

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「ラン藻の硝酸同化系変異株を利用し
た遊離脂肪酸の高効率生産系の構築」

研究終了報告書

研究期間 平成23年10月～平成29年3月

研究代表者：小俣達男
(名古屋大学大学院生命農学研究科、
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

我々の研究チームは、ラン藻(シアノバクテリア)を用いて、バイオ燃料の材料となる遊離脂肪酸(FFA)を大量生産することを目指して研究を実施した。このような研究では従来、「油脂を細胞内に蓄積させる方法」が主流だったが、生産物を細胞から抽出するためのコストがかさみ、また大量生産のために「容れ物」である細胞も大量につくる必要があるため、生産コストの削減が困難であった。そこで、海外の先行グループによって開発された「FFAを細胞から放出させる方法」を改良し、細胞をなるべく増やさずに FFA を外部に継続的に放出させることで、生産コストの引き下げを目指した。

先行研究では材料として *Synechocystis* sp. PCC 6803 株(以降 PCC 6803 と略)を用い、FFA の生産速度 $0.4 \text{ mg}^{-1} \text{ L}^{-1}$ を報告していたが、私たちは FFA 生産速度を $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ にまで引き上げることが生産コスト削減のために必要と考え、PCC 6803 を含む 3 種のモデルラン藻を材料として、平成 24~25 年に小俣グループと愛知グループで様々な遺伝子操作による品種改良を試みた。しかし、作出した FFA 生産株は先行研究を超える成績を残せず、さらに細胞の増殖を抑制すると容易に死滅し、扱いが難しかった。その原因を探るため、池田グループが細胞内の脂質類の分析を行った結果、意外にも、特に脆弱で FFA 放出量も少なかった *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株(以降 PCC 7942 と略)由来の FFA 生産株が他のラン藻に比べて格段に高い脂肪酸合成活性をもつことがわかった。この株は FFA 放出量こそ少ないものの、細胞内に乾燥重量の 30%にも及ぶ FFA を蓄積しており、これを考慮に入れると FFA 生産速度自体は目標値 $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ を満たしていた³⁾。若山グループによるメタボローム解析からも、PCC 7942 由来の FFA 放出株では、光合成産物の FFA 合成系への流れが着実に強化されていることが確認された。以上の結果から、FFA 生産能力に着目した場合には、PCC 7942 がもっとも優れた研究材料であることが判明した。一方、小俣グループの解析により、FFA が細胞内に滞留すると光化学系 II が不安定化されて細胞が光感受性になることが示された¹⁾。さらに小俣グループは、PCC 7942 において細胞の外へと FFA を積極的に排出するトランスポーター(RND1と命名)を発見し、その高発現によって FFA 生産株の増殖の安定化に成功した²⁾。以上のことから、FFA の安定した放出を実現するためには、FFA の生産速度に見合った放出速度を実現して、細胞内に FFA が蓄積しないようにすることが、肝要であることが示された。

以上の発見を踏まえ、平成 26 年度以降は、品種改良の対象を PCC 7942 に絞った。愛知グループでは PCC 7942 以外のラン藻や生物を含め、FFA の排出や FFA への耐性に関わる有用遺伝子を探索するとともに、これらを効率的に FFA 生産株に組み込む方法を開発した⁴⁾。小俣グループではこれらを利用しつつ遺伝子操作による品種改良を進め、池田グループ、若山グループが株の評価を行った。以上の結果、平成 28 年度には $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ の最大 FFA 放出速度を実現した⁵⁾。また、20 日間の長期培養により、積算 FFA 放出量 $0.7 \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1}$ と平均放出速度 $1.7 \text{ mg}^{-1} \text{ L}^{-1}$ を達成したが、これらは各々先行研究の 3 倍以上に達する値であった⁵⁾。次に、細胞の増殖速度を窒素制限で低下させたところ、増殖だけでなく FFA の放出も抑制されてしまったが、この条件下で FFA 輸送体 RND1 の発現を強化することで、細胞の増殖を抑制したまま FFA の放出量を回復させることができた。現状の FFA 放出量は、細胞乾燥重量と同等(FFA:細胞=1)で、「油脂を細胞内部に蓄積させる方法」の油脂蓄積量と細胞乾燥重量の比に並んだ段階であるが、我々の結果は FFA の生産・放出を細胞の増殖から切り離して制御した最初の成功例であり、今後、細胞あたりの FFA 生産性を着実に向上させていくための基盤となる成果である。

1) Takatani et al. (2015) *Plant and Cell Physiology* 56 (8): 1608-1615.

2) Kato et al. (2015) *Plant and Cell Physiology* 56 (12): 2467-2477.

3) Kato et al. (2016) *Biotechnology for Biofuels* 9:91

4) Kojima et al. (2016) *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (23): 10107-10113.

5) Kato et al. (2017) *Biotechnology for Biofuels* 10, in press

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 強光への適応における膜脂質の脱アシル化の役割の発見

概要: ラン藻における FFA 生産の制御機構は不明だったが、小俣グループでは、強光条件下で膜脂質全般の脱アシル化反応が活性化されることを明らかにし (Takatani et al. 2015; 論文 7)、この過程に関与するリパーゼのひとつを同定した上で、その高発現によって光化学系 II の修復が促進されることを明らかにした (Takatani et al. 投稿中)。これらは、強光への適応と脂質リモデリングの関連を明らかにした重要な発見である。

CREST 課題への寄与: 本発見により、リパーゼの発現強化によって FFA 生産と強光耐性を同時に増強できる可能性が示された。また、現在は FFA 生産増強のために外来のチオエステラーゼ遺伝子を利用しているが、将来的には内在リパーゼの高発現で代替できる可能性も出て来た。これらは、野外開放系における太陽光下での FFA 生産の実現に向けての技術的、法制的な問題の解決に向けた大きな前進である。

2. ラン藻の FFA 排出型輸送体の発見とその活用

概要: 小俣グループと愛知グループの研究により、細胞内への FFA の蓄積が生育阻害につながるということがわかったが、小俣グループでは、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 株から FFA 排出機能をもつ RND 型輸送体 (RND1) を発見し、その高発現によって FFA 生産株の生育阻害を緩和することに成功した (Kato et al. 2015; 論文 8)。一方、愛知グループは、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の FFA 生産株の光感受性を細菌の MFS 型 FFA 輸送体 FarB の発現により緩和することに成功した (Kojima et al. 投稿準備中)。

CREST 課題への寄与: FFA の生産性を高める上では、FFA の生産活性より放出活性を高く維持して細胞内への FFA の蓄積を回避することが重要であり、今回、内在および外来の FFA 能動輸送体の有用性が示されたことで今後、FFA 生産性の一層の向上が期待できる。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 高い脂質合成活性をもつラン藻種の発見とそれを用いた FFA 高生産の実現

概要: 従来、ラン藻は一般に脂質の合成能力が低いと考えられてきたが、小俣グループでは *Synechococcus elongatus* PCC 7942 が他のラン藻より格段に高い脂肪酸合成活性をもつことを見だし、これを用いて $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ という、従来報告の 7 倍相当の FFA 生産速度を実現した (Kato et al. 2016; 論文 9)。

CREST 課題への寄与: 今回、緑藻を用いたトリアシルグリセロール (TAG) 生産と同等以上の FFA を生産させて細胞外に放出することに成功したことで、ラン藻を用いた FFA 生産が、バイオ燃料の生産コスト削減に適した方法であることが実証できた。

2. 遺伝子操作に依存しない FFA 放出株の作製法の確立

概要: FFA 放出株は通常、遺伝子操作によって内在のアシル ACP 合成酵素遺伝子 (*aas*) を破壊し、さらに外来チオエステラーゼ遺伝子を導入することによって作製される。愛知グループでは、*aas* 欠損株が FFA 耐性を示すことを利用し、培地に添加した FFA に対する耐性を指標にして、自然変異体の中から *aas* の欠損株を選択することに成功した (特願 2015-038317) (Kojima et al. 2016 論文 10)。

CREST 課題への寄与: 遺伝子操作に依存せずに *aas* 欠損株を取得する方法は、FFA 生産株の作製に要する労力と時間を削減するだけでなく、屋外開放系での FFA 生産に用いる株の開発や遺伝子操作技術が適用できない優良種の FFA 生産への活用に道を拓く重要な技術である。

3. 外来マーカーに依存しないラン藻の遺伝子操作技術の開発

概要: 愛知グループでは上記 2. の方法をさらに発展させ、FFA を選択薬剤、*aas* 遺伝子を内在の負の選択マーカーとして用いることにより、*aas* 部位に挿入や欠失を導入する技術を開発した (Kojima et al. 2016 論文 10)。

CREST 課題への寄与: この方法により、FFA 生産株の改良のための様々な遺伝子を、*aas* の

破壊と同時に導入できるようになり、FFA 生産株の品種改良に要する時間を大幅に短縮できるようになった。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 名古屋大学グループ

研究参加者

| 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|------------|----------------------|-------|--------------|
| 小俣 達男 | 名古屋大学・ 大学院生命農学研究科 | 教授 | H23.10～ |
| 前田 真一 | 同上 | 助教 | H23.10～ |
| 高谷 信之 | 同上 | 研究員 | H23.10～ |
| 上坂 一馬 | 同上 | 研究員 | H23.10～ |
| 小島 幸治 | 同上 | 研究員 | H27.4～ |
| 辻本 良馬 | 同上 | 研究員 | H27.4～ |
| 原 由里子 | 同上 | 研究補助員 | H25.4～ |
| CHAN Yajun | 同上 | D4 | H24.11～H25.9 |
| PAN Lulu | 同上 | D2～4 | H26.4～ |
| 石浦 正寛 | 名古屋大学・ 遺伝子実験施設 | 教授 | H23.10～H27.3 |
| 井原 邦夫 | 同上 | 准教授 | H23.10～ |
| 小内 清 | 同上 | 研究員 | H25.4～ |

研究項目

- ・ 遺伝子操作によるラン藻の脂肪酸高効率生産株の育成
- ・ 脂肪酸生産株のトランスクリプトーム解析

② 中部大学グループ

研究参加者

| 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|--------|-----------------|-------|--------------|
| 愛知 真木子 | 中部大学・応用生物学 部 | 講師 | H23.10～ |
| 小島 幸治 | 同上 | 研究員 | H24.4～H27.3 |
| 氣多 澄江 | 同上 | 研究員 | H24.4～H24.11 |
| 同上 | 同上 | 同上 | H25.7～ |
| 松本 宇生 | 同上 | 研究補助 | H24.4～ |
| 高橋 圭子 | 同上 | 研究員 | H23.12～H24.2 |
| 森川 伸子 | 同上 | アルバイト | H23.11～H24.2 |

