

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 加藤 明宏

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

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	小俣 達 男
委員	名古屋大学教授	前 島 正 義
委員	名古屋大学教授	小 林 哲 夫
委員	名古屋大学教授	藤 田 祐 一
委員	名古屋大学助教	前 田 真 一

地球温暖化の抑止とエネルギー問題の解決を目指して光合成微生物を用いたバイオ燃料生産の研究が進められており、中でも真核藻類を用いたトリアシルグリセロール (TAG) 生産系の構築に多大な研究資源が投じられたが、未だ実用化に至っていない。TAG 生産では、生産物を細胞内に蓄積させるために細胞当たりの収率が低く、しかも TAG 抽出の際の細胞の回収・乾燥のエネルギーコストが大きいため、生産系の理論的なエネルギー収支比 (EPR) は最大 1.3 程度にすぎない。そこで、現状打開のために“ミルキング”と呼ばれる生産法が提唱されるようになった。この方式では、細胞の増殖を抑制しつつ生産物を細胞外に継続的に放出させることで細胞当たり生産量を増加させ、さらに集菌・乾燥コストを省くことで、EPR 値の向上が期待できる。最近、原核光合成生物であるラン藻の遺伝子操作により、生産速度や生産量が TAG 生産に比べてはるかに低いものの、バイオディーゼルの原料となる遊離脂肪酸 (FFA) を細胞外に放出させる方法が報告された。本学位論文は、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を材料とし、FFA のミルキング方式による生産の実現へ向け、数値目標 (FFA 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}) を設定して技術開発を行ったものであり、以下の 4 つの内容から構成されている。

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

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。そこで、*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が、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。しかしこの株から、硝酸培地で生育可能な疑似復帰変異株 (dAS2T-pr1) が得られたので、ゲノムのリシーケンス解析によって生育改善の原因を探索したところ、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判明した。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、ラン藻自身が FFA 排出輸送体をもつことを初めて明らかにし、さらに FFA の排出経路の確立が FFA 生産性の向上に大きく貢献することを示したものである。

2. FFA の生産速度と放出速度の調整による生産性の向上

上記 1.において dAS2T の生育と FFA 生産性が極めて不安定だったため、窒素制限のない条件での FFA 生産性を調べるため、*S. elongatus* PCC 7942 の WT 由来の FFA 生産株である dAS1T を作製した。dAS1T は dAS2T とは異なり、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、長時間培養すると細胞はクロロフィルを失って死滅した。このような生育不良が、疎水性物質である FFA の細胞内への過剰蓄積によって起こる可能性について検討するため、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ところ、O 抗原糖鎖欠損株では 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、元株である dAS1T よりも 45% 高かった。FFA の大半は依然として細胞内に残存していたものの、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り、*S. elongatus* PCC 7942 が高い FFA の生産能力をもち、ミルク方式による FFA 生産の有力なホストとなり得ることが示された。ただし、dAS1T は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り、FFA の生産能力に応じて細胞外への放出能力を高め、生産と放出の速度のバランスを最適化することが重要であることが示された。

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

上記 2.の結果を受け、細胞外への FFA の放出速度を向上させる方法を探索した。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 を重層していない対照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 の放出量が対照と比べて 3 倍以上増加し、細胞内の FFA 量も対照の 15% 以下に減少した。これらのことから、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された。IM の存在下で dAS1T を長時間 (432 時間) 培養すると、平均 FFA 放出速度は $1.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ に到達し、目標数値の半分のレベルに到達した。一方で、細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量は 0.36 g g^{-1} であり、目標数値の十分の一以下のレベルに留まっていた。これらの結果により、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明らかになった。

4. 細胞増殖と FFA 生産の脱共役による生産性の向上

上記 3.において、細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量は依然として目標数値の十分の一以下であった。これは、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原因だと考えられた。そこで、上記 1.で作製された dAS2T を利用し、細胞増殖を抑制した状態での FFA の生産・放出を再度試みた。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。そこで、上記 1.の項目で同定した RND 型 FFA 排出ポンプを dAS2T で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、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。以上の結果は、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 の生産が細胞増殖から切り離され、生産性が大きく向上したことを示すものである

以上のように、本学位論文は、①高い生産能力をもつ株の構築、②細胞外への生産物の排出能力の強化、③物質生産時の細胞増殖の抑制の三点が FFA 生産性の向上に重要であることを明確にしたものであり、ミルキング方式によるバイオ燃料生産の実現に大きく貢献するものである。現時点での FFA 生産性は先行研究で報告された値よりも数倍高く、今後も本研究で確立された基盤技術を用いることで生産性がさらに向上することが期待される。よって、当審査委員会は、本学位論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	加藤 明宏
試験担当者	主査 小俣達男、前島正義、小林哲夫、藤田祐一、前田真一			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成30年 2月 7日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				