

# 研究報告書

## 「高増殖性微細藻の合成を目指した微細藻代謝フラックス制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 蓮沼 誠久

### 1. 研究のねらい

ラン藻や微細藻をバイオエネルギー生産系として利用するためには、増殖の遅さと細胞密度の低さ、光合成産物の生産効率の低さ、光合成産物からエネルギー物質への変換効率の低さ、を解決することが不可欠である。本研究では、メタボロミクスや代謝フラックス観測技術を核とする網羅的代謝解析システムを構築し、第一に増殖、第二に糖質エネルギー生産を制御する代謝メカニズムの解明を目指した。さらには、有用藻合成のための代謝改変戦略を立案し、高増殖能・高生産能を有する藻株を取得することにより、本システムの有用性を立証することとした。本研究では遺伝子組換え技術が確立されたラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いた。

藻株の生産性を向上させるための手段としては、遺伝子組換えを用いた酵素活性の増強/阻害により、物質代謝系を促進させることを思いつく。しかしながら、これまでの研究で、大幅な増殖能の向上や物質生産能の向上に至ることはなかった。その理由として、物質代謝系が、細胞増殖に必要な様々な代謝産物を適切な配分で生み出すためのネットワークを形成し、中間代謝物質を配分する速度を厳密に調節していることが挙げられる。生物の代謝系を人為的に改変し、目的の形質を付与するためには、物質代謝の流れ(フラックス)を理解し、フラックスを律速する要因を的確に制御する必要がある。しかしながら、ラン藻や微細藻で、代謝ネットワークを形成する中間代謝物質の動的な変動を観測した例は無く、律速要因を同定することができなかった。その理由としては、中間代謝物質が微量で不安定であり、なおかつ極性が高いために従来の分析手法での定量が困難であったことが挙げられる。

そこで本研究では、ラン藻の中核代謝に位置する中間代謝物質を一斉に分析する、メタボロミクス技術を確認することとした。次に、合成・分解を繰り返す中間代謝物質のターンオーバーを観測するための、in vivo  $^{13}\text{C}$  標識技術を確認し、これらを組み合わせることで、ネットワークレベルでの代謝フラックス観測が可能な、動的代謝プロファイリング技術を開発することとした。光合成は、光強度や  $\text{CO}_2$  濃度等の外的環境に左右される。本研究では、培養環境により光合成に摂動を与え、物質代謝の変化を動的代謝プロファイリング技術で解析することで、増殖や物質生産の律速因子を特定することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

光合成代謝能力の強化は、藻類の増殖性、物質生産性を向上させる最も有効な手段の一つであり、炭酸同化速度の促進は重要な課題である。なかでも Rubisco 等による  $\text{CO}_2$  固定反応に始まり、代謝産物(糖質、タンパク質、脂質等)の生産にいたる物質代謝経路の改変は藻類の生産性の向上に欠かせない課題である。しかしながら、藻類では代謝物レベルの知見は

乏しく、生合成される代謝物の種類や量(代謝プロファイル)については限られた情報しか得られていない。ましてや *in vivo* の代謝反応速度については未知である。したがって、代謝フラックスを制御する酵素反応は不明である。その最大の理由として、中間代謝物質の細胞内蓄積量や生合成速度が実測されていないことが挙げられる。

本研究では、メタボローム解析技術を用いて中間代謝物質を網羅的に定量するとともに、ラン藻特有の代謝フラックスを実測可能なシステムを構築することに成功した。定常的に光合成するラン藻細胞に、炭素流入の基点である  $\text{CO}_2$  に同位体標識を施した  $^{13}\text{CO}_2$  を取り込ませて中間代謝産物を同位体標識し、 $^{13}\text{C}$  標識率の経時変化を観測することにより、合成・分解を繰り返す中間代謝物質のターンオーバー速度を定量化することに成功した。*In vivo*  $^{13}\text{C}$  標識法をメタボローム解析技術と組み合わせることにより、中間代謝物のターンオーバーを網羅的に解析することが可能となり、代謝ネットワークの定量的理解が可能となった。動的代謝プロファイリング技術は炭酸同化速度を直接観測できる手法であり、光合成能の評価において極めて有用であることを示した。

