

研究報告書

「糖代謝ダイナミクス改変によるラン藻バイオプラスチックの増産」

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: 小山内 崇

1. 研究のねらい

本研究では、光合成をする細菌ラン藻(シアノバクテリア)を用いて、バイオプラスチックであるポリヒドロキシ酪酸(PHB)を増産することを目的とした。PHBは、ラン藻などの細菌が合成するポリエステルであり、生分解性を有することが知られている。ラン藻を用いて二酸化炭素からPHBを合成することにより、将来的に脱化石燃料に通じる環境技術の創出へとつなげることを大きな目標にしている。

ラン藻を始めとする微細藻類を用いた物質生産は、世界的に熾烈な競争となっている。目的物質を増やすためには、目的物質を合成する酵素の活性を増大させることが直接的な方法である。しかし、この方法では、細胞内の代謝バランスが崩れて細胞の増殖が悪くなることや、基質が枯渇して酵素活性に見合った目的物質の増加が見られないなど、様々な問題がある。そこで本研究では、局所的な酵素活性の増大ではなく、代謝全体、特に有機化合物の元となる炭素の代謝を大きく変える手法を開発し、PHBなどの有用原料を増産するという新しい方法論の開発を目的とした。

過去の研究から、細菌の基本転写装置であるRNAポリメラーゼシグマ因子SigEが、炭素の代謝、特に糖異化を正に制御することが明らかになっていた。他の光合成生物同様に、ラン藻の代謝は、大気中の二酸化炭素を固定して多糖類(主にグリコーゲン)を合成する糖の「同化」と、合成した多糖類を分解して、炭素源やエネルギー源とする糖の「異化」に大別される。糖異化にはグリコーゲン異化や、解糖系、酸化的ペントースリン酸経路などが含まれ、SigEが糖異化に関与する酵素遺伝子の転写を幅広く促進することが明らかになっていた。

本研究では、このSigEを始めとする転写制御因子を利用することにより、グリコーゲンなどの分解を促進し、炭素源の流れをPHBへと向けた。この手法を「糖代謝ダイナミクスの改変」と名付け、ラン藻の代謝改変とPHB生産における新手法を開発した。また、この方法では、炭素やエネルギーの代謝を大きく変えるため、PHBの生産以外にも幅広く応用できる可能性がある。本研究では、研究の過程でPHBと水素の生産が関連していることが明らかになり、PHB以外の物質、特に水素の生産手法の開発についても研究対象とした。さらにSigEだけでなく、他の転写因子も解析をすることで、SigEとは異なる形で、代謝やPHB生産を制御するメカニズムを明らかにした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、主に淡水性ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて研究開発を行った。特に、RNAポリメラーゼシグマ因子 SigE や窒素応答性レスポンスレギュレーター Rre37 など、

ラン藻の転写制御因子を中心に解析を行った。これらの転写制御因子の遺伝子を改変することにより、ラン藻の糖代謝を大きく変え、目的物質であるポリヒドロキシ酪酸(PHB)を増産することに成功した。PHB は、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の一種で生分解性のポリエステルである。他の細菌同様、ラン藻は窒素欠乏時にPHBを合成することが知られている。ラン藻ではこれまでに、PHB 生合成酵素遺伝子の転写制御因子は見つかっていなかった。SigE、または、Rre37 タンパク質を、ラン藻細胞内で増加させることにより、PHB 合成酵素の転写やタンパク質量が増加することが分かり、両タンパク質が、PHB 合成酵素遺伝子の転写制御因子であることを明らかにした。また、SigE に関しては、PHB や糖代謝だけでなく、細胞のサイズや光合成、また、水素生産にも関係することが分かった。特に SigE タンパク質を増加させることで、嫌気条件での水素生産量が、野生株の2倍に増加することが分かった。このように、本研究では、代謝の制御因子を明らかにしていくことで、バイオプラスチックの増産に新手法をもたらすとともに、水素といった他の有用物質の生産方法も開発することができた。

