



## 5. 研究実施期間

平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月(3年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議:6回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 25 年 11 月	評価会開催
平成 26 年 3 月	研究総括による事後評価
平成 26 年 3 月	被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1)外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2)得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 評価結果

### 総論

本研究領域では、海産、淡水産の生物を用いてバイオエネルギー生産を行うための基盤技術の創出を目指す。バイオ燃料(例えばバイオディーゼル、軽油(アルカン、アルケン)、エタノール、メタン、水素等)の産生、もしくはこれらにつながる脂質、糖類等の産生に資する研究を対象とした。さらに、バイオ電池による電気エネルギーへの変換も含む。その実施体制としては、CREST とさきがけの2つのタイプで行っている。本研究領域の目的を達成するためには、様々な分野の研究者の有機的な協働と共に、新進気鋭の研究者の独創的な発想を活かした挑戦的なテーマによる成果が期待される。特に、さきがけ研究では、オリジナリティを大事にした研究成果を強く求めた。各自期間内に多くの成果を取りまとめ、領域研究の進展に寄与したと評価される。今後は、CREST とさきがけの異なる推進体制間におけるコラボレーション(研究協力)、相互の研究成果の情報交換等を通じた、得られた成果の社会還元に向けた取り組みにも積極的に参画して頂きたい。

### 1. 朝山 宗彦 研究者「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 CO<sub>2</sub> ガス再利用資源化のための基盤技術創成」

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。

### 2. 蘆田 弘樹 研究者「バイオ燃料高生産のための炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成」

光合成炭素固定酵素ルビスコとCO<sub>2</sub>濃縮細胞小器官カルボキシソームの量的強化を行い、エタノールの高生産を目指す研究を行っている。外来性優良ルビスコ過剰発現による炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成に向けた独創的な研究で発展性が期待される。また、論文等の業績などは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、CREST との融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、更なる進展を期待する。

### 3. 小山内 崇 研究者「糖代謝ダイナミクス変化によるラン藻バイオプラスチックの増産」

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(PHAs)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、CRESTとの融合研究を通じて、未完成的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。

#### 4. 鞆 達也 研究者「暗所で光合成を行う藻類の創生」

酸素発生型の光合成には、可視光が利用されているのに対して、本研究は、赤外光を用いて光合成を行うことを可能にし、可視光の存在しない暗闇でも酸素発生型光合成を駆動できるようにすることで、新たな光合成エネルギーの創生を目指している。研究期間を通じて、提案課題を実現するための基礎的知見を多くの論文成果と出来たことは、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。さらに独創的で新しいコンセプトを作り進展させ行くことを期待する。また、実用化に向けた進展については、産官学の共同研究などを積極的に推進し、基礎研究の社会還元に向けた取り組みも進めて欲しい。

#### 5. 中村 友輝 研究者「真核藻類のトリグリセリド代謝工学に関する基盤技術の開発」

バイオディーゼルの原料となる油脂トリグリセリドを、藻類を用いて大量生産する新技術の開発を目指した研究を行っている。真核微細藻類のモデルであるクラミドモナスから、油脂合成関連酵素を網羅的に単離し、藻類が油脂生産にすぐれるのかを明らかにするための重要な知見を得た。酵母での藻類油脂合成系の構築藻類由来遺伝子を用いた有用物質技術として酵母での藻類油脂合成系を構築するなど、独創的な研究で発展性が期待される。また、論文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、国際的視野に立って、藻類、酵母及び植物など幅広い分野で、豊かな感性と豊富なアイデアを活かした研究を推進することを期待する。

#### 6. 蓮沼 誠久 研究者「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」

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。

#### 7. 日原 由香子 研究者「グリコーゲンから油脂へ：シアノバクテリア変異株の代謝改変」

細胞体積が野生株の5倍、細胞あたりのグリコーゲン蓄積量は野生株の10倍にも達するシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の SII0822 転写因子欠損株について、さまざまな酵素遺伝子を欠失・導入して、この株の代謝改変を行い、高蓄積しているグリコーゲンを、脂肪酸に変換し、最終的には油脂として蓄積させる研究を行っている。研究開始当初の想定を超える困難な状況を着実に突破し、論文や特許として成果を取りまとめ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CRESTとの融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、当初の目標についても更なる進展を期待する。

#### 8. 本田 孝祐 研究者「バイオマス高度利活用を志向した人工代謝システムの創出」

微生物の発酵機能を担う代謝酵素群を自由自在に組み合わせ、さまざまな化学品を生産できる人工代謝システムを開発することを目指し、この手法を用いて、第3世代バイオ燃料としての実用化が期待されるブタノールの生産に取り組んでいる。独創的な研究で発展性が期待される提案内容であったが、研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、論文業績などが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、CRESTとの連携研究などを通じて、NADH等の補酵素群の熱安定性の問題などの解決による更なる可能性の追求や、バイオエネルギー関連物質のみならず、ファインケミカル生産などを含め、産業利用可能なレベルへの進展を期待する。

#### 9. 増川 一 研究者「ラン藻の窒素固定酵素ニトロゲナーゼを利用した水素生産の高効率化・高速化」(大挑戦型)

ヘテロシスト型ラン藻のニトロゲナーゼによる水素生産において、ヘテロシスト頻度を増やすことと、ニトロゲナ

一ゼを改変し空気下の水素生産の高速化と高効率化を目指した研究を行っている。窒素固定ラン藻のランダム変異では、分化パターン形成の最新の知見を基にスクリーニング系を上手く工夫し、効果的に多数の目的変異株を得た。水素生産活性の評価は、長期間、高活性を持続させた上で比較し、ヘテロシストの増加により水素生産が増加することを示した。ニトロゲナーゼの改変では、窒素ガス下で高活性が長期間持続することを示し、培養の低コスト化につながる成果を得た。ニトロゲナーゼの発現系を構築し、分子活性を高めるための改変にも挑戦したが、目的変異株の取得には至らなかった。光合成生物を使ったバイオ燃料としての水素生産の研究は、古くからの重要なテーマである。その中で、着実に成果を挙げ、研究領域に貢献を果たしたと評価する。今後は、得られた成果を論文として完成させるとともに、チャレンジ精神を忘れずに研究を進めて行って欲しい。

#### 10. 評価者

研究総括

松永 是 東京農工大学 学長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成26年3月末現在)

石倉 正治 王子ホールディングス株式会社研究開発本部開発研究所バイオエタノール研究室上級研究員

井上 勲 筑波大学生命環境系 教授

大倉 一郎 東京工業大学 名誉教授

大竹 久夫 大阪大学大学院工学研究科 教授

大森 正之 東京大学 名誉教授

嵯峨 直恒 北海道大学大学院水産科学研究院 院長

竹山 春子 早稲田大学理工学術院 教授

田畑 哲之 (財)かずさDNA研究所 所長

民谷 栄一 大阪大学大学院工学研究科 教授

横田 明穂 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 教授

横山 伸也 鳥取環境大学環境学部環境学科 教授

(参考)

件数はいずれも、平成26年3月末現在。

##### (1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	2	49	51
口頭	91	55	146
その他	18	2	20
合計	111	106	217

##### (2) 特許出願件数

国内	国際	計
5	1	6

##### (3) 受賞等

・蓮沼 誠久 研究者

バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究奨励賞 (H25.10.9)

「システムバイオロジー解析に基づく高機能型酵母創製とセルロースエタノール高生産技術開発への応用」

・本田 孝祐 研究者

長瀬科学技術振興財団 長瀬研究振興賞(H25.4.26)

「合成代謝工学によるオンデマンド・バイオプロセスの開発」

天野エンザイム株式会社 第14回酵素応用シンポジウム研究奨励賞(H25.6.14)



「耐熱性酵素モジュールを用いたオンデマンド・バイオプロセスの開発」

(4)招待講演

国際 23 件

国内 30 件

## 別紙

「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」領域  
事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
朝山 宗彦 (兼任)	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 CO <sub>2</sub> ガス再利用資源化のための基盤技術創成 (茨城大学)	茨城大学農学部 教授 (同准教授)	39
蘆田 弘樹 (兼任)	バイオ燃料高生産のための炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成 (神戸大学)	神戸大学大学院人間発達環境学研究科 人間環境学専攻 准教授 (奈良先端科学技術大学院大学 助教)	48
小山内 崇 (専任)	糖代謝ダイナミクス変化によるラン藻バイオプラスチックの増産 (理化学研究所環境資源科学研究センター統合メタボロミクス研究グループ代謝システム研究チーム)	JST さきがけ研究者 (理化学研究所 植物科学研究センター 基礎科学特別研究員)	40
鞆 達也 (兼任)	暗所で光合成を行う藻類の創生 (東京理科大学)	東京理科大学理学部教養学科 准教授 (同上) 中央研究院植物	49

中村 友輝  
(兼任)真核藻類のトリグリセリド代謝工学に関する基盤技術の開発  
(Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica)



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。



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」

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>

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.



