

研 究 報 告 書

「糸状性シアノバクテリアを用いた細胞間分業による効率的バイオアルコール生産」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 得平 茂樹

1. 研究のねらい

大腸菌や酵母などの微生物を用いて、糖を原料に様々なアルコールを生産させるプロセスが開発されている。アルコールはガソリン添加物あるいは代換物としてのみならず、様々な化成品の原料として利用可能であり、化石燃料の使用量削減に大きく貢献すると期待されている。微生物を用いたアルコール生産プロセスでは、植物バイオマスを分解して得られる糖を原料として用いる。したがって、植物バイオマスの生産、分解、そして微生物によるアルコールへの転換といった複数のステップが必要となり、生産コストを押し上げている。

遺伝子操作が容易で、オミクスデータが充実しているシアノバクテリアは、光エネルギーを利用した二酸化炭素のバイオ燃料への直接転換を実現する微細藻類として注目されている。しかし、微細藻類によるバイオ燃料生産プロセスは、生産性が低く実用化には至っていない。私はその原因の一つが、これまで利用されてきた微細藻類が全て単細胞性である点にあると考えた。単細胞性の微細藻類では、光合成反応、各種生体構成物質の生合成、環境応答、そして増殖、分裂といった全ての生体プロセスを一つの細胞が行う必要があり、その上でバイオ燃料を生産している。そのため、代謝系とその調節システムが非常に複雑になっている。現在バイオマス資源として利用されている植物では、デンプンや油脂などの生産に機能分化した器官を形成することで、効率的な生産を実現している。したがって、微細藻類においてもバイオ燃料生産に特殊化した細胞を作り出すことができれば、生産の効率化が期待できる。数百の細胞が一列につながった糸状性のシアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 (アナベナ) は、機能分化した細胞ヘテロシストを形成して窒素固定を行う。ヘテロシストは光合成能や増殖、分裂能を失っており、隣接した栄養細胞から受け取った糖を利用して窒素固定によりアミノ酸を生産している。つまり、光合成や細胞増殖は栄養細胞が分担し、ヘテロシストはアミノ酸生産に特殊化している。そこで本研究では、ヘテロシストを代謝工学によりアルコール生産細胞へと作り換えることを目指す。光合成、増殖を担う細胞とアルコール生産を行う細胞とを分けることで代謝の効率化を図り、二酸化炭素を直接バイオ燃料へと効率的に変換する技術を開発する。

2. 研究成果

(1) 概要

ヘテロシストは糸状性のシアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 (アナベナ) が形成する分化細胞である。ヘテロシストは窒素固定に特殊化した細胞であり、光合成を行わない。隣接した栄養細胞が光合成で作出した糖を受け取り、その糖を利用して窒素固定を行い、アミノ酸を生産している。つまり、栄養細胞とヘテロシストは、光合成と窒素固定を細胞間で分業する

ことで効率的な物質生産を実現している。本研究ではヘテロシスト特異的な代謝工学により、光合成や増殖と物質生産の場を分離し、シアノバクテリアによる物質生産の新たな可能性を示すことを目指した。

DNA マイクロアレイ解析により同定したヘテロシスト特異的に発現するプロモーターを利用して、ヘテロシストにおいてエタノール生産経路を発現させることに成功した。その株では、ヘテロシストが形成される条件においてエタノールが生産されることを明らかにした。さらに、エタノール生産性を向上させるため、ヘテロシストでの代謝改変を行った。その結果、ヘテロシストの糖異化活性を増強することで、エタノール生産量を増加させることができることが示された。また、ヘテロシストの代謝改変により生産性が向上した株においては、栄養細胞での炭素固定を増加させることでさらに生産性が向上することも明らかとなった。したがって、ヘテロシストと栄養細胞それぞれ独自の代謝改変を組み合わせることで、生産性に対する相乗効果が期待できる。ヘテロシストはアナベナの生育に必須の細胞ではないため、自由な代謝デザインが可能である。生育・増殖と切り離されたヘテロシストを物質生産の場として利用することで、シアノバクテリアによる物質生産の可能性が大きく広がると期待できる。

(2) 詳細

(1) ヘテロシストにおけるアルコール生産系の構築

ヘテロシスト特異的な遺伝子発現制御技術を開発するためには、ヘテロシストのみで働くプロモーターを取得する必要がある。ヘテロシストで働いている遺伝子を網羅的に同定するため、まず DNA マイクロアレイ解析を行った。ヘテロシストと栄養細胞からなる糸状体から、ヘテロシストのみを回収し、そこから RNA を抽出した。そして、DNA マイクロアレイにより糸状体全体と単離ヘテロシストでの遺伝子発現プロファイルを比較解析した。その結果、ヘテロシスト特異的に発現していると思われる遺伝子を多数同定することに成功した(5. 主な研究成果リスト(1)–4)。それらの遺伝子に関して、5' -RACE 法により転写開始点を決定し、プロモーター領域を同定した。以上の研究により得られたプロモーター領域をクローニングし、アルコール合成経路や糖代謝系などの遺伝子をヘテロシストにおいて高発現させるためのベクターを作製した。

