

研究報告書

「自己溶菌藻と発現ベクターを組み合わせた有用物質生産・回収による排気 CO₂ ガス再利用資源化のための基盤技術創成」

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: 朝山 宗彦

1. 研究のねらい

糸状性シアノバクテリア ABRG5-3 株は、細胞増殖が早く、炭酸ガス固定能にも優れた新種藻です。また細胞破碎剤添加や超音波などによる物理的な刺激を与えなくても、培養条件に依存して自己溶菌する特徴を有しています。一方、バイオ燃料等有用物質製造に関しては、最近、藻の高生産能が注目されています。本研究では、まず自己溶菌メカニズムを理解することを目的としています。次に藻発現ベクターを構築し、それを利用して遺伝子操作藻を創生し、バイオ燃料等任意の目的物質を藻細胞に高生産させるばかりでなく、生産藻細胞を手間要らずに溶かして、培地中から目的物質を簡単に回収する基盤技術の創成を目指しています。

2. 研究成果

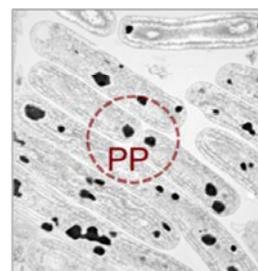
(1) 概要

本研究では、新種藻 ABRG5-3 株の特徴である自己溶菌の要因の一端を解明することができました。一方、有用物質生産に関しては、シアノバクテリア藻発現ベクターの構築に成功し、目的物質をシアノバクテリアで高生産することが可能になりました。その一例として、バイオ燃料(飽和炭化水素)高生産株を創生しました。この株を用い、2段階培養法(振とう培養後、静置条件に晒す)により溶菌が簡単に誘導されることを発見しました。これを利用して、溶菌液上澄から手間要らずにバイオ燃料を回収することができるようになりました。

(2) 詳細

(1) 自己溶菌メカニズム解明

自己溶菌は、まず「初期」過程ではチラコイド内膜系の崩壊、続いて「中期」では細胞間接着点付近に蓄積するポリリン酸(PP, 右図)などリン酸化合物による細胞構造上の歪みの誘導(学術論文 Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013)、そして「後期」では細胞壁が溶菌酵素によって崩壊することが明らかになってきました。このように、自己溶菌は、幾つかの要因が組み合わさって進行するものと思われます。更なる原因究明として、チラコイド膜構造形成に関与する脂質等の成分分析や細胞壁溶菌酵素遺伝子等の同定を試みています。



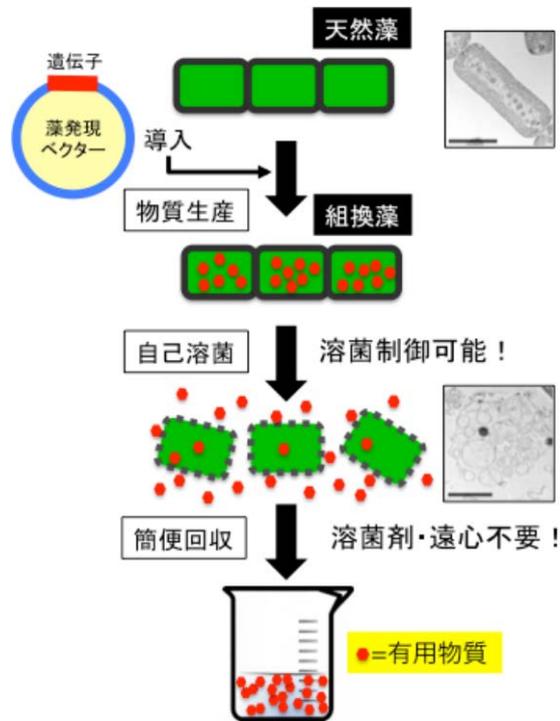
(2) シアノバクテリア発現ベクター開発

シアノバクテリアを含むグラム陰性菌を広域宿主とする藻発現(シャトル)ベクター pAM の開発に成功しました(学術論文 Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012)。このベクターの遺伝子発現制

御領域(ECE)は、明暗培養条件に関わらず、目的遺伝子の高効率転写発現と mRNA の安定性が確保されるようにデザインされています。これにより組換ベクターは、接合伝達により様々なシアノバクテリア藻細胞へ導入することができます。

(3) バイオ燃料高生産藻の創生

バイオ燃料の一種アルカン(飽和炭化水素)を合成する遺伝子群を挿入した組換ベクターをシアノバクテリア細胞に導入し、組換藻 *Synechocystis* 6803_ALK11 並びに *Limnothrix/Pseudanabaena* 5-3_ALK11 株を創生しました。両組換株において、2%炭酸ガス(大気中の濃度の約 50 倍)供給培養条件下では、野生株と比較して 5~7 倍程度の目的物質(ヘプタデカン, C₁₇H₃₆)の増産が確認されました(特開 2013-198473)。