研究項目

- ・ 遺伝学的手法による有用遺伝子の探索とゲノム編集による変異導入法の開発

③ 慶応大学グループ

研究参加者

| 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|-------|----------------------|-------|--------------|
| 若山 正隆 | 慶応義塾大学・ 先端生命科学研究所 | 特任助教 | H26.4～ |
| 池田 和貴 | 同上 | 上級研究員 | H23.10～H26.3 |
| 伊藤 卓朗 | 同上 | 特任助教 | H23.10～H28.3 |

| | | | |
|--------|----|-------|--------------|
| 中東 憲治 | 同上 | 特任准教授 | H23.10～H27.3 |
| 高橋 春香 | 同上 | 技術員 | H24.4～H26.3 |
| 山中 早苗 | 同上 | 研究補助員 | H24.4～H26.3 |
| 阿部 千賀子 | 同上 | 研究補助員 | H24.4～H26.3 |

研究項目

- ・ラン藻の脂肪酸生産株のメタボローム解析

④理化学研究所グループ

研究参加者

| 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|-------|-------------------------------|-------|---------------|
| 池田 和貴 | 理化学研究所・IMS メタボローム研究チー ム | 上級研究員 | H26.4～ |
| 原田 美々 | 同上 | 研究補助員 | H26.10～H28.3 |
| 堀 あや | 同上 | 研究補助員 | H26.11～H27.10 |
| 池田 瑠美 | 同上 | 研究補助員 | H28.5～ |

研究項目

- ・ラン藻の脂質メタボローム解析技術の開発
- ・ラン藻の脂肪酸生産株の脂質メタボローム解析

(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 オールジャパン体制での藻類バイオ燃料の実用化へ向けた企業組織への参加

経産省 (NEDO) および農水省の藻類バイオ燃料開発プロジェクトの運営委員を務めることで、関連研究を実施・計画している企業関係者と情報交換をするようになり、産業競争力懇談会 (COCN) 「微細藻類を利用した燃料の開発」のアドバイザーを経て 2014 年 9 月より、「微細藻類燃料開発推進協議会 (JMAF)」のアドバイザーボードの委員として、藻類バイオ燃料の実用化に向けて各種の提言を行って現在にいたっている。

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 統合的アプローチによるラン藻の脂肪酸高効率生産株の育成 (名古屋大学 小俣グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

① 研究実施内容

Synechococcus elongatus PCC 7942 を主材料とし、基本的な FFA 生産株を作製した上で、遺伝子操作技術を駆使して様々な遺伝子を導入・操作し、また培養条件を最適化することで FFA 生産性を大幅に向上させた。さらに生物学的封じ込めのための遺伝子操作の方法や、FFA 生産性に影響しうる諸遺伝子の利用方法について検討した。

② 研究成果

1) 脂肪酸合成活性の高いラン藻種を用いた FFA 生産系の構築

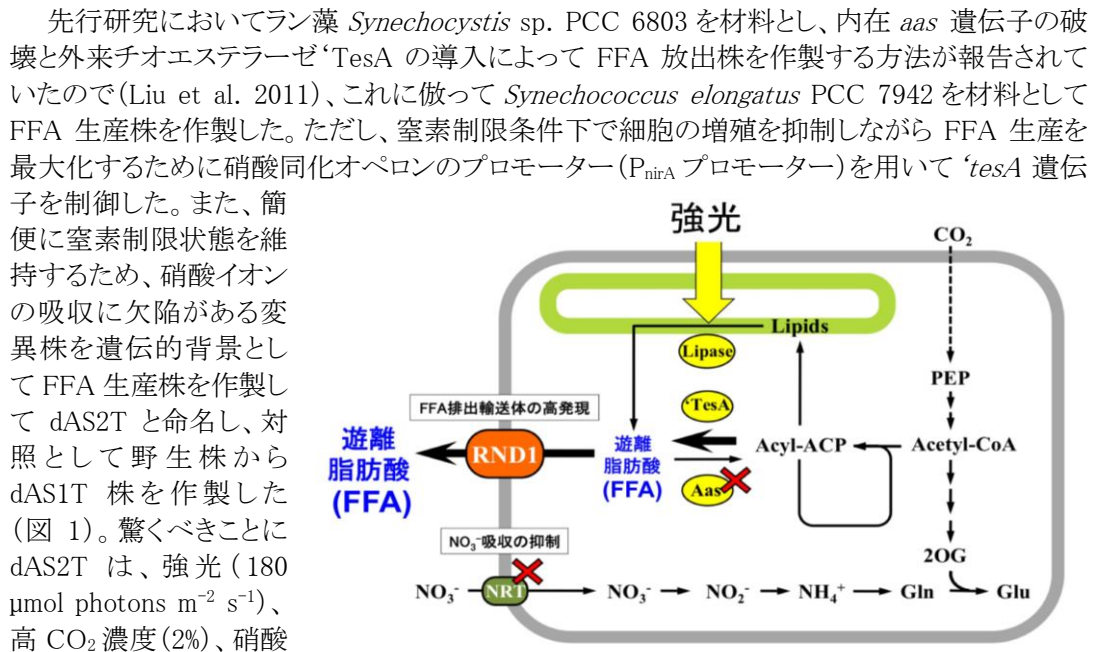


図1. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来の FFA 生産株の概念図. NRT は硝酸イオン能動輸送体を表す. 研究開始当初は、強光の影響や FFA 排出輸送体 RND1 の存在は未知であった点に留意.

による増殖抑制を受けない dAS1T はこれらの条件下で増殖したが、10 日後には細胞は青色に変色して死滅した(図 2b)。累積 FFA 放出量は 100 mg L^{-1} 弱で、20 日間の継続的 FFA 放出を実現している先行研究の半分程度であり、FFA 放出速度も先行研究より低かった(図 3a)。これらの結果は、一見すると *S. elongatus* PCC 7942 が FFA 生産に不適であることを示すかに思われたが、細胞内の FFA 量を池田グループが開発した方法で測定したところ、細胞外に放出された FFA の約 6 倍もの FFA が細胞内に蓄積していることが判明した。*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた先行研究では FFA の 95%が細胞外に放出されているが、細胞内 FFA を考慮すると、dAS1T の生存期間中の FFA 生産速度は、 $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ で先行研究の 7 倍相当の値であった(図 3c, Kato et al. 2016; 論文 9)。従来、ラン藻は脂質の合成活性が低いと考えられており、先行研究でも脂肪酸合成経路を強化するための遺伝子操作が必須とされていた。今回の結果は、そのような遺伝子操作を行わずに得られたものであり、*S. elongatus* が異例に高い脂肪酸合成能力をもつことが示された。*S. elongatus* PCC 7942 の FFA 生産速度は、緑藻のトリアシルグリセリドの生産速度にも匹敵するものであり、このラン藻がバイオ燃料生産の材料としてきわめて有望であることがわかった。

FFA は界面活性剤としての作用により細胞毒性を示すので、dAS1T の生育の不安定性も FFA の蓄積の結果と推定された。この点を検証するため、細胞表層部の親水層を形成している O 抗原糖鎖を除去する遺伝子操作(*wzt* 遺伝子の破壊)を dAS1T に施したところ、細胞外 FFA の増加と細胞内 FFA の減少はわずかであったが(図 3a, b)、細胞の増殖が安定化されたため培養液全体の最終 FFA 含量は細胞内外を合わせて約 0.7 g L^{-1} に達した(図 3c)。

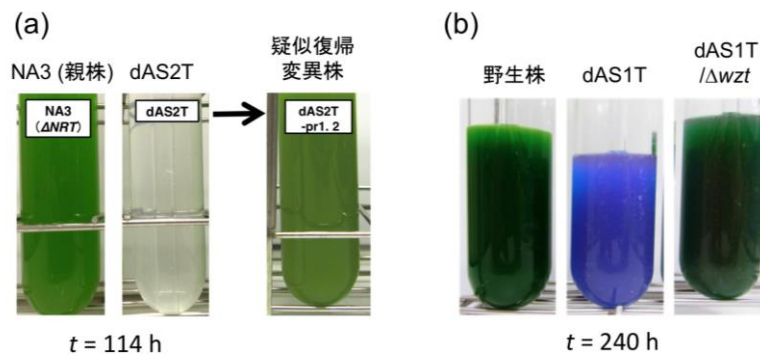


図 2. FFA 生産株の増殖の様子. (a) 硝酸輸送体の変異株 NA3 に由来する FFA 生産株 dAS2T は FFA 生産条件で生育不能だが、長時間のインキュベーションを経て疑似復帰変異株が増殖してくる場合がある. (b) 野生株由来の FFA 生産株 dAS1T に見られる生育障害は、細胞表層部の O 抗原の親水層を除く遺伝子操作により、軽減される.

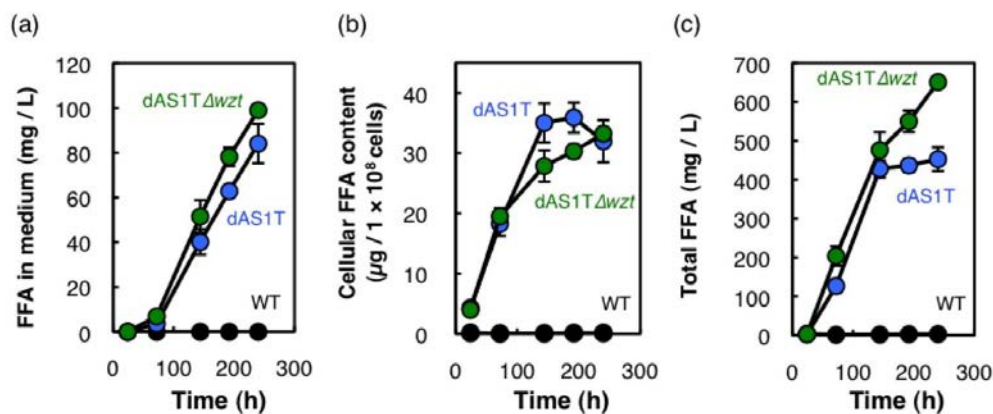


図 3. FFA 生産株 dAS1T および O 抗原欠損株 dAS1T Δwzt の培養における細胞外 FFA 量 (a), 細胞内 FFA 量 (b), および細胞内外の FFA 総量 (c) の経時的変化. (論文 9)

