

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「シアノファクトリの開発」

研究終了報告書

研究期間 平成23年4月～平成28年3月

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)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では海洋シアノバクテリアの有する優れたバイオ燃料関連化合物生産能力に注目し、バイオ燃料関連化合物の生合成ならびにバイオプロセスを人工的に高度に制御し、かつ藻体からの当該化合物の回収プロセスまで一貫してデザインした「シアノファクトリ」を開発することを目的とした。

まず、本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 における緑色光遺伝子発現系を構築した。さらにこの成果を活用することで、緑色光に応じて溶菌出来るシステムを構築した。また、本課題において海洋シアノバクテリアとして用いている *Synechococcus* sp. NKBG 15041c にも緑色光遺伝子発現系を導入することにも成功している。さらに、シアノバクテリアの自己凝集を実現するため、シアノバクテリアの細胞表面に細胞凝集を誘導するようなタンパク質を提示させる技術を開発した。**(農工大グループ、フェリグループ)**。

また、シアノバクテリアで機能するリボレギュレータを開発し、設計したリボレギュレータが海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp. NKBG 15041c 内でも機能することを示した。また、RNA 結合タンパク質である Hfq とその結合配列の利用により、リボレギュレータの安定性向上にもとづくシアノバクテリア内での高い発現レベルを実現した。**(農工大グループ)**。

海洋シアノバクテリアとして用いている *Synechococcus* sp. NKBG 15041c の全ゲノム解析(約 3.2 Mbp)、ORF 同定、遺伝子予測を行い、3224 個の ORF が同定された。さらに、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来の炭化水素合成関連酵素を元にアルカン生産用の合成オペロンを *Synechococcus* sp. NKBG 15041c 株に広宿主域ベクタを用いて導入し Heptadecane の生産能を付与した。また、この株に PHB 合成遺伝子群 (phaA, phaB, phaE, phaC) を導入し、PHB 生産能力を付与することに成功した**(農工大グループ)**。

藻体プロセスへの利用を目的とした種々のイオン液体の特性評価を通じ、水素結合受容性の高いイオン液体を用いることで含水含塩状態のシアノバクテリアを直接溶解可能であることを見いだした。PHB を生産した *Synechocystis* sp. PCC 6803 をイオン液体中に溶解後、藻体内に産生された PHB の約 98% を回収できることを明らかとした。また、アルカン抽出用のイオン液体としては、カチオンに長鎖アルキル基を有するイオン液体が Heptadecane を溶解することを明らかにした。**(農工大グループ)**。

代謝系のグローバルレギュレータ cyAbrB2、および光合成系のグローバルレギュレータ RpaB について、その機能解析、およびリボレギュレータを用いた発現抑制系の構築の両面から解析を行い、明暗周期条件や異なる光強度下での物質生産において、転写因子の制御方法に関する知見を得た**(日原グループ)**。

また、グローバルレギュレーターである転写因子として、RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE やレスポンスレギュレータ Rre37 の過剰発現株、サーカディアンリズムに関わるヒスチジンキナーゼである Hik8 の過剰発現株により、光合成能力を含め、代謝経路の改変の可能性を示した。**(小山内グループ)**。

さらに、これまでに得られた結果を統合して、シアノバクテリアの培養、バイオエネルギー関連化合物の生産、藻体の回収および破碎、さらにイオン液体を用いる目的物質の回収まで含めた、一連のバイオプロセス、シアノファクトリを構築している**(全グループ)**。

以上、本研究を通して、人工情報伝達系を駆使することにより、シアノバクテリアを用いる汎用性の高い新しいバイオプロセス、「シアノファクトリ」を開発することができた。本研究成果は今後、シアノバクテリアを用いるバイオ燃料関連化合物生産をはじめとする藻類バイオプロセスにおける新しいプラットフォーム技術として、バイオリクター技術や他の微細藻類を用いる物質生産技術との組み合わせにより、多方面に活用されるものと確信する。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. シアノバクテリアで機能するリボレギュレータ

概要:

本成果はシアノバクテリアで機能するリボレギュレータを開発した世界で初めての研究である。転写後遺伝子制御システムであるリボレギュレータのリボソーム結合部位をシアノバクテリア由来の配列に変更し、*Synechocystis* sp. PCC 6803 中で機能するリボレギュレータのデザインに成功した(原著論文 8)。さらに変異導入を行い、任意に発現レベルを調整することにも成功した。

課題目標への寄与:

開発したリボレギュレータは本プロジェクトにおける人工情報伝達系構築において柱となる技術であり、本研究成果はシアノファクトリが提供する代表的に要素技術である。緑色光遺伝子発現系等の光誘導型プロモータと組み合わせることで世界ではじめての光スイッチ型リボレギュレータとしての応用も可能である。

2. 高極性イオン液体による含塩含水状態からの PHB 回収プロセスの構築

概要:

含塩含水状態のシアノバクテリアを溶解可能である高極性イオン液体を開発した(原著論文 1)。PHB を藻体内に生産した *Synechocystis* sp. PCC 6803 をイオン液体中で溶解後、減圧ろ過を行い、藻体内に産生された PHB の約 98%を回収し、また、濾液を回収、乾燥すれば、98%のイオン液体が藻体の溶解能を保持したままリサイクル可能であった。

課題目標への寄与:

イオン液体でバイオエネルギー関連化合物を藻類バイオプロセスに応用できることを示した世界ではじめての成果である。この技術の開発により、藻体内に生産された PHB の回収プロセスを構築できることから、合成生物学的アプローチで構築されたシアノバクテリアと組み合わせることでシアノファクトリが実現できる。

3. *Synechococcus* sp. NKBG 15041c におけるアルカン生合成

概要:

海洋シアノバクテリアを用いたアルカン合成の世界ではじめての研究結果である。*Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 Acyl-ACP Reductase および Aldehyde deformylating oxygenase の遺伝子を用いアルカン合成オペロンを構築した。これをプラスミドベクターに載せて海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp. NKBG 15041c 株を形質転換したところ、最大 $4.2 \pm 1.2 \mu\text{g/g dry cells}$ の Heptadecane が生産された(原著論文 17)。

課題目標への寄与:

本プロジェクトにおける目的生産物の 1 つであるアルカンの生産能を、野生型ではアルカンを生産しない *Synechococcus* sp. NKBG 15041c 株に付与することに成功した。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 緑色光誘導型プロモータの改良

概要:

緑色光によってシアノバクテリア内の外来性遺伝子の発現を制御するシステムを開発した。*Synechocystis* sp. PCC6803 由来の *cpcG2* プロモータ下流にシアノバクテリア由来の SD 配列を導入し、かつ二成分制御系の response regulator (CcaR)もプラスド上で発現させることで、緑色

光下で目的遺伝子を効果的に発現制御できる遺伝子発現系を開発した(特願 2013-115822、PCT/JP2014/064017、原著論文 5)。

課題目標への寄与:

本成果はリボレギュレータの開発とともに、人工情報伝達系構築において柱となる技術であり、本研究成果はシアノファクトリが提供する代表的な要素技術である。このプロモータ下に溶菌関連遺伝子を配置することで、光による溶菌や凝集の制御が可能となった。これにより、藻体内に蓄積されたバイオ燃料関連化合物の回収を光により制御することが可能となる。

2. 緑色光により誘導される溶菌システムの構築

概要:

緑色光の照射により自己溶菌するシアノバクテリア株を開発した。上記1で改良、構築したプロモータの下流に大腸菌の溶菌を促すタンパク質である Holin および Endolysin の構造遺伝子を、定常発現を行うプロモータの下流に Anti-holin の構造遺伝子をそれぞれ配したプラスミドを作製し、これを *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入した。この形質転換体を緑色光照射下で培養したところ、緑色光により誘導された Holin および Endolysin によって溶菌が起こることを示した(原著論文 6)。

課題目標への寄与:

本成果はシアノバクテリアバイオプロセスにおける光で溶菌を制御した初めての報告である。本技術によって、培地への誘導剤非添加で溶菌できるため、培養液は培地成分を調製した上で再度培養に用いることが可能である。このプロセスは排水を最小限に減らすことをめざした本プロジェクトには無くてはならない要素技術である。さらに、本株は白色光下では原理的には死滅してしまうことから、今後の遺伝子組み換え藻類・生物の実用化において環境影響評価の面で非常に安全性の高い系として今後の発展が大いに期待される。

3. シアノバクテリアの細胞表面へのタンパク質提示

概要:

シアノバクテリアの細胞表面に組換えタンパク質を提示させた世界で初めての研究成果である。*Synechocystis* sp. PCC 6803 を宿主として、緑色光遺伝子発現系プロモータの下流に大腸菌由来オートトランスポータタンパク質である Antigen43 をコードした遺伝子を配したプラスミドを導入し、緑色光の照射により Antigen43 の発現を誘導した。その結果、Antigen43 は細胞表面に提示された(原著論文 27)。

課題目標への寄与:

本成果は、光によって細胞表面の状態、すなわちシアノバクテリアの凝集しやすさを制御できる可能性を示している。さらに、この研究成果は今後のシアノバクテリアを用いる新しいバイオプロセスをデザインするきわめて重要な技術として位置づけられる。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 農工大グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
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	H23.4～
小関 良宏	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	教授	H23.4～
大野 弘幸	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	教授	H23.3～
池袋 一典	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	教授	H23.4～
山田 晃世	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	准教授	H23.4～
吉野 知子	東京農工大学・大学院工学研究院生命機能科学部門	准教授	H23.4～
中村 暢文	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	教授	H23.3～
津川 若子	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	准教授	H23.4～
小嶋 勝博	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	特任准教授	H23.10～
Stefano Ferri	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	助教	H23.4～H27.3 (異動に伴いH27.4より「フェリグループ」として独立)
一川 尚広	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	助教	H23.4～H26.3
宮原 平	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	助教	H26.4～
深谷 幸信	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門	特任助教	H23.4～H25.4
藤田 恭子	東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学	講師	H23.4～

	部門		
島倉 雅子	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	研究補助員	H24.4～
阿部 公一	東京農工大学・大学院工 学研究院生命機能科学 部門	特任助教	H23.4～H27.3
阿部 充	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	特任助教	H26.4～H27.3
吉田 亘	東京農工大学・大学院工 学研究院生命機能科学 部門	特任助教	H25.4～H25.8
中島 満晴	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	産学官連携研究 員	H23.4～
James J. Ellinger	東京農工大学・大学院工 学研究院生命機能科学 部門	産学官連携研究 員	H26.9～H26.11
河野 雄樹	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D3	H23.4～H24.3
小田 真弓	東京農工大学・工学府・ 生命工学専攻	D3	H23.4～H24.3
塚越 かおり	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D3	H23.4～H25.3
野中 芳彦	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D3	H23.4～H25.3
梁 越	東京農工大学・工学府・ 生命工学専攻	D3	H23.4～H24.3
田口 怜美	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D3	H23.4～H25.3
本多 亨	東京農工大学・工学府・ 生命工学専攻	D2	H23.4～H24.3
黒田 浩介	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
税田 祥平	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D2	H23.4～H26.3
服部 裕光	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
角堀 健治	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
佐々木 泰彦	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
戸田 礼	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
長江 大地	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
宮本 侑典	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
岩田 真緒	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H26.3

平岡 大介	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
毛塚 麻希	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
斎藤 大希	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
巽 敦郎	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
深谷 剛弘	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
久保田 千尋	東京農工大学・工学府・ 生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
山田 亮	東京農工大学・工学府・ 生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
西岡 美幸	東京農工大学・工学府・ 生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
大重 智彦	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H26.3
セーボレー 那沙	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D2	H23.4～H26.3
酒井 雄大	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D3	H23.4～
洞口 陽平	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
安藤 沙智子	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
遠藤 貴之	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H26.3
大西 陽介	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H23.4～H25.3
山岸 彩奈	東京農工大学・工学府・ 生命工学専攻	M2	H23.4～H24.3
新井 大地	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M2	H24.4～H26.3
保田 昂之	東京農工大学・工学部・ 生命工学科	M2	H23.4～H25.3
菅村 百合子	東京農工大学・工学部・ 生命工学科	M2	H23.4～H25.3
中村 清太	東京農工大学・工学部・ 生命工学科	M2	H23.4～H25.3
中野 拓朗	東京農工大学・工学部・ 生命工学科	M2	H23.4～H26.3
今野 旭	東京農工大学・工学部・ 生命工学科	M2	H23.4～H26.3
内倉 悠貴	東京農工大学・工学部・ 生命工学科	M2	H23.4～H26.3
神尾 英里	東京農工大学・工学部・ 生命工学科	M2	H23.4～H26.3

齊藤 匠子	東京農工大学・工学部・生命工学科	M2	H23.4～H26.3
櫻井 潤	東京農工大学・工学部・生命工学科	M2	H23.4～H26.3
二上 日向子	東京農工大学・工学部・生命工学科	M2	H23.4～H26.3
三宅 琴音	東京農工大学・工学部・生命工学科	M2	H23.4～H26.3
荒木 将貴	東京農工大学・工学部・生命工学科	M2	H23.4～H26.3
角田 晃一	東京農工大学・工学部・生命工学科	M2	H23.4～H26.3
中島 沙記	東京農工大学・工学部・生命工学科	M2	H23.4～H26.3
三田 千福	東京農工大学・工学部・生命工学科	M2	H23.4～H26.3
小林 大悟	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H23.4～H26.3
目代 晴紀	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H23.4～H26.3
中村 真由美	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H25.4～H27.3
河合 純也	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H25.4～H27.3
木坂 暢介	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H25.4～H27.3
徳田 彩	東京農工大学大学院工学府産業技術専攻	M2	H25.4～H27.3
杉山 純哉	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H25.4～H27.3
Amr Mohamed Aly Kamel Ibrahim Badary	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	D3	H25.4～
田中 崇彬	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H26.4～
長井 一晃	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H26.4～
伊藤 康仁	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H26.4～
伊藤 彰子	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H26.4～
坂本 一平	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2	H26.4～
関口 光	東京農工大学大学院工学府産業技術専攻	M1	H26.4～
生野 千佳	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M1	H27.4～
永田 まどか	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M1	H27.4～

	学府生命工学専攻		
布施 沙織	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M1	H27.4～
上加 寛人	東京農工大学大学院工 学府産業技術専攻	M1	H27.4～
角中 夏実	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	M1	H27.4～
Dwi Ariyanti	東京農工大学大学院工 学府生命工学専攻	D1	H27.4～

研究項目

- ・「海洋合成シアノバクテリアの開発」
- ・「バイオ燃料関連化合物生産用の合成オペロンの開発」
- ・「バイオ燃料関連化合物高効率抽出用イオン液体の開発」
- ・「シアノファクトリ開発」

②小山内グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
小山内 崇	明治大学農学部農芸化 学科	専任講師	H26.4～
渡辺 敦子	明治大学農学部農芸化 学科	研究技術員	H27.4～

研究項目

- ・「海洋合成シアノバクテリアの開発」
- ・「シアノファクトリ開発」

③日原グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
日原 由香子	埼玉大学大学院理工学 研究科	准教授	H26.4～
佐藤 雄介	埼玉大学大学院理工学 研究科	M2	H26.4～

研究項目

- ・「海洋合成シアノバクテリアの開発」
- ・「シアノファクトリ開発」

②フェリグループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
Stefano Ferri	静岡大学大学院工学研 究科	准教授	H27.4～ (異動に伴い「農 工大」グループよ り独立)

研究項目

- ・「海洋合成シアノバクテリアの開発」
- ・「シアノファクトリの開発」

(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

ヨーロッパにおけるプロジェクト、EC FP7 のプロジェクトの一つに 2012 年 12 月 1 日～2015 年 11 月 30 日を期限とする Cyanofactory という同名称の研究コンソーシアムが設立されている (<http://cyanofactory.eu/>)。同コンソーシアムはスウェーデン、ドイツ、ポルトガル、イギリス、スロベニア、スペイン、イタリアの 7 か国・10 大学の研究グループから構成されている。我々のプロジェクトは EC FP7 Cyanofactory 以前から開始しており、同プロジェクトは設立当初から両者ともに情報の交換はなかった。2013 年 10 月に JST/生物工学会共催で開催された国際会議“International Symposium on Biotechnology for Green Growth”において EC FP7 Cyanofactory からドイツ・ルール大学ボッフム校 M. Rögner 教授が来日・講演されたことをきっかけとして、同コンソーシアムとの関係の基礎が築かれた。その結果、2013 年 11 月に同コンソーシアムの研究会に本プロジェクトの代表である早出が招待され講演することとなった。この交流を契機として同年以降毎年、同コンソーシアムの研究会において本プロジェクトの研究者が招待されて講演する一方、日本に EC FP7 Cyanofactory の研究者を招待し、東京農工大を会場として本 CREST チームが中心となって「Cyanofactory に関する国際シンポジウム」(公開)を 2014 年度から毎年開催し、積極的な学術交流を行っている。

