

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を利用した
ミルキング方式による藻類バイオ燃料生産系の開発

氏名 加藤 明宏

論文内容の要旨

地球環境問題やエネルギー問題への解決策として、微細藻類を用いたバイオ燃料生産が注目を集めている。特に真核藻類を用いたトリアシルグリセロール (TAG) の細胞内生産は実用化に向けた研究が盛んに行われている。しかし、TAG の抽出に必要とされる細胞の回収や乾燥に多大なエネルギーが消費されるため、生産系全体のエネルギー収支比 (EPR) は最大でも約 1 と推計されており、持続可能なレベル (EPR > 5) には到達していない。このことは、燃料物質の細胞内生産の困難さを示している。この現状を打破する方法として、“ミルキング” と呼ばれるバイオ燃料の細胞外生産法が挙げられる。この方式では、細胞の増殖を抑制した状態で生産物が継続的に細胞外へと放出されるため、生産コストの削減や生産量の上限の拡大等のメリットがある。最近、酸素発生型の原核光合成生物であるシアノバクテリアが、遺伝子操作によって遊離脂肪酸 (FFA) を細胞外へと放出できることが報告され、ミルキングの実現が期待された。しかしその生産性は非常に低く、実用化に向けた大きな障害となっている。本学位論文は、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を材料として、ミルキング方式によるバイオ燃料生産を実現するための技術基盤の構築を行ったものである。目標数値 (FFA の放出速度 $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、細胞乾燥重量あたり FFA 放出量 4 g g^{-1}) を定め、以下の 4 つの試みを行った。

1. FFA の排出能をもつ内在性 RND 型多剤排出ポンプの同定と機能解析

S. elongatus PCC 7942 の硝酸イオン輸送体欠損株を親株として FFA 生産株 dAS2T を作製し、細胞の増殖を抑制した状態で FFA を大量に生産・放出させることを試みた。硝酸イオンを唯一の窒素源とする培地 (硝酸培地) では、硝酸イオン輸送体の欠損株は窒素源の獲得を細胞内への硝酸イオンの受動拡散に依存するため、細胞が窒素制限状態に陥って増殖速度が低下する。dAS2T は硝酸培地では深刻な生育不良

を起こしてほとんど生育できず、FFAの放出量もわずかであったが、この株から硝酸培地で生育可能な擬似復帰変異株 (dAS2T-pr1) が得られた。ゲノムのリシーケンス解析を行って生育が改善された原因を探索すると、dAS2T-pr1 では RND 型多剤排出ポンプの一部をコードするオペロン (*rndA1-rndB1-synpcc7942_2370*) の上流領域に塩基置換が生じ、元株よりも発現量が増加していることが示された。そこでこの排出ポンプの機能を調べるために野生株 (WT) 由来の欠損株を作製したところ、欠損株は中鎖飽和脂肪酸 (10:0、12:0、14:0) と長鎖不飽和脂肪酸 (18:1、18:3) への感受性が WT よりも増加していた。さらに、dAS2T でこの排出ポンプを過剰発現させると、硝酸培地での生育が改善して FFA の放出量も増加した。これらの結果は、シアノバクテリアにおいて FFA の排出能をもつ輸送体が初めて同定されたことを示すとともに、FFA の排出経路の確立が生産性の向上に重要であることを示している。