(4) 目的物質簡便回収法

緑色蛍光蛋白質(GFP)を過剰蓄積する ABRG5-3 株組換藻を創生し、自己溶菌させた後、培養液上澄より GFP を回収することに成功しました(首都圏北部4大学発新技術説明会, 学術論文 Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012)。更に ABRG5-3 株の自己溶菌誘導因子を検証したところ、振とうから静置への培養条件の切りかえ(2段階培養)をした際、暗黒曝露等も溶菌に相乗効果を与えることが明らかになりました。以上をもとに、バイオ燃料生産藻 5-3_ALK11 株を自己溶菌させ、培養液上澄よりアルカンの簡便回収が行なえるようになりました(上図, 学術論文投稿準備中)。

3. 今後の展開

自己溶菌メカニズムの更なる解明と共に、それを溶菌制御系確立に反映させてゆきたいと考えています。また得られた組換藻を用いて大規模培養に挑戦し、目的物質製造の実用化を図っていきたいと思います。目的物質に関しては、バイオ燃料の他に、バイオプラスチック(PHB)高生産藻の創生にも成功していますが、今後は、他の高付加価値物質の生産にも挑戦したいと思っています。さきがけ本研究で得られた成果が、藻の研究や産業に役に立ち、それを通じて少しでも社会貢献ができればと願っています。

4. 評価

(1) 自己評価

自己溶菌メカニズムの解明に関しては、進行過程を「初期」・「中期」・「後期」と捉えた場合、「中期」にあたる時期に ABRG5-3 細胞内にポリリン酸などリン酸化合物の蓄積が溶菌の引き金になっていることを明らかにすることができたことは評価に値します。また「初期」と「後期」に

関与すると思われる本株に特徴的な生体構成分子や遺伝子についても現在新たな知見が得られてきていますので、全容解明に向けて今後更なる研究の発展が期待されます。一方、自己溶菌藻を利用した有用物質生産系に関しては、藻発現ベクターの構築から始まり、バイオ燃料（飽和炭化水素）高生産藻の創生に成功しました。更には簡単に自己溶菌を誘導する培養条件を発見し、実際に溶菌培養液上澄より手間要らずにバイオ燃料を回収できるような基盤技術創成に至ったことは、本研究課題の目標を充分達成できたと言えます。

(2) 研究総括評価

藻類によるバイオ燃料生産技術の開発では、細胞における目的物質の生産効率が重要であるばかりか、その後の抽出・製造に関する経費削減が実用化に向けた高いハードルとなっている。そこで、自己溶菌藻にバイオ燃料等を高効率で生産させた後、自己溶菌を制御誘導し、低コストで簡単に回収する基盤技術の開発に取り組んでいる。期間内に論文や特許を取りまとめ、研究領域に貢献を果たしたと評価する。今後は、アイデアを大切に、チャレンジ精神を忘れず、実用化を目指して高密度高速培養装置の開発、培養の大規模化及び生産物質の抽出・製造の更なる実証試験に取り組むことを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Asayama M.
Overproduction and Easy Recovery of Target Gene Products from Cyanobacteria, Photosynthesizing Microorganisms.
Appl. Microbiol. Biotechnol. (2012) 95:683-695
2. Kitazaki C, Numano S, Takanezawa A, Nishizawa T, Shirai M, Asayama M.
Characterization of Lysis of Multicellular Cyanobacterium, *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. Strain ABRG5-3.
Biosci. Biotechnol. Biochem. (2013) 77:2339-2347

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.
発 明 者: 朝山 宗彦
発明の名称: 自己溶菌能を有するシアノバクテリアを用いた物質の製造及び回収方法
出 願 人: 茨城大学
出 願 日: 2011/9/28
出 願 番 号: 特開 2013-198473 (2013)

(2) 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)

1. 朝山 宗彦
溶ける藻を利用したバイオ燃料等の大量生産と回収方法「Overproduction and Easy Recovery of High-Value Products like Biofuel from Autolysed Cyanobacteria」

| |
|---|
| <p>首都圏北部4大学発新技術説明会 (2012.6.12, JST 東京別館ホール・市ヶ谷) 説明会サイト http://jstshingi.jp/4u/2012/index.html 説明会パンフレット http://jstshingi.jp/4u/2012/pamphlet.pdf</p> |
| <p>2. Asayama M, Takanezawa A, Takahashi M, Numano S, Kitazaki T, Nishizawa T, Shirai M. Characterization of Auto Cell-Lysis of a Novel Filamentous Cyanobacterium. 112th General Meeting of American Society of Microbiology (2012.6.16-19, San Francisco) Abstract 12-GM-A-840-ASM, Poster Boad I-2366</p> |
| <p>3. 日経産業新聞(掲載日 2012.7.25 日刊 6 頁) 「バイオ燃料藻、分離簡単、製造費安く」</p> |
| <p>4. 朝山 宗彦 藻類バイオマスの利用「Algal Biomass for Future」 中国産業創造センター主催 平成 24 年度 第 2 回「環境・エネルギーセミナー： 二酸化炭素を資源と捉え、その循環を考える」(2013.2.22, ワークピア広島)</p> |
| <p>5. 本堂彩花、高橋正俊、沼野節子、北崎千富美、長谷川守文、朝山宗彦 藻類バイオプラスチック PHB 高増産株の創生 日本農芸化学会 関東支部大会 2013 (2013.11.22, 慶応大学日吉キャンパス) ポスター番号 P-03 (要旨集 p16)</p> |