増加・低下させるコントロールが可能であることを明らかにした。

本研究では、RuBisCO の進化に着目し、機能そのものを強化するための基礎研究も行った。RuBisCO 機能進化解析から、好熱性シアノバクテリア RuBisCO が常温性シアノバクテリアのものと比較して熱安定性と CO<sub>2</sub> 親和性が高く、進化上、高い機能性を獲得していることを明らかにした。また、非光合成生物の RuBisCO ホモログと RuBisCO との比較解析から RuBisCO の機能発現機構を明らかにした。一方で、アーキアの RuBisCO ホモログは CO<sub>2</sub> 固定能を有し、カルビン回路の原型ともいえる、アーキア型新規 CO<sub>2</sub> 固定回路で機能していることを明らかにした。

上記の成果をシアノバクテリアのバイオ燃料生産能強化へ応用するための研究も行った。*S. elongatus* PCC7942 株に pyruvate decarboxylase (PDC) と alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子を導入した代謝改変エタノール生産株に、RuBisCO 機能強化を施し光合成速度を増加させることで、エタノール生産性を向上することに成功した。

## (2) 詳細

シアノバクテリアは、RuBisCO の CO<sub>2</sub> 固定反応を最適化するために、carboxysome と呼ばれるタンパク質シェルから構成される CO<sub>2</sub> 濃縮細胞小器官を進化させている。無機炭素濃縮機構により carboxysome 内に高 CO<sub>2</sub> 環境を作りだし、この中で RuBisCO を機能させることで、ほとんど O<sub>2</sub> 阻害を受けずに CO<sub>2</sub> 固定を行うことができる。このことから、RuBisCO 機能発現と carboxysome 形成の間には、何らかの相互制御メカニズムがあると予想されるが、これまで明らかにされていなかった。そこで、carboxysome 内における RuBisCO の機能発現機構解明を目指し、RuBisCO 量を増加、または低下させた *Synechococcus elongatus* PCC7942 変異株を作製し、解析した。興味深いことに、RuBisCO 量を2または10倍に増加、または RuBisCO 遺伝子をヘテロに破壊し RuBisCO 量を1/2に低下させた *Synechococcus elongatus* PCC7942 変異株を解析した結果、RuBisCO 量の増加に伴い carboxysome が肥大すること、また、RuBisCO 量低下により carboxysome が減少することが明らかになった。このことから、RuBisCO 合成と carboxysome の形成・形態の間に制御メカニズムが存在すること、さらに、RuBisCO 発現量が carboxysome の形成・形態を制御していることを明らかにした。RuBisCO 量低下株と RuBisCO 量が10倍と過剰に発現している株では生育遅延と光合成活性低下が観察された。これらのことから、RuBisCO が光合成の律速因子であること、また過剰に発現しカルボキシソーム外に局在した RuBisCO は最適に機能発現ができないことを示していた。一方で、RuBisCO 量が2倍に増加している発現株では光合成活性が高くなった。このことにより、シアノバクテリアの光合成の律速段階の一つが RuBisCO の CO<sub>2</sub> 固定反応であることが明らかになった。また、RuBisCO 量を制御することで、光合成能力をコントロールが可能であり、最適な量的強化により、光合成能を増加させることができることを明らかにした。

*lividus* に常温性 *Synechococcus elongatus* PCC7942 や *Synechococcus sp.* PCC7002 のものと比較して、熱安定性が高く、約 3 倍高い CO<sub>2</sub> 親和性を示す RuBisCO を発見した。この結果から、好熱性シアノバクテリア RuBisCO が常温性のものと比較して、進化上、高い機能性を獲得していることを明らかにした。好熱性シアノバクテリアと常温性 RuBisCO を比較したところ、アミノ酸配列で 95% と非常に高い相同性を示した。このことから、好熱性と常温性 RuBisCO の比較により、数少ない置換されている残基に注目すれば、高機能性に関与する残基を同定できると期待され、実際、これら好熱性 RuBisCO で特異的に保存される残基、構造を見出した。その中でも、small subunit の C 末端 extension が特徴的であった。そこで、常温性 *Synechococcus elongatus* PCC7942 と好熱性 *Thermosynechococcus elongatus* BP1 RuBisCO の large subunit と small subunit をそれぞれ置換したキメラ RuBisCO の大腸菌発現系を構築し、解析を行った。その結果、好熱性シアノバクテリア RuBisCO の酵素特性決定には、small subunit が大きく関与していることが明らかになった。これらのことから、シアノバクテリア RuBisCO の高機能化には、small subunit に着目した分子育種が有効であると期待された。

また、RuBisCO が光合成以外でも機能するよう多様に進化していることに注目し、非光合成生物の RuBisCO ホモログの機能解析を行った。枯草菌の RuBisCO ホモログはメチオニン再生経路においてエノラーゼとして機能しており、この経路における機能、また RuBisCO とホモログの比較解析から、これまで RuBisCO のみを用いた解析からは明らかにすることができなかった光合成 RuBisCO の機能発現に必須な残基・構造を同定した。さらに、非光合成生物であり、生命の起源に近いとされるアーキアが有する RuBisCO ホモログは、どのような分子進化の末に今もなお RuBisCO が効率の悪い CO<sub>2</sub> 固定酵素であるのかを解析する好材料である。解析の結果、アーキアの RuBisCO ホモログは RuBisCO であった。しかしながら、一般的にアーキアは光合成生物の RuBisCO が機能する CO<sub>2</sub> 固定のためのカルビンサイクルを有しておらず、RuBisCO の基質リブローソビスリン酸をリブローソ-5-リン酸から合成するホスホリブロキナーゼ (PRK) を欠失している。本研究により、一部のメタン菌において、アーキア型 PRK を同定した。これらの結果から、アーキアにおいて光合成カルビンサイクル様の RuBisCO と PRK が機能する新規 CO<sub>2</sub> 固定経路の存在が示唆された。アーキアが光合成生物よりも前に出現してきた生物であると考えられていることから、このアーキアの経路がカルビンサイクルの原始経路で、ここで機能する RuBisCO が光合成 RuBisCO の進化的原型であると予想された。RuBisCO の反応生成物解析から、このアーキア RuBisCO の O<sub>2</sub> 反応性が非常に高かったことから、分子進化初期から RuBisCO の O<sub>2</sub> 反応性が既に獲得されていたことが示唆された。

上記の研究成果をシアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産に応用するために、まず、バイオエタノール生産系の確立を行った。これまでの報告を参考に、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 にアルコール発酵菌である *Zymomonas* 由来の pyruvate decarboxylase と NADH 依存型 alcohol dehydrogenase 遺伝子を導入し、培地中にエタノール生産代謝導入株を出発株とし、エタノール生産系の検討・改良を行った。この株を用いた系では、培地中に生産されたエタノールが蓄積することから、回収が容易である利点がある。改良・最適化の結果、光合成で直接合成される NADPH を補酵素に用いる alcohol dehydrogenase を利用することで、エタノール生産量が最適化前の 3~4 倍に増加した。また、

最適に RuBisCO の量的強化を施し光合成能が向上した株を用いてエタノール生産することで、強化前と比較して、エタノール生産量を 1.2 倍に増加させることに成功した。この株では、1 L の培地あたり、2 g 以上のエタノール生産が可能であった。この結果は、RuBisCO 機能強化が、シアノバクテリアにおいてバイオ燃料生産量を増加させる一つの方向性であることを示していた。

### 3. 今後の展開

エタノール生産代謝導入シアノバクテリアの光合成およびエタノール生産量解析から、光合成で固定した炭素の実に 60%がエタノール合成に利用されていた。このため、シアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産を制限する大きな要因の1つは、光合成炭素固定であると結論される。シアノバクテリアのバイオ燃料生産効率を大きく向上させるためには、光合成炭素固定能そのものを強化するブレークスルーが必須である。