2. FFA の生産速度と放出速度の調節による生産性の向上

dAS2T の生育と FFA 生産性が極めて不安定だったため、*S. elongatus* PCC 7942 の WT 由来の FFA 生産株である dAS1T を作製して使用した。dAS1T は FFA の生産を促す強光条件下でも FFA を放出しつつ生育したが、生産された FFA の約 85% が細胞内に蓄積しており、長時間培養することで細胞はクロロフィルを消失して死滅した。このような生育不良は、疎水性物質である FFA が細胞外へと効率的に放出されず、細胞内に過剰蓄積することに起因すると考えられた。そこで、dAS1T から細胞表層の親水性障壁である O 抗原糖鎖を欠損させ、FFA の受動拡散の促進を試みた。O 抗原糖鎖の欠損株では FFA 放出速度が dAS1T よりも向上して $0.41 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ に到達し、さらに生育不良も緩和されていた。細胞内外の FFA 量から算出された FFA の総生産速度は、O 抗原糖鎖の欠損株では $2.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ となり、dAS1T よりも 45% 高い値を記録した。ほとんどの FFA は細胞内に蓄積しているが、この生産速度は FFA 放出速度の目標数値 ($3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) と比較しても十分な値であった。このことから、*S. elongatus* PCC 7942 が高い FFA の生産能力をもち、FFA 生産の有力なホストとなることが示された。しかし、高い生産能力をもつがゆえに細胞外への FFA の排出が追いつかず、細胞内に蓄積した FFA によって生育不良が引き起こされていることも明らかとなった。以上の結果から、FFA の放出能力をさらに強化し、細胞内での生産速度と細胞外への放出速度のバランスを最適化することが必要だと示された。

3. 水・有機二相培養法による FFA 生産の安定化と生産性の向上

WT と dAS1T を $500 \mu\text{M}$ (0.13 g L^{-1}) のパルミチン酸 (16:0) の存在下で培養すると、dAS1T の生育のみが特異的に阻害された。このことから、培地に蓄積した FFA によって細胞内から細胞外への FFA の受動拡散が阻害されていることが示唆された。そこで、細胞から放出された FFA を培養中に除去するために、有機溶媒を用いた水・有機二相培養法を構築した。ミリスチン酸イソプロピル (IM) を用いて dAS1T を二相培養すると、IM を重相していないコントロール条件と比べて細胞の増殖が著しく

改善され、クロロフィル量の減少や光合成活性の低下も大きく緩和された。さらに、細胞外への FFA の放出量がコントロール条件と比べて 3 倍以上増加し、細胞内の FFA 量もコントロール条件の 15%以下に減少した。このことから、二相培養法によって FFA の受動拡散が促進された結果、細胞の生育が改善されたことが示唆された。IM の存在下で dAS1T を長時間 (432 時間) 培養すると、FFA 放出量 0.64 g L^{-1} 、平均 FFA 放出速度 $1.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ が達成された。この放出速度は目標値の半分に相当する値である。一方で、細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量は 0.36 g g^{-1} に留まり、目標数値の十分の一以下の値であった。以上のように、FFA 生産株の生育を安定化して生産性を高めるためには、放出された FFA を培養中に取り除き続けることが極めて重要であることが示された。

4. 細胞増殖と FFA 生産の脱共役による生産性の向上

細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量が依然として目標値の十分の一以下である原因としては、二相培養法によって FFA の細胞内への蓄積が解消された結果、細胞の生育が大幅に改善されたことが考えられる。そこで、再び dAS2T を利用して細胞増殖を抑制した状態での FFA の生産・放出を試みた。二相培養法によって dAS2T は硝酸培地でも生育可能となったが、増殖速度とともに FFA の放出速度も dAS1T の数分の一に減少してしまい、細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量は最大でも 0.38 g g^{-1} に留まった。dAS2T で FFA 排出ポンプを高発現させて二相培養すると、FFA の放出速度のみが dAS1T と同程度にまで増加し、細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量も 0.61 g g^{-1} に到達した。さらに、培地中の硝酸イオン濃度を FFA 生産に最適化すると、*rndA1-rndB1* を高発現した dAS2T における細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量は培養 240 時間で 0.90 g g^{-1} まで向上し、同時に FFA の平均放出速度も $1.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ を達成した。このように、細胞増殖を抑制した状態で FFA の排出能力を強化することにより、FFA の光合成生産と細胞増殖とが切り離され、生産性が大きく向上した。

以上のように、本学位論文はミルキング方式によるバイオ燃料生産を実現するための基盤技術を構築した。すなわち、①高い生産能力をもつ株を構築し、②細胞外への生産物の排出能力を強化し、③物質生産時の細胞増殖を抑制することの三点が生産性の向上に重要であることを明確にした。現時点での FFA 生産性は目標数値には届いていないが、先行研究で報告された *Synechocystis* sp. PCC 6803 の値と比較すると、FFA 放出速度は約 4 倍、細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量は約 7 倍に増加しており、生産性を向上させるための基本原理が確立されたことを示している。