2) 強光に応答した膜脂質脱アシル化反応の活性化と FFA による光化学系 II の不安定化の発見

ラン藻では、外来チオエステラーゼを導入しなくても *aas* 遺伝子を破壊して FFA の再利用を妨げるだけで FFA が放出されるようになるので、細胞内で恒常的に FFA が生産されていることは明らかだったが、FFA の由来は不明の点が多く、また FFA 生産の制御機構は不明だった。我々は外来チオエステラーゼをもたない *aas* 欠損株 dAS1 を用い、細胞内の FFA とリゾ脂質の量をモニターした結果、強光条件下で膜脂質全般の脱アシル化反応が促進されることを発見した (Takatani et al. 2015; 論文 7)。さらに、生じた FFA がリサイクルされずに細胞内に蓄積すると光化学系 II が不安定化され、細胞が光感受性になることを見いだした。これらの結果は、上記 1) で推定した「過剰な FFA の細胞内蓄積が生育障害を引き起こす」という仮説を指示するものであった。

3) ラン藻の FFA 排出型輸送体の発見とその活用

1) で述べたように、恒常的に窒素制限状態にある FFA 生産株 dAS2T は、FFA 生産条件で生育できなかったが、これは、細胞分裂が緩慢な状態で FFA が急速に細胞内に蓄積するためと推定された。この株を FFA 生産条件に放置したところ、このような条件で増殖する疑似復帰変異株が得られた (図 4a)。この株のゲノム解析により、RND 型排出輸送体をコードするオペロンのプロモーター領域の塩基置換によって、このオペロンが高発現していることがわか

ったので、改めてこのオペロンの破壊株と高発現株を作製し、それらの性質の解析から、このオペロンのコードする輸送体が FFA 排出活性をもつことを確認して RND1 と命名した (Kato et al. 2015; 論文 8)。FFA 濃度が高い動物の粘膜組織上に棲息する細菌類に FFA 排出輸送体が広く分布していることは、よく知られた事実であるが、光独立栄養生物であり、貧栄養環境に適応した生物であるラン藻に FFA 排出輸送体が存在することは、きわめて意外な発見であった。RND1 高発現株は細胞外への FFA の排出量の増加 (図 4b) とともに生育が改善しており、RND1 が FFA 高生産株の作製に好適な輸送体であることが示された。

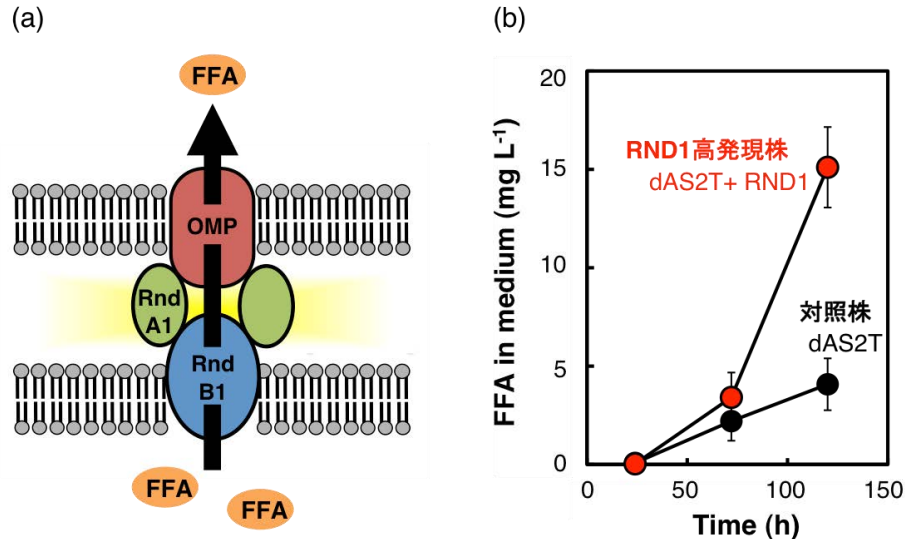


図 4. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株で同定した RND 型 FFA 排出輸送体の模式図 (a)とその高発現による dAS2T 株の FFA 排出能力の強化 (論文 8) (b)。

4) 二相培養系を用いた FFA 放出の促進

近年、酵母や大腸菌を用いた疎水性有用物質の生産では、二相培養とよばれる培養方式が採用されて好成績を上げている。これは、有機溶媒を培地に重層し、有機層に疎水性の生産物を吸収する方法である。FFA 生産の場合、培養液の攪拌を停止すれば、細胞は沈降し、FFA は培養液表層に浮遊するので生産物の物理的分離は比較的容易であるが、実験室レベルで多数の培養瓶や試験管で定期的に FFA を除去するのは実質上不可能なので、我々もミスチン酸イソプロピルを用いた二相培養法を採用することとした。その結果、dAS1T の増殖は、著しく安定化し、細胞外に放出された累積 FFA 量は培養液あたりで約 0.7 g L⁻¹ に達した(図 5)。この結果は、

上記 1)で *wzt* を破壊した dAS1T 誘導株において細胞内外の合計値として達成されていた値にほぼ一致しており、細胞内に蓄積していた FFA のほぼ全量が細胞外に放出されたことを示すものであった。また、この放出量は *Synechocystis* sp. PCC 6803 での先行研究で達成した値の 3.3 倍に相当していた。18 日間の平均 FFA 放出速度も 1.7 mg L⁻¹ h⁻¹ で先行研究の約 4 倍に達した(表 1) (Kato et al. 印刷中, 論文 12)。

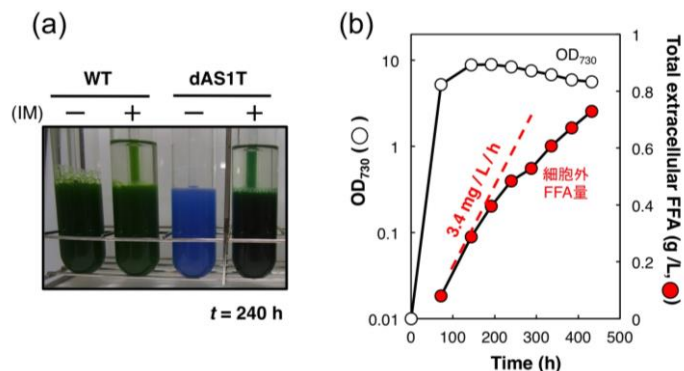


図 5. 二相培養法による dAS1T の増殖の安定化 (a) と FFA の細胞外への放出の促進 (b)。

表1. 他のラン藻の結果との比較 **本研究の結果**

| | PCC6803 (SD277) | PCC7002 (S07) | PCC7942 (dAS1T) | PCC7942 (dAS1T) |
|------------------------------|---|--|---------------------------------|---------------------------------|
| FFA放出量 (g/L) | 0.20 | 0.13 | 0.084 | 0.73 |
| Time (h) | 480 | 480 | 240 | 432 |
| 平均FFA放出速度 (mg/L/h) | 0.44 | 0.27 | 0.35 | 1.7 |
| 細胞あたりFFA放出量 (g FFA/g DCW) | ~0.1 | — | ~0.1 | ~0.3 |
| 遺伝子型 | Δ as P_{trc} -tesA137 Δ 1951 etc... | Δ as P_{trc} -tesA P_{psbA1} -rbcLS | Δ as P_{nirA} -tesA | Δ as P_{nirA} -tesA |
| | Liu et al. 2011 | Ruffing 2014 | 2012 | 2016 |

5) P_{II} タンパク質の完全欠損株の作製による機能解析

P_{II} タンパク質は、ラン藻と細菌、高等植物の間で保存されている唯一の調節タンパク質である。植物や細菌で P_{II} がアセチル CoA カルボキシラーゼと相互作用して脂肪酸合成を抑制することが明らかにされたのを受け、本研究でも FFA 生産の効率を上げるため、ラン藻で P_{II} 変異株の作製を試みた。以前から、ラン藻では P_{II} が必須タンパク質であり、その構造遺伝子 *glnB* の完全欠損株は得られにくく、得られたとしても、他の調節タンパク質の二次的な変異を併存するとされてきた。我々は、窒素制限条件のもとで *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の *glnB* 遺伝子の破壊を試み、他の遺伝子に変異をもたない真正の P_{II} 欠損株の作製に初めて成功したが、得られた欠損株は増殖がきわめて遅く、窒素に対して超感受性であり、さらに遺伝的に不安定で二次的な変異がゲノム中に急速に蓄積した。これらのことから P_{II} はラン藻の正常な増殖に必須の成分であることが示された (Chang et al. 2013; 論文 1)。一方、上述のように *S. elongatus* PCC 7942 から作製した FFA 生産株がきわめて高い脂肪酸合成活性を有していることが判明し、ともすると遊離脂肪酸が細胞内に蓄積して生育に有害なレベルにまで達することがわかったので、当面、FFA 生産株への *glnB* の変異導入は見送ることとした。

6) 生物学的封じ込めのために操作する遺伝子の選択

屋外でのラン藻細胞の大量培養では、培養池外でのラン藻の増殖を阻止するための生物学的な封じ込めが必須である。本研究構想では、ラン藻の CO₂ 濃縮機構 (以下 CCM と略) を破壊して自然環境下での生育を阻止する計画であるが、最近になって藻類の培養系への CO₂ の注入に多大なエネルギーが必要なことが報告され、CCM を完全に破壊することは得策でないことが判明した。そこで、CCM を部分的に破壊して、CCM の機能を弱めることを目指した。CCM の構成成分のうち、カルボキシゾームの機能に関わる遺伝子の破壊の効果をまず調べた。カルボキシゾームに局在するカルボニックアンヒドラーゼ (CA) を欠損した株は 5% というきわめて高濃度の CO₂ を要求したが、カルボキシゾームの構造タンパク質群をコードする *ccm* オペロンの欠損株は 2% の CO₂ 濃度で生育した。また、これらの変異株の性質の比較から、通常カルボキシゾーム内に存在しているラン藻の Rubisco はカルボキシゾーム外、すなわち細胞質では十分に機能できないことがわかった (Nishimura et al. 2014; 論文 2)。本研究の当初計画では Rubisco の構造遺伝子である *rbcLS* の高発現によって CO₂ 同化能力を向上させることを目指していたが、今回の結果から *rbcLS* のみでなく、カルボキシゾームの外殻タンパク質と CA も増やす必要があることが明らかになった。引き続き、CCM を構成する HCO₃⁻ 能動輸送体や CO₂ 水和機構のマスターレギュレーターである *cmpR* とその上位にあると推定される制御因子 *rbcR* の変異株について解析したが、*cmpR* の欠損株は顕著な高 CO₂ 要求性を示さず、*rbcR* は、通常条件下では必須遺伝子であることが確認された (Pan et al., 投稿準備中)。以上の結果から、生物学的封じ込めのためには、*ccm* オペロンの欠損株の利用がもっと

