

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08174

研究課題名(和文)組換えシアノバクテリアによるCO<sub>2</sub>を資源とする高効率なバイオエチレン創製

研究課題名(英文) Engineering a Chimeric Complex of Plant Enzymes to Improve Photosynthetic Production of Bio-ethylene by Cyanobacterium.

研究代表者

神藤 定生 (Jindou, Sadanari)

名城大学・理工学部・助教

研究者番号：90583865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、光合成細菌の光合成産物をバイオエチレンとして効率よく回収する研究である。キメラ骨格タンパク質Cip4を構築し、これを保持する組換え体をSOC4株とした。バイオエチレン生産量を既存のSOC2株と比較した結果、SOC4株は2.4倍高い活性を示した。菌体再利用によるバイオエチレン連続生産プロセスは、12時間のエチレン生成と24時間の回復培養のサイクルであり、かつ、その上限は7サイクルであることを明らかにした。タンパク質高生産タグをACOへ付加させることで、バイオエチレン生産活性をSOC2株の2.4倍高めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シアノバクテリアにエチレン合成に関わる二つの酵素を局在化させることで効率的なエチレン創製が可能となった。この技術を起点として、律速酵素の生産性をあげる技術、培養条件の最適化等を駆使して、経済的な生産効率の確保に関する知見を得られた。将来的な目標効率値の達成により、化石資源原料のエチレンをCO<sub>2</sub>原料によるエチレン=バイオエチレンとすることができ、炭素循環社会に貢献するものである。また、微生物からエチレンが創製出来るということは、他の基礎化学製品(プロピレン、ブタジエン)にも拡大できることを想定出来ることから、本技術をプラットフォームとした開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We engineered a cyanobacterium using a synthetic biological approach to construct a photosynthetic system producing ethylene from carbon dioxide. In this research, the recombinant strain SOC4 was constructed and its ethylene production efficiency was increased by 2.4-fold. We have developed a continuous ethylene production process and found that the bacteria can be reused repeatedly. Introduction of promotion tag at ACO resulted in changes of ethylene production activities.

研究分野：合成生物学

キーワード：エチレン酸化酵素 シアノバクテリア 酵素複合体 Synechococcus コヘシン ドックリン ACC合成酵素 ACC

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エチレンはプラスチックなどの石油化学製品を製造する初発物質として極めて重要な工業用原料ガスである。いっぽう、資源枯渇や気候変動などの課題が顕在化するなか、CO<sub>2</sub>の削減による持続可能な社会の構築および脱石油依存社会の実現は喫緊の課題である。そこで、我々は CO<sub>2</sub>から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築し、石油を原料やエネルギー源に用いない、新規なエチレン製造法の基盤技術を確立した。具体的には、植物由来のエチレン生合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を複合体化(SOC2)させ、これをシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 へ導入し SOC2 株とした。結果、当該細菌はバイオエチレンを 3.4 nl/ml/O.D.<sub>730</sub>/h の効率で生産した。また、酵素複合体の形成により 3.7 倍高いバイオエチレン合成活性を得た。バイオエチレン生産の事業化を視野に、更にその生産効率を高めることが急務である。

### 2. 研究の目的

CO<sub>2</sub>を資源とするバイオエチレンの実用化を目指すとき、その生産量は微量である。原因として、エチレン合成に関わる ACO の  $V_{max}$  値は ACS の約 270 分の 1 であり、律速段階であること、また、ACS の触媒反応時に阻害物質メチルチオアデノシン(MTA)が同時生成され、ACC 合成能が低下すること、が考えられる。

そこで本研究では、以下の項目について検討した。

- (1) 酵素組成中の律速酵素のモル比を増やし、かつ、ACS 阻害物質分解酵素 (MTAN) を組み込んだ複合体 SOC4 を構築する。
- (2) 二酸化炭素からバイオエチレンへの物質変換効率を算出する。
- (3) バイオエチレン生産のコストダウンをはかるため、連続生産プロセスの検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### 発現ベクター-pUC303-SOC4 の構築