これらの研究成果は、原著論文として国際誌で発表された他、特許出願、プレスリリース、新聞報道などによっても、一般社会に公開された。

(2) 詳細

本研究では、ラン藻が窒素欠乏時に合成するポリエステルである PHB の増産を目指した。研究は、淡水性非窒素固定型ラン藻である *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて行った。

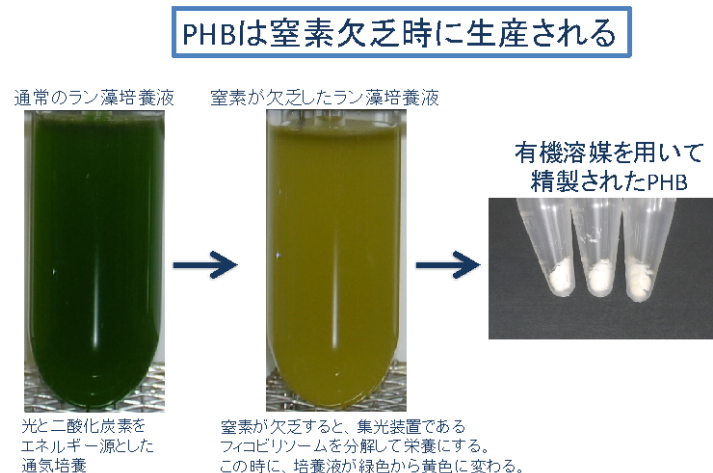


図1 ラン藻 *Synechocystis* の培養液および精製された PHB

研究テーマ A「RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE による糖代謝制御機構の解明と PHB 増産」
 発表論文 Osanai et al. 2011, *J. Biol. Chem.*; Osanai et al. 2013, *DNA Res.*

過去の研究から、*Synechocystis* の *sigE* 欠損株では、グリコーゲン異化、解糖系、酸化的ペントースリン酸経路などの糖異化酵素遺伝子群の転写が減少することが明らかになっていた。

本研究では、光合成反応中心タンパク質 PsbAII の遺伝子のプロモータを利用することで、SigE タンパク質量を増やした SigE 過剰発現株を構築した。SigE 過剰発現株を解析したところ、グリコーゲン異化酵素や酸化的ペントースリン酸経路の酵素の mRNA およびタンパク質量が増加することが分かり、グリコーゲン量が約2~3割減少することが明らかになった。キャピラリー電気泳動マスマスペクトロメトリーによるメタボローム解析を行ったところ、アセチル CoA やクエン酸など、糖異化下流の代謝産物が増加することが分かった。これらの結果より、SigE を過剰発現することによって、糖異化が包括的に促進されることが明らかになった(Osanai et al. 2011, *J. Biol. Chem.*)。

SigE 過剰発現株を用いてトランスクリプトーム解析を行った結果、PHA 合成酵素である PhaC と PhaE の遺伝子が、SigE の制御下にあることが示唆された。そこで、SigE 過剰発現株を用いて、PHB 合成に関与する4つ酵素(PhaA, B, C, E)の遺伝子発現を調べたところ、mRNA およびタンパク質量が変化することが分かった。窒素欠乏時の PHB 量を比較したところ、SigE の過剰発現によって、PHB 量が 2.5 倍に増加することが明らかになった。一方、分子量や化学組成など、PHB の質は変化しなかった。これまでにラン藻では、PHA 合成酵素遺伝子の転写制御因子は見つかっておらず、本研究によって、ラン藻における最初の PHA 合成酵素遺伝子の転写制御因子の発見となった(Osanai et al. 2013, *DNA Res.*)。