も適切であると判断した。また、前項でも記したように、現状では十分な FFA 合成活性が得られているため、CO₂ 同化能力の向上に関わる遺伝子操作は、当面見送ることとした。

7) 異種生物の輸送体タンパク質のラン藻の細胞膜へのターゲティング技術の開発

本研究の過程で、FFA の高生産のためには FFA を細胞外へ排出して細胞内への蓄積を防ぐことが重要であることが明らかになった。FFA の排出のためには、FFA 輸送体の活用が有効であり、実際、上述のように *S. elongatus* PCC 7942 自身の RND 型 FFA 排出輸送体を同定し、これを用いて生育の安定化と FFA 放出量の増加に成功したが、さらなる生産性向上のためには FFA 排出能力の一層の強化が必要である。このためには、近年同定されつつある様々な異種生物の FFA 輸送体の機能をラン藻で発現させることが有効と考えられる。しかし予備的な研究では、異種生物の FFA 輸送体による FFA 排出能力の向上は認められなかった。この原因のひとつとしてラン藻が細胞膜から独立した内膜系(チラコイド膜)をもつため、外来 FFA 輸送体を細胞膜にターゲットできていない可能性が考えられた。ラン藻の細胞膜とチラコイド膜は異なるタンパク質組成をもっており、各膜系へのターゲティング機構の存在が予想されるが、その具体的な機構も未知であった。そこで、小俣グループでは、ラン藻の細胞膜に見いだした HPP ファミリーの亜硝酸イオン輸送体 Nitr2、およびその植物におけるオースログ NITR2 に着目し、前者の N 末端アミノ酸配列を後者に融合する事で、後者の機能をラン藻細胞内で発現させることに成功した(Maeda et al. 2014; 論文 3)。これらの結果は、Nitr2 の N 末端に細胞膜への局在化シグナルが存在する可能性を示唆するものであり、ラン藻の膜分化機構に新しい知見を提供するものである。現在、この N 末端配列をシロイヌナズナ葉緑体の FFA 排出輸送体 FAX1 に融合してラン藻に導入し、FFA 排出能力の強化を試みている。

8) ラン藻の呼吸の抑制因子の発見

最近、微細藻類を用いたバイオ燃料生産における夜間の呼吸の役割について大きな関心が寄せられている。光合成産物を呼吸で消費することが燃料物質の生産性低下につながる「浪費」と考えて呼吸を抑制すべきという主張がある一方で、夜間における適切な代謝活動が昼間の活動に必要とする主張がある。いずれにしても、ラン藻における呼吸活性の調節機構には不明な点が多い。本研究では、糸状性ラン藻 *Leptolyngbya boryana* の変異株で高い呼吸活性を示す dg5 株のゲノム解析により、ラン藻に広く保存されているが機能不明であったシトクロム c_M が呼吸活性を抑制していることを明らかにした。シトクロム c_M による呼吸抑制の機構の解明は、さらなる研究に待たなければならないが、今回の発見により、ラン藻の呼吸活性を必要に応じて自在に制御できる可能性が広がった。

3. 2 遺伝学的手法による有用遺伝子の探索とゲノム編集による変異導入法の開発

(中部大学 愛知グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

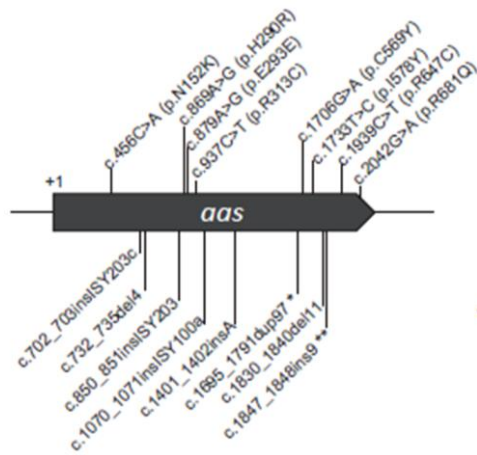
① 研究実施内容

愛知グループでは、*Synechocystis* sp. PCC 6803 から作製した FFA 放出株を材料とし、外部から加えた FFA と強光に対する耐性を指標にして、FFA の排出の促進と FFA の毒性に対する抵抗性の向上に資するための遺伝子変異を探索した。また、これらの有用変異や FFA 生産株作製に必須な遺伝子変異を、外来のマーカー遺伝子を使うことなく、FFA または強光に対する抵抗性を指標にして FFA 放出株に対して形質転換によってラン藻のゲノムに導入する技術を開発し、名古屋大学における FFA 高生産株の構築作業の迅速化を図った。

② 研究成果

1) 遺伝子操作に依存しない FFA 放出株の作製法の確立

ラン藻の FFA 生産株は、一般的には遺伝子操作によって内在のアシル ACP 合成酵素遺伝子 (*aas*) を破壊し、さらに外来チオエステラーゼ遺伝子を導入することによって作製される。愛知グループでは、*aas* 欠損株が FFA 耐性を示すことを利用し、培地に添加した FFA に対する耐性を指標にして、*Synechocystis* sp. PCC 6803 と *Synechococcus* sp. PCC 7002 の自然変異体の中から *aas* の欠損株を迅速に選択することに成功した (特願 2015-038317) (図 6.



Kojima et al. 2016 論文 10)。これにより、FFA 生産株の作製に要する労力と時間を削減できるようになった。また、遺伝子操作に依存せずに *aas* 欠損株を取得することができる本法を用いれば、ゲノム配列が未解明のラン藻種や遺伝子操作技術が適用できない優良種からも FFA 放出株を得ることが可能である。現在、法規制上の問題から、ラン藻の形質転換株を用いた屋外でのバイオ燃料生産の研究は実質的に不可能であるが、本方法は、屋外開放系で利用が可能な FFA 生産株の開発に道を拓くものである。

図 6. FFA 耐性を指標にして選抜した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の自然変異株で見いだされた *aas* 遺伝子の変異 (論文 10)

2) 外来マーカ-遺伝子に依存しない FFA 生産株の作製技術の開発

上述の方法をさらに発展させ、FFA を選択薬剤、*aas* 遺伝子を内在の負の選択マーカ- (自殺遺伝子) として用いることにより、*Synechocystis* sp. PCC 6803 と *Synechococcus* sp. PCC 7002 の *aas* 部位に挿入や欠失を導入することに成功した (図 7. Kojima et al. 2016 論文 10)。この方法は形質転換を用いるため、適用可能なラン藻種は限られるが、任意の塩基の欠失や置換を外来マーカ-なしに *aas* 遺伝子に導入できる点で、上述の方法より優れている。また、有用外来遺伝子を用いて *aas* 遺伝子を挿入破壊したり置換することも可能なので、FFA 生産株の作製過程での形質転換の回数を減らし、FFA 生産株の品種改良に要する時間を大幅に短縮できるようになった。

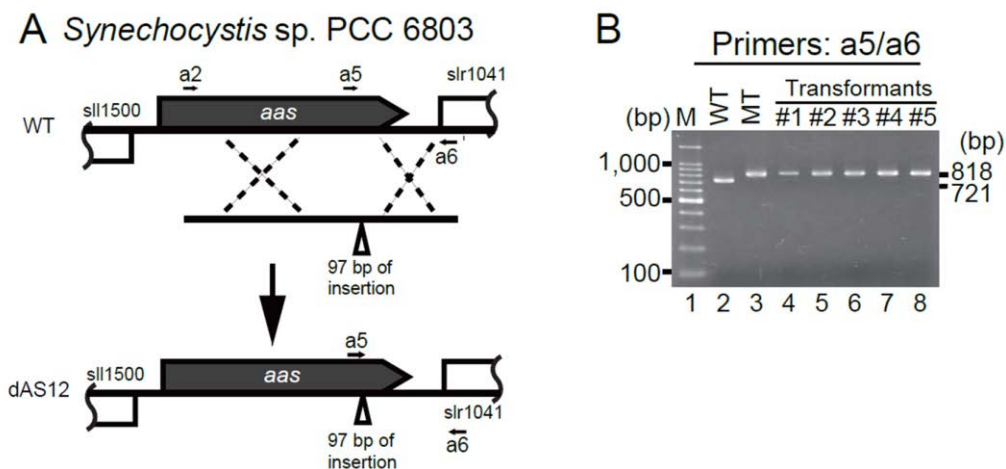


図 7. *Synechocystis* sp. PCC 6803 における *aas* 遺伝子を内在の負の選択マーカ-として用いた挿入変異株の作製. (A) 野生型と形質転換に使用した *aas* 遺伝子への挿入を含む断片および挿入変異株 dAS12 のゲノムマップ. (B) *aas* 遺伝子周辺領域の PCR による解析.

レーン1:マーカー, 2:野生株, 3:形質転換に用いた *aas* 遺伝子への挿入を含む断片, 4~8, 得られた形質転換体. (論文 10)

3. 3 ラン藻の脂肪酸生産株の脂質メタボローム解析 (理化学研究所 池田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

① 研究実施内容

ラン藻に FFA の大量生産を行わせるためには、FFA の種類と起源を明らかにし、膜脂質を中心とした細胞内脂質の代謝との関係を解明することが必須である。このため、各種のラン藻株の遺伝子操作や培養条件の変化にも対応した網羅的な脂質メタボローム解析システムが重要となってくる。そこで、ラン藻中および培養液中に含まれる脂質と FFA を一斉に同定および定量的解析する系の開発に取り組んだ。

② 研究成果

1) 細胞および培養液からの高回収率な総脂質抽出法の開発

網羅的な脂質メタボローム解析を可能にするために、ラン藻および培養液から回収効率の高い脂質抽出法の検討を進めた。従来の2相分配抽出法 (Bligh and Dyer 法) では、FFA やリゾ脂質などの一部の極性脂質が各液相に分配されるために、これまで回収率の低さが問題であった。このため、抽出液の組成を工夫することで 1 相条件下において脂質抽出が可能になり、糖脂質やリン脂質などの複合脂質だけでなく、FFA やリゾ脂質も一斉かつ簡便に回収することに成功した (図 8)。また、培養液中は脂質の含有濃度が低いために、予め遠心濃縮してから1層抽出する手法を適用することで、回収率を上げて安定的な抽出が可能となった (Ikeda, 2015, その他の著作物 4)。