同プロジェクトとは人的な交流も活発に行っており、2014 年 11 月に同コンソーシアムの PI であるスウェーデン・Uppsala 大学 P.Lindblad 教授の研究室に修士課程学生を派遣し、同研究室との遺伝子発現系に関する共同研究を開始した。また、同コンソーシアムの中心メンバーであり藻類バイオリアクタ開発の実績が豊富なドイツ・ルール大学ボッフム校 M.Rögner 教授の研究室には研究員および修士課程学生を平成 26 年度、27 年度の 2 度にわたって派遣し、バイオリアクタを用いるシアノバクテリア培養に関する共同研究を行っている。同様に、平成 27 年度に同コンソーシアムのメンバーであるポルトガル・ポルト大学 P.Tamagnini 教授の研究室に修士課程学生を派遣し、共同研究を開始している。逆に同コンソーシアムからも、平成 27 年度にポルトガル・ポルト大学の研究者が日本に滞在し、研究を行った。

このほかの人的交流としては、平成 26 年度に農工大の研究員としてミネソタ大学から博士研究員 (James Ellinger 博士) を採用した。同氏は本プロジェクトに興味を持ち、早出にコンタクトをとり、本プロジェクトへの参画を希望した。同博士は 2014 年 9 月～11 月末まで滞在し、緑色光遺伝子発現系を有するシアノバクテリア形質転換体の環境対応についての研究に貢献した。

また、我々の研究活動に興味を抱き、サウジアラビア・アブドラ国王科学技術大学より研究者が来訪した。同大学においても今後、シアノファクトリの考え方にに基づき、シアノバクテリア応用におけるプラットフォーム技術を開発することを目指している。

一方、これまでの研究成果を基に、東インドネシア唯一の技術系大学であるスンバワ工科大学とともに JST の地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) に応募した。

このように、本プロジェクトの国際化は急速に進展している。

2013 年 7 月に本研究領域のさきがけ研究者との交流会に早出が参加し、さきがけ研究者の目覚ましい研究成果を知った。これをきっかけとして、平成 26 年度から新たに理化学研究所 (当時。現 明治大学) 小山内崇博士を代表とする小山内グループおよび埼玉大学理学部日原由香子博士を代表とする日原グループを本プロジェクトに迎え、両氏の研究成果を有効に活用するとともに、研究体制の充実を図った。

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 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 (農工大グループ、フェリグループ)

(1)研究実施内容及び成果

【緑色光センシングシステムの改良および溶菌系の構築】(農工大グループ、フェリグループ)

Synechocystis sp. PCC 6803 は、緑色光にตอบสนองして遺伝子発現制御を行う二成分制御系を有することが報告されている(図1)。そこで、本研究では、同株が有する緑色光センシング系の二成分制御系、CcaS/CcaR およびそれにより制御される *cpcG2* プロモータを応用することで、*Synechocystis* sp. PCC 6803 における緑色光遺伝子発現系を構築した。すなわち、広宿主域ベクタープラスミド上に *cpcG2* プロモータ、およびその下流に GFP をモデル遺伝子として挿入することで、緑色遺伝子発現用のベクタープラスミドを構築し、これを *Synechocystis* sp. PCC 6803 に形質転換した。その結果、新たにシアノバクテリア由来の SD 配列を導入し、かつ CcaR もプラスミド上で発現させることで、緑色光下で目的遺伝子を効果的に発現制御できる遺伝子発現系を開発した(図2)(原著論文5)。本成果は特許としても出願している(特願 2013-115822、PCT/JP2014/064017)。

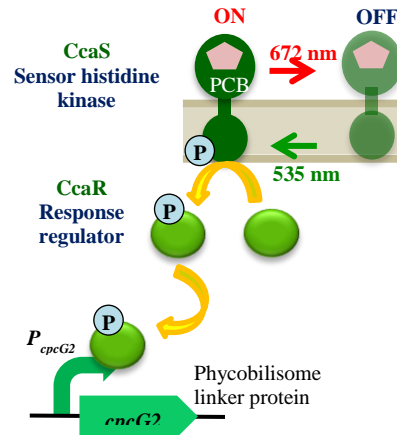


図1 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の緑色光応答型二成分制御系

この成果を活用することで、緑色光に応じて溶菌出来るシステムを構築した(図3)(原著論文6)。培地への誘導剤非添加で溶菌できるため、今後バイオ燃料関連化合物を容易に回収できるシステムの構築が期待できる。すなわち、上記プロモータの下流に Holin および Endolysin の構造遺伝子を、定常発現を行うプロモータの下流に Antiholin の構造遺伝子をそれぞれ配したプラスミドを作製し、これを *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入した。同形質転換体を緑色光照射下で培養したところ、生育阻害および培地中に漏出したフィコシアニン蛍光が観察された。本システムでは、完全な溶菌は観察されてい

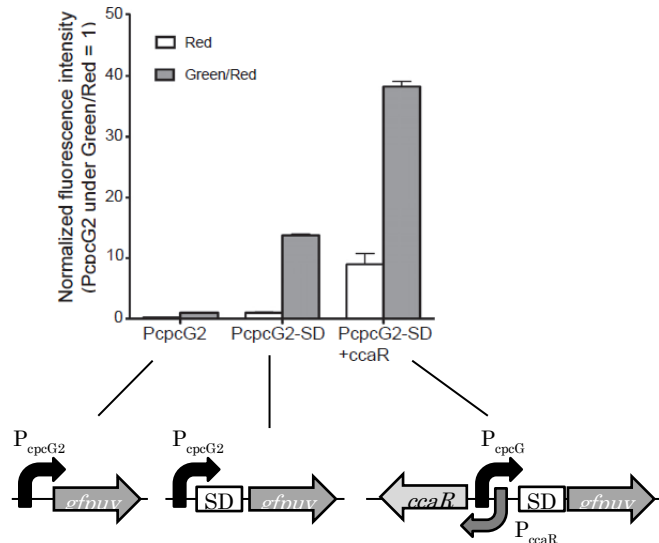


図2 SD 配列付加による緑色光での発現強化

ないものの、緑色光を照射することで菌体は脆弱になり、集菌後に純水や界面活性剤等で容易に溶菌を引き起こすことが出来た。緑色光を照射し、菌体を脆弱にした後に、各種溶媒で処理することで簡単に細胞内容を抽出できることが期待できる。

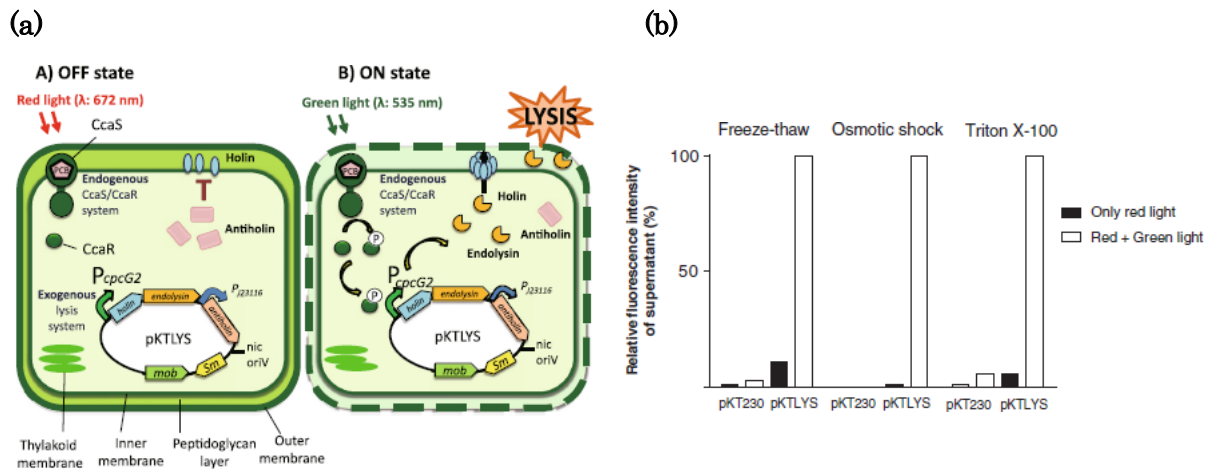


図3 緑色光誘導型溶菌システム

(a) 概念図

(b) 溶菌系が誘導された菌体に対する各種処理の効果

pKT230:ベクターのみを導入した株 pKTLYS:溶菌システムを導入した株

また、海洋シアノバクテリアとして用いている *Synechococcus* sp. NKBG 15041c のゲノム解析を行ったところ、同株には *Synechocystis* sp. PCC 6803 が保有している緑色光センシングシステムのホモログは見つからなかった。そこで *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来緑色光センシングシステムを *Synechococcus* sp. NKBG 15041c へ導入したところ、緑色光に応じて、*cpcG2* プロモータの下流の遺伝子発現が確認できた(図4)(原著論文19)。今後、同システムを用いて *Synechococcus* sp. NKBG 15041c の溶菌系の構築を目指す。

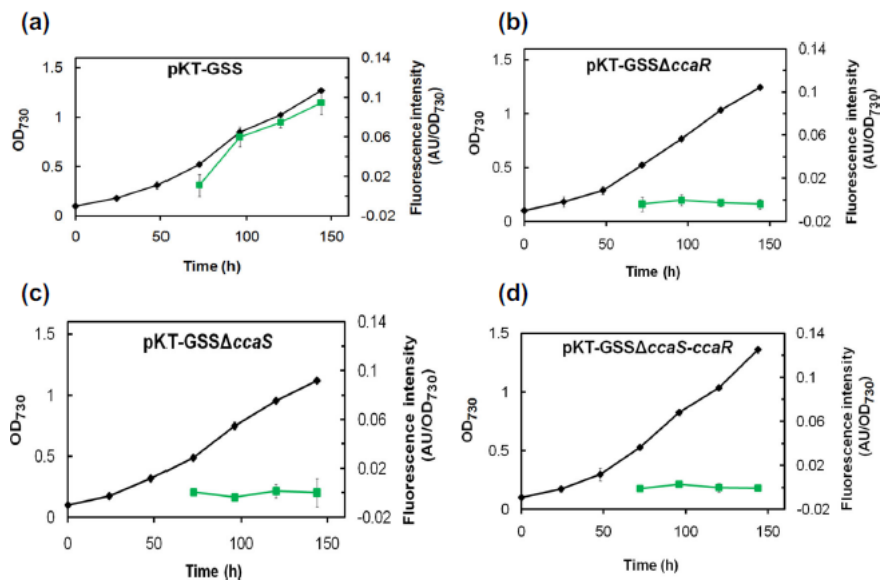


図4 緑色光照射下における *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来緑色光センシングシステムを導入した *Synechococcus* sp. NKBG 15041c の増殖(黒)とリポーター遺伝子(GFPuv)の発現(緑)

(a) CcaS, CcaR を導入 (b) CcaR を欠損 (c) CcaS を欠損 (d) CcaS, CcaR とも欠損

【緑色光センシングによる自己凝集プロセスの開発】(農工大グループ、フェリグループ)

シアノバクテリアの自己凝集を実現するため、シアノバクテリアの細胞表面に細胞凝集を誘導するようなタンパク質を提示させる技術を開発した。*Synechocystis* sp. PCC 6803 に対して、*cpcG2* プロモータの下流に大腸菌由来オートトランスポートタンパク質である Antigen43 をコードした遺伝子を配したプラスミドを導入し、緑色光の照射により Antigen43 の発現を誘導した。発現した Antigen43 は *Synechocystis* sp. PCC 6803 細胞表面に提示されることを確認した(図5)(原著論文27)。この技術を応用することで、凝集タンパク質を細胞表面に提示し、細胞の凝集を促すことができると考えられる。

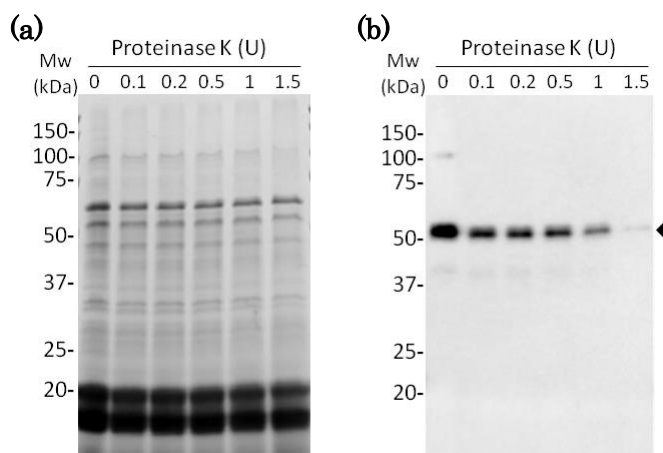


図5 プロテイナーゼKで処理した Antigen43 発現 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の SDS-PAGE 解析 (a) CBB 染色 (b) 抗 Antigen43 抗体によるウェスタンブロット
細胞表面に発現した Antigen43 はプロテイナーゼK処理により消化され、ウェスタンブロットのシグナルが弱くなる。

【青色光で制御を行う光情報伝達系の開発】(農工大グループ)

青色光を用いるシアノバクテリアでの遺伝子発現制御を実現するため、トランスクリプトーム解析により、青色光センシングに係る遺伝子の検索を目指した。海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp. NKBG 15041c を赤色光のみ、あるいは赤色光及び青色光の同時照射下で培養し、全 RNA を抽出した。これらの試料を対象に次世代シーケエンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行い、青色光で転写抑制されている遺伝子と青色光で転写が促進されている遺伝子を解析した。その結果、赤色光照射条件下と比較して、赤色光及び青色光照射条件下で転写量が 1/10 以下に減少していた遺伝子が 15 種、1/2~1/10 に減少した遺伝子が 53 種得られた。また、赤色光及び青色光の同時照射条件下で転写量が 10 倍以上に上昇していた遺伝子が 3 種、2~10 倍に上昇していた遺伝子が 242 種得られた。今後、これらの遺伝子を詳細に解析し、青色光を用いるシアノバクテリアでの遺伝子発現制御の実現を目指す。

【制御用リボレギュレータの開発】(農工大グループ)

リボレギュレータは、mRNA である *cis*-repressed mRNA (crRNA) と、non-coding RNA である *trans*-activating RNA (taRNA) から構成される。crRNA は、構造遺伝子の上流でステムループ構造を形成する。このステム部分にはリボソーム結合配列が含まれており、ステムループ構造が形成されているとリボソームが結合できず、下流の構造遺伝子の発現は抑制される。一方で、taRNA は crRNA と二本鎖形成することができる。taRNA と crRNA が相互作用すると crRNA のステムループ構造が変化し、リボソーム結合配列が一本鎖として露出する。その結果、リボソーム結合配列へのリボソームの結合が可能となり、構造遺伝子の発現が促進される(図6)。

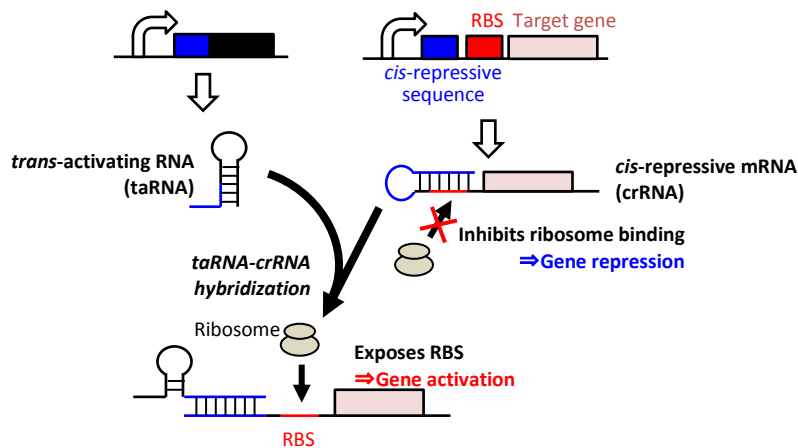


図 6 リボレギュレータ概念図

本研究では、シアノバクテリアで機能するリボレギュレータを開発した。大腸菌で用いられているリボソーム結合配列は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では翻訳効率が低いことから、*Synechocystis* sp. PCC 6803 で高い翻訳効率を示すリボソーム結合配列を利用して crRNA と taRNA を設計した。リボレギュレータは、crRNA の下流に配したレポータータンパク質である緑色蛍光タンパク質 GFPuv の発現を指標に、設計・開発を進めた。はじめに、設計したリボレギュレータを大腸菌で機能を確認し、改良した。設計したリボレギュレータは、大腸菌内で taRNA を転写誘導すると、crRNA の下流に配した GFPuv の発現を約 6 倍促進した。また、シアノバクテリアの培養温度である 30℃でもリボレギュレータが機能することを確認した。大腸菌を宿主として用いた場合、設計したリボレギュレータを用いて、細胞溶菌酵素系である Holin および Endolysin の発現を制御し、細胞の溶菌を制御できた。