本さがけ研究において、シアノバクテリアにおける、RuBisCO による carboxysome 形態・形成制御機構の存在が明らかになったことから、RuBisCO-carboxysome CO<sub>2</sub> 固定複合体形成の人為的制御が可能となった。実際、RuBisCO 量による CO<sub>2</sub> 固定複合体形成制御を介して光合成能を向上させ、バイオエタノール生産量増加に成功した。また、好熱性シアノバクテリアや非光合成 RuBisCO の機能解析の結果から、RuBisCO の機能改良ターゲットとなる構造・残基の同定が可能となった。これらにより、RuBisCO そのものの機能改良または CO<sub>2</sub> 固定複合体としての機能強化の新しい方向性が開けた。

今後は、これら両方向からの RuBisCO 機能発現最適化を行うことで、シアノバクテリアの光合成炭素固定能強化を行い、バイオ燃料高生産可能なシアノバクテリアの創成を目指す。更に RuBisCO を中心とした光合成炭素固定機構が明らかになることで、光合成能の根本的な改良が可能となり、シアノバクテリアで確立されてきている様々なバイオ燃料の生産能増加が期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素 RuBisCO に注目して、この酵素の機能発現最適化によるシアノバクテリアの光合成能強化ならびにこれを利用したバイオ燃料高生産化は、研究のねらい通り、達成できたと考えている。また、将来的な、更なる RuBisCO 機能強化のための材料や方向性も、準備できたと考えている。

#### (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)。

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。

光合成炭素固定酵素ルビスコとCO<sub>2</sub>濃縮細胞小器官カルボキシソームの量的強化を行い、エタノールの高生産を目指す研究を行っている。外来性優良ルビスコ過剰発現による炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成に向けた独創的な研究で発展性が期待される。また、論文等の業績などは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、CREST との融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、更なる進展を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kang W, Hong SH, Lee HM, Kim NY, Lim YC, Le LT, Lim B, Kim HC, Kim TY, Ashida H, Yokota A, Hah SS, Chun KH, Jung YK, Yang JK. Structural and biochemical basis for the inhibition of cell death by APIP, a methionine salvage enzyme. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 2014, 111, E54-E61, doi: 10.1073/pnas.1308768111.
2. Nakano T, Ohki I, Yokota A and Ashida H. MtnBD is a Multifunctional Fusion Enzyme in the Methionine Salvage Pathway of Tetrahymena thermophila. PLoS One, 2013, 8, e67385.doi: 10.1371/journal.pone.0067385.
3. Nakano T, Saito Y, Yokota A and Ashida H. Plausible novel ribose metabolism catalyzed by enzymes of the methionine salvage pathway in Bacillus subtilis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013, 77, 1104-1107.
4. Nakano T, Saito Y, Yokota A, Ashida H. His267 is involved in carbamylation and catalysis of RuBisCO-like protein from Bacillus subtilis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 431, 176-80.
5. Ashida H and Yokota A. Increasing photosynthesis/RuBisCO and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. Comprehensive Biotechnology, 2011, 4, 165-176.

### (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)

#### 学会発表

1. 蘆田弘樹、RuBisCO 機能進化研究 ~RuBisCO-like protein の解析を通して、日本光合成学会若手の会第4回セミナー 2011年6月
2. 蘆田弘樹、メチオニン欠乏環境で機能する枯草菌メチオニン再生経路酵素 RuBisCO-like protein と光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素 RuBisCO の比較研究 第84回 日本生化学会大会 シンポジウム 2011年9月
3. Hiroki Ashida, Perspectives of research on increasing photosynthesis in cyanobacteria by overcoming the limitations of CO<sub>2</sub>-fixing enzyme, RuBisCO. 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 2012年3月
4. 河野卓成、遠藤千夏子、Mehrotora Sandhya、横田明穂、蘆田弘樹 メタン産生アーキア Methanospirillum hungatei における RuBisCO と PRK を利用した新規 CO<sub>2</sub> 固定回路の解析 日本農芸化学会 2012年度大会 2012年3月
5. 河野卓成、遠藤千夏子、Mehrotora Sandhya、横田明穂、蘆田弘樹 メタン菌における Pre-Calvin cycle の解析 日本 Archaea 研究会 第25回講演会 2012年7月

6. Hiroki Ashida, Evolutional and functional diversity of RuBisCO and RuBisCO-like proteins. Japanese-Finnish Seminar 2012, Sep. 2012
7. 蘆田弘樹、食糧問題解決に期待される光合成微生物の CO<sub>2</sub> 固定酵素ルビスコが持つポテンシャル 日本化学会第93回春季年会 (2013)、アドバンス・テクノロジー・プログラム 2013年3月
8. 河野卓成、遠藤千夏子、横田明穂、蘆田弘樹 アーキアが有する phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析 日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月
9. 蘆田弘樹、向川佳子、小林知佑、横田明穂 シアノバクテリアを用いたエタノール生産のための代謝改変 日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月
10. 河野卓成、遠藤千夏子、横田明穂、蘆田弘樹 アーキアが有する光合成カルビンサイクル酵素 phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析 日本 Archaea 研究会 第26回講演会 2014年7月
11. 蘆田弘樹 光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素ルビスコの基礎研究とその成果を用いた応用研究 東京大学生産技術研究所第1回応用化学セミナー 2014年7月
12. Takunari Kohno, Chikako Endo, Akiho Yokota and Hiroki Ashida. Enzymatic analysis of archaeal homologues of phosphoribulokinase, a key enzyme in the photosynthetic Calvin cycle. 30th of the Gordon conference of Archaea: Ecology, Metabolism and Molecular Biology. July 2014
13. 蘆田弘樹 ラン藻を用いたエタノール高生産を目指したルビスコ機能強化研究 第4回藻類バイオ燃料生産技術研究会 2014年9月
14. 蘆田弘樹 光合成 CO<sub>2</sub> 固定酵素ルビスコの機能進化を探る 第27回インターゲノミクスセミナー 2014年12月
15. 蘆田弘樹、向川佳子、横田明穂 シアノバクテリアにおける RuBisCO 発現量によるカルボキシソーム形成制御機構 日本農芸化学会 2014年度大会 2014年3月
16. 河野卓成、遠藤千夏子、木津奈津子、木村浩之、溝端栄一、井上豪、松村浩由、横田明穂、蘆田弘樹アーキア型 phosphoribulokinase の機能解析 日本農芸化学会 2014年度大会 2014年3月

#### 著作物

1. 蘆田弘樹 シアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産技術の開発 藻類オイル 開発研究の最前線、株式会社エヌ・ティー・エス、2013年、pp149-161
2. シアノバクテリアの光合成能を利用したバイオ燃料生産 生物工学会誌、2013年、91巻、6号、pp352