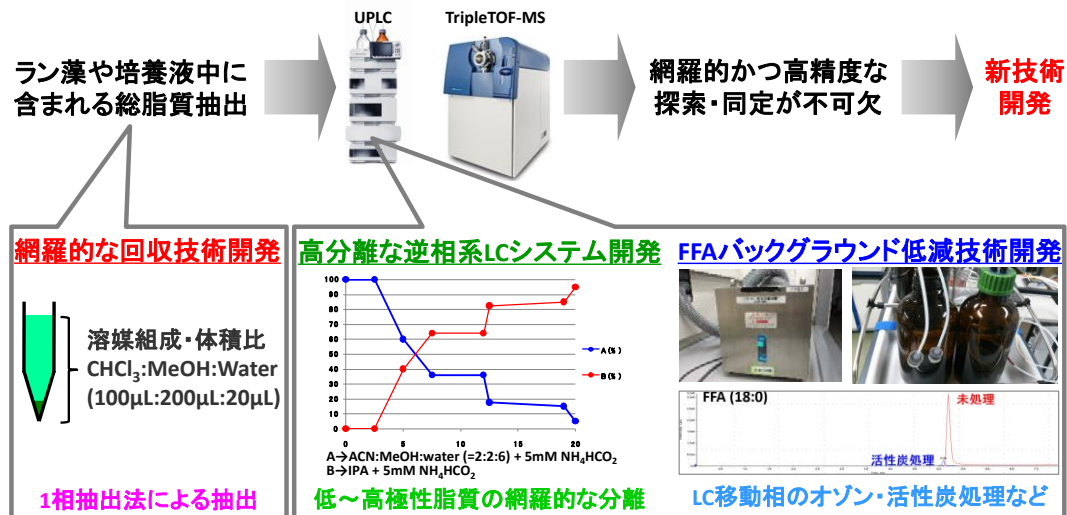


図 8. ラン藻および培養液中の脂質代謝物の網羅的な分析システムの確立

2) 高分離 LC と高分解 Triple TOF-MS を組み合わせた網羅的な脂質分析システムの構築

脂質代謝物は、各種のラン藻株の遺伝子操作や培養条件で質的および量的に変化するために、様々な極性脂質が分子種レベルで探索できる高分離な逆相系 LC システムを確立した (Ikeda, 2015, その他の著作物 5) (図 8)。さらに、高分解能かつ高速 MS/MS スキャンが可能な Triple TOF-MS を用いて分離した脂質分子種の分析を行い、従来よりも網羅性が高い定性および定量解析の確立に取り組んだ。特に、本 CREST 研究では炭素鎖長や不飽和度の異なる FFA 分子種レベルでの定量評価が重要であるが、従来では LC の移動相溶媒に含まれる残留 FFA のために、バックグラウンドノイズが高くて定量性に問題があった。これを改善する方法として、LC 移動相のオゾン分解処理や活性炭フィルター処理などによりノイズ低減

に成功し、安定的に FFA の LC-MS 分析が可能となった(図 8)。また、FFA 分析の定量精度のさらなる向上に繋げるために、抽出効率やイオン化効率の補正技術にも取り組み、現段階では FFA キットと同等レベルの絶対的な定量評価が可能になった。

3) 網羅的な脂質 MS スクリーニングソフトウェア「Lipidiscovery」の開発

ラン藻株の糖脂質やリン脂質などの複合脂質も、遺伝子操作や培養条件の変化によって、その構成脂肪酸の組成も大きく変動することが明らかになり、高精度な定性解析技術が不可欠になった。そこで、これらの変化をより網羅的かつ迅速に捉えるために、新たなアルゴリズムを用いた精度の高い自動同定ソフトウェア構築に取り組んだ(図 9)。既存技術は、同定クライテリアの設定などが不十分なために精度が低く(正答率は約 50%程度)、正しい同定結果を得るためには、膨大なデータをマニュアルで再検証する必要があった。そこで、各脂質クラスの数多くの実測の MS/MS データを予め取得し、それぞれのフラグメントピークの重要度・安定度などを綿密にパターン解析して、これらの情報を基に高精度かつ網羅的に同定するためのルールの普遍化を進めた。次に、それらを最終的にプログラミング化して、自動同定が可能な脂質スクリーニングソフトウェア(Lipidiscovery)を開発した。これにより、従来よりも解析のスループット性も飛躍的に上がり、ほぼ正しい同定結果のみを選出することが可能になった(正答率は約 100%)。また、この自動化促進によって、ラン藻中の糖脂質やリン脂質などの複合脂質の定性および定量解析に要する時間が、当初の 20 日から現在は約 3 日までに大幅短縮できた。さらに、探索可能な範囲も広がっており、これまで同定できていた約 200 分子種の脂質に加え、新たな代謝物(未知を含めた)の発見にも繋がっている(図 9)。

Lipidiscovery は“in - house 版”のソフトウェアとして開発段階中であるが、同定アルゴリズムは共同研究ベースで一部公開しており、これまでに他の新たなソフトウェア開発にも貢献を果たしている(Tsugawa and Ikeda et al. 2015; 論文 4)(Ikeda et al. 投稿中)。

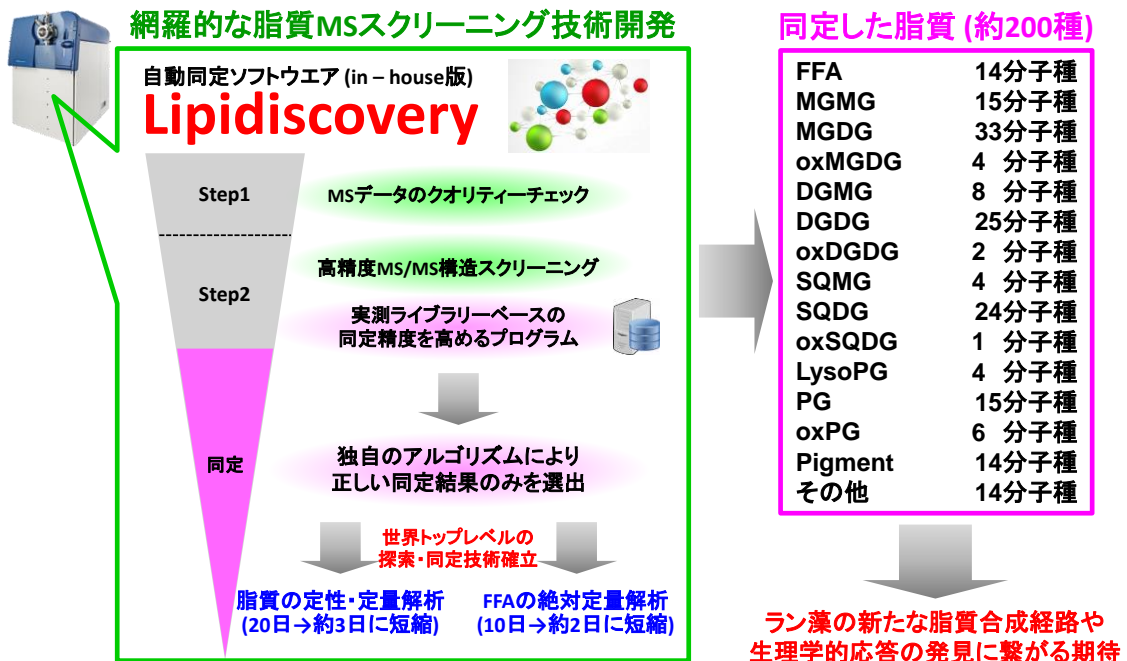


図 9. Lipidiscovery によるラン藻に含まれる脂質代謝物の探索

3. 4 メタボローム解析と遺伝学的アプローチによる脂肪酸生産性の向上

(慶應大学 若山グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

① 研究実施内容

FFA 生産の更なる向上を目指し、ボトルネックとなっている代謝段階を探索するために、温度、光強度、日周の環境要因を変えて生育させた *S. elongatus* PCC 7942 由来の FFA 生産株 (dAS1T) の代謝をメタボローム解析により野生株と比較した。

②研究成果

1) ラン藻の代謝に与える FFA 生産のための遺伝子改変と生育環境の影響

野生株と dAS1T の代謝の変化の傾向を、分散分析により有意な変化が認められた代謝産物をもとに階層的クラスター解析により分類した (図 10)。その結果、代謝全般が低下する低温条件と光合成が活性化される強光条件については、野生株と dAS1T で類似した傾向が見られ (図 10 A, B)、これらの条件では FFA の生産よりも生育環境の変化が代謝に大きく影響することが示唆された。一方、8 時間の暗期をいれた条件 (16 h Light/8 h Dark) で生育した dAS1T の代謝産物の変化の傾向は、同条件の野生株や連続光下 (24 h Light) で生育させた野生株、dAS1T と異なっており (図 10. C)、FFA の生産が暗所での代謝全般に大きく影響することが示唆された。