次に、設計したリボレギュレータを *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入し、その機能を確認した。*Synechocystis* sp. PCC 6803 においても、リボレギュレータの機能を評価するために GFPuv をレポータータンパク質として用いた。crRNA の下流に GFPuv の配列を挿入し、その転写を *trc* プロモータで誘導するプラスミドを *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入したところ、crRNA 配列を持たない場合と比較して、GFPuv 由来の蛍光が顕著に低下した。この結果から、*Synechocystis* sp. PCC 6803 内で crRNA が正しく機能していることが示された。また、taRNA を Ni²⁺ (NiSO₄) で転写誘導される *nrsB* プロモーターの下流に挿入させた配列をプラスミドに導入させた場合、NiSO₄ の添加により taRNA の転写が誘導され、crRNA 下流の GFPuv の発現が約 13 倍上昇することが確認された(図 7) (原著論文 8)。この結果から、設計したリボレギュレータが、*Synechocystis* sp. PCC 6803 で機能し、遺伝子の発現を制御できることが示されている。

さらに、設計したリボレギュレータを海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp. NKBG 15041c 内で評価した。*Synechococcus* sp. NKBG 15041c でも、crRNA 配列の導入により、GFPuv 由来の蛍光が低下し、*Synechococcus* sp. NKBG 15041c 内で crRNA が機能していることが示された。さらに crRNA に加え、taRNA の配列を含むプラスミドを *Synechococcus* sp. NKBG 15041c に導入した結

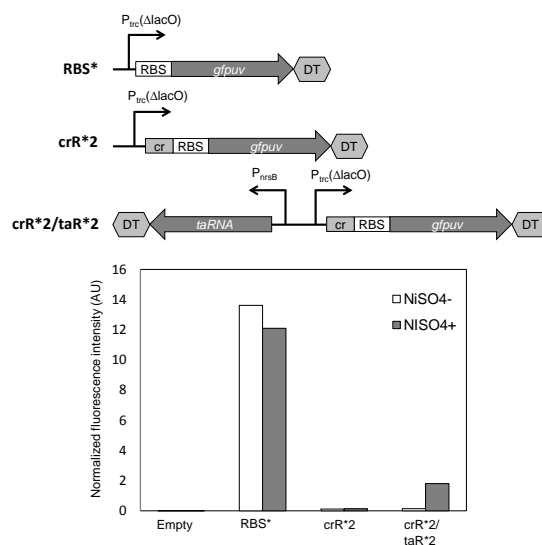


図 7 リボレギュレーターの様式図および *Synechocystis* sp. PCC 6803 中での機能確認

果、GFPuv 発現量が上昇し、海洋シアノバクテリア内でリボレギュレータが機能することが確認された。

新規リボレギュレータを設計するだけでなく、設計したリボレギュレータの機能改良も行った。crRNA が形成するステムループ構造のループ配列を改変することで、リボレギュレータの機能を向上させることに成功している。ループ配列に塩基を挿入し、その配列を最適化した結果、*Synechocystis* sp. PCC 6803 においてリボレギュレータの crRNA による遺伝子抑制能を大幅に向上させることに成功した。

また、異なるアプローチとして RNA 結合タンパク質である Hfq とその結合配列の利用による機能改良も行った。大腸菌では、RNA 結合タンパク質である Hfq が遺伝子の発現を調節する non-coding small RNA に結合し、non-coding small RNA の細胞内での安定性を向上させると報告されている。RNA は細胞内でヌクレアーゼによる分解を受けやすく、本研究で設計したリボレギュレータに関しても同様に細胞内での安定性は低い。そこで、リボレギュレータの安定性向上による機能向上を目指し、Hfq の結合配列をリボレギュレータの taRNA に連結した。その結果、taRNA の細胞内での安定性が向上した。また、Hfq 結合配列を持たない taRNA と比べて、Hfq 結合配列を連結した taRNA を大腸菌内で転写誘導した結果、GFPuv の発現量が約 5 倍上昇した (図 8) (原著論文 9)。さらに *Synechocystis* sp. PCC 6803 においても、大腸菌由来 *hfq* を導入することで、Hfq 結合配列を付与した taRNA を利用したリボレギュレータが高い機能を持つことが示されている (図 9) (原著論文 20)。



図 8 Hfq 結合配列導入による GFPuv 発現量の増大

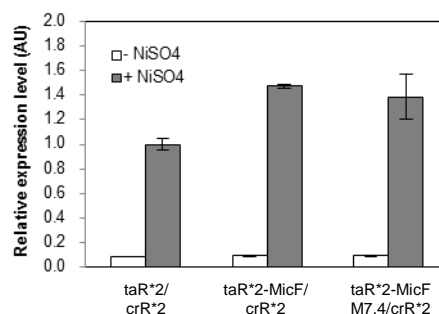


図 9 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における Hfq 結合配列導入の効果

3.2 バイオ燃料関連化合物生産用の合成オペロンの開発 (農工大グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

【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 3% の NaCl を含む BG-11 培地で生育が良好な東京農工大学保有マリンカルチャーコレクションのシアノバクテリア (*Synechococcus* sp. NKBG 15041c 株) を選択した。この株はこれまでの研究から接合伝達法による遺伝子操作系が確立されており、さらに広宿主区域ベクタープラスミドが利用できることが知られている。

さらなる利便性を高めるために、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を検討した。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。また、NKBG 15041c 株で使用可能なプロモータとして、NKBG 15041c 株のゲノム情報 (後述) からフィコシアニンプロモータ配列を獲得し、その有効性を評価した。その結果、従来使用していた *trc* プロモータと比較して、RNA 発現量が 3 倍増大した。さらに近年、学術誌に報告された「スーパプロモータ」と称されている *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の *Pcpc560* についても、NKBG 15041c 内で効果的に機能し、これまでで最も高い発現レベルを達成できている。

さらに NKBG 15041c 株での発現誘導系の確立として、テトラサイクリンリプレッサー遺伝子をフィコシアニンプロモータの下流に融合、*trc* プロモータにテトラサイクリンオペレータを組み込み、その下流に GFP 遺伝子を導入した発現ベクターを構築した。NKBG 15041c 株にプラスミドを導入した後、アンヒドラテトラサイクリン(ATc, テトラサイクリン誘導体)を添加して培養を行った結果、ATc 濃度増加に伴い、GFP の発現量が増大することが示された(図 10)。この結果より、NKBG 15041c 株において、発現誘導系の開発に成功した(原著論文 15)。

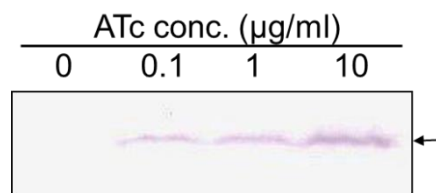


図 10 アンヒドラテトラサイクリン(ATc)添加による GFP の発現誘導

【アルカン合成シアノバクテリアのゲノム解析及びアルカン生合成系の解明】

特徴的な炭化水素(1,n-Nonadecadiene、1-Nonadecene)を生産する 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(原著論文 7)。また、COG データベースによる遺伝子分類の結果を図 11 に示す。

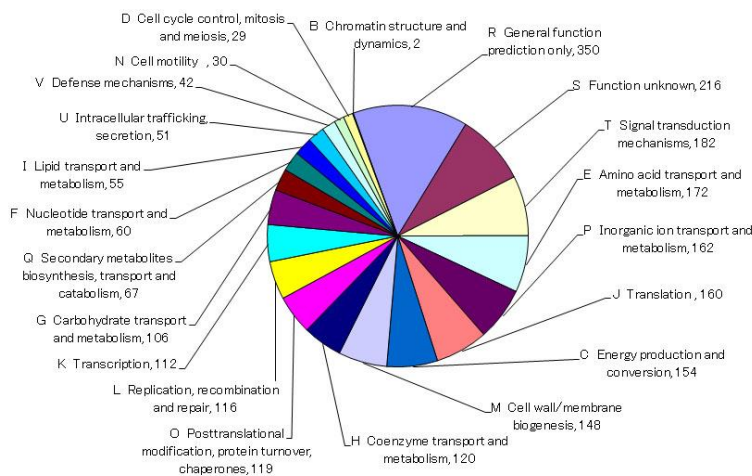


図 11 COG データベースによる NKBG 15041c 株の遺伝子分類

さらに遺伝子配列から得られた 16S rDNA 配列をもとに系統樹の作製を行った。比較する株としては *Synechococcus* 属を中心とした 30 種のシアノバクテリアを対象とした。その結果、NKBG 15041c 株は海洋性 *Synechococcus* 属のクラスターであるクラスター 3 に分類されることが示された(原著論文 17)。

得られたゲノム情報から当該株が生産する炭化水素 1-Nonadecene の合成に関連する遺伝子の探索を行った。その結果、*Synechococcus* sp. PCC 7002 株において同定された 1-Nonadecene 生産に関連する酵素(Olefin synthase、OLS)と 70%以上の DNA 配列の相同性を示す遺伝子(ORF: 8kb)が同定された。さらに炭化水素生産株として海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp. NKBG 042902 株においても NKBG 15041c 株と同様に 1-Nonadecene を合成していることが見出された。NKBG 042902 株は内在性高コピープラスミドを保持していることが知られており、NKBG 15041c 株とは異なる特徴を持つ。そこで次世代シーケンサーを用いて NKBG 042902 株の全ゲノム解析を行った。その結果、ゲノム長が約 3.9 Mbp、また 3412 個の ORF が同定され、NKBG 15041c 株と同様に Olefin synthase 遺伝子を有していることが明らかとなった。よって、NKBG 042902 株においても当該遺伝子が 1-Nonadecene の合成に関与していることが示唆された(原著論文 14)。

【アルカン合成オペロン開発】

Synechococcus elongatus PCC 7942 由来の炭化水素合成関連酵素である Acyl-ACP Reductase (AAR)および Aldehyde deformylating oxygenase (ADO) の遺伝子データを元に設計・合成を行い、

アルカン合成オペロンを構築した。各遺伝子上流には *trc* プロモータ(Ptrc)、及びフィコシアニンプロモータ(Pcpc)を組み込み、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 に導入した(pKT-Ptrc-alkane, pKT-Pcpc-alkane)。アルカン合成関連遺伝子の発現ベクターを用いて NKBG 15041c 株の形質転換を行い、炭化水素生産を評価した。その結果、野生株においてはアルカン合成が確認されていない NKBG 15041c 株において Heptadecane の生産が確認され(図 12)、Pcpc を用いることで最大 $4.2 \pm 1.2 \mu\text{g/g}$ の生産が確認された(原著論文 17)。

一方で、NKBG 15041c 野生株が高生産する 1-Nonadecene の合成が形質転換において著しく減少した。Heptadecane と 1-nonadecene はいずれも炭素鎖長 18 の Fatty acyl-ACP を出発物質して生合成されることから、アルカン合成遺伝子の導入によりアルケン(1-Nonadecene)合成量が抑制されたことが考えられた。しかし、1-Nonadecene の減少量に比べ、Heptadecane の増加量は低かった。このことから、1-Nonadecene 合成に使用されなかった Fatty acyl-ACP の全てが Heptadecane 合成に使用されていないと考えられた。そこでアルカン合成と競合する合成経路の解析を行った。近年、他のシアノバクテリアにおいて脂肪酸アルデヒドから脂肪酸アルコールを合成する Aldehyde reductase (AHR)や脂肪酸アル

デヒドから脂肪酸を合成する Aldehyde dehydrogenase (ALDE)などの酵素が報告されている。これらの酵素は、脂肪酸アルデヒドからアルカンを合成する Aldehyde deformylating oxygenase (ADO)と同様の基質を用いており、競合していることが考えられる(図 13)。NKBG 15041c 株のドラフトゲノム情報を解析した結果、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株由来の AHR と高い相同性を示す配列が同定され、また RT-PCR による AHR 遺伝子の mRNA 発現が確認された。そこで GC/MS を用いて NKBG 15041c 野生株、及びアルカン合成遺伝子を導入した形質転換体の代謝産物の解析を行った。その結果、野生株及び形質転換体において Octadecanol (脂肪酸アルコール)が検出され、形質転換体の Octadecanol の生産量は野生株と比較して 4.5 倍増加した。また、AHR による Octadecanol 合成の前駆体である Octadecanal (脂肪酸アルデヒド)は、形質転換体では検出されたが、野生株では検出されなかった。よって、Octadecanal の生産によって、

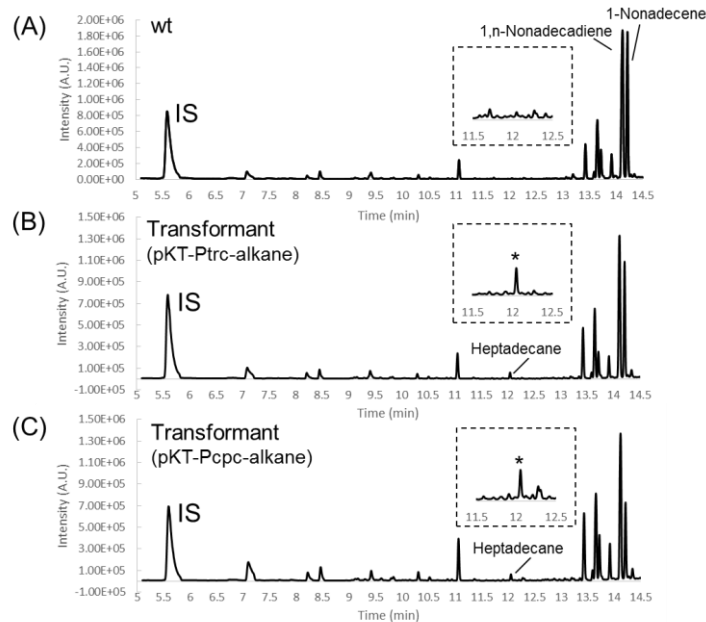


図 12 アルカン合成遺伝子導入 *Synechococcus* sp. NKBG 15041c における炭化水素生産の評価 (A) 野生株、(B) pKT-Ptrc-alkane 保持株、(C) pKT-Pcpc-alkane 保持株

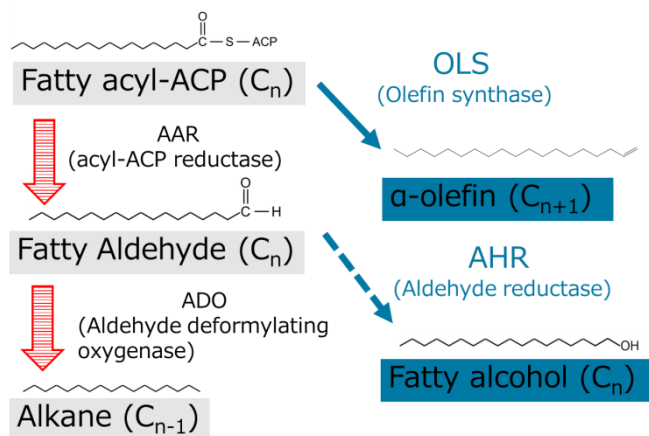


図 13 *Synechococcus* sp. NKBG 15041c における Fatty acyl-ACP を基質としたアルカン、アルケン、脂肪酸アルコール合成

Octadecanol の生産量が増加したことが考えられ、アルカン合成経路と競合する脂肪族アルコール合成経路の存在が示唆された。現在、AHR 遺伝子のノックアウト及びノックダウンに向けた形質転換体の構築を試みており、アルカン生産量の増大を試みている。

3.3 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(農工大グループ)

(1)研究実施内容及び成果

【PHB 抽出用イオン液体プロセスの開発】

藻体プロセスへの利用を目的とした種々のイオン液体の特性評価を通じ、水素結合受容性の高いイオン液体を用いることで含水含塩状態のシアノバクテリアを直接溶解可能であることを見だし報告した。その中でもアルキルイミダゾリウムリン酸誘導体イオン液体へ PHB は溶解しないことを確認し、イオン液体中への藻体成分と PHB の溶解性の違いを利用したろ過による分離を行った。PHB を生産した *Synechocystis* sp. PCC 6803 をイオン液体中に溶解後、減圧ろ過を行うことで、藻体内に産生された PHB の約 98%を回収できることを明らかとした。また、減圧ろ過後の濾液を回収、乾燥することで、イオン液体を初期と同様の藻体溶解性を保持したまま 98wt%以上リサイクルできることを確認した(表1)(原著論文 18)。

表1 シアノバクテリアからのイオン液体(IL)および PHB の回収率

	Recycle number				
	1	2	3	4	5
Recovery of IL (%)	99	98	98	98	98
Yield of PHB (%)	98	98	98	99	98

また、PHB を溶解可能なイオン液体の探索を行い、安息香酸アニオンを有するイオン液体が他の系に比べて低温で PHB を溶解し、イオン液体中の含水量により PHB の溶解性が異なることを見出した。さらに効率的な PHB 回収プロセスの構築を目指して、極性を有し、水との相分離を可能にする新規イオン液体の合成や相分離後の含水率を調整するための双性イオンの合成を行った。