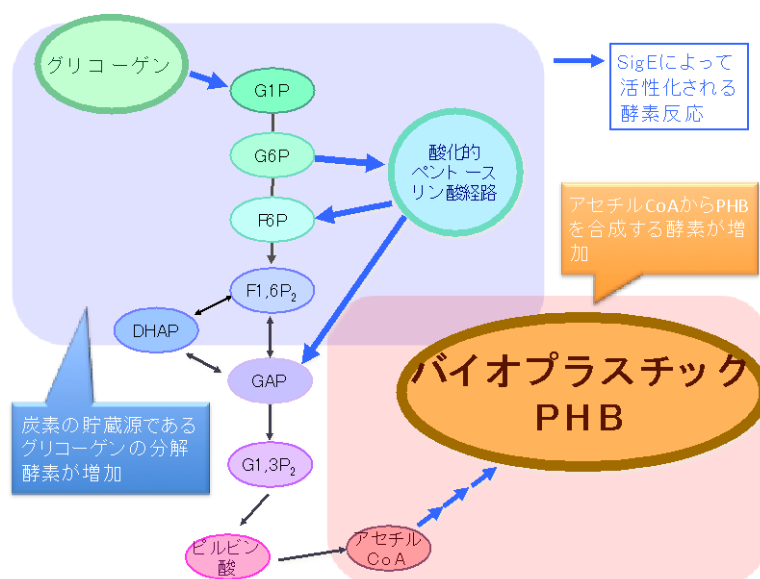


図2 SigE による糖代謝制御と PHB 増産のモデル図

SigE は、グリコーゲン異化、酸化的ペントースリン酸経路、PHB 合成などに関与する酵素遺伝子の発現を包括的に促進することが分かった。

研究テーマ B「窒素欠乏時のラン藻の代謝変化とレスポンスレギュレーターRre37 による PHB 増産」

発表論文 Osanai et al. 2014, *Environ. Microbiol.*; Osanai et al. 2014, *Plant Physiol.*

過去の研究から、レスポンスレギュレーターRre37 は、SigE と同様に、窒素欠乏時に転写

が誘導されることが知られていた。*rre37*欠損株を用いた過去の解析から、Rre37は、グリコーゲン異化や解糖系など、SigEとは違った形で *Synechocystis* の糖代謝に関与することが知られていた。

本研究において、Rre37 過剰発現株を構築し、トランスクリプトーム解析を行ったところ、グリコーゲン異化や解糖系、PHB 合成およびアミノ酸代謝に関与する酵素遺伝子の発現が増加していることが明らかになった。特に Rre37 過剰発現によって、通常培養条件下でのグリコーゲン量が野生株の 10 分の 1 に減少した。また、Rre37 過剰発現によって、特に PhaA および PhaB の発現が増加することが分かった。窒素欠乏時の PHB 量を調べたところ、Rre37 過剰発現によって、野生株(対照株)の2倍に増加した。また、SigE との二重過剰発現を行ったところ、野生株の3倍に増加することが明らかになった

(Osanai et al. 2014, *Plant Physiol.*)

窒素欠乏条件で培養したラン藻から抽出したPHB量の比較

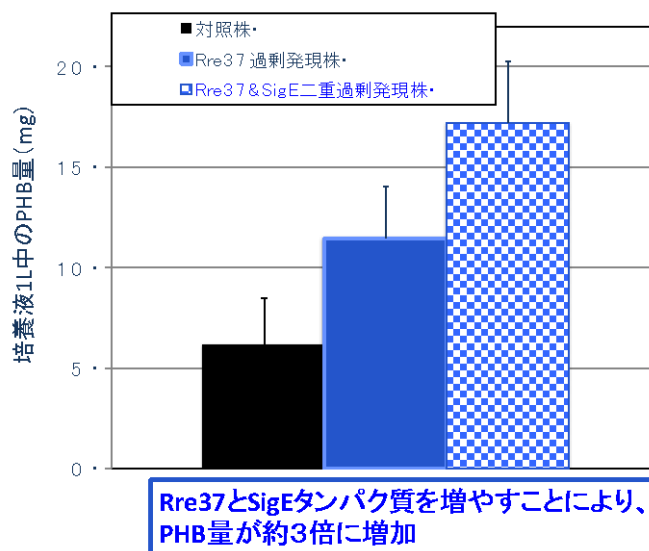


図3 窒素欠乏時の Rre37 過剰発現株および Rre37&SigE 二重過剰発現株の PHB 量

また、本研究では、野生株や Rre37 過剰発現株を用いて、詳細なメタボローム解析を行った。その結果、ラン藻における代謝の新事実が明らかになってきた。野生株の窒素欠乏時のメタボロームデータを検討したところ、リン酸基が多いヌクレオチドほど、より大きく減少するという法則が見出された。また、還元力 NADH と NADPH の量を測定したところ、NADPH/NADH 比が窒素欠乏によって減少することが分かった。さらに窒素欠乏4時間後では、窒素を多く含むアミノ酸が減少するのに対し、それ以外のアミノ酸はすべて増加するという変化が起こった。このように、窒素欠乏になったラン藻は、炭素や窒素代謝産物をダイナミックに再分配することが示された(Osanai et al. 2014, *Environ. Microbiol.*)。