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。

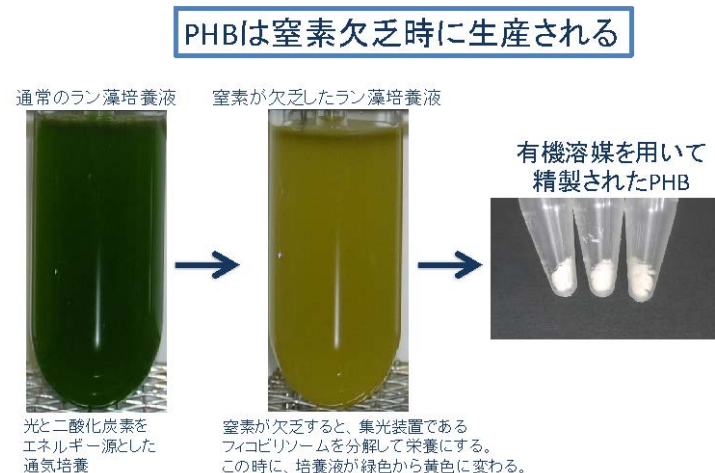


図1 ラン藻 *Synechocystis* の培養液および精製された PHB

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.*)。

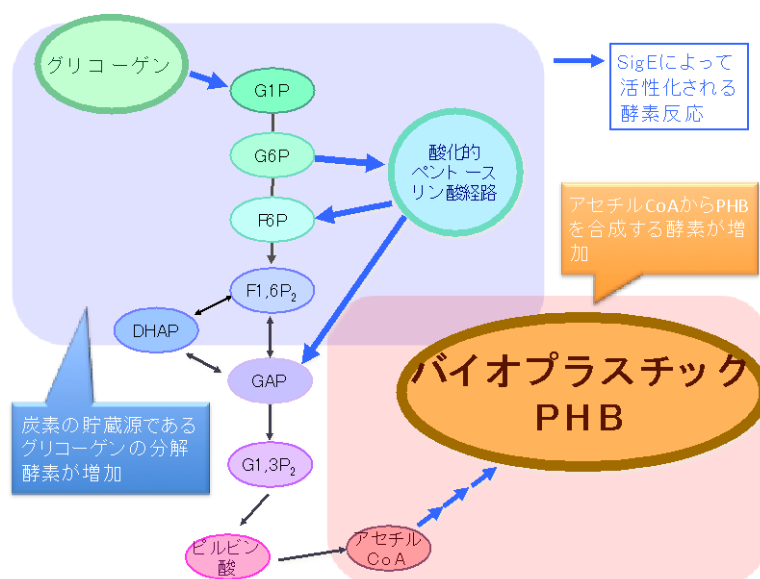


図2 SigE による糖代謝制御と PHB 増産のモデル図

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

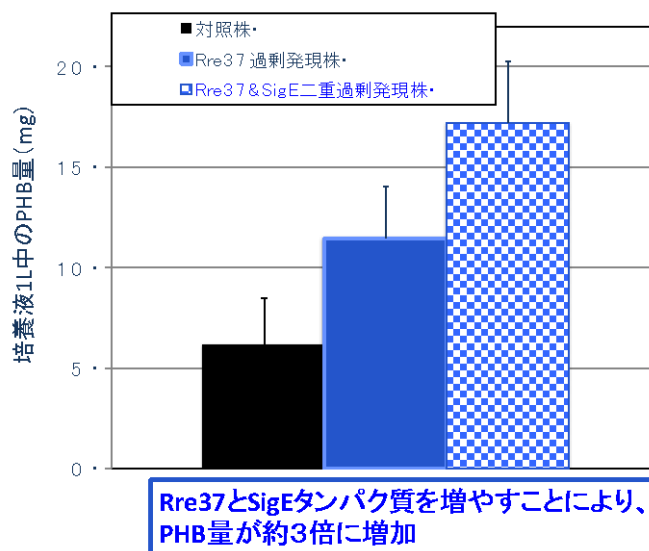


図3 窒素欠乏時の Rre37 過剰発現株および Rre37&SigE 二重過剰発現株の PHB 量

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 3<sup>rd</sup> 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” 1<sup>st</sup> 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





(2) 詳細



この結果は、新奇クロロフィルにおける光合成において応用可能であり、効率の良いエネルギー変換機構の創生につながる。

#### (4)人工光合成系の創生

光合成のエネルギー移動効率および電子伝達の効率は通常光において 100%に近い理想的な反応である。電子伝達において、最終的に NADPH のような還元力が得られるが、この代わりにプロトン還元することによって水素生産が可能になる。水素は代表的な次世代エネルギーの一つであり、自然の光合成系を応用した人工光合成の創生はエネルギー供給において火急の課題である。光化学系複合体を金粒子に結合させることにより、電子の授受を行いそれをヒドロゲナーゼや Pt 触媒を用いることにより、水素生産が可能になる。そのためには、分子を配向させて結合させることが必要になるが、まずは水分解系を担う光化学系 II 複合体を遺伝子改変により標識を付加し、金粒子と相互作用により結合させることに成功した。現在、光化学系 I のタンパク質を改変または、電子伝達成分を人工的に入れ替えて分子配線することにより電子を取り出す系の開発を進めている。

### 3. 今後の展開

クロロフィル *f* をもつシアノバクテリアより、光化学系 I および II を単離・精製することにより、クロロフィル *f* の正確な局在位置と低エネルギー利用機構を分光学的手法を用いて解析する。室温における。クロロフィル *f* からクロロフィル *a* へのアップヒルなエネルギー移動原理を確立することにより、それを応用したクロロフィル *f*、クロロフィル *d*、クロロフィル *a* を組み合わせた光合成系を作製することにより、どのような光質でも光合成エネルギー生産可能な生物・反応系の創生を行う。

酸素発生型光合成反応において低エネルギー光利用可能な原理を明らかにした。また、それに必要な電位を制御する方法を見いだした。これらを組み合わせ、低エネルギー光を用いた人工光合成を含むエネルギー変換系の作製を行う。また、クロロフィル環の C2 位および C3 位をフォルミル基に置換することにより、吸収極大がさらに低エネルギー側にシフトする知見を得るので、そのクロロフィルの新規合成を化学的および酵素学的に行う。化学的に得られた新規クロロフィルを既存の光化学系に結合させるとともに基盤や金粒子に結合させ人工光合成系の開発を進める。クロロフィル *f*、クロロフィル *d*、クロロフィル *a* を組み合わせた光合成系を作製することにより、光合成による新しいエネルギーの創生を行う。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

既存のクロロフィル *a* と比較して低エネルギー領域に吸収極大をもつ新奇クロロフィルの光合成反応は還元側の電位を調節することにより、クロロフィル種が変わっても水分解反応を維持できる根本原理を明らかにした。光合成タンパク質を金粒子・基盤等に結合させ電子を取り出す基盤技術の創生は完成が近い。一方、遺伝子改変を行い、より低エネルギー側に吸収極大をもつクロロフィルの開発はその遺伝子の同定が進まなかったことにより当初の計画より遅れている。クロリン環に化学合成により  $\pi$  電子を導入し吸収を長波長シフトさせる方法を試みたが、期待したほどの低エネルギーシフトは実現できなかった。引き続き、より低エネルギーに吸収極大を位置するクロロフィルの合成遺伝子的手法・化学的手法により続けていく。本研究

で得た成果および途中経過を、より一層加速し研究を進めていき、藻類による新しいエネルギー創生を行う。

(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)。

酸素発生型の光合成には、可視光が利用されているのに対して、本研究は、赤外光を用いて光合成を行うことを可能にし、可視光の存在しない暗闇でも酸素発生型光合成を駆動できるようにすることで、新たな光合成エネルギーの創生を目指している。研究期間を通じて、提案課題を実現するための基礎的知見を多くの論文成果と出来たことは、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。さらに独創的で新しいコンセプトを作り進展させ行くことを期待する。また、実用化に向けた進展については、産官学の共同研究などを積極的に推進し、基礎研究の社会還元に向けた取り組みも進めて欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Suleyman I. Allakhverdiev, Tohru Tsuchiya, Kazuyuki Watabe, Akane Kojima, Dmitry A. Los, Tatsuya Tomo, Vyacheslav V. Klimov, and Mamoru, Redox potentials of primary electron acceptor quinone molecule ( $Q_A$ )<sup>-</sup> and conserved energetics of photosystem II in cyanobacteria with chlorophyll *a* and chlorophyll *d*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108, 8054-8058
2. Tatsuya Tomo, Suleyman I. Allakhverdiev, Mamoru Mimuro, Constitution and energetics of photosystem I and photosystem II in the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*, J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. B, 2011, 104, 333-340
3. Tatsuya Tomo, Hayato Kusakabe, Ryo Nagao, Hisashi Ito, Ayumi Tanaka, Seiji Akimoto, Mamoru Mimuro, Shigetoshi Okazaki, Biochim. Biophys. Acta, 2012, 1817, 754-759
4. Chihiro Uno, Ryo Nagao, Hiroyuki Suzuki, Tatsuya Tomo, Takumi Noguchi, Structural Coupling of Extrinsic Proteins with the Oxygen-Evolving Center in Red Algal Photosystem II As Revealed by Light-Induced FTIR Difference Spectroscopy, Biochemistry, 52, 5705-5707
5. Ryo Nagao, Michihiro Suga, Ayako Niikura, Akinori Okumura, Faisal Hammad Mekky Koua, Takehiro Suzuki, Tatsuya Tomo, Isao Enami, Jian-Ren Shen, Crystal Structure of Psb31, a Novel Extrinsic Protein of Photosystem II from a Marine Centric Diatom and Implications for Its Binding and Function, Biochemistry, 2013, 52, 6646-6652
6. Ryo Nagao, Makio Yokono, Seiji Akimoto and Tatsuya Tomo, High Excitation Energy Quenching in Fucoxanthin Chlorophyll *a/c*-Binding Protein Complexes from the Diatom *Chaetoceros gracilis*, J. PHYS. CHEM. B, 2014, 117, 6888-6895

(2)特許出願

なし

(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)

国際学会・シンポジウム招待講演

○International Conference "Photosynthesis Reserch for Sustainability", CURRENT TOPICS OF CHLOROPHYLL-D DOMINATED CYANOBACTERIAL PHOTOSYSTEMS, Azerbaijan, 2011年7月24-30日