【アルカン抽出用イオン液体プロセスの開発】

カチオンに長鎖アルキル基を有するイオン液体が Heptadecane を溶解することを明らかにした。

また、アニオンがアルカンの溶解度に及ぼす影響について検討を進め、カルボキシル基を有するものが溶解に有効であることを明らかにした。イオンの組み合わせによりアルカンを溶解するイオン液体を作製できること、またアルカンを溶解後、水を添加することで水、イオン液体、アルカンの 3 層に分離出来ることを明らかにした(図 14)。

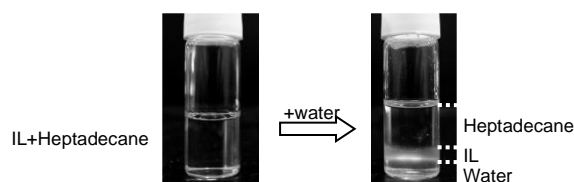


図 14 イオン液体中への Heptadecane の溶解と水添加による 3 相形成

【スターチ抽出用イオン液体プロセスの開発】

多糖類の溶解に有用であると考えられる極性イオン液体は、水と混和しやすく、含水率が上昇に伴い糖の溶解性が大きく低下する傾向があった。そこで、高い水素結合受容性を持つアニオンと、疎水性のカチオンとを組み合わせ、糖と親和しつつ含水量の影響を受けないような疎水性高極性イオン液体を設計した(図 15)。

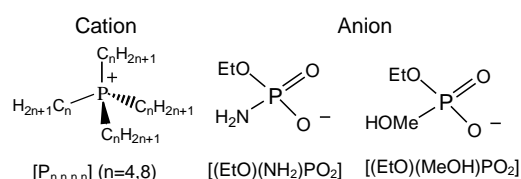


図 15 疎水性高極性イオン液体の構造

3. 4 シアノファクトリ用 cyAbrB2、および RpaB 転写因子制御系の開発 (日原グループ)

(1)研究実施内容及び成果

淡水性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を対象として、代謝系のグローバルレギュレータ cyAbrB2、および光合成系のグローバルレギュレータ RpaB について、その機能解析、およびリボレギュレータを用いた発現抑制系の構築の両面から解析を行った。

【グローバルレギュレータの機能解析】

cyAbrB2 転写因子は、連続明条件下での炭素窒素代謝の潤滑な進行に必須であり、cyAbrB2 を欠損すると細胞内にグリコーゲンが高蓄積することがこれまでに示されている。しかし、暗所では蓄積したグリコーゲンの速やかな分解が観察されることから、明所と暗所での cyAbrB2 の働きが異なる可能性が示唆された。そこで明所から暗所に移した際の cyAbrB2 欠損株の表現型解析を行ったところ、暗所下での標的遺伝子の発現変動、代謝産物量の変動は cyAbrB2 の有無により違いはなく、暗所下での窒素・炭素代謝制御に cyAbrB2 が必須でないことが示された。しかし、明暗周期下でのグリコーゲン量の増減パターンが、cyabrB2 破壊株では乱れることから、cyAbrB2 は明暗条件下での代謝の切り替えに働く可能性が示唆された(原著論文 16)。

RpaB 転写因子は光強度変化に伴い、光合成関連遺伝子の転写活性化と転写抑制の両方に機能することが知られている。RpaB は二成分制御系のレスポンスレギュレータであり、その活性制御にはヒスチジンキナーゼ Hik33 によるリン酸基転移が関与することが示唆されているが、その詳細は不明であった。本研究では新たに、この二成分制御系のリン酸基転移に加えて、調節タンパク質チオレドキシシンによるシステイン残基の還元が、RpaB の活性制御に関与する可能性を示唆する結果を得た。RpaB がチオレドキシシンからの還元力供給を受けることにより、光合成電子伝達活性に依存した転写制御を行っている可能性が新たに示された(原著論文 21)。

以上の、cyAbrB2 と RpaB の生理的役割や活性制御メカニズムに関する新知見は、明暗周期条件や異なる光強度下での物質生産において、これらの転写因子をどのように制御することが有効であるか、考慮するにあたって重要な情報である。

【リボレギュレータを用いた発現抑制系の構築】

銅誘導性 *petJ* プロモータの制御下でリボレギュレータを発現させることにより、cyAbrB2、および RpaB の発現抑制を試みた。銅欠乏条件下に移した *Synechocystis* 細胞内では *petJ* プロモータからの転写誘導が起きることが知られているが、リボレギュレータを接続した際の誘導レベルは低く、cyabrB2、および *rpaB* mRNA からの翻訳を抑制するには不十分であった。リボレギュレータが細胞内で不安定である可能性を考え、大腸菌の RNA シャペロン Hfq タンパク質を共発現する株を作製したが、リボレギュレータによる cyAbrB2、および RpaB の発現抑制効果は観察されなかった。

現在、ニッケル誘導性の *nrsB* プロモータや、緑色光誘導性の *cpcG2* プロモータに変えて同様にリボレギュレータの誘導を試みている。また池袋グループの、cyabrB2 遺伝子上流域にリボスイッチを挿入した株において、*nrsB* プロモータおよび *cpcG2* プロモータを併用しての cyabrB2 の転写抑制に成功したという成果を受けて、現在この株の表現型が野生型から cyAbrB2 欠損型へと置き換わるかどうかの表現型解析を行っている。

3. 5 転写制御因子によるシアノファクトリ用制御系の開発(小山内グループ)

(1)研究実施内容及び成果

小山内グループでは、グローバルレギュレーターである転写因子を利用してシアノファクトリの開発を行っている。特に、光合成反応中心 D1タンパク質遺伝子 *psbAII* のプロモータを利用して、淡水性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の過剰発現株を利用して、細胞、代謝、光合成の改変を行った。

RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE やレスポンスレギュレータ Rre37 の過剰発現株では、窒素欠乏1日後には、mRNA レベルと代謝産物レベルに相関がなくなることを明らかにした。このことから、

増殖を止める窒素欠乏などの状態では、トランスクリプトーム解析はあまり有効ではなく、メタボローム解析によって代謝状態を直接明らかにすることが重要であることが分かった。この成果は、国際誌にて発表済みである(原著論文 22)。

実生産プロセスを想定する上で、微細藻類の培養には、「淡水を多量に使用する」という欠点がある。日本では淡水は豊富であるが、世界的に見れば淡水は貴重な資源であり、藻類培養には飲料・農業利用と競合しない海水を利用することが望ましい。そこで、淡水性シアノバクテリアを、人工海水を用いて培養したところ、窒素とリン源を加えることで、海水中でも増殖することが明らかになった。培養中に培地が酸性化することがわかったため、窒素、リン源に加えてバッファーを添加したところ、さらに増殖が促進されることが分かった。また、通常の合成培地と海水培養での細胞内アミノ酸量を比較したところ、海水培養によってグルタミンやアスパラギン酸が5倍、リシンが10倍に増加することが明らかになった。この成果は、国際誌にて発表済みである(原著論文 23)。

3. 6 転写制御因子による代謝と光合成の改変と PHB 生産(小山内グループ)

(1)研究実施内容及び成果

サーカディアンリズムに関わるヒスチジンキナーゼである Hik8 の過剰発現株では、光合成や代謝が変化することが明らかになった。Hik8 過剰発現株では、光合成電子伝達の活性が変化し、光化学系 I, II の遺伝子発現がすべて増加することが分かった。また、アミノ酸レベルも変化するなど、Hik8 過剰発現によって光合成と一次代謝が包括的に変化することが明らかになった(原著論文 26)。

3. 7 シアノファクトリの開発(全グループ)

(1)研究実施内容及び成果

これまでに得られた結果を統合して、シアノバクテリアの培養、バイオエネルギー関連化合物の生産、藻体の回収および破碎、さらにイオン液体を用いる目的物質の回収まで含めた、一連のバイオプロセス、シアノファクトリの構築を試みた。

まず、PHB生産・回収を目的としたシアノファクトリの構築を試みた。ここでは 26 年度から本チームに合流した、明治大学小山内講師が開発した、PHB 高生産株の応用を試みた。*Synechocystis* sp. PCC 6803 *sigE* 高発現株は、窒素欠乏条件下で PHB 生産量が増加する。そこで、*sigE* を高発現させたシアノバクテリアに緑色光誘導型溶菌制御システムを導入することで、PHB の生産および回収を目的としたバイオプロセスの開発を目指した。しかし、同株を窒素枯渇下において培養した場合、緑色光センシングシステムが働かなかった。これは窒素枯渇下では、緑色光センシングシステムの中核を成す CcaS の転写そのものが抑制される結果であることが考察された。そこで、PHB 生産とこの緑色光遺伝子発現系とを組み合わせるためには、PHB を藻体内に蓄積させたのち、緑色光遺伝子発現系で溶菌を誘導させるために、窒素源を培地中に後から加えることで同システムの機能を復帰させることを試みた。以上の準備のもとで *sigE* を高発現させたシアノバクテリアを用いた PHB 生産プロセスにおいて、緑色光誘導型溶菌システムの機能評価を行った。その結果、窒素源存在下においては緑色光の照射が開始されて直ちに藻体の溶菌に伴う培地上清中のフィコシアニン漏出に伴う、同タンパク質由来の蛍光が観察された。これに対し、窒素源欠乏下においては緑色光を照射されても上清中のフィコシアニン蛍光は観察されなかった。しかし、窒素源を後から加えることで、培養上清中にフィコシアニンの蛍光が確認された(図 16)。このことから、シアノバクテリアを用いた PHB 生産プロセス、つまり *sigE* を高発現させたシアノバクテリアを PHB 生産に十分な期間、窒素欠乏条件下においた後であっても、窒素源を添加することで、緑色光による溶菌誘導システムが機能することが示唆された。一方でこれまでにシアノバクテリア藻体を完全に溶解し、かつ、PHB は全く溶解せず、水相にこれらを沈殿させるイオン液体が開発されている。また、このイオン液体においては、シアノバクテリアの完全溶解には一定時間の攪拌が不可欠である。そこで、ここで開発した緑色光誘導型溶菌システムが導入された *sigE* 高発現株を用いて PHB 生産とイオン液体による PHB 回収プロセスを組み合わせさせたシアノファクトリの構築を現在進めている。すなわち、*sigE* 高発現株を用いて PHB を藻体内に高度に蓄積させた後に、緑色光照射により溶菌状態とし

て、この藻体に対してイオン液体を添加することで、藻体は短時間で完全溶解させるとともに、PHBを水相に分離回収できるバイオプロセスを構築する。

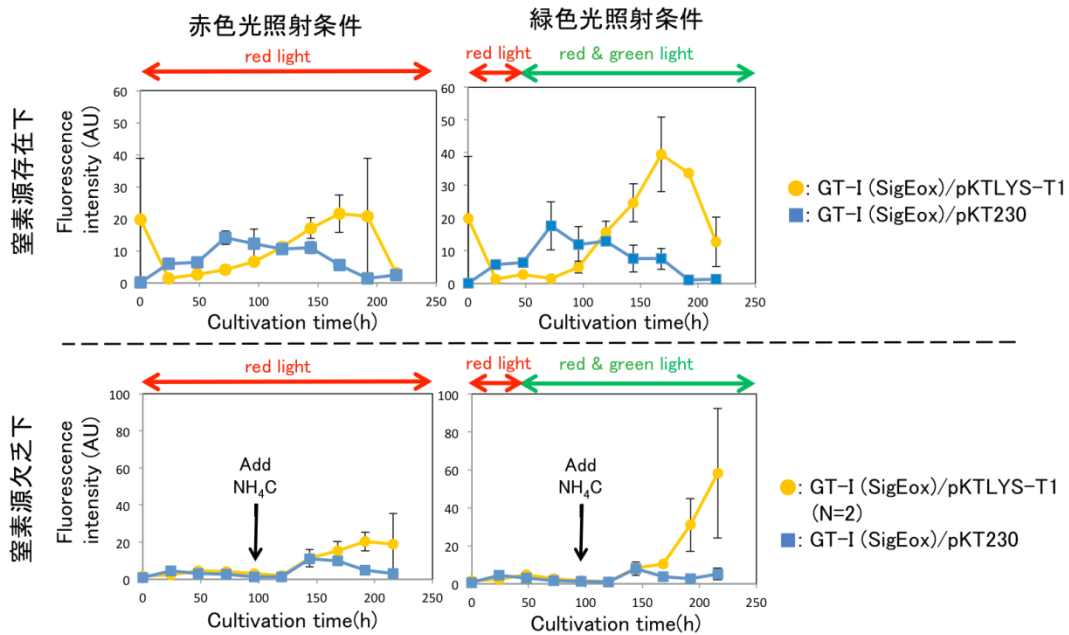


図 16 *Synechocystis* sp. PCC 6803 *sigE* 高発現株における緑色光誘導型溶菌システムへの窒素源の影響

さらに、グリコーゲンの生産・回収を目的としたシアノファクトリの構築を試みた。ここでは、同じく 26 年度から本チームに合流した、埼玉大学 日原准教授が開発したグリコーゲン高生産株の応用を試みた。*Synechocystis* sp. PCC 6803 *cyabrB2* 欠損株は野生株に比べて高いグリコーゲン生産量を示す。そこで同株に対して、前年度までに構築してきた緑色光誘導型溶菌システムの導入を行い、生産されるグリコーゲンを緑色光誘導による溶菌を応用することで、生産物であるグリコーゲンの回収を試みた。その結果、*Synechocystis* sp. PCC 6803 *cyabrB2* 欠損株に緑色光誘導型溶菌システムを導入することで、緑色光照射により、同株が溶菌することが示された。さらに、同株が藻体内に蓄積しているグリコーゲンを緑色光誘導による溶菌により培地中に放出することが示された。この培養上清から回収されるグリコーゲン量は野生株に比べ、緑色光誘導型溶菌システムが導入された *cyabrB2* 欠損株では緑色光照射時に 4 倍以上のグリコーゲンが回収できることが示された (図 17)。

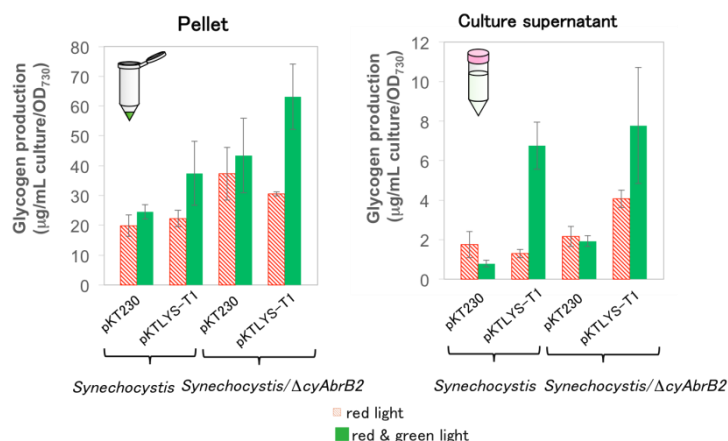


図 17 緑色光誘導型溶菌システムを導入された *Synechocystis* sp. PCC 6803 *cyabrB2* 欠損株におけるグリコーゲンの細胞内における蓄積と、培養上清中に存在するグリコーゲン量
 pKT230: ベクターのみを導入した株 (negative control)
 pKTLYS-T1: 緑色光誘導型溶菌システムを導入した株

そこで、ここで開発した緑色光誘導型溶菌システムが導入された *cyabrB2* 欠損株を用いてグリコーゲン生産とイオン液体によるグリコーゲン回収プロセスを組み合わせさせたシアノファクトリの構築を進めた。

緑色光誘導型溶菌システムが導入された *Synechocystis* sp. PCC 6803 *cyabrB2* 欠損株を培養してグリコーゲンを藻体内に高度に蓄積させた後に、緑色光照射により溶菌状態とし、遠心分離により藻体を回収した。この藻体に対してイオン液体を添加すると、緑色光で溶菌を誘導した藻体は高効率で溶解した(図 18)。

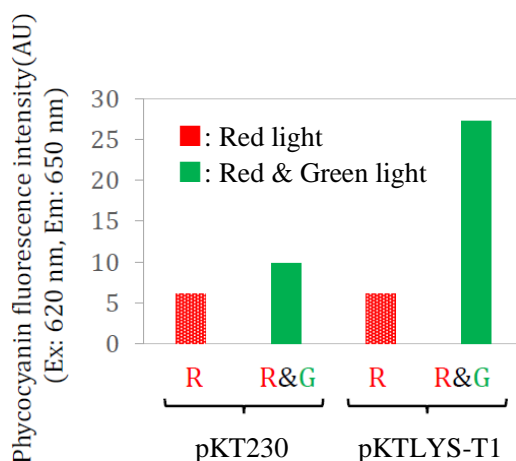


図 18 緑色光誘導型溶菌システムを導入された *Synechocystis* sp. PCC 6803 *cyabrB2* 欠損株のイオン液体による溶菌
 pKT230: ベクターのみを導入した株 (negative control)
 pKTLYS-T1: 緑色光誘導型溶菌システムを導入した株

