. (DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.043)
- 12 Xue Zhang, Xiao-Fei Zhang, Li-Yan Wang, Chong Zhang, Yinyee Tan, Haibo Chang, He-ping Li, Xin-Hui Xing, “Recent research progress of atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutation breeding technology and its applications”, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2014. (in press)
- 13 Ryosuke Hayashi, Ginga Shimakawa, Keiichiro Shaku, Satoko Shimizu, Seiji Akimoto, Hiroshi Yamamoto, Katsumi Amako, Toshio Sugimoto, Masahiro Tamoi, Amane Makino, Chikahiro Miyake, “O<sub>2</sub>-dependent large electron flow functions as electron sink, replacing the steady-state electron flux in photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, but not in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78, 2014.

(in press)

14. 金鋒, 焉迪, 王志斌, 李和平, 葛楠, 包成玉, “大气压射频辉光放电阻抗特性的实验研究”, 高电压技术, 2013, 39, 1596–1601.
- 15 Shimpei Aikawa, Atsumi Nishida, Shih-Hsin Ho, Jo-Shu Chang, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo, “Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002 from oceanic area”. (in submission)
- 16 Tsubasa Nakajima, Shuichi Kajihata, Katsunori Yoshikawa, Fumio Matsuda, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu. “Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic and photoheterotrophic conditions”. (in submission)
- 17 Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu, “Effect of malic enzyme on ethanol production in by *Synechocystis* sp. PCC 6803”. (in submission)
- 18 Ginga Shimakawa, Keiichiro Shaku, Akiko Nishi, Hiroshi Yamamoto, Amane Makino, Chikahiro Miyake, “Flavodiiron proteins 2/4 drive O<sub>2</sub>-dependent photosynthetic electron flow in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803”. (in preparation)

### (3-2) 知財出願

- ①平成 25 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ②CREST 研究期間累積件数(国内 1件)