○Phototsystem reaction by using near infrared light, JST-PRESTO International Joint Symposium on Photo-Science Leading to a Sustainable Society: Environment, Energy, Functional Materials, Hiyoshi, Kanagawa, Japan, 2012年3月25日～3月28日

○International meeting"Photosynthesis Research for Sustainability - 2013", Redox regulation of photosystem II with a focus on newly chlorophyll, Azerbaijan, 2013年6月5日～9日

○1st Korea-Japan Microalgae Symposium, Low photon-energy utilization by cyanobacteria, Daejeon, Korea, 2013年10月10日～10月12日

国内学会・シンポジウム招待講演

○第54回日本植物生理学会, クロロフィル *d*を主要色素としてもつシアノバクテリアの光化学系II反応機構, 2013年3月21日～3月23日

○第85回日本生化学会, クロロフィル *d*を主要色素としてもつシアノバクテリアの光合成について, 2012年12月14日～12月16日

○植物科学シンポジウム「植物科学最先端研究への期待」, 低エネルギー光による光合成光エネルギー変換, 2012年12月3日

プレスリリース

「近赤外線を用いて水を分解する詳細な光合成メカニズムを解明」日経産業新聞、日刊工業新聞、科学新聞(2011年5月)



とがわかった(原著論文1)。次に、酵母の脂質代謝を改変することで、培養条件により乾燥菌体重量の 50%–150%にあたる多量の油脂を生産する方法を作り出した(論文投稿中)。さらに、こうした脂質代謝改変技術を植物に適用した。植物の組織のうち花が脂質の合成、備蓄に優れていることを明らかにし(原著論文2)、組織特異的な脂質代謝改変技術により花芽の一部で脂質代謝を改変し、開花時期を制御することに成功した(原著論文3)。

(2) 詳細



かった。そこで、花芽のうちフロリゲンが作用する部位でのみ脂質代謝改変を行い PC 量を増加させると花は早咲きになり、逆に減少させると花は遅咲きになった。この影響はフロリゲンを欠損すると顕著にみられなくなった。さらに、PC 分子種は昼夜で変動していることがわかり、不飽和度の高い夜の分子種は飽和度の高い昼の分子種と比べてフロリゲンとの結合が弱いことがわかった。そこで、脂質代謝改変を行い日中に夜の分子種を増加させると花は遅咲きになった。以上の結果から、フロリゲンは日周変動を示す PC と結合することにより開花時期を制御していることが明らかとなった。

### 3. 今後の展開

本研究から、クラミドモナスの油脂合成酵素遺伝子が油脂蓄積に優れた機能性をもつことが世界に先駆けて明らかとなった。また、ほぼ同時期にアメリカの研究グループにより、DGTT2 がシロイヌナズナの葉においても大量の油脂を蓄積させることが独立に発見された。今後、こうした機能性に優れた藻類の遺伝子リソースを整備することで、これらの特性を生かした新たな代謝工学的手法の確立と、革新的な有用物質生産技術の開発が国際的に期待される。

また、本研究で開発を進めた代謝改変技術は高等植物でも適用できることが分かった。特に、脂質とフロリゲンが相互作用し、脂質の改変により開花時期を変えることができたことは基礎研究と応用の両面で画期的な発見であり、こうした知見をもとに脂質改変から開花を制御する技術が花き産業や有用作物の分子育種、また有用物質やバイオエネルギーの生産に貢献することが期待できる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本研究により、クラミドモナスに存在する油脂合成酵素が網羅的に単離された。これらのうち、DGTT2 が油脂合成における機能に優れていることがわかり、遺伝子形質転換技術を用いて酵母に多量の油脂を蓄積させることが可能となった。藻類由来遺伝子のこうした高い機能性は、なぜ藻類が油脂生産にすぐれるのかを明らかにするための重要な知見となるとともに、藻類由来遺伝子を用いた有用物質技術を構築するための新たな手掛かりとなる。

代謝改変の方法論は多細胞生物である高等植物でも適用することができ、脂質—フロリゲンの結合を基軸とした開花制御の新たなモデルと、脂質改変により開花時期を制御する技術開発の可能性が提示できた。このことは基礎と応用の両面で重要な知見であるといえる。

藻類での応用については、遺伝子改変技術の開発が他のモデル生物に比べて遅れていることや種間での多様性が大きいことなどもあり、技術開発の上でまだ課題が多く残されている。今後、引き続きこの点に取り組み、種々の藻類で油脂が高生産できる技術基盤の確立を目指したい。

#### (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。)

バイオディーゼルの原料となる油脂トリグリセリドを、藻類を用いて大量生産する新技術の開発を目指した研究を行っている。真核微細藻類のモデルであるクラミドモナスから、油脂合成関連酵素を網羅的に単離し、藻類が油脂生産にすぐれるのかを明らかにするための

重要な知見を得た。酵母での藻類油脂合成系の構築藻類由来遺伝子を用いた有用物質技術として酵母での藻類油脂合成系を構築するなど、独創的な研究で発展性が期待される。また、論文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、国際的視野に立って、藻類、酵母及び植物など幅広い分野で、豊かな感性と豊富なアイデアを活かした研究を推進することを期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Chun-Hsien Hung, Ming-Yang Ho, Kazue Kanehara and Yuki Nakamura. Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* (2013) 587(15):2364–2370.
2. Yuki Nakamura, Fernando Andres, Kazue Kanehara, Yu-chi Liu, Peter Dörmann and George Coupland. Arabidopsis florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. *Nature Communications* (2014) in press
3. Yuki Nakamura, Norman Z. W. Teo, Guanghou Shui, Christine H.L. Chua, Wei-Fun Cheong, Sriram Parameswaran, Ryota Koizumi, Hiroyuki Ohta, Markus R. Wenk, and Toshiro Ito. Transcriptomic and lipidomic profiles of glycerolipids during Arabidopsis flower development. *New Phytologist* (2014) in press

### (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)

#### 著作物

- Nakamura Y\*. (2013) NPC: non-specific phospholipase Cs in plant functions. In "Phospholipases in Plant Signaling (Wang, X ed)" Springer-Verlag Berlin Heidelberg, in press
- Nakamura Y\*. (2013) Galactolipid biosynthesis in flowers. *Botanical Studies*, 54:29.
- Nakamura Y\*. Assaying Plant Phosphatidic Acid Phosphatase Activity. In "Plant Lipid Signaling Protocols (Munnik T and Heilmann I, eds)" *Methods in Molecular Biology* 1009:233–240, Springer, 2013
- Nakamura Y\*. (2013) Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog Lipid Res* 52:43–50.

#### 国際学会招待講演

- Nakamura Y. Lipid metabolic switching to alter lipid levels in algae and plants. 4th International Singapore Lipid Symposium (Singapore, 2012年3月)
- Nakamura Y. Meristem maintenance by phospholipid biosynthesis. 第28回中華植物学会

- 大会及 2012 Symposium on Innovative Plant Sciences (Taipei, 2012 年 12 月)
- Nakamura Y. Phospholipids function in coordinating reproductive processes. Gordon Research Conferences 2013, Plant Lipids, Metabolism & Function (Galveston, TX, 2013 年 1 月)
  - Nakamura Y. Membrane lipid remodeling in response to phosphate starvation. 1st International Symposium on Root Systems Biology (Taipei, 2013 年 9 月)

プレスリリース

「脂質が開花時期を制御することを発見」(仮題) プレス発表準備中



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

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。

### 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)



## (2) 詳細

### 研究テーマA「SII0822 転写因子欠損株の生理学的解析」 (発表論文2)

異なる栄養条件下で培養した野生株および SII0822 欠損株について、ノーザン解析により炭素・窒素代謝関連遺伝子の発現レベルを調べると同時に、光合成活性測定およびキャピラリー電気泳動-質量分析(CE-MS)により各種代謝活性の評価を行った。

光独立栄養条件下では、SII0822 欠損株は、野生株と同等以上の光合成活性を示すこと、窒素代謝・糖代謝関連遺伝子の発現レベルが低いこと、糖リン酸が野生株より高蓄積している一方、糖異化経路でより下流に位置するピルビン酸や 2-オキソグルタル酸といったいくつかの重要な中間体量が少ないことが明らかになった。これらの結果より、SII0822 欠損株では CO<sub>2</sub> 固定が活発に行われている一方、解糖系下流部分の活性が低く、結果として余剰糖がグリコーゲンとして蓄積している可能性が示された。