また、生産されたグリコーゲンは水相に分離回収されるが、この時藻体の溶菌、分離に用いたイオン液体は使用後に回収することで、再利用が可能であった(図 19)。

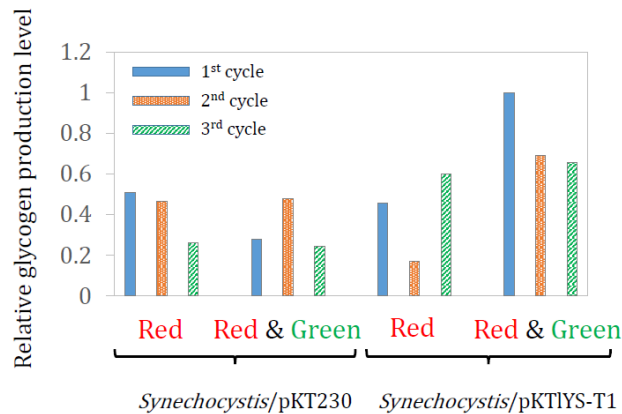


図 19 グリコーゲン回収におけるイオン液体の再利用

さらに、菌体分離後の培地は回収し、再利用を行ったところ、少なくとも3回までは増殖速度等に大きな変化は見られなかった(図 20)。

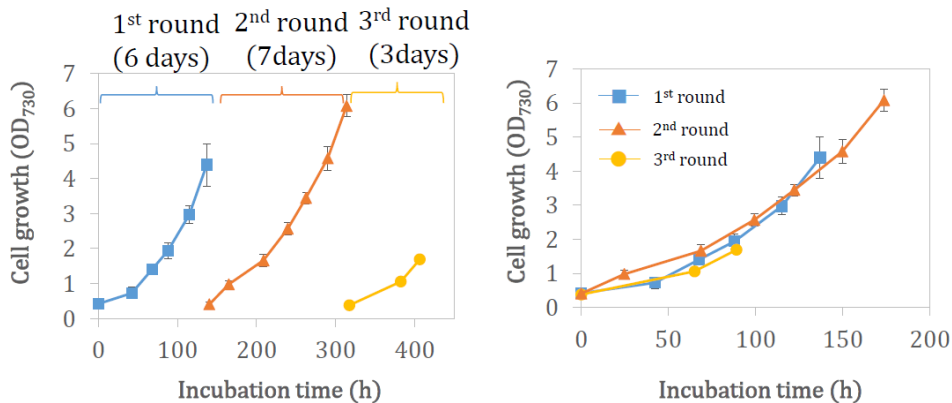


図 20 培養終了後に回収した培地を再利用したときの *Synechocystis* sp. PCC 6803 の増殖

以上のように、藻体回収、溶菌、イオン液体を用いるバイオエネルギー関連化合物回収と培養液のリサイクルが統合された「シアノファクトリ」を構築することができた。

§ 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 30件)

1. Kyoko Fujita, Daigo Kobayashi, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Direct dissolution of wet and saliferous marine microalgae using polar ionic liquids without heating”, *Enzyme Microb Technol*, 52(3), 199-202. 2013 (DOI: 10.1016/j.enzmictec.2012.12.004)
2. Jun Kuwahara, Ryunosuke Ikari, Kenichi Murata, Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Electrocatalytic reduction of oxygen by bilirubin oxidase in hydrophobic ionic liquids containing a small quantity of water”, *Catalysis Today*, 200, 49-53. 2013 (DOI: 10.1016/j.cattod.2012.06.009)
3. Yukinobu Fukaya, Hiroyuki Ohno, “Hydrophobic and Polar Ionic Liquids”, *Phys Chem Chem Phys*, 15(11), 4066-4072. 2013 (DOI: 10.1039/c3cp44214d)
4. Kyoko Fujita, Y. Nikawa, Hiroyuki Ohno, “Cold crystallisation behaviour of

- water molecules in ionic liquids as a screening method to evaluate biocompatibility of the hydrated ionic liquids”, *Chem Commun*, 49, 3257-3259, 2013 (DOI: 10.1039/C3CC39033K)
5. Koichi Abe, Kotone Miyake, Mayumi Nakamura, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, “Engineering of a green - light inducible gene expression system in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, *Microbial Biotechnol*, 7(2), 177-183, 2014 (DOI: 10.1111/1751-7915.12098)
 6. Kotone Miyake, Koichi Abe, Stefano Ferri, Mitsuharu Nakajima, Mayumi Nakamura, Wataru Yoshida, Katsuhiko Kojima, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, “A green-light inducible lytic system for cyanobacterial cells”, *Biotechnol Biofuels*, 7(56), 2014 (DOI:10.1186/1754-6834-7-56)
 7. Tomoko Yoshino, Toru Honda, Masayoshi Tanaka, Tsuyoshi Tanaka, “Draft Genome Sequence of Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain NKBG 15041c”, *Genome announc*, 1(6), e00954-13, 2013 (DOI: 10.1128/genomeA.00954-13)
 8. Koichi Abe, Yuta Sakai, Saki Nakashima, Masataka Araki, Wataru Yoshida, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Design of riboregulators for control of cyanobacterial (*Synechocystis*) protein expression”, *Biotechnol Lett*, 36(2), 287-294, 2013 (DOI 10.1007/s10529-013-1352-x)
 9. Yuta Sakai, Koichi Abe, Saki Nakashima, Wataru Yoshida, Stefano Ferri, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Improving gene regulation ability of small RNAs by scaffold engineering in *Escherichia coli*”, *ACS Synth Biol*, 3(3), 152-162, 2014 (DOI: 10.1021/sb4000959)
 10. Yukinobu Fukaya, Hiroyuki Ohno, “Phosphonium phosphonate-type zwitterion/water mixture showing variable hydrogen bonding ability as a function of temperature”, *Phys Chem Chem Phys*, 15, 14941-14944, 2013 (DOI: 10.1039/C3CP52178H)
 11. Shohei Saita, Yuki Kohno, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Ionic liquids showing phase separation with water prepared by mixing hydrophilic and polar amino acid ionic liquids”, *Chem Commun*, 49, 8988-8990, 2013 (DOI: 10.1039/C3CC45302B)
 12. Yoritsugu Ito, Yuki Kohno, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Design of Phosphonium-Type Zwitterion as an Additive to Improve Saturated Water Content of Phase-Separated Ionic Liquid from Aqueous Phase toward Reversible Extraction of Proteins”, *Int J Mol Sci*, 14(9), 18350-18361, 2013 (DOI:10.3390/ijms140918350)
 13. Yohsuke Nikawa, Kyoko Fujita, Keiichi Noguchi, Hiroyuki Ohno, “2-(Trimethylazaniumyl)ethyl hydrogen phosphate (phosphocholine) monohydrate” *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online*, 70(5), o549, 2014 (DOI:10.1107/S160053681400779X)
 14. Toru Honda, Yue Liang, Daichi Arai, Yasuhito Ito, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, “Draft genome sequence of marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain NKBG042902, which harbors a homogeneous plasmid available for metabolic engineering” *Genome announc*, 2(4), e00704-14, 2014 (DOI: 10.1128/genomeA.00704-14)
 15. Yoshiaki Maeda, Yasuhito Ito, Toru Honda, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, “Inducible expression system for the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain NKBG 15041c” *Int J Hydrogen Energy*, 39(33), 19382-19388, 2014 (DOI:10.1016/j.ijhydene.2014.06.170)
 16. Masamitsu Hanai, Yusuke Sato, Atsuko Miyagi, Maki Kawai-Yamada, Kyoko Tanaka, Yasuko Kaneko, Yoshitaka Nishiyama, Yukako Hihara, “The effects of dark incubation on cellular metabolism of the wild type cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and a mutant lacking the transcriptional regulator

- cyAbrB2" *Life (Basel)*, 4(4), 770-787, 2014 (DOI:10.3390/life4040770)
17. Tomoko Yoshino, Yue Liang, Daichi Arai, Yoshiaki Maeda, Toru Honda, Masaki Muto, Natsumi Kakunaka, Tsuyoshi Tanaka, "Alkane production by the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c possessing the α -olefin biosynthesis pathway" *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(3), 1521-1529, 2015 (DOI:10.1007/s00253-014-6286-2)
 18. Daigo Kobayashi, Kyoko Fujita, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, "A simple recovery process for biodegradable plastics accumulated in microalgae treated with ionic liquids" *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(4), 1647-1653, (DOI : 10.1007/s00253-014-6234-1)
 19. Amr Badary, Koichi Abe, Stefano Ferri, Katsuhiko Kojima, Koji Sode, "The development and characterization of an exogenous green-light regulated gene expression system in marine cyanobacteria" *Mar Biotechnol (NY)*, 17(3), 245-251, 2015 (DOI: 10.1007/s10126-015-9616-1)
 20. Yuta Sakai, Koichi Abe, Saki Nakashima, James J. Ellinger, Stefano Ferri, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, "Scaffold-fused riboregulators for enhanced gene activation in *Synechocystis* sp. PCC 6803" *MicrobiologyOpen*, 4(4), 533-540, 2015 (DOI: 10.1002/mbo3.257)
 21. Taro Kadowaki, Yoshitaka Nishiyama, Toru Hisabori, Yukako Hihara, "Identification of OmpR-family response regulators interacting with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803" *PLoS One*, 10(3), e0119107, 2015 (DOI: 10.1371/journal.pone.0119107)
 22. Yuka Nakaya, Hiroko Iijima, Junko Takanobu, Atsuko Watanabe, Masami Yokota Hirai, Takashi Osanai, "One day of nitrogen starvation reveals the effect of *sigE* and *rre37* overexpression on the expression of genes related to carbon and nitrogen metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803" *J Biosci Bioeng*, 120(2), 128-134, 2015 (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.020.)
 23. Hiroko Iijima, Yuka Nakaya, Ayuko Kuwahara, Masami Yokota Hirai, Takashi Osanai. "Seawater cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 drastically alters amino acid composition and glycogen metabolism" *Front Microbiol*, 6: 326, 2015 (DOI: 10.3389/fmicb.2015.00326.)
 24. Hiroyuki Ohno, Kyoko Fujita, Yuki Kohno, "Is seven the minimum number of water molecules per ion pair for assured biological activity in ionic liquid-water mixtures?" *Phys Chem Chem Phys*, 17, 14454-14460, 2015 (DOI: 10.1039/c5cp00768b)
 25. Mitsuru Abe, Kosuke Kuroda, Hiroyuki Ohno, "Maintenance-free cellulose solvents based on onium hydroxides" *ACS Sustainable Chem Eng*, 3, 1771-1776, 2015 (DOI : 10.1021/acssuschemeng.5b00303)
 26. Ayuko Kuwahara, Satomi Arisaka, Masahiro Takeya, Hiroko Iijima, Masami Yokota Hirai, Takashi Osanai. "Modification of photosynthetic electron transport by overexpression of a circadian-related histidine kinase *hik8* in *Synechocystis* sp. PCC 6803" *Front Microbiol*, 6:1150 2015 (DOI : 10.3389/fmicb.2015.01150)
 27. Stefano Ferri, Mayumi Nakamura, Akiko Ito, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Koji Sode, "Efficient surface-display of autotransporter proteins in cyanobacteria" *Algal Research*, 12, 337-340, 2015 (DOI : 10.1016/j.algal.2015.09.013)
 28. Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Stefano Ferri, Koji Sode, "Development of a light-regulated cell-recovery system for non-photosynthetic bacteria" *Microb Cell Fact*, 15(1):31, 2016 (DOI: 10.1186/s12934-016-0426-6)
 29. Akihito Kawahara, Yusuke Sato, Yujiro Saito, Yasuko Kaneko, Yasushi Takimura, Hiroshi Hagihara, Yukako Hihara, "Free fatty acid production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is enhanced by deletion of the

- cyAbrB2 transcriptional regulator." *J Biotechnol*, 220, 1-11, 2015 (DOI:10.1016/j.jbiotec.2015.12.035)
30. Taro Kadowaki, Ryuta Nagayama, Jens Georg, Yoshitaka Nishiyama, Annegret Wilde, Wolfgang R. Hess, Yukako Hihara "A feed-forward loop consisting of the response regulator RpaB and the small RNA PsrR1 controls light acclimation of photosystem I gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Plant Cell Physiol*, 57, 813-823, 2016 (DOI: 10.1093/pcp/pcw028)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 「微細藻類によるエネルギー生産と事業展開」(竹山春子 監修) 第III編 第6章「シアノファクトリの開発」 小嶋勝博、早出広司 シーエムシー出版、2012
2. 「イオン液体の科学」(イオン液体研究会監修) 3.4「バイオマスを溶解する極性イオン液体の設計」 深谷幸信、大野弘幸 丸善 2012
3. 「高極性イオン液体の機能設計による次世代バイオマスエネルギー生産への挑戦」 深谷幸信、大野弘幸、*Journal of the Vacuum Society of Japan*, 56(3), 97-103, 2013
4. 「海洋バイオマスからのバイオディーゼル燃料生産」 田中剛、吉野知子、武藤正記、*化学と生物*, 51(3), 183-188, 2013
5. 「2030年への挑戦 “藻類を燃料に”」 田中剛、根本理子、吉野知子、*太陽エネルギー*, 39(1), 27-35, 2013
6. 「イオン液体を用いた植物バイオマスエネルギー変換」 大野弘幸、*太陽エネルギー*, 39, 21-25, 21-25, 2013
7. Takashi Osanai, Hiroko Iijima, Masami Yokota Hirai. "Understanding sugar catabolism in unicellular cyanobacteria toward the application in biofuel and biomaterial production" Editors: Yuki Nakamura and Yonghua Li-Beisson. "Lipids in Plant and Algae Development" Publisher: Springer. Berlin, Germany, 2016 (DOI: 10.1007/978-3-319-25979-6)
8. Annegret Wilde, Yukako Hihara, "Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyanobacterial photosynthesis." *Biochim Biophys Acta*, 1857:296-308, 2016 (DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.11.002.)
9. 「塩生植物や微細藻類由来の環境ストレス耐性遺伝子の探索と応用」 山田晃世、*ケミカルエンジニアリング*, 61(2), 20-23, 2016

(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 8件、国際会議 18件)

〈国内〉

1. 早出広司「シアノファクトリ™～海洋シアノバクテリアを用いるバイオ燃料関連化合物生産システムの提案～」日本農芸化学会 2013年度大会、東北大学 川内北キャンパス、2013年3月27日
2. 吉野知子「海洋微生物を活用した環境調和型の有用物質生産」東京農工大学・上智大学 共催シンポジウム、2014年3月11日
3. 小山内崇「ラン藻の転写制御因子を用いた独自の物質生産法の研究開発」14-1 エコマテリアル研究会 東京大学農学部 2014年7月4日
4. 小山内崇「ラン藻の転写と代謝を理解して、物質生産に役立てる」日本植物学会第78回大会 明治大学生田キャンパス 2014年9月13日
5. 小山内崇「ラン藻の糖代謝ダイナミクス改変を基盤としたプラスチック原料の増産」、「藻類バイオエネルギー」領域さきがけ・CREST 合同シンポジウム、新宿NSビル 2014年12月5日
6. 小山内崇「代謝工学を目的としたラン藻の炭素代謝改変法について」第3回代謝工学研究部会シンポジウム、大阪大学、2015年1月20日

7. 中村暢文「微細藻類が生産する有用物質のイオン液体を用いた回収プロセスの構築」第34回広島大学バイオマスイブニングセミナー、広島、2015年9月14日
8. 池袋一典「シアノバクテリアで機能するリボレギュレーターのエンジニアリング」藍藻の分子生物学 2015、かずさアカデミアホール、2015年11月17日

〈国際〉

1. *Koji Sode “The Cyanofactory™ ~ a novel cyanobacterial bioprocess based on the synthetic biology concept”, International Symposium on Biotechnology for Green Growth, Kobe, Japan, 26th October, 2012
2. *Koichi Abe, Kotone Miyake, Mayumi Nakamura, Amr Badary, Wataru Yoshida, Stefano Ferri, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, “A synthetic biology approach to develop a novel marine cyanobacterial bioprocesses -The Cyanofactory™”, 10th International Marine Biotechnology Conference Brisbane, Australia, 11–15th November 2013
3. Koji Sode, “The Cyanofactory™ - A synthetic biology approach to develop a novel marine cyanobacterial bioprocesses”, Scientific Meeting Cyanofactory, Porto, Portugal, 18–20th November 2013
4. Kyoko Fujita, Daigo Kobayashi, Haruki Mokudai, Takuro Nakano, Yukinobu Fukaya, “Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, Ionic liquids for downstream processing in Cyanofactory”, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
5. Koichi Abe, Yuta Sakai, Saki Nakashima, Sumiya Kawai, Ippei Sakamoto, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Riboregulators to control gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
6. Tomoko Yoshino “Kinetic analysis of intracellular molecules in microalgae by *in vivo* cell imaging” Institute for Protein Research (IPR) International Seminar, Osaka, Japan, 24th October 2014
7. *Mitsuru Abe, Sachiko Yamanaka, Kosuke Kuroda, Yukinobu Fukaya, Tatsuhiko Yamada, Hiroyuki Ohno, “Onium hydroxide aqueous solutions: a great solvent for wood biomass dissolution under mild condition in the presence of water” Sci-Mix in Kanazawa 2014 Green Innovative Chemistry, Kanazawa, Japan, 17th December 2014
8. Koji Sode “CyanoFactory Japan: present status and future perspectives” CyanoFactory Scientific Meeting 2014, Ljubljana, Slovenia, 10th December, 2014
9. Koichi Abe “Riboregulators for gene expression control tools in cyanobacteria” CyanoFactory Scientific Meeting 2014, Ljubljana, Slovenia, 10th December, 2014
10. Stefano Ferri “Synthetic biological devices for the Cyanofactory platform” 2nd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March, 2015
11. Tomoko Yoshino “*In vivo* imaging of biomolecules in a living microalga cell using confocal Raman microspectroscopy” 2nd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March, 2015
12. Yukako Hihara “Key transcription factors of light-harvesting and metabolic regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803” 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March, 2014
13. *Koji Sode, “Cyanofactory – a synthetic biology based cyanobacterial bioprocess”, Keynote Lecture, 1st International Conference on Solar Fuels, Uppsala, Sweden, 28th April, 2015
14. Kyoko Fujita, Yukinobu Fukaya, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “A