ヘテロシストにおいてエタノールを生産させるため、エタノール生産菌である *Zymomonas mobilis* のエタノール合成経路を構成する 2 個の酵素、ピルビン酸デカルボキシラーゼ (*pdc*) とアルコールデヒドロゲナーゼ (*adhA*) をヘテロシスト特異的に発現させた。*Z. mobilis* の *pdc* 遺伝子とシアノバクテリア *Synechocystis* PCC 6803 の *adhA* をヘテロシスト高発現プロモーター PhupS の下流にクローニングした。これらのコンストラクトをアナベナに導入し、形質転換体を得る事に成功した。アルコール合成経路を導入したアナベナを培養し、ヘテロシスト分化を誘導した後、培地中のエタノールをガスクロマトグラフにより検出したところ、エタノールを検出することができた。したがって、ヘテロシストにおいてエタノールを生産するアナベナを作り出すことに成功した。

(2) ヘテロシスト特異的代謝改変によるアルコール生産性の向上

ヘテロシストにおけるエタノール生産性を向上させるために、ヘテロシストにおける糖代謝活

性の強化を行った。ヘテロシストにおいては、スクロースを解糖系で代謝することでエネルギーと炭素骨格が供給されている。そこで、スクロース分解酵素であるインベルターゼをコードする *invA*, *invB* 遺伝子、さらに解糖系を活性化する転写因子をコードする *sigE* 遺伝子をヘテロシストで過剰発現させ、糖代謝の活性化を試みた。ヘテロシスト特異的に高い活性を示す *nifB* プロモーターからこれら 3 個の遺伝子を発現するコンストラクトを作製し、染色体上のニュートラルサイトに導入することでヘテロシスト内での発現量を増加させた。それぞれの株におけるエタノール生産性を評価したところ、全ての株で生産性の増加が見られたが、特に *invB* 過剰発現株は高いエタノール生産性を示し、元の株のおよそ 2 倍のエタノールを生産した。以上のように、ヘテロシスト内での糖代謝を活性化することで、エタノール生産性を向上させることに成功した。エタノールはピルビン酸を出発物質に作られる。糖代謝の活性化によりピルビン酸合成量が増加したことが、エタノール生産量の増加につながったと考えられる。ヘテロシストにおいては、アラニンを経由してピルビン酸に変換するアラニンデヒドロゲナーゼ(*ald*)が高発現することが知られている。そこで、*ald* の発現増加のエタノール生産への効果を評価した。その結果、*ald* 発現増加株においても、エタノール生産量がおよそ 30%増加した。ヘテロシスト内のピルビン酸合成量を増加させることが、エタノール生産性の向上につながる事が明らかとなった。

アナベナを使った代謝改変では、栄養細胞とヘテロシストでそれぞれ異なる代謝改変を施すことができるのが特色である。そこで、ヘテロシストにおける糖代謝の活性化と同時に、栄養細胞におけるスクロース合成の活性化に取り組んだ。ヘテロシストは光合成を行わないため、隣接した栄養細胞から光合成により合成されたスクロースを受け取り、窒素固定に利用している。栄養細胞でのスクロース合成量を増加させることで、ヘテロシストが利用できるスクロースが増え、さらにヘテロシストでのスクロース代謝が活性化すると期待できる。アナベナは塩ストレスによりスクロースを適合溶質として蓄積することが知られている。そこで、塩ストレス条件下でのスクロース合成を制御するメカニズムの解明に取り組んだ。その結果、転写因子 *OrrA* がスクロース合成系の遺伝子発現を制御していることを明らかにした(5. 主な研究成果リスト(1)-2)。さらに、*orrA* 遺伝子の過剰発現株では、スクロース合成系の遺伝子の発現が上昇し、細胞内のスクロース量が増加することが示された。*orrA* 過剰発現株を用いて、上記のヘテロシストにおける糖代謝改変を行うことで、エタノール生産性向上への相乗効果が期待できる。