培地にグルコースを添加し、光合成と糖代謝の両者が活発に行われる光混合栄養条件下では、SII0822 欠損株が厳しい増殖障害を受けることを見出した。この条件下の SII0822 欠損株では、糖異化、CO<sub>2</sub> 固定、窒素同化等に関連する遺伝子群の発現レベルが野生株に比べて顕著に低く(図1)、細胞内にグリコーゲンが高蓄積(図2)、CO<sub>2</sub> 固定活性の大きな低下が観察された。このことは、栄養条件の変動に応答しての遺伝子発現制御、ひいては代謝活性の制御に SII0822 転写因子が必須であることを示している。

SII0822 遺伝子欠損株で蓄積量の少ないピルビン酸および 2-オキソグルタル酸を培地に添加したところ、光混合栄養条件下での増殖の改善が観察された。特に 2-オキソグルタル酸を添加した場合には、SII0822 欠損株は光独立栄養条件下と同様な増殖を示した。この条件下において、

CO<sub>2</sub> 固定、呼吸、窒素同化等の顕著な活性化が観察されたことから、SII0822 欠損株の光混合栄養条件下での致死原因が代謝活性の停滞によることが強く示唆された。光混合栄養条件下では各種代謝活性が低下する一方、光合成電子伝達活性は維持されるため、おそらく還元力の供給過剰により生育障害が引き起こされると考えられる。また、光混合栄養条件下では 2-オキソグルタル酸がシグナル物質として細胞内代謝に広汎な影響を与え得ることが本研究により新たに示された。

以上の結果より、SII0822 は、炭素・窒素代謝の停滞を防いで円滑に進行させる調節に関与しており、変動する栄養条件下での生存に不可欠な転写因子であることが明らかになった。

き、以下の 5 項目を代謝改変の戦略として研究を進めた(図3)。

3. 脂肪酸生合成経路の鍵酵素をコードする *accBCDA* を *PpsbA2* プロモーターに連結して恒常的に過剰発現させた。この株の脂質解析を行ったところ、*accBCDA* 過剰発現により脂肪酸生合成経路が増強されること、SII0822 欠損バックグラウンドで増強効果がより顕著であることが明らかになった。SII0822 欠損株に対して過剰発現を行った場合、脂質分子種の中では MGDG (1.7 倍) の増加が顕著であり、膜脂質中の脂肪酸分子種の中では、パルミチン酸 (1.4 倍)、オレイン酸 (2.6 倍) の増加が顕著であった。

4. 条件誘導プロモーター *Pspac* に *Acinetobacter* sp. ADP1 由来の *wax-dgaT* 遺伝子を連結して発現させたところ、野生株バックグラウンドにて、IPTG 濃度依存的な TAG の蓄積を検出した。薄層クロマトグラフィーにて中性脂質を展開後、スポットをかき取り定量を行ったところ、TAG の蓄積量は全膜脂質の 5%ほどであることが明らかになった。

5. アシル ACP シンテターゼ遺伝子を破壊し、チオエステラーゼ遺伝子を導入することで脂肪酸分泌生産能を付与した結果、菌体外に放出される脂肪酸量が、SII0822 欠損バックグラウンドでは野生株に比べて 1.5~2 倍に向上することを見出した。

### 3. 今後の展開

本研究において SII0822 欠損株が野生株に比べて脂肪酸の高生産が可能な株であることが明らかになった。現段階では、この株に高蓄積しているグリコーゲンを炭素源として脂肪酸生合成系へ供給することが出来ていない。今後は、それにも関わらず、なぜ野生株に比べて高生産が可能なのか、生理学解析によって明らかにすると同時に、グリコーゲン量を減少させ、余剰糖を炭素源とした物質生産を行う方策を考えていく必要がある。これらが達成できた暁には、SII0822 の改変による代謝の人為的制御、および欠損株を用いての物質生産は、高効率なエネルギー・物質生産を達成する上での有力な手段となると期待される。また、本研究では TAG 合成酵素の条件誘導により、野生株バックグラウンドで TAG の蓄積に成功した。今後は更なる代謝改変により、この株における TAG 蓄積量の増加を試みると同時に、未だポジティブな結果の得られていない SII0822 欠損株について、TAG の蓄積条件を検討していく予定である。

*cyAbrB* 転写因子はシアノバクテリアの種内に広く保存されているため、SII0822 欠損株を用いた物質生産技術を確立することができれば、将来的には *Synechocystis* 以外の有用種の代謝改変にも、その技術を応用することができると期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

さきがけ研究期間内に、SII0822 転写因子が各種代謝経路の活性制御に重要な役割を果たしていることを明らかにし、SII0822 欠損株を物質生産プラットフォームとして使用していくための基礎的な知見を取得した。またこれらの知見に基づいて実際に代謝改変を行い、脂肪酸合成系の増強、および遊離脂肪酸の細胞外への排出等に関して、SII0822 欠損株が野生株に比べ高生産が可能な系であることを明らかにした。以上の点から SII0822 欠損株を用いた応用研究の導入段階までを達成することができたと考える。現段階では、この株に高蓄積しているグリコーゲンを炭素源として脂肪酸生合成系へ供給することが出来ていない。この株の長所を最大限に生かすためには、余剰糖を脂肪酸・油脂生産の原料とすることが必須であるため、今後はグリコーゲン量を減少させる方策を見つけ出し、結果の得られている代謝改変と統合することが最重要課題であると考えている。

(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)。

細胞体積が野生株の 5 倍、細胞あたりのグリコーゲン蓄積量は野生株の 10 倍にも達するシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の SII0822 転写因子欠損株について、さまざまな酵素遺

伝子を欠失・導入して、この株の代謝改変を行い、高蓄積しているグリコーゲンを、脂肪酸に変換し、最終的には油脂として蓄積させる研究を行っている。研究開始当初の想定を超える困難な状況を着実に突破し、論文や特許として成果を取りまとめ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CREST との融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、当初の目標についても更なる進展を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Muramatsu M, Hihara Y. Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. <i>J Plant Res.</i> 2012, 125(1), 11–39.   |
| 2. Kaniya Y, Kizawa A, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Kaneko Y, Nishiyama Y, Hihara Y. Deletion of the transcriptional regulator cyAbrB2 deregulates primary carbon metabolism in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. <i>Plant Physiol.</i> 2013, 162(2), 1153–1163. |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1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

- 2011/10/30–11/3 “cyAbrB transcriptional regulators and their physiological roles”  
The 6th German–Japanese Binational Seminar “Microalgal Products: From Metabolic Fundamentals to Promising Applications”
- 2013/3/22 「シアノバクテリアの順化応答と転写因子」  
第54回日本植物生理学会年会シンポジウム「進化的視点からシグナル伝達系を考える—シアノバクテリアから高等植物まで」
- 2013/11/20 「シアノバクテリアを用いた油脂生産系の構築」  
第1回 SUPER FORUM シンポジウム
- 2013/11/22 「cyAbrB 転写因子と代謝制御」  
ラン藻の分子生物学 2013
- 2013/11/30 「小さな藻類から大きなパワーを引き出す」  
埼玉大学・戸田市連携講座
- 2013/12/16–18 “Significance of the cyAbrB2 transcriptional regulator in metabolic regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803”  
Indo–Japanese Workshop, supported by DST–JSPS
- 2014/3/7 “Key transcriptional factors of light–harvesting and metabolic regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803”  
1st International Workshop of Cyanofactory

#### プレスリリース

- シアノバクテリアの代謝を制御する転写因子の働きを解明 —エネルギー・物質生産への応用に期待— (2013年5月)  
<http://www.saitama-u.ac.jp/announce/20130507-2.pdf>



做してデザインされたものである。しかし、天然型経路を構成する酵素反応には、細胞外環境では動作困難なものも複数含まれることから、必要に応じてこれらの反応をバイパスさせるなど人為的なデザイン変更を施した。各種好熱性微生物のゲノム情報等を参考に、人工経路のモジュールとなりうる耐熱性酵素群を選択し、これらを個別に大腸菌内で過剰発現させた。得られた組換え大腸菌の細胞に 60～70℃程度の熱処理を施すことで、宿主である大腸菌に由来する中温性酵素群を不活化させた。こうして耐熱性酵素だけが活性を保持した触媒モジュールを調製するとともに、これらを組み合わせることで人工代謝経路を構築した。また、今回の研究では、人工経路内での代謝の流れ(流束)を、吸光度測定をベースにリアルタイムで測定する手法を開発することで、所望の代謝流束(すなわち目的物質の生産速度)を達成するのに必要な酵素濃度を実験的に最適化することを可能とした。この結果、生産速度 8.2  $\mu\text{mol/l/min}$ 、対グルコース収率 82% (mol/mol)という生産効率で 1-ブタノールの試験管内生産に成功した。この生産効率は、発酵プロセスを用いたこれまでの世界最高水準に比肩しうる値であった。