さらに Rre37 過剰発現株のトランスクリプトームおよびメタボローム解析により、Rre37 が TCA 回路(クエン酸回路)とオルニチン回路(尿素回路)の遺伝子を制御することが明らかになった。これらのデータを統合すると、TCA 回路とオルニチン回路の“ハイブリッド回路”

が窒素欠乏下で出現する可能性が示唆された。この回路では、1サイクルあたり2分子のアンモニア分子が同化されるため、窒素欠乏時に、一過的にこのハイブリッド回路が活性化されることは、生理学的に重要と思われる(Osanai et al. 2014, *Plant Physiol.*)。

このように本研究では、PHB 増産に転写制御因子を利用するという新しい手法を開発するとともに、ラン藻の代謝における法則を見つけるなど、基礎研究においても重要な知見を提供した。

研究テーマ C「SigE 過剰発現株における代謝、光合成、細胞の形態など多様な表現型と水素の増産」

発表論文 Osanai et al. 2013, *Plant J.*

SigE を解析する過程で、SigE 過剰発現株では様々な変化が起こることが明らかになった。SigE 過剰発現によって、細胞の直径が約 1.6 倍に増加することが分かった。また、SigE 過剰発現で、通常培養条件下での光合成活性および呼吸活性が 1、2 割減少した。さらに、トランスクリプトーム解析の結果より、水素の生産に関与するヒドロゲナーゼ遺伝子の発現が、SigE 制御下にあることが分かった。ラン藻は特に嫌気条件下で水素を生産することが知られている。そこで嫌気条件下の水素生産量を調べたところ、明暗条件ともに、SigE 過剰発現によって、水素生産量が約 2 倍に増加することが明らかになった。このように SigE は、好気・窒素欠乏条件では PHB の生産を、嫌気条件では水素の生産を促進するというユニークな因子であることが示された。

3. 今後の展開

本研究では、SigE や Rre37 を改変することで、特に糖異化が促進され、バイオプラスチックである PHB が増加することが分かった。一方で、現在の PHB 生産系では、二酸化炭素を炭素源としており、培養液あたりの PHB 生産量は、糖を炭素源とした従属栄養細菌よりも二桁以上低い。今後はさらなる代謝改変を行い、二酸化炭素からでも糖由来の PHB 生産に匹敵する技術を開発することが重要である。また、本研究では PHB の量を増やすことに主題をおいたが、PHB の分子量を増大させることや、別の PHA を合成することなど、PHA の質を変え、高機能化させることも重要である。また、SigE が水素生産にも関与することが明らかになり、バイオプラスチックと水素という一見関係のない物質が、なぜ同じ因子によって制御されているかという疑問を明らかにする必要がある。これにより、応用面ではバイオプラスチックと水素の同時生産という、生物特有のユニークな物質生産系の構築が可能となるかもしれない。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究によって、SigE および Rre37 という2つのタンパク質が、ラン藻の代謝改変および PHB 増産に有用であることを示すことができた。また、SigE は、嫌気条件で水素の生産にも関与するというユニークな結果を得ることが出来た。さらに、メタボローム解析を組み合わせることで、ラン藻の代謝制御機構についても一部解明が出来たと考えている。現在投稿中の論文を除いても、5本の論文(国際誌)を筆頭著者として発表し、また、2件の特許出願を行うことが

出来た。

一方で、現時点での PHB 生産量については、まだまだ社会実装からはほど遠い。我々の系では炭素源として糖を用いず、二酸化炭素のみから PHB を合成しているので、生産量が低いのは当然ではあるが、今後は糖を炭素源とした PHB 生産に匹敵するレベルの PHB 生産ラン藻系を構築していきたいと考えている。