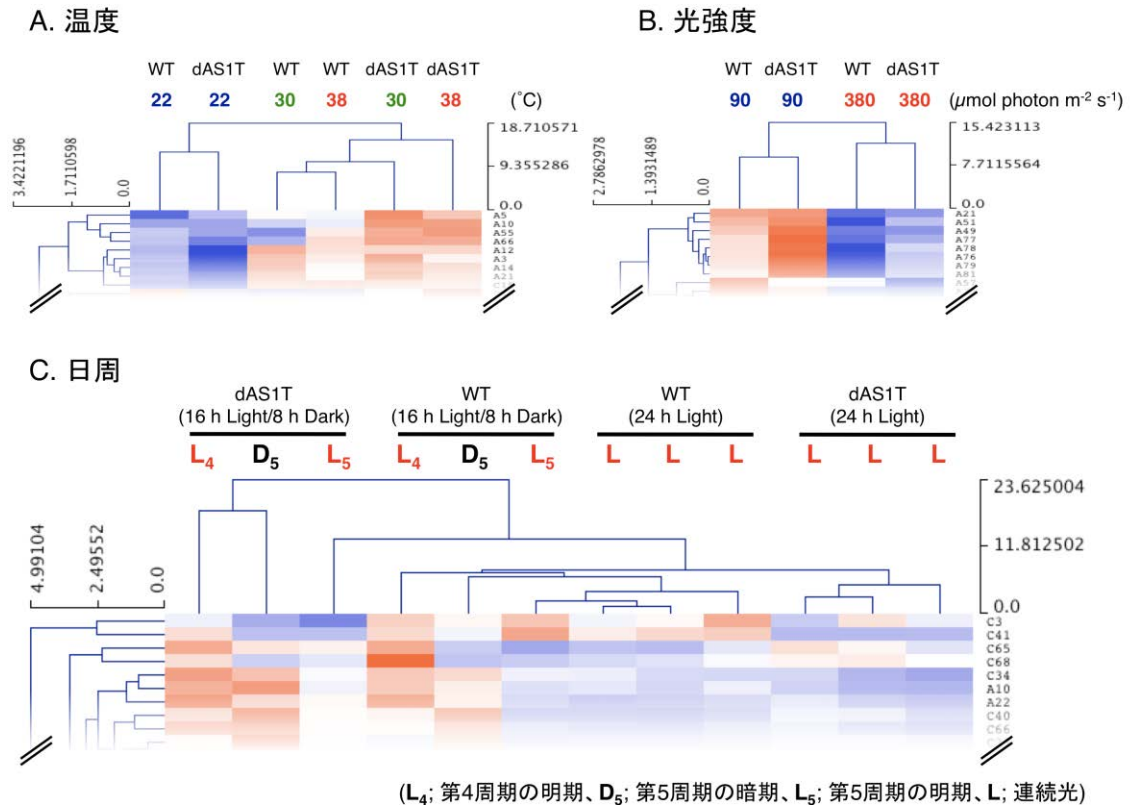


図 10. ラン藻の代謝に与える FFA 生産能と生育環境の影響

温度 (A)、光強度 (B)、日周 (C) を変えて生育させた野生株 (WT) と FFA 生産株 (dAS1T) について、分散分析により有意な変化が認められた代謝産物をもとに階層的クラスター解析を行った。ヒートマップは、各代謝産物の Z-score を示し、その一部を示した。

2) FFA 生産株における光合成により固定された炭素の分配

FFA 生産のボトルネックとなっている代謝段階を探索するため、光合成により固定された炭素の流れを FFA 合成の前駆体であるアセチル CoA を起点として、FFA の合成、糖類の合成、有機酸及びそれから派生するアミノ酸の合成の 3 つに分類して詳しく見てみると、dAS1T で固定された炭素は、どの生育条件でも FFA の合成に使われていることが示唆され、特に FFA の生産量が高い強光条件でより顕著にその傾向が見られた。つまり、dAS1T

に施した *aas* の不活性化とチオエステラーゼの導入の FFA 生産のための最低限の遺伝子操作により、*dAS1T* の炭素代謝が FFA 合成に至適化されていることが考えられた。このことから FFA 生産性の向上のためのさらなる代謝改変の必要性は低いと判断した。

一般的に FFA 合成の律速段階は、アセチル CoA からマロニル CoA を生合成するアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) の段階であると考えられており、先行研究の *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた FFA 生産株では ACC の発現強化を施している (Liu et al. 2011)。しかし、これまでにメタボローム解析により網羅的にラン藻における FFA 生産のボトルネックを探索した実験例はなく、本成果は少なくとも *S. elongatus* PCC 7942 においては ACC が律速となっていないことを明らかにした点で意義があると考えられる。

§ 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 12件)

1. Chang Y, Takatani N, Aichi M, Maeda S, Omata T, “Examination of the effects of P_{II} deficiency and the toxicity of PipX on growth characteristics of the P_{II}-less mutant of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*” *Plant and Cell Physiology*, Vol. 54, No. 9, p. 1504-1514 (2013)
2. Nishimura T, Yamaguchi O, Takatani N, Maeda S, Omata T, “In vitro and in vivo analyses of the role of carboxysomal β -type carbonic anhydrase of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in carboxylation of ribulose-1,5-bisphosphate”, *Photosynthesis Research*, Vol. 121, No.2/3, pp.151-157, (2014)
3. Maeda S, Konishi K, Yanagisawa Y, Omata T, “Nitrite transport activity of a Novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts” *Plant and Cell Physiology*, Vol. 55, No 7, pp.1311-1324, (2014)
4. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M, “MS-DIAL: data independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis”, *Nature Methods*, Vol. 12, No. 6, pp.523-526, 2015
5. Maeda S, Murakami A, Ito H, Tanaka A, Omata T, “Functional characterization of the FNT family nitrite transporter of marine picocyanobacteria”, *Life*, Vol. 5, No. 1, pp.432-446, (2015)
6. Hiraide Y, Oshima K, Fujisawa T, Uesaka K, Hirose Y, Tsujimoto R, Yamamoto H, Okamoto S, Nakamura Y, Terauchi K, Omata T, Ihara K, Hattori M, Fujita Y “Loss of cytochrome *c_M* stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark”, *Plant and Cell Physiology*, Vol. 56, No. 2, pp.334-345, (2015)
7. Takatani N, Use K, Kato A, Ikeda K, Kojima K, Aichi M, Maeda S, Omata T “Essential role of acyl-ACP synthetase in acclimation of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 to high-light conditions”, *Plant and Cell Physiology* Vol. 56, No 8, pp.1608-1615, (2015)
8. Kato A, Takatani N, Use K, Uesaka K, Ikeda K, Chang Y, Kojima K, Aichi M, Ihara K, Nakahigashi K, Maeda S, Omata T “Identification of a cyanobacterial RND-type efflux system involved in export of free fatty acids”, *Plant and Cell Physiology* Vol. 56, No 12, pp.2467-2477 (2015)
9. Kato A, Use K, Takatani N, Ikeda K, Matsuura M, Kojima K, Aichi M, Maeda S, Omata T “Modulation of the balance of fatty acid production and secretion is crucial for enhancement of growth and productivity of the engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*”, *Biotechnology for Biofuels* Vol. 9, 91 (2016)
10. Kojima K, Keta S, Uesaka K, Kato A, Takatani N, Ihara K, Omata T, Aichi M “A simple method for isolation and construction of markerless cyanobacterial mutants defective in acyl-acyl carrier protein synthetase using free fatty acids as selective agents” *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 100, No 23, pp. 10107-10113 (2016)
11. Tsugawa H*, Ikeda K*, Tanaka W, Senoo Y, Arita M, Arita M (*Contributed equally) “Comprehensive identification of sphingolipid species by in silico retention time and tandem mass spectral library”, *Journal of Cheminformatics*, Vol.9:19 DOI: 10.1186/s13321-017-0205-3 (2017)
12. Kato A, Takatani N, Ikeda K, Maeda S, Omata T “Removal of the product from the culture medium strongly enhances free fatty acid production by genetically engineered *Synechococcus elongatus*” *Biotechnology for Biofuels* Vol. 10, in press, DOI: 10.1186/s13068-017-0831-z (2017)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 小俣達男、微細藻類の生産性向上のために考慮すべき諸因子、*IN “微細藻類の大量生産・事業化に向けた培養技術”*、(株)情報機構、pp. 49-60(2013)

2. 小俣達男、培養種の選定と新規開発の指針、*IN* “微細藻類の大量生産・事業化に向けた培養技術”、(株)情報機構、pp. 63-68 (2013)
3. 小俣達男、微細藻類を活用した研究開発テーマの発掘、*IN* “技術シーズを活用した研究開発テーマの発掘”、(株)技術情報協会、pp. 184-187 (2013)
4. 池田和貴、「リン脂質の質量分析解析法の新展開」、*IN* “最新生理活性脂質研究—実験手法、基礎的技術とその応用—”(遺伝子医学 MOOK 24号)、メディカルドゥ、pp. 39-43 (2013)
5. Kazutaka Ikeda, “Mass-spectrometric analysis of phospholipids by target discovery approach”, *IN* “Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols”, Springer Japan, pp.349-356. (2015)

(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 13 件、国際会議 3 件)

1. 小俣達男(名大)、藻類を用いたバイオ燃料生産における窒素コスト低減の重要性と技術的方策、第 53 回日本植物生理学会年会、京都、2012 年 3 月 18 日
2. 小俣達男(名大)、ラン藻を用いた有用物質生産系の開発において細胞外多糖産性ラン藻から学ぶこと、日本植物学会第 76 回大会、姫路、2012 年 9 月 15 日
3. Tatsuo Omata(名大)、How can we manage the nitrogen cost in algal biofuel production? 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Kochi, Japan, 2012 年 7 月 14 日
4. 池田和貴(慶應大)、Retro MRM によるノンターゲット型の高網羅的な脂質メタボローム解析の取り組み、第 61 回質量分析総合討論会、つくば、2013 年 9 月 12 日
5. 小俣達男(名大)、光合成生物の窒素過剰に対する応答の新理解、第 55 回日本植物生理学会年会、富山、2014 年 3 月 18 日
6. 池田和貴(理研)、真の網羅的なリポドミクス技術の確立に向けた取り組み、第 56 回日本脂質生化学会、大阪、2014 年 6 月 6 日
7. 愛知真木子(中部大)、微細藻類における脂質生産の現状と課題、第 45 回中部化学連合会秋季大会、春日井、2014 年 11 月 29 日
8. Kazutaka Ikeda(理研)、Multi lipidomics platforms for focusing globally on lipo-quality, Radiation Effects Research Foundation Workshop, Hiroshima Japan, 2014 年 12 月 2 日
9. 池田和貴(理研)、SWATH-MS を用いた次世代ノンターゲットメタボロミクス、第 9 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、横浜、2015 年 3 月 12 日
10. Tatsuo Omata(名大)、The energetically feasible approach to biofuel production using photosynthetic microorganism, Japan-Germany Binational Seminar “Harvesting Light: From light to biotechnological products”, Atami, Japan, 2015 年 3 月 25 日
11. 池田和貴(理研)、ノンターゲット解析による脂質メタボロミクスの新展開、第 135 回日本薬学会、神戸、2015 年 3 月 26 日
12. 小俣達男(名大)、シアノバクテリア工学:CCM から油脂生産まで、第 6 回日本光合成学会公開シンポジウム、岡山、2015 年 5 月 23 日
13. 小俣達男(名大)、藍藻と糸状菌の人工共生系の構築と利用、藍藻の分子生物学 2015、木更津、2015 年 11 月 17 日
14. 池田和貴(理研)、脂質メタボローム研究の現状と今後の展望、よこはま NMR 研究会、横浜、2016 年 3 月 23 日
15. 小俣達男(名大)、ラン藻を用いた遊離脂肪酸の大量生産を目指して —課題と到達点—、ラン藻ゲノム交流会、東京、2016 年 6 月 25 日
16. 池田和貴(理研)、リポクオリティを見極める新しいリポドミクス技術、必須脂肪酸と健康研究会、京都、2016 年 8 月 5 日

② 口頭発表 (国内会議 24 件、国際会議 4 件)

