

主論文の要約

論文題目

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

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) の生産系は、最大で細胞乾燥重量の 50% に相当する TAG が細胞内に蓄積され、TAG の蓄積速度も $2 \sim 3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ に到達することから、実用化に向けた研究が盛んに行われている。しかしこれは、同時に燃料物質と等量の細胞残渣が生じることを意味している。世界の化石燃料消費の 10% (11 億トン/年) を代替した場合に生じる細胞残渣の量は、世界の年間穀物生産量の約半分に匹敵する。さらに、TAG の抽出に必要とされる細胞の回収や乾燥に多大な熱・電気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 1 付近と推計されており、持続可能な生産系のレベル (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、“ミルクキング” 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ことを目指しており、細胞残渣の量を抑えつつ、高コストな抽出過程を省略することができる。しかも、細胞あたりの生産量が細胞体積によって制限されなくなるため、生産量の上限の拡大が可能となる。

最近、酸素発生型の光合成原核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、ミルクキングの実現が期待された。しかし、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の FFA 生産株について報告されている生産性は、FFA 放出速度が $0.44 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量が 0.13 g g^{-1} と非常に低く、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、ミルク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目指したものである。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} を数値目標として定め、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

先行研究に倣い、FFA 生産株の作製は、内在性のアシル-ACP 合成酵素の破壊と大腸菌由来のチオエステラーゼの導入によって行った。ただし、物質生産時の細胞増殖を窒素制限によって抑制するために、硝酸イオン輸送体 (NRT) を欠損した *S. elongatus* PCC 7942 の変異株を親株として利用した。硝酸イオンを唯一の窒素源とする培地 (硝酸培地) では、NRT 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。また、チオエステラーゼをコードする遺伝子 (*tesA*) の発現を *S. elongatus* PCC 7942 の *nirA* プロモーターの制御下に置くことにより、細胞が窒素制限状態に陥っても *tesA* が最大限発現し、FFA 生産が促進されるようにデザインした。しかし、このようにして作製された FFA 生産株 (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。このことから、細胞の増殖を抑制した状態での FFA 生産によって、細胞が著しい生育不良を起こすことが示された。幸運なことに、この株から硝酸培地で生育可能な擬似復帰変異株 (dAS2T-pr1) が得られたため、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した。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*) の上流領域に生じた変異により、dAS2T と比べてこのオペロンの発現量が上昇していることが明らかとなった。そこで、この排出ポンプの機能を調べるために野生株 (WT) 由来の変異株を作製し、細胞外に加えた FFA に対する耐性の変化を調べた。排出ポンプの欠損株では中鎖飽和脂肪酸 (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 よりも増加した一方で、排出ポンプの過剰発現株では 12:0 と 18:3 への耐性が増していることが明らかとなった。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、オペロンがコードする排出ポンプが FFA の排出能をもつことを示すとともに、細胞外への FFA の排出能力を強化すること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 を親株として同様の方法で FFA 生産株 (dAS1T) を作製した。dAS2T とは異なり、dAS1T は硝酸培地でも生育可能であった。dAS1T の細胞は NRT を保有するため硝酸培地でも窒素制限状態とならず、*tesA* の発現量が dAS2T よりも低下すると推察され

る。そのために dAS1T では dAS2T よりも FFA の生産速度が低下し、生育不良が緩和されたと思われる。しかし、dAS1T でも強光条件下で長時間（240 時間）培養すると、細胞がクロロフィルと光合成活性を消失して死滅した。細胞内外の FFA 量を測定すると、細胞内には細胞外よりも 5 倍以上多い FFA が存在していたことから、細胞内に過剰に蓄積した FFA によって生育不良が引き起こされていることが示唆された。そこで、細胞表層部の親水性障壁である O 抗原糖鎖を欠損させて FFA の受動拡散を促進するために、O 抗原糖鎖を内膜からペリプラズムへと輸送する輸送体の ATPase ドメインをコードする *wzt* を dAS1T で欠損させた。dAS1T Δ *wzt* ではクロロフィルの分解を伴う生育不良が緩和されており、培養期間中（240 時間）における FFA の平均放出速度も dAS1T と比べて 15% 向上して 0.41 mg L⁻¹ h⁻¹ に到達した。さらに、細胞内外の FFA 量から算出された FFA の総生産速度は 2.7 mg L⁻¹ h⁻¹ となり、dAS1T よりも 45% 増加した。ほとんどの FFA が細胞内に蓄積していることを考えても、目標数値である 3 mg L⁻¹ h⁻¹ の FFA 放出速度と比べて十分な生産速度を達成した。このことから、*S. elongatus* PCC 7942 が高い FFA の生産能力をもつことが明らかとなった。しかし、現状で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った。以上の結果から、FFA の生産を安定化して生産性を向上させるためには、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 μ 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。WT はデカン、ウンデカン、リン酸トリブチルを培地に重相した場合にはほとんど生育できず、ミリスチン酸イソプロピル (IM) を重相した場合にのみ生育した。そこで 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。FFA の放出量はコントロール条件と比べて 3 倍以上に増加しており、放出された FFA の約 90% が IM 相に抽出されていた。さらに、二相培養によって dAS1T の細胞内 FFA 量は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、細胞の生育が大きく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 mg L⁻¹ h⁻¹が達成された。この FFA の放出速度は目標数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、依然として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

水・有機二相培養法によって dAS1T の FFA 放出速度は大きく向上して目標値の半分に到達したが、細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量は依然として目標値の十分の一以下であった。これは、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ためである。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。dAS2T を二相培地で培養すると、細胞は硝酸培地でも生育可能となり、その生育速度を培地中の硝酸イオン濃度によって制御することが可能となった。しかし、硝酸培地における dAS2T の FFA 放出速度は、増殖速度とともに dAS1T の数分の一のレベルにまで減少してしまった。細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量も最大で 0.38 g g⁻¹に留まり、目的とする細胞の増殖制限下での FFA の大量放出は達成されなかった。しかし、FFA の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。このことは、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 の光合成生産と細胞増殖とが切り離されたことを示している。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に到達し、FFA の平均放出速度も 1.8 mg L⁻¹ h⁻¹を達成した。

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ミルキングの実現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手段が確立されたことを示している。