

戦略的創造研究推進事業(ALCA)
技術領域(実用技術化プロジェクト)「革新的な細胞
制御法や育種法による高効率バイオ生産の技術開
発」
課題名「ラン藻の発酵代謝工学－光合成を基盤と
したコハク酸・乳酸生産」

終了報告書

研究開発期間 平成25年10月～令和 5年3月

研究開発代表者：小山内崇
(明治大学農学部、専任准教授
株式会社シアノロジー、代表取締役)

○報告書要約（和文）

研究開発代表研究者：明治大学・専任准教授、株式会社シアノロジー・代表取締役
小山内崇

研究開発課題名：ラン藻の発酵代謝工学－光合成を基盤としたコハク酸・乳酸生産

1.研究開発の目的

本研究は、光合成を行う微細藻類であるラン藻を用いて、二酸化炭素からコハク酸や乳酸などのプラスチック原料を生産することを目的とした。石油系樹脂をバイオマス由来に変えると、CO₂の削減効果が重量の1.4～2倍あると試算されている。これらの情報をもとに試算を行うと、コハク酸をバイオマス由来にすれば、年間22～32万tのCO₂削減効果があると考えられ、これは日本の年間温室効果ガス排出量の0.17～0.34%にあたる。特に微細藻類は、成長過程で二酸化炭素を吸収できるため、さらなるCO₂の削減効果が期待できる。このため、本研究が進むことで、CO₂の削減に大きく寄与すると期待できる。

2.研究開発の概要

(1)内容:

本研究では、ラン藻の高密度培養系の開発とコハク酸・D-乳酸の高効率生産系の開発の2つの項目を重点的に研究した。このために、ラン藻の培養・遺伝子改変・メタボロミクス・酵素の生化学などの手法を用いた。ラン藻の培養については、小山内班と宮本班で重点的に行い、遺伝子改変とメタボロミクスは小山内班、蓮沼班、白井班、酵素の生化学は小山内班で重点的に行った。

(2)成果:

ラン藻の代謝工学により、コハク酸量は当初の10 mg/Lより増加した。2021年にリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *citH* の過剰発現と培地を交換するストリップング法を組み合わせることで、力価4.2 g/Lを達成した (Iijima et al. 2021 Metab Eng)。さらに、ホスホノールピルビン酸カルボキシラーゼ *ppc* などの遺伝子改変とコーンステーパーリカーの添加を組み合わせ、コハク酸力価5.7 g/Lを達成した (Hidese et al. 2022 ASC Synth Biol)。これは現時点でラン藻の発酵によるコハク酸生産の最高記録である。

生産量の増加だけでなく、代謝の制御メカニズムについても明らかにした。嫌気条件では、pH依存的に還元的なTCA回路が活性化することが、メタボロミクス解析や酵素の代謝再構成によって明らかになった (Hasunuma et al. 2018 Metab Eng; Ito et al. 2021 Plant J)。また、コハク酸生産を活性化するRNAポリメラーゼシグマ因子 SigE のレギュロンを明らかにするという転写制御機構の解明も行った (Kariyazono and Osanai 2022 Plant J)。さらに、ラン藻では、リンゴ酸酵素が働く特殊なTCA回路を有することも明らかになった (Katayama et al. 2022 mBio)。

また、本研究最終年度である2022年6月に、明治大学発ベンチャーとして、株式会社シアノロジーを設立した。小山内が代表取締役を務める。この会社は、JST-ALCAで培われた知見をもとに、企業と連携をしながら社会実装を行うための企業である。会社設立から2023年3月までに21種類の製品・サービスを販売した。このように、本研究計画では、基礎研究から会社の設立、製品・サービスの上市、そして売上をあげるという社会実装までを達成した。

(3)今後の展開:

今後は、発酵などのプロセスを減らしたカルボン酸生産を目指すとともに、設立した会社を活用して真の社会実装を進め、二酸化炭素を資源としたバイオプラスチック生産系の確立を目指す。

○Report summary (English)

Principal investigator: Dr. Takashi Osanai, Meiji University, Associate Professor and Cyanology Co. Ltd, CEO

R & D title: Metabolic Engineering of Cyanobacteria for Fermentative Production of Succinate and Lactate

1. Purpose of R & D

The purpose of this study was to produce plastic materials such as succinic acid and lactic acid from carbon dioxide using cyanobacteria, which are photosynthetic microalgae. It has been estimated that converting petroleum-based resins to those derived from biomass has the effect of reducing CO₂ by 1.4 to 2 times its weight. Based on this information, an estimation was made that if succinic acid were to be derived from biomass, there would be an annual reduction of 220,000 to 320,000 tons of CO₂, which is 0.17 to 0.34% of Japan's annual greenhouse gas emissions. In particular, microalgae can absorb carbon dioxide during their growth process, which is expected to further reduce CO₂ emissions. Therefore, it is expected that further progress in this research will make a significant contribution to the reduction of CO₂ emissions.

2. Outline of R & D

(1) Contents:

This study focused on two items: the development of a high-density culture system for cyanobacteria and the development of a highly efficient production system for succinic acid and D-lactic acid. For this purpose, methods such as cyanobacteria culture, genetic modification, metabolomics, and enzyme biochemistry were used. Cyanobacteria culture was focused on by the Osanai and Miyamoto groups, genetic modification, and metabolomics by the Osanai, Hasunuma, and Shirai groups, and biochemistry of enzymes by the Osanai group.

(2) Achievements:

Metabolic engineering of cyanobacteria increased the succinate titer from the original 10 mg/L. In 2021, a titer of 4.2 g/L was achieved by combining overexpression of the malate dehydrogenase gene *citH* with a stripping method of medium exchange (Iijima et al. 2021 Metab Eng). Furthermore, a succinate titer of 5.7 g/L was achieved by combining genetic modifications such as phosphonolpyruvate carboxylase *ppc* with the addition of corn steep liquor (Hidese et al. 2022 ASC Synth Biol). This is the highest succinic acid production by fermentation of cyanobacteria currently. In addition to the increase in production, the regulatory mechanisms of metabolism were also elucidated. Metabolomics analysis and metabolic reconstruction of enzymes revealed that under anaerobic conditions, the reductive TCA circuit is activated in a pH-dependent manner (Hasunuma et al. 2018 Metab Eng; Ito et al. 2021 Plant J). We also elucidated the transcriptional regulatory mechanism, revealing the regulon of the RNA polymerase sigma factor SigE, which activates succinate production (Kariyazono and Osanai 2022 Plant J). It was also revealed that cyanobacteria have a specialized TCA circuit in which malate enzymes operate (Katayama et al. 2022 mBio). In June 2022, the final year of this research, a Meiji University venture, Cyanology Inc. Osanai serves as the representative director. This company is designed for social implementation in collaboration with companies based on the knowledge developed in JST-ALCA. From the company's establishment to March 2023, 21 different products and services have been sold. Thus, in this research plan, the company has achieved social implementation, from basic research to the establishment of the company, to the launch of products and services, and to the making of sales.

(3) Future developments:

In the future, the team aims to produce carboxylic acid with reduced processes such as fermentation, and to establish a bioplastic production system using carbon dioxide as a resource by utilizing the established company to promote true social implementation.