- simple recovery process for useful materials produced by microalgae using ionic liquids” International conference on frontiers in materials processing, Applications research and technology, India, 15th June, 2015
15. *Kyoko Fujita, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Recovery process for materials accumulated in cyanobacteria treated with ionic liquids” Cyanofactory meeting, Germany, 1st October, 2015
 16. Takashi Osanai, “Cyanobacterial metabolic engineering by genetic manipulation of transcriptional regulators”, The 6th iBioK Asia Symposium, Kobe, Japan, 7th December, 2015
 17. Akiyo Yamada, “Screening of genes responsible for the fast growth in *Synechococcus* sp. NKBG 15041c” 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 8th March 2016
 18. Takashi Osanai, "Increased bioproduction with photosynthetic and metabolic alteration of cyanobacteria" 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 8th March, 2016

② 口頭発表 (国内会議 53 件、国際会議 16 件)

(国内)

1. 中島満晴、小嶋勝博、阿部公一、フェリ ステファノ、早出広司、「合成海洋藍藻バイオプロセス制御を目指した青色光センサーシステムの開発」日本化学会第 92 回春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、2012 年 3 月 28 日
2. フェリ ステファノ、三宅琴音、中島満晴、阿部公一、小嶋勝博、早出広司、「自己溶菌型組み換え藍藻宿主の構築」、日本化学会第 92 回春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、2012 年 3 月 28 日
3. 阿部公一、小芝僚介、中島満晴、小嶋勝博、フェリ ステファノ、早出広司、「海洋藍藻の自己凝集系の開発」、日本化学会第 92 回春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、2012 年 3 月 28 日
4. 池袋一典、荒木将貴、阿部公一、酒井雄太、中島沙記、早出広司、「Riboregulator を用いた自己凝集・溶菌制御系の構築」、日本化学会第 92 回春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、2012 年 3 月 28 日
5. 池袋一典、中島沙記、阿部公一、酒井雄太、荒木将貴、早出広司、「シアノバクテリア中で機能するリボレギュレーターへのデザイン」、日本化学会第 92 回春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、2012 年 3 月 28 日
6. 目代晴紀、深谷幸信、大野弘幸、「室温でポリヒドロキシ酪酸を溶解するイオン液体の開発」、日本化学会第 92 回春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、2012 年 3 月 27 日
7. 新井大地、本多亨、吉野知子、田中剛、「アルカン合成関連遺伝子の導入による海洋藍藻 *Synechococcus* sp. NKBG 15041c 株の炭化水素の生産」、第 64 回 日本生物工学会大会、神戸国際会議場、2012 年 10 月 24 日
8. 中島満晴、小嶋勝博、阿部公一、フェリ ステファノ、早出広司、「キメラ型青色光センサーの藍藻における機能評価」第 64 回 日本生物工学会大会、神戸国際会議場、2012 年 10 月 24 日
9. 三宅琴音、フェリ ステファノ、中島満晴、阿部公一、小嶋勝博、早出広司、「緑色光誘導型自己溶菌型組み換え藍藻宿主の構築」第 64 回 日本生物工学会大会、神戸国際会議場、2012 年 10 月 24 日
10. 酒井雄大、阿部公一、フェリ ステファノ、早出広司、池袋一典、「遺伝的アルゴリズムを適用した ompC プロモーターの改良」第 64 回 日本生物工学会大会、神戸国際会議場、2012 年 10 月 24 日
11. 阿部公一、酒井雄大、中島沙記、荒木将貴、早出広司、池袋一典、「藍藻で機能するリボレギュレーターのデザイン」、第 64 回 日本生物工学会大会、神戸国際会議場、2012 年

10月24日

12. 池袋一典、中島沙記、阿部公一、酒井雄大、荒木将貴、早出広司、「リボレギュレーターによるシアノバクテリアの遺伝子発現制御」、第64回日本生物工学会大会、神戸国際会議場、2012年10月24日
13. 中島満晴、岡野洋人、阿部公一、フェリ ステファノ、小嶋勝博、早出広司、「海洋藍藻 *Synechococcus* sp.由来 LOV ドメインを用いて構築した青色光センサキメラタンパク質の特性評価」、日本化学会第93回春季年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013年3月24日
14. フェリ ステファノ、中村真由美、三宅琴音、小嶋勝博、中島満晴、阿部公一、早出広司、「*Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるオートトランスポーターの光誘導発現」、日本化学会第93回春季年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013年3月24日
15. 三宅琴音、阿部公一、フェリ ステファノ、小嶋勝博、中島満晴、早出広司、「緑色光誘導型自己溶菌藍藻宿主の構築」、日本化学会第93回春季年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013年3月24日
16. 阿部公一、酒井雄大、中島沙記、荒木将貴、早出広司、池袋一典、「RNA 結合蛋白質を利用したリボレギュレータの改良」、日本化学会第93回春季年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013年3月25日
17. 阿部公一、河合純也、酒井雄大、中島沙記、荒木将貴、早出広司、池袋一典、「ループ構造改変によるリボレギュレータの改良」、日本化学会第93回春季年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013年3月25日
18. 藤田恭子、大野弘幸、「コリニウムリン酸二水素を基本構造とする水和イオン液体の解析とタンパク質溶媒としての評価」、第62回高分子討論会、金沢大学、2013年9月11-13日
19. 酒井雄大、阿部公一、中島沙記、荒木将貴、早出広司、池袋一典、「シアノバクテリアを宿主としたリボレギュレーターによる遺伝子発現制御系の開発」、第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館、2013年6月1日
20. 阿部公一、三宅琴音、中村真由美、中島満晴、小嶋勝博、Stefano Ferri、池袋一典、早出広司、「シアノバクテリア由来緑色センシングプロモーターの改良」、第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館、2013年6月1日
21. 徳田彩、木坂暢介、山田晃世、小関良宏、「末端対合アンチセンス法による *Synechococcus* sp. NKBG 15041c のグリコーゲン合成抑制」、第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館 2013年6月1日
22. 中島満晴、小嶋勝博、阿部公一、フェリ ステファノ、早出広司、「光照射により制御する組み換え大腸菌バイオプロセスの開発」、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、2013年9月18-20日
23. 酒井雄大、阿部公一、中島沙記、早出広司、池袋一典、「Hfq 結合配列の改良による small RNA の遺伝子発現制御能の向上」第7回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学、2013年9月27-29日
24. 中島満晴、阿部公一、小嶋勝博、フェリ ステファノ、早出広司「光照射によって制御する大腸菌バイオプロセスの開発」日本化学会第94回春季大会、名古屋大学、2013年3月26日
25. Amr Badary, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Koji Sode, “Prospects in biofuel production: the introduction of green-light-regulated gene expression system in marine cyanobacteria”, 日本化学会第94回春季大会、名古屋大学、2013年3月26日
26. 伊藤彰子、中村真由美、阿部公一、小嶋勝博、フェリ ステファノ、早出広司「Antigen43 を用いる藍藻外表へのタンパク質提示技術の開発」日本化学会第94回春季大会、名古屋大学、2013年3月26日
27. 三宅琴音、関口光、阿部公一、小嶋勝博、フェリ ステファノ、早出広司、「緑色光誘導型

- 藍藻自己溶菌システムの開発」日本化学会第 94 回春季大会、名古屋大学、2013 年 3 月 26 日
28. Yuta Sakai, Koichi Abe, Saki Nakashima, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Scaffold engineering of small RNAs to improve gene regulation ability in *Escherichia coli*”, 日本化学会第 94 回春季大会、名古屋大学、2013 年 3 月 26 日
 29. 阿部公一、坂本一平、河合純也、中島沙記、酒井雄大、早出広司、池袋一典、「*Synechocystis* sp. PCC 6803 において高い遺伝子発現制御能を持つリボレギュレーターへの改良」日本化学会第 94 回春季大会、名古屋大学、2013 年 3 月 26 日
 30. 三宅琴音、関口 光、阿部 公一、小嶋勝博、フェリ ステファノ、早出 広司、「緑色光誘導型自己溶菌組み換え藍藻の開発」、第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、2014 年 6 月 1 日
 31. 阿部公一、酒井雄大、河合純也、坂本一平、早出広司、池袋一典、「RNA 結合タンパク質導入による *Synechocystis* sp. PCC 6803 で機能するリボレギュレーターの改良」、第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、2014 年 6 月 1 日
 32. 酒井雄大、阿部公一、中島 沙記、早出 広司、池袋 一典、「RNA 結合タンパク質 Hfq を利用した *Synechocystis* sp. PCC 6803 内で機能するリボレギュレーターの遺伝子発現制御能の向上」、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学津島キャンパス、2014 年 9 月 11 日
 33. 長井一晃、小関良宏、山田晃世、「*Synechocystis* sp. PCC 6803 の GlgA1 発現抑制株による PHB 生産」、第 56 回日本植物生理学会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015 年 3 月 16 日
 34. 田中崇彬、小関良宏、山田晃世、「*Synechococcus* sp. NKBG 15041c の新規増殖関連遺伝子の探索とキャラクターゼーション」、第 56 回日本植物生理学会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015 年 3 月 16 日
 35. 永田まどか、バダリ・アムル、阿部公一、小嶋勝博、フェリ・ステファノ、早出広司、「海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp.における相同組換え用ベクターの開発」、日本化学会第 95 春季年会、日本大学船橋キャンパス、2015 年 3 月 26 日
 36. 布施早織、阿部公一、エリンガー・ジェームス、小嶋勝博、フェリ・ステファノ、早出広司、「シアノバクテリア緑色光遺伝子発現制御系に及ぼす培養環境の影響」、日本化学会第 95 春季年会、日本大学船橋キャンパス、2015 年 3 月 26 日
 37. 伊藤彰子、中村真由美、阿部公一、小嶋勝博、フェリ・ステファノ、早出広司、「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 繊毛合成系遺伝子の高発現」、日本化学会第 95 春季年会、日本大学船橋キャンパス、2015 年 3 月 26 日
 38. 阿部公一、生野千佳、坂本一平、河合純也、酒井雄太、早出広司、池袋一典、「*Synechocystis* sp. PCC 6803 内における緑色光誘導型リボレギュレーターの特性評価」、日本化学会第 95 春季年会、日本大学船橋キャンパス、2015 年 3 月 26 日
 39. 坂本一平、阿部公一、河合純也、酒井雄大、早出広司、池袋一典、「大腸菌で機能する光誘導型リボレギュレーターシステムの開発」、日本化学会第 95 春季年会、日本大学船橋キャンパス、2015 年 3 月 26 日
 40. 中島満晴、阿部公一、小嶋勝博、フェリ・ステファノ、早出広司、「緑色光遺伝子発現システムの改良と光誘導型大腸菌溶菌システムへの応用」、日本化学会第 95 春季年会、日本大学船橋キャンパス、2015 年 3 月 26 日
 41. 山田晃世、「新奇遺伝子を用いた有用微生物の生育促進と生産性向上をもたらす新しい方法」新技術説明会、JST 東京本部別館、2015 年 6 月 23 日
 42. 佐藤雄介、齋藤裕次郎、日原由香子、「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるスイッチング系による *cyAbrB2* 転写因子の発現制御」、日本植物学会第 78 回大会、明治大学、2014 年 9 月 12 日
 43. 小山内崇、「微細藻類ラン藻を用いた新しい代謝工学手法の開発」、理研と親しむ会 理研横浜 2014 年 7 月 8 日

44. 小山内崇、「アカデミックの研究者、お金のことを考える。」日本植物学会年会 明治大学生田キャンパス 2014年9月14日
45. Takashi Osanai, “Metabolic engineering using regulatory factors in unicellular cyanobacterium”, The German-Japanese Binational Seminar 2015 Harvesting Light: From light to biotechnological products, かんぼの宿(熱海) 日本 2015年3月21日-26日
46. 小山内崇、「ラン藻の転写因子改変による一次代謝と光合成の改変」、日本植物学会年会 新潟県朱鷺メッセ 2015年9月6日
47. 米本恭子、阿部公一、小山内 崇、早出広司「*Synechocystis* sp. PCC 6803 PHB 高生産株への緑色光誘導型溶菌システムの導入と溶菌特性」、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016年3月27日
48. 布施早織、高松祥平、日原由香子、フェリ ステファノ、早出広司「緑色光誘導型溶菌システムが導入された *Synechocystis* sp. PCC 6803 *cyabrB2* 欠損株を用いるグリコーゲン生産」、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016年3月27日
49. 布施早織、阿部公一、レグナー マティアス、早出広司「*Synechocystis* sp. PCC 6803 Olive 変異株における緑色光による遺伝子発現制御」、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016年3月27日
50. 伊藤彰子、永田まどか、中村真由美、阿部公一、小嶋勝博、フェリ ステファノ、早出広司「絨毛関連遺伝子の発現制御によるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の自己凝集」、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016年3月27日
51. 酒井雄太、上野絹子、生野千佳、坂本一平、日原由香子、早出広司、池袋一典「*Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるリボレギュレーターを用いた転写因子 *cyAbrB2* の発現制御」、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016年3月27日
52. Mitsuharu Nakajima, Stefano Ferri, Koji Sode, "The engineering of the green-light sensor protein CcaS derived from *Synechocystis* sp. PCC 6803", 日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016年3月27日
53. 中島満晴、小林俊一、早出広司「改良型緑色光センサタンパク質を用いた海洋性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. NKBG15041c の赤色光による遺伝子発現制御」、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016年3月27日

〈国際〉

1. Mitsuharu Nakajima, Stefano Ferri, Katsuhiko Kojima, Koji Sode “Blue light sensing system the interface device necessary in synthetic cyanobacterial bioprocess”, Biosensors 2012, Cancun, Mexico, 16th May, 2012
2. Mitsuharu Nakajima, Katsuhiko Kojima, Koichi Abe, Stefano Ferri, Koji Sode “The development of blue light sensing system , for marine cyanobacterial process control”, The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kanazawa, Japan, 29 May 2012
3. Kotone Miyake, Stefano Ferri, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Koji Sode “The construction of synthetic marine cyanobacterial host with controllable autolysis”, The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kanazawa, Japan, 29 May 2012
4. Kazunori Ikebukuro, Masataka Araki, Koichi Abe, Yuta Sakai, Saki Nakashima, Koji Sode “Construction of the Autoaggregation and Autolysis System Controlled by Riboregulator”, The 9th Asia-Pacific Marine

- Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 12th July, 2012
5. Koichi Abe, Yuta Sakai, Saki Nakashima, Masataka Araki, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro “Construction of novel RNA tools for controlling synthetic cyanobacterial bioprocess”, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 12th July, 2012
 6. Yuta Sakai, Koichi Abe, Stefano Ferri, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro “Directed evolution of ompC promoter by applying genetic algorithm”, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 12th July, 2012
 7. Saki Nakashima, Koichi Abe, Yuta Sakai, Masataka Araki, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro “Design of Riboregulators that Function in Cyanobacteria”, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 12th July, 2012
 8. Mitsuharu Nakajima, Stefano Ferri, Katsuhiko Kojima and Koji Sode “The development of an artificial signal transduction system for the synthetic cyanobacterial bioprocess by designing blue light sensor”, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 14th July, 2012
 9. Daichi Arai, Toru Honda, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka, “Hydrocarbon Production in *Synechococcus* sp. Strain NKBG 15041c through the Expression of Heterogeneous Alkane Synthesis Genes”, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 14th July, 2012
 10. Kotone Miyake, Stefano Ferri, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, K. Sode “Construction of a Synthetic Marine Cyanobacterial Host with Controllable Autolysis”, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 16th July 2012
 11. Sumiya Kawai, Koichi Abe, Ippei Sakamoto, Yuta Sakai, Saki Nakashima, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Loop-engineering of riboregulator to improve its gene regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803” The Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2014 (APMBC 2014), Taipei Taiwan, 5th May 2014
 12. Stefano Ferri, Kotone Miyake, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, “Green-light-inducible lytic cyanobacteria: A new synthetic biology-based extraction system” The Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2014 (APMBC 2014), Taipei, Taiwan, 5th May 2014
 13. Akiko Ito, Mayumi Nakamura, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Koji Sode, “Development of the cyanobacterial cell-surface protein-display technology” The Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2014 (APMBC 2014), Taipei, Taiwan, 5th May 2014
 14. Koichi Abe, Saki Nakashima, Yuta Sakai, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “A novel RNA based genetic control system for metabolic gene regulation” The 4th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Santa Fe, USA, 16th June 2014
 15. Stefano Ferri, Kotone Miyake, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, “Green-light-inducible lytic cyanobacteria: A new synthetic biology-based extraction system” The 4th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Santa Fe, USA, 17th June 2014
 16. Yuta Sakai, Ippei Sakamoto, Chika Shono, Sumiya Kawai, Koichi Abe, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “RNA-based gene regulators for controlling gene expression in cyanobacteria” The International chemical congress of pacific basin societies 2015 (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 19th December, 2015