ラン藻の増殖速度は光強度や  $\text{CO}_2$  濃度、窒素源濃度等の影響を受ける。本研究では、培養環境の変動により細胞増殖に摂動を与え、その際の物質代謝の変化を解析した。その結果、細胞増殖と関連のある、代謝物質を見出すことに成功した。また、ラン藻は糖質エネルギーとして有用なプラットフォーム化合物であるグリコーゲンを蓄積するが、増殖と細胞内グリコーゲン含有量は必ずしも相関しない。例えば、グリコーゲンを高蓄積させるためには、細胞を窒素源欠乏条件に追い込むことが効果的である。そこで本研究では、ラン藻の窒素代謝にも着目し、培地中の窒素源濃度が細胞増殖やグリコーゲン生産に及ぼす影響を調べることで、グリコーゲンを高生産する方法を代謝工学の観点から明らかにした。

## (2) 詳細

### ① ラン藻動的代謝プロファイリング技術の開発

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 に最適化したメタボロミクス技術を確立し、質量分析装置を用いて水溶性一次代謝物(糖リン酸, 糖ヌクレオチド, 有機酸, アミノ酸, 補酵素等)の蓄積量を網羅的に定量するシステムを構築した。また、 $^{13}\text{CO}_2$  を用いた *in vivo* 安定同位体標識法を開発し、中間代謝物質の  $^{13}\text{C}$  標識率を経時的に観測することによりターンオーバー速度を定量化することに成功した(図1)。メタボロミクスと *in vivo*  $^{13}\text{C}$  標識法を組み合わせることにより、細胞内の炭素代謝フローを観測可能な動的代謝プロファイリング技術を開発した。本技術を用いて、窒素源制限下における *Synechocystis* sp. PCC6803 の代謝変動を観測し、グルコース 1 リン酸が ADP-グルコースに変換される代謝反応がグリコ

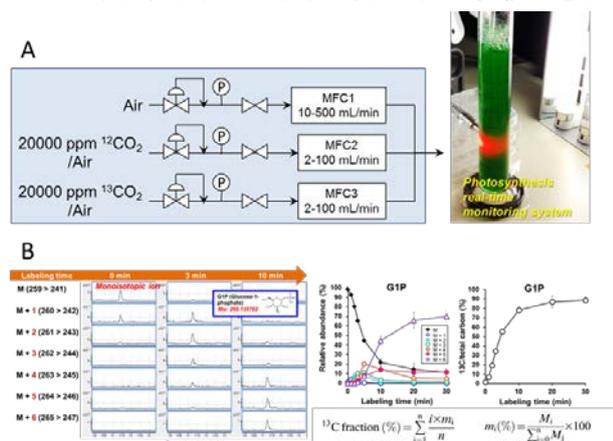


図1 *in vivo*  $^{13}\text{C}$  標識システム(A)と、グルコース1リン酸のターンオーバー観測結果(B)

ーゲン生合成経路の律速段階であることを実験的に初めて確かめた。また、炭素原子の分配を理解することにより、グリコーゲンを構成する炭素骨格がタンパク質の分解産物によることを明らかとした。

## ② ラン藻動的代謝プロファイリング技術を用いた炭素代謝制御機構の解析

十分な光照度条件下において、*Synechocystis* sp. PCC6803 の増殖は CO<sub>2</sub> 濃度と正の相関を示す。本研究では、細胞への CO<sub>2</sub> 流入量を増大させることで炭素の供給を満たしていき、それに

応じてターンオーバー速度を増加させない代謝物質を捉えることにより炭素フローの律速点を探索することとした。①で開発した動的代謝プロファイリング技術を用いて、CO<sub>2</sub> 流入量とターンオーバー速度の関係を解析したところ、還元的ペントースリン酸回路、糖リン酸代謝経路の中間代謝物質が CO<sub>2</sub> 流入量依存的なターンオーバー速度の増加を示したのに対し、ピルビン酸のターンオーバー速度が CO<sub>2</sub> 流入量非依