また、同様の方法論に基づき、酵素モジュールの組み合わせを任意に変えることによって、1-ブタノールのほか、乳酸、リンゴ酸等の化学品を選択的に生産することにも成功している。これは、本法がバイオ燃料に限定されない様々な化学品にオンデマンドに適用可能であることを示すものである。

## (2) 詳細

### (2-1) ATP 非生産性キメラ型解糖系の構築とその利用

試験管内での酵素反応では、各反応に必要なエネルギーや酸化・還元力の供給源となる補酵素(ATP や NADH 等)を外から添加する必要がある。一般にこれら補酵素群は高価な化合物であるため、物質生産を目的とした酵素反応の利用を考える場合、これらの消費と再生をバランスさせ、その利用効率を高めることが非常に重要となる。本研究では、一般的な解糖系(Embden-Meyerhof 経路、EM 経路)の一部の酵素反応を超好熱性アーキアに見られる変形EM経路のそれらと入れ替えることによりATP/ADPの消費と再生がバランスした(すなわちATPを生産しない)キメラ型EM経路を構築することに成功した(図1)。さらに構築したキメラ経路にリンゴ酸/乳酸デヒドロゲナーゼなどの酵素をカップリングさせることでグルコースからの乳酸およびリンゴ酸を選択的に生産させることに成功した(研究成果 1、2)。

### (2-2) 人工代謝経路を用いたグルコースからの 1-ブタノール生産

上記のキメラ経路をさらに伸長し、16 種類の耐熱性酵素を用いて次世代バイオ燃料として注目を集める 1-ブタノールの生産に取り組んだ。天然の 1-ブタノール生産経路を構成する酵素反応の一部については、好熱菌に由来する耐熱性酵素が見出されていなかったり、大腸菌等の異種宿主内での組換え発現が困難であるものも含まれる。そこで、本研究では、天然の 1-ブタノール生産経路には含まれない酵素反応を適宜組み込んだ人工経路をデザインすることで、これらの問題を回避した(図2)。

例えば、解糖系の最終産物であるピルビン酸からアセチル CoA への変換は、通常、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体とよばれる酵素複合体によって触媒されるが、本酵素複合体は極



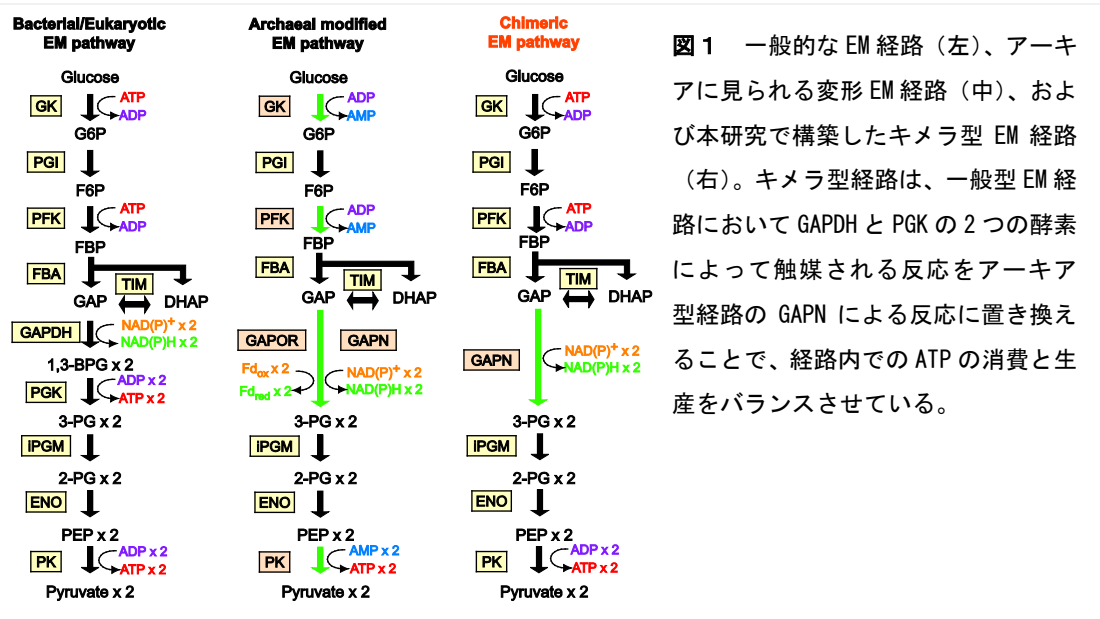
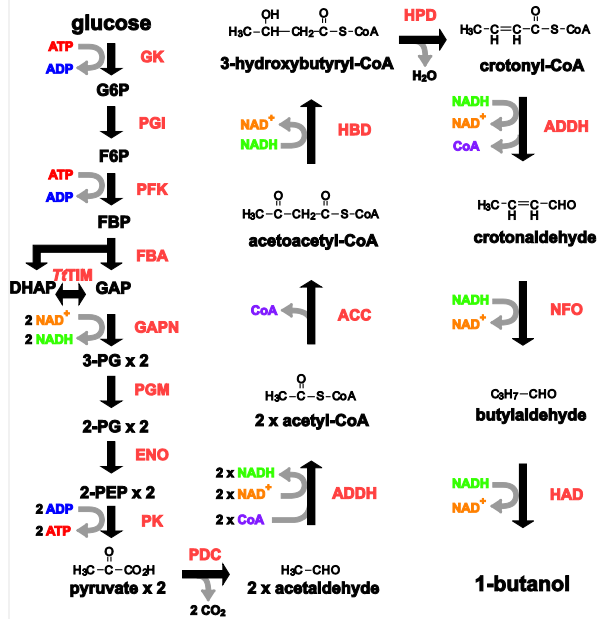


図1 一般的なEM経路(左)、アーキアに見られる変形EM経路(中)、および本研究で構築したキメラ型EM経路(右)。キメラ型経路は、一般型EM経路においてGAPDHとPGKの2つの酵素によって触媒される反応をアーキア型経路のGAPNによる反応に置き換えることで、経路内でのATPの消費と生産をバランスさせている。

めて複雑な高次構造を有し、異種宿主内での機能的発現の報告例は見られない。そこで、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ADDH)と呼ばれる二種類の酵素反応により、これをバイパスすることによって、天然型経路と同等の変換反応を試験管内でも動作させることに成功した(研究成果4)。また *Clostridium acetobutyricum* の1-ブタノール生産経路における中間体のひとつであるクロトニル CoA は、ブチリル CoA レダクターゼ(BCD)と呼ばれる酵素により二重結合の飽和化を受け、ブチリル CoA に変換され、次いでアルデヒドデヒドロゲナーゼによる還元反応でブタノール前駆体であるブチルアルデヒドへと変換される。しかし、このうち BCD は極めて酸素感受性の強い酵素であり、試験管内の反応でこれを利用するには困難が伴う。そこで、まずアルデヒドデヒドロゲナーゼによるクロトニル



ル CoA の還元的脱 CoA 反応を実施し、新たに得られた中間体であるクロトニアルデヒドを旧黄色酵素(NFO)と呼ばれる酵素で飽和化することによりブチルアルデヒドを得る新たな経路をデザインした。最終的にデザインされた人工代謝経路の流束(すなわち 1-ブタノール生産速度)を吸光度測定を用いてリアルタイムに測定し、経路構築に必要な各酵素の濃度を実験的に最適化することで、グルコースから1-ブタノールへの試験管内変換反応に成功した(研究成果5)。