1. 小俣達男(名大)、藻類を用いた物質生産における窒素コスト削減の重要性とその方策、

- ユーグレナ研究会、春日井、2011年11月12日
2. 上坂一馬(名大)、ゲノム配列上のインサクション部位を検出する新しい手法の開発、第7回日本ゲノム微生物学会、長浜、2013年3月8日
 3. 高谷信之(名大)、ラン藻を用いた脂肪酸生産において鍵となるアシル ACP 合成酵素欠損が与える生育に対する影響、第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月22日
 4. 小島幸治(中部大)、*Synechococcus* sp. PCC7002 株における遊離脂肪酸産生株の構築、第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月22日
 5. Tatsuo Omata(名大), Mechanism of CO₂-responsive regulation of the CCM-related genes by CcmR (CmpR) in *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942, The VIIIth International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms, New Orleans, USA, 2013年5月28日
 6. 小島幸治(中部大)、ラン藻種間での脂肪酸感受性の違いについて、日本植物学会第77回大会、札幌、2013年9月13日
 7. Tatsuo Omata(名大), Effects of P_{II} deficiency and the toxicity of PipX on growth of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, 2nd International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, Puerto Varas, Chile, 2013年11月19日
 8. 小島 幸治(中部大)、海産性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 POP 株における遊離脂肪酸生産の解析、第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月19日
 9. 加藤明宏(名大)、細胞の表層構造の改変によるラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 由来の脂肪酸産生株における生育不良の緩和、第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月19日
 10. 鶴瀬和秀(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を用いた脂肪酸生産に対する窒素制限の影響、第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月19日
 11. 上坂一馬(名大)、ラン藻の無機炭素濃縮機構解明に向けたRNA-Seq法によるアプローチ、第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月19日
 12. 夏目卓実(名大)、ラン藻におけるCO₂欠乏応答性遺伝子 *ccmR* の上流領域の機能解析、第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月19日
 13. 小島幸治(中部大)、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株における脂肪酸耐性株の構築、日本植物学会第78回大会、神奈川、2014年9月12日
 14. 高谷信之(名大)、ラン藻における強光条件で細胞内に蓄積された遊離脂肪酸の光化学系への影響、日本植物学会第78回大会、神奈川(明治大学)、2014年9月13日
 15. 小島幸治(中部大)、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 株の遊離脂肪酸産生株における脂肪酸輸送体遺伝子発現効果、第56回日本植物生理学会年会、東京、2015年3月16日
 16. 前田真一(名大)、ラン藻と高等植物の葉緑体の亜硝酸イオン輸送体の解析、第56回日本植物生理学会年会、東京、2015年3月16日
 17. Shin-ichi Maeda(名大), Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts, International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes 2015, Tübingen, Germany, 2015年8月3日
 18. 小島幸治(中部大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の遊離脂肪酸産生株における脂肪酸輸送体 *mtrE* 遺伝子の発現効果、第79回日本植物学会年会、新潟、2015年9月6日
 19. 池田和貴(理研)、リポクオリティを識別するノンターゲット解析、リポクオリティシンポジウム、三島、2015年9月30日
 20. 前田真一(名大)、ラン藻と高等植物の葉緑体の亜硝酸イオン輸送体の基質親和性の解析、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月19日
 21. 高谷信之(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 における強光条件で膜脂質の脱アシル化を促進するリパーゼの探索、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、

2016年3月19日

22. 氣多澄江(中部大)、アシルACP合成酵素の機能欠損はラン藻 *Synechocystis* PCC 6803 株の低温応答を低下させる、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月19日
23. 加藤明宏(名大)、受動拡散の促進によるラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の脂肪酸生産系の生産性の向上、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月19日
24. 小島幸治(中部大)、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 株の遊離脂肪酸生産株におけるナイセリア属の脂肪酸輸送遺伝子 *mtrE* の発現調節とその効果、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月19日
25. Tatsuo Omata(名大)、“Milking” of cyanobacterial cells as a strategy for sustainable production of biofuels”, Bioenergy 2016, Rome, Italy, 2016年6月14日
26. 加藤明宏(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 を利用した Milking 方式によるバイオ燃料生産、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月17日
27. 中野太陽(名大)、外来性 FFA 輸送体の発現による *Synechococcus elongatus* PCC7942 の遊離脂肪酸生産性の向上、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月17日
28. 高谷信之(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 における低温条件で促進される膜脂質の脱アシル化、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月18日

③ ポスター発表 (国内会議 34 件、国際会議 8 件)

1. 小俣達男(名大)、藻類を用いたバイオ燃料生産における窒素コスト低減の重要性、ラン藻の分子生物学 2011、木更津、2011年12月2日
2. 鶴瀬和秀(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を用いた窒素制限条件下での脂肪酸生産系の構築、第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月21日
3. 上坂一馬(名大)、次世代シーケンサー SOLiD を用いた *Synechococcus elongatus* PCC 7942 のリシーケンス解析、第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月21日
4. Yajun Chang(名大)、Effects of PII deficiency on growth of *Synechococcus elongatus* PCC 7942、第54回日本植物生理学会年会、岡山 2013年3月23日
5. 加藤明宏(名大)、細胞表層構造の改変によるラン藻人工脂肪酸放出系の効率化. 日本植物学会第77回大会(札幌)2013年9月14日
6. 鶴瀬和秀(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 を用いた脂肪酸生産の窒素制限による脂肪酸の生産性向上とそれに伴う新たな問題点. 第65回日本生物工学会大会(広島)2013年9月18日
7. Shin-ichi Maeda(名大)、Characterization of the nitrite-specific transporter from marine cyanobacteria, 2nd International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, Puerto Varas, Chile, 2013.11.19
8. 小島幸治(中部大)、海産性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 における遊離脂肪酸産生の基礎となる POP 株の構築、ラン藻の分子生物学 2013、木更津、2013年11月22日
9. 上坂一馬(名大)、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 の PII 欠損株から生じたアンモニア耐性疑似復帰変異株の解析、ラン藻の分子生物学 2013、木更津、2013年11月22日
10. 池田和貴(理研)、ノンターゲット型の高網羅的な脂質メタボローム“構造”解析の取り組み、第62回質量分析総合討論会、大阪、2014年5月15日
11. 高谷信之(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 のアシル ACP 合成酵素欠損株において強光条件で高蓄積された脂肪酸は光化学系 II の活性阻害を引き起こす、第5回日本光合成学会年会、奈良、2014年5月30日

12. 前田真一(名大)、ラン藻と高等植物の葉緑体の亜硝酸イオン取り込み活性の解析、第5回日本光合成学会年会、奈良、2014年5月30日
13. 加藤明宏(名大)、細胞表層の親水性構造であるO抗原糖鎖の欠損によりラン藻の脂肪酸放出は効率化される、第66回日本生物工学会大会、東京、2014年9月10日
14. 松浦美祥(名大)、ラン藻を用いた脂肪酸生産に対する明暗周期の影響、日本植物学会第78回大会、生田、2014年9月14日
15. Yajun Chang(名大)、“Growth characteristics of a PII-deficient mutant of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 carrying the wild-type *pipX* gene”, The 7th Asian Pacific Phycological Forum, Wuhan, China, 2014年9月22日
16. Lulu Pan(名大), Induction patterns of the promoters of CCM-related genes by CcmR in *Synechococcus* sp. strain PCC7942, The 7th Asian Pacific Phycological Forum, Wuhan, China, 2014年9月22日
17. Kazutaka Ikeda(理研), Multi-lipidomics approach for investigating lipid metabolic changes globally and unbiasedly, 6th international conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators, Tokyo, Japan, 2015年2月11日
18. 高谷信之(名大)、ラン藻を用いた脂肪酸生産において鍵となるアシル ACP 合成酵素は強光条件下での光化学系の活性維持に重要な役割を果たす、第56回日本植物生理学会年会、東京、2015年3月18日
19. 松浦美祥(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を用いた脂肪酸生産に対する明暗周期の影響、第56回日本植物生理学会年会、東京、2015年3月18日
20. 加藤明宏(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の内在性 RND 型輸送体が脂肪酸生産に与える影響、第56回日本植物生理学会年会、東京、2015年3月18日
21. 氣多澄江(中部大)、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 株におけるアシル ACP 合成酵素が低温応答に及ぼす影響、第56回日本植物生理学会年会、東京、2015年3月18日
22. 上坂一馬(名大)、RNA-Seq 法による脂肪酸耐性擬似復帰ラン藻の解析、第56回日本植物生理学会年会、東京、2015年3月18日
23. Nobuyuki Takatani(名大), Acyl-ACP synthetase is essential for high-light acclimation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, Japan-Germany Binational Seminar “Harvesting Light: From light to biotechnological products”, Atami, Japan, 2015年3月25日
24. 辻本良真(名大)、脂肪酸放出ラン藻と糸状菌による硝酸同化を介した人工共生系の構築、第6回日本光合成学会年会、岡山、2015年5月22日
25. Nobuyuki Takatani(名大), Acyl-ACP synthetase is essential for acclimation of photosynthesis to high-light conditions in *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942, International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes 2015, Tübingen, Germany, 2015年8月2-6日
26. Akihiro Kato(名大), Removal of the hydrophilic O-antigen layer on the cell surface improved free fatty acid production in engineered *Synechococcus elongatus*, International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes 2015, Tübingen, Germany, 2015年8月2-6日
27. Tatsuo Omata(名大), Dual role of CmpR (CcmR) in CO₂-responsive gene regulation in *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 and the underlying molecular mechanism, International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes 2015, Tübingen, Germany, 2015年8月2-6日
28. 加藤明宏(名大)、ラン藻の内在性 RND 型脂肪酸輸送体の同定とそれを利用した脂肪酸高放出株の作製、藍藻の分子生物学 2015、木更津、2015年11月16日
29. 高谷信之(名大)、ラン藻を用いた脂肪酸生産系における問題点とその解決策、藍藻の分子生物学 2015、木更津、2015年11月16日