(3)ヘテロシスト分化の制御機構

上記のようにヘテロシストを利用した物質生産系の構築に成功したが、その利用をさらに進めるためにはヘテロシスト分化や糖代謝系の制御に関する分子レベルでの理解を深める必要がある。本研究では、スクロース合成系だけでなく、ペントースリン酸経路を構成する遺伝子の発現制御の分子機構を明らかにした。また、ヘテロシスト分化の制御に関しても、新たに RNA ポリメラーゼのシグマ因子である *SigC* が重要な役割を果たすことを見いだした(5. 主な研究成果リスト(1)-1)。さらに、ヘテロシスト内を嫌気的な環境にし、窒素固定酵素ニトロゲナーゼの発現誘導を制御する転写因子を同定することにも成功している。これらの研究成果は、ヘテロシストにおけるさらなる代謝改変や生産の場である細胞数の調節など、生産の効

率化につながると期待できる。

3. 今後の展開

本研究では、シアノバクテリアの分化細胞であるヘテロシストを用いて、光合成とバイオ燃料生産の場を分離することに成功した。ヘテロシストは増殖・分裂が停止した細胞であり、生存に必須の細胞ではない。そのため、その代謝系の改変には制約が無く、バイオ燃料生産の反応場としての利用が容易である。本研究でも行った代謝改変に留まらず、合成生物学的手法を用いた全く新規の代謝系を構築することも可能な細胞として期待できる。また、代謝系の酵素には酸素感受性が高いものが多く知られており、酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアを利用した物質生産の一つの課題となっている。しかし、ヘテロシストは、隣接した細胞で光合成が行われていても細胞内を嫌氣的に保つことができる。ヘテロシストは、単細胞性のシアノバクテリアでは実現が難しい、嫌氣的な環境を必要とする代謝経路による物質生産を可能にする細胞として期待できる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、アナベナのヘテロシスト特異的な代謝工学により、エタノールを生産させることに成功した。さらに糖代謝系の改変により、生産性を向上させることにも成功した。また、基礎的な面でも、アナベナの糖代謝調節機構の解明、ヘテロシスト分化制御機構の解明につながる複数の成果を挙げた。研究は順調に進み、当初の研究目的は概ね達成することができたと思う。微細藻類による二酸化炭素からのバイオ燃料生産に対する社会全体の期待は増している。本研究の成果は、ヘテロシストという生存に必須ではない細胞を利用することで、単細胞性の微細藻類では難しい合成生物学的な代謝デザインによる物質生産にアナベナを利用して実現できる可能性を示している。酸素発生型の光合成を行う微細藻類が作り出す嫌氣的な細胞という特徴もあわせ、微細藻類での生産が通常では難しい物質の生産にはヘテロシストの利用が特に有効であると思う。

(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)

(研究総括)

研究は順調に進展し、当初の目的は概ね達成できたと評価する。ヘテロシストの代謝工学によりエタノール生産能を付与し、さらに生産性を向上させることにも成功している。シアノバクテリアによる物質生産の報告は多くあるが、窒素固定型のシアノバクテリアであるアナベナを利用し、さらに細胞特異的な代謝工学を行った例は無く、研究の独自性は高い。しかし、エタノールの生産性という面では、改善の余地があり、本研究を工業的なエタノール生産に発展させるためには課題は多い。ヘテロシストによる物質生産には、嫌氣的細胞内環境などの他の微細藻類にはない特徴があり、その特徴をより活かすことができる物質の生産に取り組むことで、今後の研究が大きく展開する可能性がある。得平研究者は本さがけ研究の成果が認め

られ、研究期間中に首都大学東京に准教授として着任した。また、本研究の成果を活かし、今後は当領域のCREST研究に分担者として参加する予定であり、研究者としても着実にステップアップしている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ehira, S., Miyazaki, S. (2015) Regulation of genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by a group 2 sigma factor SigC. *Life* **5**:587-603.
2. Ehira, S., Kimura, S., Miyazaki, S., Ohmori, M. (2014) Sucrose synthesis in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 is controlled by the two-component response regulator OrrA. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:5672-5679.
3. Ehira, S., Ohmori, M. (2014) NrrA directly regulates expression of the *fraF* gene and antisense RNAs for *fraE* in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* **160**:844-850.
4. Ehira, S. (2013) Transcriptional regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Russ. J. Plant Physiol.* **60**:443-452.
5. Ehira, S., Ohmori, M. (2012) The redox-sensing transcriptional regulator RexT controls expression of thioredoxin A2 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **287**:40433-40440.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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)

招待講演

「Regulation of glycogen catabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120」 Physiology and Biotechnology of Microalgae, Moscow, Russia, Oct. 2012

招待講演

「多細胞性シアノバクテリアを用いた細胞間分業によるバイオ燃料生産」 広島大学サステナブル科学シンポジウム、広島、2012 年 11 月

日本ゲノム微生物学会 第 5 回研究奨励賞 (平成 24 年 3 月)

第 3 回日本光合成学会大会 ポスター賞 (平成 24 年 6 月)

中央大学学術研究奨励賞 (平成 25 年 3 月)