図2 本研究で構築した1-ブタノール生産のための人工代謝経路

### 3. 今後の展開

本研究では、耐熱性酵素をモジュールとした試験管内での人工代謝経路構築技術を確立するとともに、本法を用いて 1-ブタノールをはじめとする各種の代謝産物を選択的に作りわけること成功している。本法の魅力のひとつは、モジュールである耐熱性酵素を自在に組み合わせることで、様々な有用化学品をオンデマンドで作りに出せる点にある。一方、本研究で示された物質生産システムの魅力は、生産速度と収率の点では既存の発酵プロセスを凌駕するものであった反面、一部の補酵素(NADH、NADPH など)の高温条件下での不安定性などが原因で長時間にわたる物質生産には適さず、結果的に得られた生産物濃度は、実用化には不十分な値にとどまっている。この問題は同時に、「高温環境下で生育する好熱菌たちはいかにして、これら補酵素群の持続的利用を可能にしているのか？」という基礎的疑問を投げかけるものでもある。今後、好熱菌における補酵素安定化メカニズムの解明など、本研究の遂行により新たに顕在化した課題をクリアすることで、人工代謝経路による物質生産プロセスのフィージビリティを向上させていくことが必要となろう。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

一連の研究を通じて、耐熱性酵素をモジュールとした試験管内での人工代謝経路構築という新たな方法論を確立することができた。本技術の魅力のひとつはモジュールである耐熱性酵素を自在に組み合わせることで、様々な有用化学品をオンデマンドで作りに出せるポテンシャルを有する点にある。今後、高付加価値な化学品にターゲットを定めることによって比較的近い将来の産業利用も可能であると考えている。

一方、バイオ燃料などのバルクケミカルへの応用を考えた場合、現時点で得られている生産物濃度などの値は、産業利用可能なレベルに比べ、未だ大きな隔たりのあるものと言わざるを得ない。しかし、補酵素群の熱安定性の問題など、今後、本技術のフィージビリティを向上させるために取り組むべき要素技術が本プロジェクトの遂行により具体化された点は非常に重要であると認識している。

#### (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)。

微生物の発酵機能を担う代謝酵素群を自由自在に組み合わせ、さまざまな化学品を生産できる人工代謝システムを開発することを目指し、この手法を用いて、第3世代バイオ燃料としての実用化が期待されるブタノールの生産に取り組んでいる。独創的な研究で発展性が期待される提案内容であったが、研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、論文業績などは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、CREST との連携研究などを通じて、NADH 等の補酵素群の熱安定性の問題などの解決による更なる可能性の追求や、バイオエネルギー関連物質のみならず、ファインケミカル生産などを含め、産業利用可能なレベルへの進展を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Ye Xiaoting, Kohsuke Honda, Takaaki Sakai, Kenji Okano, Takeshi Omasa, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Hisao Ohtake Synthetic metabolic engineering—a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. <i>Microbial Cell Fact.</i> 2012, 11, 120.                                |
| 2. Ye Xiaoting, Kohsuke Honda, Yumi Morimoto, Kenji Okano, Hisao Ohtake Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering. <i>J. Biotechnol.</i> 2013, 164, 34–40.   |
| 3. Pham Huynh Ninh, Kohsuke Honda, Yukako Yokohigashi, Kenji Okano, Takeshi Omasa, Hisao Ohtake Development of continuous bioconversion system using thermophilic whole-cell catalyst. 2013, 79, 1996–2001.  |
| 4. Borimas Krutsakorn, Takashi Imagawa, Kohsuke Honda, Kenji Okano, Hisao Ohtake Construction of an <i>in vitro</i> bypassed pyruvate decarboxylation pathway using thermostable enzyme modules and its application to <i>N</i> -acetylglutamate production. <i>Microbial Cell Fact.</i> 2013 12, 91 |
| 5. Borimas Krutsakorn, Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Takashi Imagawa, Xiaoyu Bei, Kenji Okano, Hisao Ohtake <i>In vitro</i> production of <i>n</i> -butanol from glucose. <i>Metab. Eng.</i> 2013, 20, 84–91   |

### (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)

#### ・学会発表

1. Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Kenji Okano, Hisao Ohtake Construction of a chimeric glycolysis pathway by synthetic metabolic engineering. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS). Sep 18, 2012, Daegu, Korea
2. Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Kenji Okano, Hisao Ohtake Synthetic metabolic engineering –A novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. Society of Biotechnology Japan, International Symposium on Green Growth. Oct 26, 2012, Kobe, Japan
3. Kohsuke Honda Butanol production through *in vitro* synthetic metabolic pathway. Sep 26, 2013 Enzyme Engineering XXII, Toyama, Japan.

#### ・受賞

4. 本田孝祐 「耐熱性酵素モジュールを用いたオンデマンド・バイオプロセスの開発」 第 14 回酵素応用シンポジウム研究奨励賞(主催:天野エンザイム株式会社)2013 年 6 月 14 日

#### ・報道/プレスリリース

5. 「試験管内でバイオ燃料合成」2013 年 10 月 3 日 朝日新聞 朝刊 21 面



(2) 詳細

性(アセチレン還元活性)の最大値は約 2 倍まで増大した。5 日間に亘る水素生産の速度は、約 30%向上することがわかりました。

これらの結果から、ヘテロシスト分化の活性化因子である HetR の活性レベルをランダム変異導入により制御することで、ヘテロシスト形成を一定間隔のパターンで、その頻度を増大させ、さらに様々なヘテロシスト頻度を示す変異株を作成できることに初めて成功しました。藻類を用いたランダム変異による改良の成功例は、非常に少なく、本研究成果は窒素固定ラン藻では世界で初めての成功例である。

株の水素生産性が優れていることを明らかにすることができた。藻類では数少ないランダム変異による改良成功例であり、その方法の有効性を示すことができたことは重要な成果であると考えられる。

また、ヘテロシスト頻度増大株で、CO<sub>2</sub> 通気により、細胞当たりの色素濃度の低下が見られる変異株では、高濃度の培養液における光利用効率の向上、および強光阻害の軽減が示唆され、これらの培養条件で水素生産性が顕著に増大するという有利な点を明らかにすることができた。今後、この変異株の色素分析と水素生産性増大との関連を明らかにする必要がある。

ニトロゲナーゼの分子活性向上のためのランダム変異による改変は、ニトロゲナーゼ発現系は構築できたが、変異株のスクリーニング系の工夫が必要で、今後の課題である。

(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)。

ヘテロシスト型ラン藻のニトロゲナーゼによる水素生産において、ヘテロシスト頻度を増やすことと、ニトロゲナーゼを改変し空気下の水素生産の高速化と高効率化を目指した研究を行っている。窒素固定ラン藻のランダム変異では、分化パターン形成の最新の知見を基にスクリーニング系を上手く工夫し、効果的に多数の目的変異株を得た。水素生産活性の評価は、長期間、高活性を持続させた上で比較し、ヘテロシストの増加により水素生産が増加することを示した。ニトロゲナーゼの改変では、窒素ガス下で高活性が長期間持続することを示し、培養の低コスト化につながる成果を得た。ニトロゲナーゼの発現系を構築し、分子活性を高めるための改変にも挑戦したが、目的変異株の取得には至らなかった。光合成生物を使ったバイオ燃料としての水素生産の研究は、古くからの重要なテーマである。その中で、着実に成果を挙げ、研究領域に貢献を果たしたと評価する。今後は、得られた成果を論文として完成させるとともに、チャレンジ精神を忘れずに研究を進めて行って欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, H. Sakurai, R. P. Hausinger “Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and water” AMBIO 2012, 41:169-173
2. H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue “Photobiological Hydrogen Production: Bioenergetics and Challenges for its Practical Application” Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews 2013, 17, 1-25

### (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)

#### 【国際会議 招待講演】

- ・Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and

water. H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, H. Sakurai, and R. P. Hausinger  
JSP-RSAS Joint Conference “Capturing the Sun” (2011), Sweden  
・Creating Anabaena PCC 7120 mutants with increased heterocyst frequency to increase  
photobiological hydrogen production. H. Masukawa  
18th International Congress on Nitrogen Fixation (2013), Miyazaki, Japan

【著作物】

- ・増川一、北島正治、櫻井英博、井上和仁、ラン藻の窒素固定酵素ニトロゲナーゼを利用した大規模な水素生産構想、「微細藻類によるエネルギー生産と事業展開」、竹山春子 監修、執筆分 第II編 第10章、シーエムシー出版 (2012.7)
- ・増川一、井上和仁、櫻井英博、ラン藻の光生物的水素生産性向上に向けたヘテロシスト形成頻度の増大、第64回日本生物工学会大会(創立90周年記念大会)トピックス集 (2012.10)
- ・増川一、櫻井英博、シアノバクテリア及び微細藻類による光水素生産、水素エネルギーシステム 2013, 38(1), 27-32