30. 辻本良真(名大)、窒素化合物の授受を介したラン藻と糸状菌の人工的外部共生系の構築、藍藻の分子生物学 2015、木更津、2015年11月16日
31. 上坂一馬(名大)、ゲノム構造変化を感度よく検出する方法: InDel Hunter. 第10回日本ゲノム微生物学会年会、東京、2016年3月4日
32. 坂本貴之(名大)、ラン藻におけるアンモニア耐性機構とそれに関わる P_{II} タンパク質の未知機能の解析、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月18日
33. 吉田和裕(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を用いた脂肪酸生産株の生育に対する明暗周期の影響、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月18日
34. 上坂一馬(名大)、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 脂肪酸耐性遺伝子の探索、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月20日
35. Lulu Pan(名大)、Analysis on the relationship between the two LysR-type transcriptional factors RbcR and CcmR in *Synechococcus elongatus* PCC7942、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月20日
36. 辻本良真(名大)、ラン藻と糸状菌の人工共生系を利用した脂肪酸高放出ラン藻のスクリーニング、第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月20日
37. 高谷信之(名大)、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 における強光条件下での光化学系IIの修復の活性化に関与するガラクトリパーゼ、第7回日本光合成学会年会およびシンポジウム、東京、2016年5月28日
38. 加藤明宏(名大)、二層培養法によるラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の脂肪酸生産性の向上、第68回日本生物工学会大会、富山、2016年9月30日
39. 青葉璃沙(名大)、Nitrate transporter activity of novel transmembrane proteins in cyanobacteria、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月16日
40. 坂本貴之(名大)、PII を欠損したラン藻変異株のアンモニア感受性機構の解明とアンモニア耐性に関わる PII の未知機能の探索、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月16日
41. 吉田和裕(名大)、培地からの遊離脂肪酸除去は日周条件における *Synechococcus elongatus* PCC7942 由来脂肪酸生産株の生育を高める、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月16日
42. 上坂一馬(名大)、An improved workflow to complete bacterial genomes、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月18日

(4)知財出願

①国内出願 (1件)

1. ラン藻の脂肪酸放出株及び脂肪酸耐性株の作出法、愛知真木子・小島幸治・小俣達男、学校法人中部大学・国立大学法人名古屋大学、平成27年2月27日、特願2015-038317

(5)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・名大で開発した次世代シーケンサー用の解析プログラムについては、ソフトウェア開発プロジェクトのためのソースコード管理サービス「GitHub」にて公開予定。

②社会還元的な展開活動

- ・セミナーなどで、研究者に対し、本研究で採用した「Milking 法」による有用物質生産の有効性について紹介を行っている。

§ 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 |
|-----------|--|---------------|--------|--------------------------------------|
| 24年3月18日 | 日本植物生理学会シンポジウム「微細藻類による燃料生産:実現への課題と生物学からの解決策」 | 京都産業大学 | 200人以上 | 帝京大の篠村知子教授と小俣が共同企画・開催 |
| 24年4月21日 | 中部大学春のオープンキャンパス | 中部大学 | 42人 | 研究室を公開し、藻類によるバイオエネルギー生産の説明を行った。 |
| 24年6月14日 | 模擬講義×2回 | 愛知工業大学名電高等学校 | 50人 | 藻類によるバイオ燃料生産についての講義 |
| 24年7月6日 | 模擬講義×2回 (2年生対象) | 愛知県立春日井南高等学校 | 42人 | 藻類によるバイオ燃料生産と分子生物学の発展についての講義 |
| 24年8月5-7日 | 中部大学夏のオープンキャンパス | 中部大学 | 115人 | 研究室を公開し、藍藻によるバイオエネルギー生産および研究内容の説明。 |
| 24年10月13日 | 中部大学秋のオープンキャンパス | 中部大学 | 35人 | 研究室を公開し、藍藻によるバイオエネルギー生産および研究内容の説明。 |
| 24年10月26日 | 模擬講義×2回 (1年生対象) | 愛知県立春日井南高等学校 | 40人 | 藻類によるバイオ燃料生産についての講義 |
| 25年4月20日 | 中部大学春のオープンキャンパス | 中部大学 | 38人 | 研究室を公開し、藍藻によるバイオエネルギー生産および研究内容の説明。 |
| 25年6月27日 | コスモサイエンスコース 模擬講義 | 愛知県立春日井高等学校 | 35人 | 遺伝子組換えと藻類バイオ燃料生産についての模擬講義 |
| 25年8月4-6日 | 中部大学夏のオープンキャンパス | 中部大学 | 144人 | 研究室を公開し、藍藻によるバイオエネルギー生産および研究内容の説明。 |
| 25年8月23日 | 中部大学フェア | 中部大学 | 20人 | 「藻類バイオ燃料生産への方策と現状」ブース展示を行った。 |
| 25年10月19日 | 中部大学秋のオープンキャンパス | 中部大学 | 32人 | 研究室公開し、藍藻によるバイオエネルギー生産および研究内容の説明。 |
| 26年1月9日 | NAIST 植物科学セミナー | 奈良先端科学技術大学院大学 | 30人 | 藻類バイオ燃料実用化のための課題と解決策についての講演 |
| 26年1月22日 | NPOバイオ「ものづくり中部」平成25年度第2回環境分科会 | 名古屋大学 | 25人 | 微細藻類をエネルギー・資源として産業利用するための技術課題についての講演 |

| | | | | |
|-----------|-----------------------|--------------------|------|---|
| 26年4月19日 | 中部大学春のオープンキャンパス研究室公開 | 中部大学 | 35人 | 実験室, ラン藻培養装置等の見学および藻類におけるエネルギー生産に関する研究概要の説明 |
| 26年6月4日 | 模擬講義 | 中部大学 | 37人 | 藻類におけるエネルギー生産とその現状について |
| 26年8月8-9日 | 中部大学夏のオープンキャンパス研究内容紹介 | 中部大学 | 100人 | 藻類におけるエネルギー生産に関する研究の説明 |
| 26年9月17日 | 多治見西高等学校模擬講義 | 多治見西高等学校 | 30人 | 遺伝子工学を用いて藍藻でバイオエネルギーをつくる |
| 26年9月18日 | 中部大学フェア | 中部大学 | 50人 | 「微細藻類におけるバイオエネルギー生産性向上技術の開発」と題してブース展示を行った |
| 26年10月18日 | 秋のオープンキャンパス研究室公開 | 中部大学 | 50人 | 微細藻類におけるバイオエネルギー生産について, 説明および研究室, 脂肪酸生産を行う藍藻の展示を行った |
| 26年12月2日 | 愛知教育大学岡崎中学校追及活動 | 中部大学 | 1人 | 藻類におけるバイオエネルギー生産の現状と課題について解説するとともに, 研究室の見学を行った |
| 27年2月3日 | 岐阜県立多治見北高等学校模擬講義 | 岐阜県立多治見北高等学校 | 45人 | 遺伝子工学を用いた藍藻におけるバイオエネルギー生産について講義を行った |
| 27年4月18日 | 中部大学春のオープンキャンパス研究室公開 | 中部大学 | 37人 | 藻類におけるエネルギー生産に関する研究の説明 |
| 27年8月7-9日 | 中部大学夏のオープンキャンパス | 中部大学 | 20人 | ラン藻による脂肪酸生産についてパネル展示を行った |
| 27年9月17日 | 中部大学フェア | 中部大学 | 20人 | 「光合成細菌ラン藻におけるバイオエネルギー生産系の構築」展示を行った |
| 27年10月17日 | 秋のオープンキャンパス研究室公開 | 中部大学 | 35人 | 研究室内を案内し, 藍藻の培養の様子を見学, 研究内容について説明を行った. |
| 28年6月21日 | 模擬講義 | 岐阜県立多治見北高等学校 | 35人 | 遺伝子組換えと藻類バイオ燃料生産についての模擬講義 |
| 28年8月7-9日 | 中部大学夏のオープンキャンパス | 中部大学 | 20人 | ラン藻による脂肪酸生産についてパネル展示を行った |
| 28年9月15日 | 中部大学フェア | 中部大学 | 30人 | 「ラン藻を用いた遊離脂肪酸高効率生産系の構築」パネルと脂肪酸生産株の展示 |
| 29年1月25日 | 名大サイエンスカフェ | ナディアパーク・デザインセンタービル | 35人 | 講演「藻類でバイオ燃料をつくるはなし」はどこまで進んだか」 |

| | | | | |
|---------|---------|---------------|-----|----------------------|
| 29年2月4日 | サイエンス講座 | 名古屋市 守山図書館 | 20人 | 講演「微細藻類は人類の未来を変えるか？」 |
|---------|---------|---------------|-----|----------------------|

§6 最後に

目標の達成度と成果の自己評価

本研究計画では、遊離脂肪酸 (FFA) の放出速度 $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、および放出された FFA の細胞乾燥重量に対する比 4 を 2 つの数値目標として開発研究を行った。これらのうち前者については、目標をほぼ達成することができた。後者については、現状ではまだ 1 をやや超えたレベルであるが、細胞の増殖を抑制しつつ FFA の放出を増加させることに成功し、先行研究で報告された値を 10 倍に引き上げることができており、我々の提案した方法の原理的な正しさが証明されたと考えている。今後の研究によって当初目標値を達成するべく、さらなる努力を継続している。

今後の研究の見通しについて

上記の目標値は、細胞の増殖に必要な肥料、特に窒素の利用効率の向上のために設定したものである。この目標の達成の目処がつきつつある現在、藻類バイオ燃料の実用化に向けた次の課題は、ラン藻や微細藻類の共通の問題である「強光に対する弱さ」の克服である。これらの生物の光合成は、太陽光の十分の一程度の弱い光強度で飽和してしまい、それ以上の光強度では光阻害に苦しむことになる。光阻害を軽減するため、光合成生物は余剰エネルギーを熱に変換して捨てる様々な機構をもっているが、これらの機構を強化するだけでは光合成能力は上がらない。我々が発展させていった FFA 生産系では、FFA の合成と細胞外への放出過程に 1 分子あたり 14~16 分子の NADPH を消費するので、この過程を光エネルギー過剰条件下における過剰還元力の排出過程として利用することにより、光耐性の強化と FFA 生産量の増加を同時に実現することを目指した研究を進める計画である。

基礎研究と応用研究の関係

本研究計画は、バイオ燃料の実用化を目指すという点で応用指向のものであるが、研究を進めるうちに、ラン藻の脂質代謝の未知領域を開拓しつつ進める状況となり、FFA の輸送体や強光条件下で活性化されるリパーゼなど、新規の機能性因子を発見するに至った。これらは FFA 生産性の向上に有用であるだけでなく、基礎研究上の重要な発見であるが、従来の基礎研究の延長上には発見し得なかったものである。基礎研究と応用研究は対置的にとらえられたり、後者が前者の延長上に想定されることが多いが、今回の経緯が教えるところは、基礎研究と応用研究は一枚の紙の両面のように表裏一体のものであるということである。「基礎」にこだわることなく、「出口」ばかりに目を奪われることなく、バランスのとれたアプローチをこれからも続けたいと考えている。