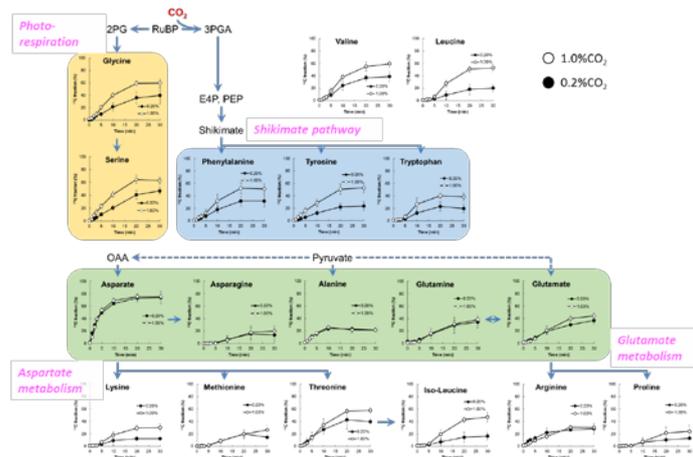


図2 0.2%および1.0% CO<sub>2</sub> 条件下における <sup>13</sup>C 標識率の経時変化

存的であることを見出した。また、ピルビン酸を前駆体とする

アミノ酸のターンオーバー速度も CO<sub>2</sub> 流入量依存的であることが明らかとなり(図2)、ピルビン酸を基質とする代謝反応が炭素フローのボトルネックとなっている可能性が示唆された。DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、CO<sub>2</sub> 濃度の増大に伴う CCM 遺伝子の発現誘導とともに、ピルビン酸代謝関連遺伝子の発現抑制が確認され、動的代謝解析を裏付ける結果が得られた。

## ③ 遺伝子工学的手法による高増殖性ラン藻の作出とバイオエネルギー生産

光合成電子伝達系で酸素の光還元を触媒するタンパク質を高蓄積させることにより、高い細胞増殖能と高い糖質エネルギー生産能を向上させた株を作出することに成功した(図3)。1% CO<sub>2</sub>, 100 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 条件下で培養した藻体の動的代謝プロファイリングを行ったところ、還元的ペントースリン酸回路や有機酸生合成経路の中間代謝物質のターンオーバー速度が形質転換体で増加していることが明

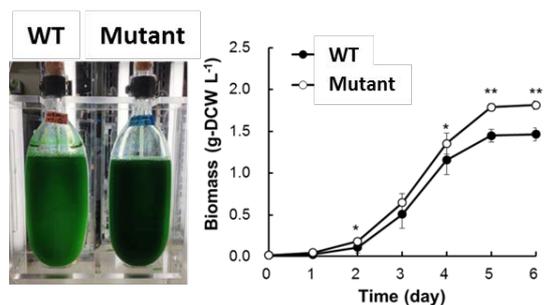


図3 野生株と形質転換株の藻体密度の比較

らかとなった。従来、藻類では二酸化炭素の同化を直接観測することが不可能であったが、本研究は炭素同化を観測するだけでなく、その速度を定量化することで光合成速度を評価することを可能にした世界で初めての例である。本研究を通して代謝プロファイリング技術の有用性を実証することができた。

### 3. 今後の展開

本研究により、ラン藻の細胞内代謝を網羅的に観測するだけでなく、代謝変動を動的に捉えることが可能となり、代謝物の合成・分解や炭素の分配に関する情報を取得することが可能になった。また、動的代謝プロファイリング技術は光合成能の評価において有用な手法であることを明らかとした。速度論的な代謝情報の取得は代謝ネットワークの制御に関連する因子の推定に有効であり、取得した情報を基にさらなる光合成能の向上が期待できる。また、遺伝子リソースが豊富で、形質転換技術が整備されたラン藻は合成生物学的研究の実践に優れたホストであり、今後は、バイオ燃料や化学品原料など様々な物質生産への応用が期待できる。一方で、動的代謝プロファイリング技術は株や種を選ばないため、緑藻や珪藻等への適用も可能である。近年、耕作地の限界と将来的な水資源の枯渇を克服するため、水生バイオマス利用への期待が高まっている。今後は、藻類の代謝制御機構の解明をさらに進めるとともに、様々な水生バイオマスを有効利用する工学的技術開発を展開していきたいと考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本研究では、ラン藻の細胞内代謝を網羅的に観測するだけでなく、代謝変動を動的に捉えることができ、炭素の分配に関する情報を取得することが可能な、新規代謝解析システム、「動的代謝プロファイリング技術」を構築することができた。本技術を用いて、細胞増殖時にボトルネックとなる炭素同化反応を見出すことに成功し、グリコーゲン生合成の律速反応を同定することができた。また、遺伝子工学的手法により、高増殖性とグリコーゲン高生産性を両立する藻株を作出することに成功し、動的代謝プロファイリング技術を用いることで組換え株の炭酸同化能の向上を観測することができた。本研究を通して、動的代謝プロファイリング技術が光合成能の評価において有用であり、合理的な代謝改変を実現するための革新的な解析ツールであることを示すことができた。当初の研究目標を達成することができた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