(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)。

光合成を行う細菌であるラン藻を用いて、生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の増産を行うことを目的に、シグマ因子や転写制御因子に着目し、代謝ダイナミクスを改変したラン藻の作成、さらに、それらを用いた安価で環境に優しいバイオプラスチック生産系の確立を目指した研究を行っている。一期生として、3年の研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、特許出願と論文作成などの業績で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、未完成な成果部分の充実を図り、更なる論文成果に繋がることを期待する。また、研究者として、豊かな感性と豊富なアイデアを持つと共に、チャレンジ精神を忘れずに研究を進めていって欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Takashi Osanai**, Akira Oikawa, Miyuki Azuma, Kan Tanaka, Kazuki Saito, Masami Yokota Hirai, and Masahiko Ikeuchi. Genetic engineering of the group 2 sigma factor SigE widely activates the expressions of sugar catabolic genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* (2011) **286**, 30962–30971.
2. **Takashi Osanai**, Keiji Numata, Akira Oikawa, Ayuko Kuwahara, Hiroko Iijima, Yoshiharu Doi, Kan Tanaka, Kazuki Saito, and Masami Yokota Hirai. Increased bioplastic production with an RNA polymerase sigma factor SigE during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* (2013) **20**, 525–535.
3. **Takashi Osanai**, Ayuko Kuwahara, Hiroko Iijima, Kiminori Toyooka, Mayuko Sato, Kan Tanaka, Masahiko Ikeuchi, Kazuki Saito, and Masami Yokota Hirai. Pleiotropic effect of *sigE* over-expression on cell morphology, photosynthesis and hydrogen production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.* (2013) **76**, 456–465.
4. **Takashi Osanai***, Akira Oikawa*, Tomokazu Shirai, Ayuko Kuwahara, Hiroko Iijima, Kan Tanaka, Masahiko Ikeuchi, Akihiko Kondo, Kazuki Saito, and Masami Yokota Hirai. Capillary electrophoresis-mass spectrometry reveals the distribution of carbon metabolites during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Environ. Microbiol.* (2014) **16**, 512–524 (*Equally contributed).
5. **Takashi Osanai**, Akira Oikawa, Keiji Numata, Ayuko Kuwahara, Hiroko Iijima, Yoshiharu Doi, Kazuki Saito, and Masami Yokota Hirai. Pathway-level acceleration of glycogen catabolism by

response regulator Rre37 in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Physiol.* (2014) DOI: 10.1104/pp.113.232025

(2)特許出願

研究期間累積件数:3件

国内出願

1.

発明者: 小山内崇 平井優美 斎藤和季 沼田圭司

発明の名称: 藍藻においてプラスチック原料および関連物質を生産する方法

出願人: 独立行政法人理化学研究所

出願日: 2013/3/14

出願番号: 特願 2013-52208

(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)

学会口頭発表

国際会議

- (1) Takashi Osanai, Akira Oikawa, Miyuki Azuma, Kan Tanaka, Masahiko Ikeuchi, Kazuki Saito, Masami Yokota Hirai “Engineering of cyanobacterial carbon metabolism with a group2 sigma factor SigE.” The 3rd International Conference on Biobased Polymers. Beijing, China, October, 2011 (招待講演).
- (2) Takashi Osanai, Akira Oikawa, Miyuki Azuma, Kan Tanaka, Masahiko Ikeuchi, Kazuki Saito, Masami Yokota Hirai “Engineering of sugar catabolism with modified transcriptional regulators in *Synechocystis* sp. PCC 6803.” Microalgal Products: From Metabolic Fundamentals to Promising Applications, Binational Seminar Germany – Japan, Freiburg–Munzingen, Germany, October–November, 2011 (招待講演).
- (3) Takashi Osanai “Using transcriptional regulators for metabolic engineering of cyanobacteria” 1st Korea–Japan Microalgae Symposium. Daejeon, Korea, October, 2013.
- (4) Takashi Osanai “Genetic engineering of the transcriptional regulators for bioplastic and hydrogen production In *Synechocystis* sp. PCC 6803. International Workshop of Cyanofactory, Tokyo, Japan, March, 2014 (招待講演).