③ポスター発表 (国内会議 38 件、国際会議 80 件)

(国内)

1. 小林大悟、藤田恭子、中村暢文、大野弘幸、「含塩含水状態の微細藻類の溶解に有用

- なイオン液体の設計」、第 2 回イオン液体討論会、キャンパスプラザ京都、2011 年 12 月 17 日
2. 小林大悟、藤田恭子、中村暢文、大野弘幸、「極性イオン液体を用いた含塩含水状態の微細藻類の直接溶解」、日本化学会第 92 回春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、2012 年 3 月 27 日
 3. 深谷幸信、中野拓朗、服部裕允、大野弘幸、「構成イオンの改変による極性イオン液体の水親和性の制御」、第 61 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2012 年 5 月 30 日
 4. 深谷幸信、中野拓朗、目代晴紀、大野弘幸、「新規カルボン酸型疎水性高極性イオン液体の設計及び各種生体高分子の分離抽出」、第 61 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2012 年 5 月 30 日
 5. 小林大悟、藤田恭子、中村暢文、大野弘幸、「海洋性藻体内で生産される生分解性プラスチックの単離を目的とする高極性イオン液体の評価」、第 3 回イオン液体討論会、沖縄県男女共同参画センター「ていりる」、2012 年 12 月 7 日
 6. 目代晴紀、深谷幸信、中村暢文、大野弘幸、「含水条件下でポリヒドロキシ酪酸を溶解できるイオン液体の開発」、第 3 回イオン液体討論会、沖縄県男女共同参画センター「ていりる」、2012 年 12 月 7 日
 7. 中野拓朗、深谷幸信、中村暢文、大野弘幸、「高極性イオン液体と水の親和性に及ぼすカチオン構造の影響」、第 3 回イオン液体討論会、沖縄県男女共同参画センター「ていりる」、2012 年 12 月 7 日
 8. 山田晃世、木坂暢介、徳田彩、小関良宏、「グリコーゲンシンターゼ発現抑制ラン藻の開発」、第 54 回日本植物生理学会、岡山大学津島キャンパス、2013 年 3 月 23 日
 9. 目代晴紀、深谷幸信、中村暢文、大野弘幸、「LCST 型の相転移を示すイオン液体/水混合系を用いたポリヒドロキシ酪酸の溶解」、第 62 回高分子討論会、金沢大学、2013 年 9 月 11–13 日
 10. 税田祥平、大野弘幸、「アミノ酸イオン液体/水混合系の相状態の制御」、第 62 回高分子討論会、金沢大学、2013 年 9 月 11–13 日
 11. 税田祥平、「混合アミノ酸イオン液体と水の相挙動に及ぼす脱水和の効果」、第 36 回溶液化学シンポジウム、北海道大学、2013 年 10 月 9–11 日
 12. 中野拓朗、深谷幸信、藤田恭子、中村暢文、大野弘幸、「セルロース系バイオマスの処理へ向けた疎水性かつ高極性なイオン液体の作製」、第 4 回イオン液体討論会、慶応大学、2013 年、11 月 20–21 日
 13. 中村真由美、伊藤彰子、中島満晴、小嶋勝博、阿部公一、フェリ ステファノ、早出広司、「藍藻における大腸菌オートトランスポータの発現」、酵素工学会第 70 回講演会、東京大学、2013 年 10 月 25 日
 14. 三宅琴音、関口光、阿部公一、吉田亘、小嶋勝博、FERRI Stefano、早出広司、「緑色光で制御可能な自己溶菌型藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の構築」、酵素工学会第 70 回講演会、東京大学、2013 年 10 月 25 日
 15. Amr Badary, Koichi Abe, Mitsuharu Nakajima, Stefano Ferri, Katsuhiko Kojima, Tomoko Yoshino, Koji Sode, “Development of an artificial signal transduction system for green-light-regulated gene expression in marine cyanobacteria”, 第 65 回日本生物工学会大会、広島国際会議場、2013 年 9 月 18–20 日
 16. 三宅琴音、フェリ ステファノ、中島満晴、阿部公一、小嶋勝博、早出広司、「光で制御可能な自己溶菌型組み換え *Synechocystis* sp. PCC 6803 の構築」、第 65 回日本生物工学会大会、広島国際会議場、2013 年 9 月 18–20 日
 17. 中村真由美、三宅琴音、阿部公一、吉田亘、小嶋勝博、FERRI Stefano、早出広司、「オートトランスポータータンパク質を用いた自己凝集型組み換え藍藻の構築」、第 65 回日本生物工学会大会、広島国際会議場、2013 年 9 月 18–20 日

18. 阿部 公一、河合 純也、酒井雄大、中島沙記、早出広司、池袋一典、「藍藻で機能するリボレギュレータの改変」、第 65 回日本生物工学会大会広島国際会議場、2013 年 9 月 18-20 日
19. 中島沙記、阿部公一、酒井雄大、早出広司、池袋一典、「リボレギュレーターの光制御」、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学、2013 年 9 月 27-29 日
20. 河合純也、酒井雄大、中島沙記、阿部公一、早出広司、池袋一典、「ループ領域改変によるリボレギュレーターの遺伝子発現能の向上」、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学、2013 年 9 月 27-29 日
21. 木坂暢介、徳田彩、李俊錫、山田晃世、小関良宏、「海洋ラン藻の末端対合アンチセンス法による glycogen synthase I の発現制御」、第 31 回日本植物細胞分子生物学会、北海道大学(高等教育推進機構)、2013 年 9 月 10-12 日
22. 山田晃世、杉山純哉、小関良宏、「*Synechococcus* sp. NKBG 15041c のストマチンのキャラクタリゼーション」、第 55 回日本植物生理学会、富山大学五福キャンパス、2014 年 3 月 18 日
23. 佐藤雄介、齋藤裕次郎、日原由香子、「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるスイッチング系による cyAbrB2 転写因子の発現制御」、第5回日本光合成学会、近畿大学、2014 年 5 月 30 日
24. 伊藤 康仁、本多 亨、梁 越、前田 義昌、田中 剛、吉野 知子、「海洋藍藻 *Synechococcus* sp. NKBG 15041c 株におけるテトラサイクリン発現誘導システムの構築」、第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、2014 年 5 月 31 日
25. 小山内崇, “Metabolic engineering using transcriptional regulators of cyanobacteria to achieve “Green Innovation”.”, 第 4 回理研 Genomic Sciences Research Complex (GSC) セタミーティング、理研横浜、2014 年 7 月 11 日
26. 小山内崇、「転写因子 NtcA を用いたラン藻の増殖速度と一次代謝の改変」、日本生物工学会年会、札幌コンベンションセンター、2014 年 9 月 10 日
27. 小山内崇, “Genetic engineering of transcriptional regulators boosting biology and biotechnology of cyanobacterial metabolisms”, 内藤コンファレンス、シャトラーゼ札幌、2014 年 10 月 7 日・10 日
28. 田中崇彬、小関良宏、山田晃世、「*Synechococcus* sp. NKBG 15041c の新規増殖関連遺伝子の探索とキャラクタリゼーション」、日本植物生理学会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015 年 3 月 16 日
29. 長井一晃、小関良宏、山田晃世、「*Synechocystis* sp. PCC 6803 の *glgA* 発現抑制株による PHB 生産」、日本植物生理学会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015 年 3 月 16 日
30. 角中夏実、梁越、伊藤康仁、本多亨、吉野知子、田中剛、「海洋藍藻 *Synechococcus* sp. NKBG 15041c 株へのアルカン合成関連遺伝子の導入とアルカン合成に関わる脂肪酸化合物の解析」、第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会、東京海洋大学 品川キャンパス、2015 年 5 月 30 日
31. 田中崇彬、長井一晃、小関良宏、山田晃世、「*Synechococcus* sp. NKBG 15041c 由来の新規増殖タンパク質の精製と探索と機能解析」、日本細胞分子生物学会、東京大学弥生キャンパス、2015 年 8 月 12 日
32. 高松祥平、中島満晴、阿部公一、早出広司 「緑色光誘導型溶菌系が導入された *Synechocystis* sp. PCC 6803 の培養特性」、酵素工学会第 74 回講演会、東京大学山上会館、2015 年 10 月 16 日
33. 小林俊一、中島満晴、阿部公一、早出広司「大腸菌における新規光制御バイオプロセスの開発」、酵素工学会第 74 回講演会、東京大学山上会館、2015 年 10 月 16 日
34. 米本恭子、布施早織、阿部公一、早出広司「*Synechocystis* sp.由来緑色光遺伝子発現システムへの環境要因の影響」、酵素工学会第 74 回講演会、東京大学山上会館、2015 年 10 月 16 日

35. 酒井雄大、早出広司、池袋一典「二次構造予測に基づく small RNA の機能改良法の開発」、第 67 回日本生物工学会大会、城山観光ホテル、2015 年 10 月 27 日
36. 酒井雄大、佐藤雄介、日原由香子、早出広司、池袋一典「*Synechocystis* sp. PCC 6803 由来 RpaB の発現を抑制する人工 small RNA の開発」、藍藻の分子生物学 2015、かずさアカデミアホール、2015 年 11 月 16 日
37. 田中崇彬、小関良宏、山田晃世、「*Synechococcus* sp. NKBG15041c 由来の新規増殖関連遺伝子の解析」、日本植物生理学会、岩手大学上田キャンパス、2016 年 3 月 18 日
38. 長井一晃、小関良宏、山田晃世、「NAD キナーゼを過剰発現した *Synechocystis* sp. PCC 6803 による PHB 生産」、日本植物生理学会、岩手大学上田キャンパス、2016 年 3 月 18 日

〈国際〉

1. K. Abe, Y. Sakai, K. Sode, K. Ikebukuro “Riboregulator for controlling synthetic cyanobacterial bioprocess”, Biosensors 2012, Cancun, Mexico, 16th May, 2012
2. M. Araki, K. Abe, Y. Sakai, S. Nakashima, K. Sode, K. Ikebukuro “Construction of the autoaggregation and autolysis system controlled by riboregulator”, The 2nd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, San Diego, USA, 12th June, 2012
3. S. Nakashima, K. Abe, Y. Sakai, M. Araki, K. Sode, K. Ikebukuro “Design of riboregulators that function in cyanobacteria”, The 2nd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, San Diego, USA, 12th June, 2012
4. K. Miyake, S. Ferri, M. Nakajima, K. Abe, K. Kojima, K. Sode “Construction of a synthetic marine cyanobacterial host with controllable autolysis”, The 2nd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, San Diego, USA, 13th June, 2012
5. H. Mokudai, Y. Fukaya, N. Nakamura, and H. Ohno “Synthesis of ionic liquids as solvents for poly(3-hydroxybutyrate) under mild condition”, PRiME2012, Honolulu, USA, 9th October, 2012
6. Y. Fukaya, T. Nakano, N. Nakamura, and H. Ohno “Effect of ion structures on phase behaviors of hydrophobic and polar ionic liquids after mixing with water”, PRiME2012, Honolulu, USA, 9th October, 2012
7. D. Kobayashi, K. Fujita, N. Nakamura, and H. Ohno “Direct dissolution of wet and saliferous microalgae with ionic liquids and isolation of poly(3-hydroxybutyrate)”, PRiME2012, Honolulu, USA, 10th October, 2012
8. D. Arai, T. Honda, T. Yoshino, T. Matsunaga, T. Tanaka, “Hydrocarbon Production in *Synechococcus* sp. Strain NKBG 15041c through the Expression of Heterogeneous Alkane Synthesis Genes”, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 14th July, 2012
9. Shohei Saita, Hiroyuki Ohno, “LCST-type phase transition of ionic liquid/water mixture enables comparison of hydrophilicity of added ions” 5th International Congress on Ionic Liquids (COIL 5), Vilamoura, Portugal, 21–25th April 2013
10. Daigo Kobayashi, Kyoko Fujita, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Separation of target products accumulated in microalgae with ionic liquids” 5th International Congress on Ionic Liquids (COIL 5), Vilamoura, Portugal, 21–25th April 2013
11. Kyoko Fujita, Yohsuke Nikawa, Hiroyuki Ohno, “Cold crystallization behavior of co-existed water molecules observed in dihydrogen phosphate analogs” 5th International Congress on Ionic Liquids (COIL 5), Vilamoura, Portugal, 21–25th April 2013
12. Kyoko Fujita, Hiroyuki Ohno, “G-quadruplex formation in hydrated ionic

- liquids” 5th International Congress on Ionic Liquids (COIL 5), Vilamoura, Portugal, 21–25th April 2013
13. Yuta Sakai, Koichi Abe, Saki Nakashima, Masataka Araki, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Engineering Hfq binding sequence to control gene regulation of bacterial small RNA”, The Sixth International Meeting on Synthetic Biology, London, UK, 9–11th July 2013
 14. Koichi ABE, Yuta Sakai, Saki Nakashima, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Engineering of riboregulators for cyanobacteria”, The Sixth International Meeting on Synthetic Biology, London, UK, 9–11th July 2013
 15. Yuta Sakai, Koichi Abe, Saki Nakashima, Wataru Yoshida, Stefano Ferri, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Improving gene regulation ability of bacterial small RNAs by scaffold engineering”, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 神奈川大学, 13–15th November 2013
 16. Shohei Saita, Hiroyuki Ohno, “Evaluation of hydrophilicity of ions using by lower critical solution temperature-type phase transition of ionic liquid/water mixture”, Post-symposium on Ionic Liquids From Science to Green Chemical Applications, Tokyo, Japan, 13th July 2013
 17. Kyoko Fujita, Hiroyuki Ohno, Hydration state of choline dihydrogen phosphate and analogous ionic liquids, Post-symposium on Ionic Liquids From Science to Green Chemical Applications, Tokyo, Japan, 13th July 2013
 18. Yasuhito Ito, Daichi Arai, Toru Honda, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka. Metabolic engineering for alkane synthesis in *Synechococcus* sp. NKBG 15041c. Asia BioHydrogen & BioEnergy 2013, Osaka, Japan, 22–24th November 2013
 19. Haruki Mokudai, Yukinobu Fukaya, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, Development of ionic liquid/water biphasic system to harvest poly(3-hydroxybutyrate) accumulated in microalgae, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 20. Takuro Nakano, Yukinobu Fukaya, Kyoko Fujita, Nobuhumi Nakamura, and Hiroyuki Ohno, Design of hydrophobic and polar ionic liquids as extraction solvents for cellulose, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 21. Daigo Kobayashi, Kyoko Fujita, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, Separation of poly(3-hydroxybutyrate) accumulated in microalgae from other cellular components with ionic liquids, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 22. Shohei Saita, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, Amino acid ionic liquid mixtures showing reversible and temperature-sensitive phase separation behavior with water, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 23. Mitsuru Abe, Akira Konno, Hiroyuki Ohno, Extraction of component polymers from wet wood biomass without heating, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 24. Yasuhito Ito, Toru Honda, Daichi Arai, Yoshiaki Maeda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, Construction of tetracycline inducible system in marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c. 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 25. Kazuaki Nagai, Akiyo Yamada, Yu Tokuta, Youhei Kisaka, Koji Sode, Yoshihiro Ozeki, Enhancement of PHB production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 that suppress the expression of glycogen synthase, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 26. Junya Sugiyama, Akiyo Yamada, Koji Sode, Yoshihiro Ozeki, Enhancement of salt tolerance in PHB producing cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803,

