

未来社会創造事業（探索加速型）
「地球規模課題である低炭素社会の実現」領域
終了報告書（探索研究）

令和元年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名: 蓮沼 誠久]

[所属: 神戸大学 先端バイオ工学研究センター・教授]

[研究開発課題名: 細胞分裂制御技術による物質生産特化型ラン藻の創製と
光合成的芳香族生産への応用]

実施期間: 令和元年 11 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

§1. 研究実施体制

(1)「ラン藻芳香族代謝工学技術の開発(蓮沼)」グループ(神戸大学)

① 研究開発代表者: 蓮沼 誠久 (神戸大学先端バイオ工学研究センター、教授)

② 研究項目

- ppGpp が制御する代謝メカニズムの解析
- 動的メタボロミクスによるラン藻芳香族代謝メカニズムの解析
- メカニズム解析に基づく代謝工学による芳香族化合物(*p*-クマル酸)の高生産化
- 代謝経路設計技術を用いた多様な芳香族生産

(2)「細胞増殖制御メカニズムの解析と応用(大林)」グループ(静岡大学)

① 主たる共同研究者: 大林 龍胆 (静岡大学理学部生物科学科、助教)

② 研究項目

- ppGpp による増殖停止機構の解明
- ppGpp による代謝スイッチ機構の解明
- メカニズム解析に基づく細胞増殖制御工学の開発

(3)「光合成機能工学の開発(蘆田)」グループ(神戸大学)

① 主たる共同研究者: 蘆田 弘樹 (神戸大学人間発達環境学研究科、教授)

② 研究項目

- ppGpp 蓄積と光合成機能の関係性解析
- 光合成とチロシン生合成の関係性解析
- ppGpp 応答の分解タンパク質解析とチロシン生産への応用

§2. 研究開発成果の概要

我々は、枯草菌由来 ppGpp 合成酵素をラン藻内で誘導発現すると芳香族アミノ酸が細胞外に放出される現象を見出した。本研究ではこの発見を起点とし、CO₂ から芳香族化合物を高生産する技術の開発に取り組んだ。まずはこれまで知見が乏しかったラン藻における ppGpp の役割を解析し、ppGpp による DNA 複製の開始阻害、FtsZ タンパク質の機能阻害、GTP 量制御といった新機構を見出した。さらに、N 欠応答における ppGpp の関わりを明らかにした。こうした知見を応用することで、DNA 複製の促進、細胞分裂の促進、および細胞の巨大化に成功した。また、本研究では光の自己遮蔽が光合成代謝のボトルネックとなっている事実を世界で初めて定量的に捉えた上で、ppGpp による細胞分裂制御を利用して、CO₂ からの芳香族アミノ酸の合成強化に成功した。また、*p*-クマル酸をハブとして *p*-ヒドロキシスチレンとフェルラ酸、さらにはムコン酸の光合成微生物による生産にも初めて成功した。さらに、グリコーゲン蓄積の解消が芳香族生産において有効な戦略であることを見出し、その背景にある代謝オーバーフローや、機械受容チャネルを介したアミノ酸排出といったメカニズムを定量的に捉えることができた。また、動的メタボロミクスにより見出した代謝ボトルネックの解除、芳香族アミノ酸合成経路に対するフィードバック阻害の解除、フィコシアニンの分解促進など、芳香族アミノ酸の生産向上に有効戦略を複数導出することに成功した。234.4 mg/L チロシン、392.3 mg/L *p*-クマル酸は光合成による芳香族生産の世界最高値である。本研究で取り組んだ細胞増殖制御技術は芳香族だけではなく、脂肪酸を含む幅広いコモディティケミカルズ生産に有効であることが明らかになった。

【代表的な原著論文情報】

1. Ryota Hidese, Ryudo Ohbayashi, Yuichi Kato, Mami Matsuda, Kan Tanaka, Sousuke Imamura, Hiroki Ashida, Akihiko Kondo, Tomohisa Hasunuma. ppGpp accumulation reduces the expression

of the global nitrogen homeostasis-modulating NtcA regulon by affecting 2-oxoglutarate levels. *Communications Biology* 6(1), 1285 (2023)

2. Yuichi Kato, Ryota Hidese, Mami Matsuda, Ryudo Ohbayashi, Hiroki Ashida, Akihiko Kondo, Tomohisa Hasunuma. Glycogen deficiency enhances carbon partitioning into glutamate for an alternative extracellular metabolic sink in cyanobacteria. (Submitted to *Communications Biology*)

3. Tetsuhiro Hatakeyama and Ryudo Ohbayashi. Evolutionary innovation in polyploidy (revised in *iScience*), *bioRxiv* 2022, <https://doi.org/10.1101/2022.10.29.514387>