国内会議

- (1) 小山内崇 桑原亜由子 飯嶋寛子 斎藤和季 平井優美 窒素欠乏下におけるシアノバクテリア電子伝達のスイッチングについて 日本植物生理学会年会 京都産業大学 京都 2012年3月
- (2) 小山内崇 及川彰 沼田圭司 豊岡公德 佐藤繭子 桑原亜由子 飯嶋寛子 土肥義治 斎藤和季 平井優美 転写制御因子の解析を中心としたシアノバクテリア糖代謝の理解と制御 日本生物工学会年会 神戸国際会議場 兵庫 2012年10月
- (3) 小山内崇 糖異化グローバルレギュレーターを利用したラン藻バイオプラスチックの増産

第7回メタボロームシンポジウム 慶応義塾大学鶴岡キャンパス 山形 2012年10月(招待講演)

- (4) 小山内崇 代謝グローバルレギュレーター改変によるラン藻 PHB の増産 若手研究会「新規材料創製を目指した合成生物学」理化学研究所(和光) 埼玉 2012年11月(招待講演)
- (5) 小山内崇 沼田圭司 及川彰 桑原亜由子 飯嶋寛子 齊藤和季 平井優美 転写制御因子を用いたラン藻の代謝と光合成の改変 日本ゲノム微生物学会年会 神戸国際会議場 兵庫 2013年3月
- (6) 小山内崇 転写制御因子を中心としたラン藻の光合成代謝工学と物質生産 2013年植物科学シンポジウム コクヨホール 東京 2013年12月(招待講演)
- (7) 小山内崇 及川彰 沼田圭司 飯嶋寛子 桑原亜由子 齊藤和季 平井優美 Metabolic engineering using a nitrogen-responsive response regulator in cyanobacteria 日本植物生理学会年会 富山大学 富山 2014年3月

著作物

- (1) 小山内崇 ラン藻によるバイオプラスチックおよび水素生産のための基礎技術開発 月刊クリーンエネルギー2014年1月号 日本工業出版株式会社
- (2) 小山内崇 ラン藻の代謝改変によるバイオプラスチック増産 化学と生物 日本農芸化学会 印刷中

プレスリリース

- (1) 2013年7月9日 独立行政法人理化学研究所、窒素欠乏時のラン藻の代謝を網羅的に解析し、代謝の矛盾を解消 (Osanai et al. 2014 Environ. Microbiol.の論文について)
- (2) 2013年7月16日 JST・理研共同発表 ラン藻が作るバイオプラスチックの増産に成功 代謝経路を制御する新手法 (Osanai et al. 2013 DNA Res.の論文について)
 - i. 日刊工業新聞 2013年7月17日 理研、ラン藻由来のバイオプラを代謝制御で2.5倍増産
 - ii. 化学工業日報 2013年7月17日 理研 藍藻からバイオプラ 遺伝子改良で収量向上
 - iii. 日経産業新聞 2013年7月18日 バイオプラの作製量2.5倍に 理化学研が新技術
 - iv. フジサンケイビジネスアイ 2013年11月13日 ラン藻のバイオプラスチック生産量2.5倍に
- (3) 2013年9月11日 理研発表 ラン藻の水素生産量を2倍以上増加させることに成功
ー水素とバイオプラスチックの生産は同じタンパク質「SigE」が制御ー (Osanai et al. 2014 Plant J.の論文について)
 - i. 化学工業日報 2013年9月20日 藍藻の水素生産量を倍増 理研、遺伝子改変で実現
- (4) 2014年2月17日 理研発表 ラン藻のバイオプラスチック生産が3倍増
ーバイオプラスチック生産の新規因子「Rre37」の発見と代謝制御機構の解明ー (Osanai et al. 2014 Plant Physiol.の論文について)
 - i. 日刊工業新聞 2014年2月24日 理研、ラン藻遺伝子を改変しバイオプラ生産量を3倍に増やすことに成功