微細藻の生体システムを制御する物質代謝機構を精密に解析できる新規代謝解析手法の開発により、増殖性を決定する因子を特定し、これを強化することで微細藻由来のエネルギー生産の向上を目指す研究を行っている。3年の研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、特に、動的代謝プロファイリング技術については、更なる進展を期待する。特許出願と論文作成などの業績においても満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、実用化に向けた産官学の共同研究開発などを積極的に推進し、研究成果の社会還元に向けて邁進してほしい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Hasunuma T, Kikuyama F, Matsuda M, Aikawa S, Izumi Y, Kondo A. Dynamic metabolic profiling of cyanobacteria glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *Journal of Experimental Botany*. 2013, 64, 2943–2954.
2. Izumi Y, Aikawa S, Matsuda F, Hasunuma T, Kondo A. Aqueous size-exclusion chromatographic method for the quantification of cyanobacterial native glycogen. *Journal of Chromatography B*. 2013, 930, 90–97.
3. Joseph A, Aikawa S, Sasaki K, Teramura H, Hasunuma T, Matsuda F, Osanai T, Hirai MY, Kondo A. Rre37 stimulates accumulation of 2-oxoglutarate 1 and glycogen under nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters*. 2014, 588, 466–471.
4. Joseph A, Aikawa S, Sasaki K, Matsuda F, Hasunuma T, Kondo A. Increased biomass production and glycogen accumulation in *apcE* gene deleted *Synechocystis* sp. PCC 6803. *AMB Express*. In press
5. Aikawa S, Izumi Y, Matsuda F, Hasunuma T, Chang JS, Kondo A. Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresource Technology*. 2012, 108, 211–215
6. Aikawa S, Joseph A, Yamada R, Izumi Y, Yamagishi T, Matsuda F, Kawai H, Chang JS, Hasunuma T, Kondo A. Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. *Energy and Environmental Science*. 2013, 6, 1844–1849.

### (2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 近藤昭彦, 蓮沼誠久, 三宅親弘  
発明の名称: 微細藻の生育機能を増強する方法  
出 願 人: 国立大学法人神戸大学  
出 願 日: 2013/10/8  
出 願 番 号: 特願 2013-211446

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 蓮沼誠久, ラン藻動的代謝プロファイリング技術の開発と応用, ラン藻の分子生物学 2013, かずさ DNA 研究所, 2013/11/22–23
2. 蓮沼誠久, in vivo <sup>13</sup>C 標識法によるラン藻動的代謝プロファイリング技術の開発, 第 28 回つくば藻類・プロティストフォーラム, 筑波大学, 2013/10/28
3. 蓮沼誠久, メタボローム解析による次世代バイオ燃料生産のための微細藻代謝改変戦略の導出, 微細藻類研究会 2013, 基礎生物学研究所, 2013/6/13–14
4. 蓮沼誠久, シアノバクテリアのシステムバイオロジー解析とバイオリファイナリーへの応用, 日本光合成学会若手の会 第 6 回セミナー, 名古屋大学, 2013/6/1

5. Tomohisa Hasunuma, Development of microalgal cell factories based on systems biology approach, 1<sup>st</sup> Korea-Japan Microalgae Symposium, Taejon, Korea, 2013/10/10-12
6. 蓮沼誠久, 微細藻バイオリファイナリーに資する動的代謝プロファイリング解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム「第二世代バイオ燃料研究の潮流と最先端オミクス解析の活用による新展開」, 東北大学, 2013/3/26
7. Tomohisa Hasunuma, Metabolic profiling analysis of *Synechocystis* sp. PCC6803 cultivated under nitrogen depleted condition, 日本化学会第 92 春季年会 JST さきがけ四領域国際シンポジウム, 東京, 2012/3/26-27

#### 受賞

1. バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究奨励賞

#### 著作物

1. 蓮沼誠久, リサイクルバイオテクノロジーの最前線, 第 1 編, 第 1 章, 微細藻類・シアノバクテリアからのバイオエタノール生産, シーエムシー出版, 57-65 (2013)
2. 蓮沼誠久, 近藤昭彦, 藻類ハンドブック, 第 3 章, 第 5 節 3, システムバイオロジー技術, エヌティーエス, 535-540 (2012)
3. 蓮沼誠久, 近藤昭彦, 微細藻類によるエネルギー生産と事業展望, 第 17 章, バイオリファイナリーへの微細藻類の展開, シーエムシー出版, 137-143 (2012)

#### 総説

1. 蓮沼誠久, 藍川晋平, 和泉自泰, 近藤昭彦, 微細藻類によるバイオリファイナリー, 生物工学会誌, 89(4), 181-183 (2011)