- 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
27. Mayumi Nakamura, Akiko Ito, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Koji Sode, Expression of autotransporter protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 28. Kotone Miyake, Stefano Ferri, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Koji Sode, Development of green-light-inducible lytic system for *Synechocystis* sp. PCC 6803, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 29. Amr Badary, Koichi Abe, Stefano Ferri, Katsuhiko Kojima, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, A marine cyanobacterium with an engineered green-light regulation system, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 30. Mitsuharu Nakajima, Stefano Ferri, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Koji Sode, Development of a light regulated *Escherichia coli* precipitation system, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 31. Sumiya Kawai, Ippei Sakamoto, Saki Nakashima, Yuta Sakai, Koichi Abe, Koji Sode,
 32. Kazunori Ikebukuro, Loop engineering of riboregulator for strict gene regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 33. Saki Nakashima, Koichi Abe, Yuta Sakai, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, Photo-counter system based on light-regulated riboregulator, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 34. Yuta Sakai, Koichi Abe, Saki Nakashima, Stefano Ferri, Koji Sode & Kazunori Ikebukuro, Scaffold-engineered riboregulator and its function in *Synechocystis* sp. PCC 6803 expressing *Escherichia coli*-derived Hfq, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 35. Koichi Abe, Kotone Miyake, Mayumi Nakamura, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, Engineering of green-light inducible gene expression system in *Synechocystis* sp. PCC 6803, 1st International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March 2014
 36. Mitsuru Abe, Kosuke Kuroda, Hiroyuki Ohno, "Functional evaluation of a series of onium hydroxides on cellulose dissolution in the presence of water in related to the chemical shift of ¹³C NMR signals of cellobiose", Gordon Research Conference on Ionic Liquids, Sunday river resort newry, ME, USA, 8th Augst 2014
 37. Amr Badary, Koichi Abe, Stefano Ferri, Katsuhiko Kojima, Kazunori Ikebukuro, Koji Sode, "The development of a green-light-regulated gene expression system for marine cyanobacteria" The 4th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Santa Fe, USA, 16th June 2014
 38. Mayumi Nakamura, Akiko Ito, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Koji Sode, "Surface-display technology for cyanobacteria" The 4th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Santa Fe, USA, 17th June 2014
 39. Yuta Sakai, Koichi Abe, Saki Nakashima, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, "Engineering the scaffold region of natural and artificial small RNAs to enhance their gene regulation abilities" RNA 2014: The Nineteenth Annual Meeting of the RNA Society, Quebec, Canada, 4th June 2014
 40. Yuta Sakai, Koichi Abe, Koji Sode and Kazunori Ikebukuro, "Engineering artificial small RNAs to control post-transcriptional gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803" The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kitakyushu, Japan, 5th November 2014

41. Koichi Abe, Chika Shono, Ippei Sakamoto, Sumiya Kawai, Yuta Sakai, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, "Characterization of a green-light inducible riboregulator system in *Synechocystis* sp. PCC 6803" 2nd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 5th March 2015
42. Ippei Sakamoto, Koichi Abe, Sumiya Kawai, Yuta Sakai, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, "Development of light regulated riboregulator for *Escherichia coli*", 2nd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 5th March 2015
43. Sumiya Kawai, Yuta Sakai, Koichi Abe, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, "Development of gene-activation system under dark condition in *Synechocystis* sp. PCC 6803", 2nd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 5th March 2015
44. Yuta Sakai, Koichi Abe, Yusuke Sato, Yukako Hihara, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, "Engineering artificial small RNA to knockdown response regulator RpaB in *Synechocystis* sp. PCC 6803", 2nd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 5th March 2015
45. Yasuhito Ito, Yue Liang, Natsumi Kakunaka, Yoshiaki Maeda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, "Metabolic engineering of alkane biosynthesis pathway in a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c, an α -olefin producer", 2nd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March, 2015
46. Natsumi Kakunaka, Yue Liang, Yasuhito Ito, Yoshiaki Maeda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, "Analysis of fatty alcohol synthesis pathway in a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c", 2nd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 6th March, 2015
47. Kyoko Fujita, Daigo Kobayashi, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, "Recovery process for biodegradable plastics accumulated in cyanobacteria treated with ionic liquid, 6th international congress on ionic liquids", jeju, Korea, 18th June 2015
48. Kyoko Fujita, Daigo Kobayashi, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, "Effectiveness of ionic liquids for recovery process of useful substrates accumulated in cyanobacteria", The International chemical congress of pacific basin societies 2015 (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 18th December, 2015
49. Akiko Ito, Mayumi Nakamura, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Koji Sode, "Control the self-aggregation of cyanobacteria by regulating pilus gene" The International chemical congress of pacific basin societies 2015 (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 19th December, 2015
50. Chika Shono, Koichi Abe, Ippei Sakamoto, Kinuko Ueno, Yuta Sakai, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, "Engineering of a wide dynamic range green-light regulation system for gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803" The International chemical congress of pacific basin societies 2015 (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 19th December, 2015
51. Yasuhito Ito, Yue Liang, Natsumi Kakunaka, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, "Alkane production by genetically engineered marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c" The International chemical congress of pacific basin societies 2015 (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 19th December, 2015
52. Yoshiaki Maeda, Yasuhito Ito, Toru Honda, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, "Construction of inducible expression system for a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c", 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
53. Madoka Nagata, Amr M. Badary, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Koji Sode, "Construction of integration vectors to introduce green light regulated gene expression for marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG15041c", 3rd

- International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
54. Takaaki Tanaka, Yoshihiro Ozeki, Akiyo Yamada, “Characterization of a growth related gene in *Synechococcus* sp. NKBG15041c”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 55. Sayumi Shioya, Madoka Nagata, Akiyo Yamada, Yoshihiro Ozeki, Koji Sode, “Development of salt-tolerance *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain by integrating a gene from marine cyanobacteria”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 56. Natsumi Ikari, Koji Sode, Yoshihiro Ozeki, Akiyo Yamada, “Enhancement of sodium tolerance in PHB producing cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 57. Yuta Sakai, Yusuke Sato, Yukako Hihara, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Knockdown of *rpaB* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by using an artificial small RNA”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 58. Taro Kadowaki, Ryuta Nagayama, Jens Georg, Yoshitaka Nishiyama, Annegret Wilde, Wolfgang R. Hess, Yukako Hihara, “A feed-forward loop consisting of the response regulator RpaB and the small RNA PsrR1 controls light acclimation of photosystem I gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 59. Yuta Sakai, Kinuko Ueno, Chika Shono, Ippei Sakamoto, Yukako Hihara, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Regulation of endogenous gene *cyAbrB2* expression using riboregulator in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 60. Ippei Sakamoto, Chika Shono, Yuta Sakai, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Development of photo-counter system using riboregulator in *Escherichia coli*”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 61. Chika Shono, Koichi Abe, Ippei Sakamoto, Kinuko Ueno, Yuta Sakai, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, “Improvement of a green-light regulation system for gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 62. Mitsuharu Nakajima Stefano Ferri, Koji Sode, “The engineering of the green-light sensor protein CcaS derived from *Synechocystis* sp. PCC 6803”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 63. Eunice Ferreira, Mitsuharu Nakajima, Shunichi Kobayashi, Koji Sode, “Development of a red-light sensing system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 employing engineered CcaS”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 64. Shunichi Kobayashi, Mitsuharu Nakajima, Koji Sode, “Characterization of a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c introduced the engineered light sensor histidine kinase CcaS”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 65. Masahiro Takeya, Takashi Osanai, “Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Synechocystis* sp. PCC6803 has unusual allosteric properties, being insensitive to feedback inhibition”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 66. Satomi Arisaka and Takashi Osanai, “Change of photosynthesis by *rpaA* overexpression in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
 67. Dwi Ariyanti, Koji Sode, “Characterization of complementary chromatic adaptation (CCA) in *Synechococcus* sp. PCC 7335”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016

68. Amr M. Badary, Koji Sode, “Potential of *Synechococcus* sp. NKBG15041c towards glycogen production”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
69. Kazuaki Nagai, Shota Isobe, Yoshihiro Ozeki, Koji Sode, Akiyo Yamada, “PHB production in *Synechococcus* sp. NKBG15041c”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
70. Kazuaki Nagai, Shota Isobe, Yoshihiro Ozeki, Koji Sode, Akiyo Yamada, “Improved PHB production in *Synechocystis* sp. PCC6803 by overexpression of NAD kinase”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
71. Yasuhito Ito, Yue Liang, Natsumi Kakunaka, Yoshiaki Maeda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, “Fatty alcohol metabolism in a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
72. Natsumi Kakunaka, Tomoko Yoshino, Yue Liang, Daichi Arai, Yoshiaki Maeda, Toru Honda, Masaki Muto, Tsuyoshi Tanaka, “Metabolic engineering of a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 15041c for alkane production”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
73. Akiko Ito, Mayumi Nakamura, Mitsuharu Nakajima, Koichi Abe, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Koji Sode, “Regulation of PilA1 in cyanobacteria by green-light sensing system”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
74. Saori Fuse, Koichi Abe, Matthias Roegner, Koji Sode, “Green-light regulated gene expression in olive mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
75. Shouhei Takamatsu, Saori Fuse, Yukako Hihara, Koji Sode, “Semi-continuous production of glycogen using mutant *Synechocystis* sp. PCC 6803 transformed with green-light inducible lytic system”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
76. Kyoko Fujita, Masako Shimakura, Nobuhumi Nakamura, Hiroyuki Ohno, “Ionic Liquids and Water Biphasic System for Recovery Process of Glycogen Accumulated in Cyanobacteria”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
77. Takashi Akiba, Mizuki Shimo, Sachiko Yamanaka, Akiko Tsurumaki, Hiroyuki Ohno, “Required factors for ionic liquids to dissolve lignin under mild condition”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
78. Daiki Sato, Mitsuru Abe, Kosuke Kuroda, Hiroyuki Ohno, “Design and evaluation of hydrophobic ionic liquids to dissolve cellulose”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
79. Eri Yamaki, Kazuma Ikeda, Kyoko Fujita, Hiroyuki Ohno, Nobuhumi Nakamura, “Direct oxidation of cellulose dissolved by ionic liquids using a platina-loaded titanium dioxide electrode”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016
80. Kazuma Ikeda, Kyoko Fujita, Hiroyuki Ohno, Nobuhumi Nakamura, “Effect of surface charge and hydrophobicity of chemically modified cytochrome *c* on distribution behavior in the ionic liquid / buffer biphasic system”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016

(4)知財出願

①国内出願 (2件)

1. 「遺伝子発現の制御方法、目的物質の製造方法、および、それらに用いるDNA配列、発現ベクター、並びに、シアノバクテリア」、発明者:阿部公一、早出広司、出願人:国立大学法人東京農工大学、出願日:2013年5月31日、出願番号:特願2013-115822
2. 「新規ストレス耐性遺伝子」、発明者:山田晃世、小関良宏、早出広司、田中崇彬、杉山純哉、出願人:国立大学法人東京農工大学、出願日:2014年8月20日、出願番号:特願2014-167667→出願日:2015年8月19日、出願番号:特願2015-161736(国内優先権制度を利用して、出願内容の補充)

②海外出願 (1件)

1. 「遺伝子発現の制御方法、目的物質の製造方法、および、それらに用いるDNA配列、発現ベクター、並びに、シアノバクテリア」、発明者:阿部公一、早出広司、出願人:国立大学法人東京農工大学、出願日:2014年5月27日、出願番号:PCT/JP2014/064017(特願2013-115822の優先権出願)

(5)受賞・報道等

①受賞

1. Best Student Award First Prize: The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (Kochi, Japan), Daichi Arai, 16th July, 2012
2. 学生講演賞、酒井雄大、日本化学会第94回春季大会、名古屋大学、2013年3月26日
3. Student poster award、Yasuhito Ito, Asia BioHydrogen & BioEnergy 23th November 2013
4. Young Researcher Travel Award, Yuta Sakai, The Sixth International Meeting on Synthetic Biology, 7th, July 2013
5. ISNAC Outstanding Poster Award in 2013, Yuta Sakai, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 15th November 2013
6. RNA2014 Travel fellowship, Yuta Sakai, RNA 2014: The Nineteenth Annual Meeting of the RNA Society, Quebec (Canada), 3rd June 2014
7. Poster award, Satomi Arisaka, 3rd International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, 7th March 2016

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 日経産業新聞「植物の増殖促進 熱や塩に耐性」、2015年6月1日
2. プレス発表「光誘導による微生物回収技術の開発に成功～光制御型バイオプロセスの構築をめざして～」、東京農工大学、JST共同、2016年2月12日
(シアノバクテリアの緑色光センシング機能を大腸菌に組み込み、緑色光を照射して細胞凝集タンパク質 Antigen43を大腸菌の表層に発現させることで、大腸菌を自己凝集させ、容易に菌体を回収することに成功した。)

(6)成果展開事例

①社会還元的な展開活動

- 招待講演:小山内崇「光合成微細藻類によるバイオエネルギー・バイオマテリアル生産」時代を刷新する会、衆議院議員第一会館、2016年2月18日
- 本プロジェクトおよび研究成果について、インターネット(URL: <http://www.tuat.ac.jp/~cyano/>)で公開し、一般に情報提供している。

§ 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
2011年8月3日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	17人	研究進捗報告のためのミーティング
2011年9月5日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	15人	研究進捗報告のためのミーティング
2011年11月2日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	15人	研究進捗報告のためのミーティング
2011年12月7日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	16人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年5月2日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	15人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年6月6日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	15人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年11月21日	フランス原子力・代替エネルギー庁 ライフサイエンス局長 見学	東京農工大学	11人	研究や今後の連携についての意見交換
2012年11月21日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	15人	研究進捗報告のためのミーティング
2012年12月17日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	16人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年7月17日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	7人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年9月4日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	7人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年10月2日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	9人	研究進捗報告のためのミーティング
2013年12月20日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	7人	研究進捗報告のためのミーティング
2014年3月6,7日	1st International Workshop of Cyanofactory	東京農工大学	86人	EC FP7のCyanofactoryチームとの研究交流
2014年5月2日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	10人	研究進捗報告のためのミーティング
2014年11月19日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	14人	研究進捗報告のためのミーティング
2014年12月26日	チーム内ミーティング(非公開)	東京農工大学	6人	研究進捗報告のためのミーティング
2015年3月5,6日	2nd International Workshop of Cyanofactory	東京農工大学	85人	EC FP7のCyanofactoryチームとの研究交流
2016年3月7,8日	3rd International Workshop of Cyanofactory	東京農工大学	85人	EC FP7のCyanofactoryチームとの研究交流

§6 最後に

本研究では、海洋シアノバクテリアの有する優れたバイオ燃料関連化合物生産能力に注目し、バイオ燃料関連化合物の生合成ならびにバイオプロセスを人工的に高度に制御し、かつ藻体からの当該化合物の回収プロセスまで一貫してデザインした「シアノファクトリ」を開発することを目的としてきた。その結果として、汎用性の高い、高度な機能制御が行える海洋合成シアノバクテリアホスト細胞が開発され、人工情報伝達系設計による合成生物学のコンセプトに基づく新しい生物工学の基盤技術が形成されることを目指してきた。このように、極めて独創的で高度な技術集約が求められる研究テーマを提案したが、チーム一丸となって、中核となる技術開発はほぼ目標を達成することができたと自負している。本研究は東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門の教員を中心として構成された研究チームによって遂行された。チーム構成員がそれぞれ独自の研究的な特徴を有しており、研究の進め方も異なる中、かつ絶妙なハーモニーの中で研究が進められてきた。これは物理的に同じ組織で教育研究に携わっているメンバから構成される研究チームの最大の利点が活用された結果と考えている。チーム内の研究グループの個々の目標の達成度や目標を達成した結果の社会的インパクトの差はあったものの、投稿論文への情報発信をはじめとした学術的な貢献は十分に果たしたと信じている。現時点での投稿論文数やその質はまだ満足いく状態ではないが、今年度の研究の仕上がり状態が極めて良好であることから、このあと数年の中で、継続して質の高い学術論文が公開されていくものと確信している。その一方で、本研究課題の特徴である、異種の技術を統合することで得られる一つの研究成果を学術論文にふさわしい内容として公開するためには時間を要することを認識した。また、学術論文の投稿においては研究倫理規定を遵守し、それぞれの論文の著者を吟味し、かつその内容を再三にわたりチェックした状態にて投稿しており、決して研究不正がないことも、当たり前ではあるが、付言したい。一方、本研究成果は極めて汎用性の高い、プラットフォーム技術を提案したことであるが、現時点での達成レベルにおいて、生産物の産業上・市場の位置づけから、産業界との距離が存在することは否めない。これから、具体的な生産物をこのプラットフォームに載せていくことで、産業界との距離を縮め、本研究成果を社会に還元していきたい。

本研究成果は本研究チームメンバ、学生諸氏の日夜に渡る努力がなければ決して達成できるものではなかった。チームメンバ全体に対して感謝の意を表したい。

最後に、本研究は研究総轄の松永先生、領域アドバイザーの諸先生方のご助言と忍耐強いご理解とご指導のもとで推進できたことが、この成果につながったと信じております。心より、感謝申し上げます。さらに、研究支援をいただいた JST 側の職員の皆様の親身なご援助に厚く御礼申し上げます。