人工酵素複合体 SOC2 の酵素組成の改良を行い、SOC3B 株および SOC3D 株の特徴をあわせもつ新規人工酵素複合体 SOC4 の構築を目的に、新規キメラ骨格タンパク質 Cip4 のコドン頻度を最適化した合成遺伝子で構築した。Cip4 によって形成される人工酵素複合体 SOC4 をコードする pUC303-SOC4 発現ベクターを既存の発現ベクター-pUC303-SOC2B と連結させ、In-Fusion 法で構築した。

#### 組換え体 SOC4 株の確保

人工酵素複合体 SOC4 をコードする pUC303-SOC4 ベクターを保持する組換えシアノバクテリア SOC4 株を確保した。本組換え体の生産するタンパク質は抗 His タグ抗体によるウェスタンブロットング解析で観察した。また、本組換え体のバイオエチレン生産効率はガスクロマトグラフィー(GC)で解析した。

#### シアノバクテリアの CO<sub>2</sub> 固定化能およびエチレン生産能を定量

ルー氏培養瓶を密閉デシケーターに入れ、CO<sub>2</sub> 濃度を 15%にしてバブリング培養した。以降、密閉デシケーター内のガスは GC-TCD を用いて CO<sub>2</sub> 濃度を測定した。バイアル瓶に、培養液とアスコルビン酸溶液を入れて CO<sub>2</sub> の吹き込みを行った後密閉し、攪拌を繰り返して 27 時間条件において培養し、6 時間ごとに GC-FID でエチレンを測定した。

#### バイオエチレン連続生産プロセスの検討

菌体再利用の可否を検討するため、エチレン生成後の菌体を遠心分離で回収し、培地を交換後、バブリングによる回復培養を行った。得られた培養液を用いて再度エチレンを生成させ、初回の生成量と比較することで回復率を求めた。さらに回復培養終了時の濁度を吸光度計で測定した。

### 4. 研究成果

(1) 酵素複合体の酵素組成および酵素モル比の変更によるバイオエチレン生産の効率化を目的に新規キメラ骨格タンパク質 Cip4 の構築を行った。具体的には 1 ヶの 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)、1 ヶのメチルチオアデノシン(MTA)分解酵素(MTAN)および 2 ヶの ACC 酸化酵素(ACO)を保持する骨格タンパク質であるところの Cip4 を構築した(Fig. 1)。次にこれを保持する発現ベクターを用いて *Synechococcus elongatus* PCC7942 (R2-Pc 株)を形質転換させ、得られた組換え体を SOC4 株とし、バイオエチレン生産量をガスクロマトグラフィーで定量した。結果、既存の SOC2 株と比較して、2.4 倍高いバイオエチレン生産量増加を示し

た(Fig. 2)。また、ウェスタンブロッティング解析の結果、ポリシストロニック mRNA 中の Cip4 を含む各 ORF のタンパク質発現を観察した。よって、酵素の組成およびモル比変更によるバイオエチレン生産効率の上昇理論値を得た。

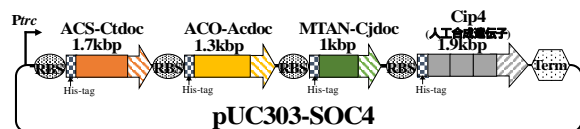


Fig. 1 Map of the plasmids used in this study. The Cip4 consists of three cohesins with different binding specificity, allowing the possibility of binding three different dockerin containing enzymes selectively.

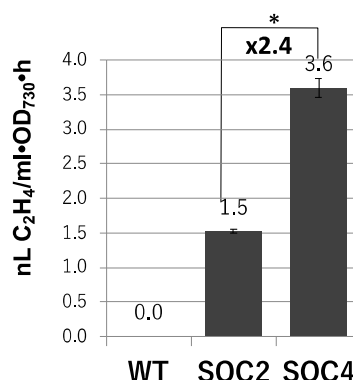


Fig. 2 The accumulation of ethylene in the headspace of closed cultures of *S. elongatus* PCC7942 strains SOC2 and SOC4. Ethylene production values are expressed as the mean and standard deviation obtained from 3 independent experiments. Pairs of bars marked with an asterisk were significantly different at a P-value less than 0.05.

(2) バイオエチレン合成反応によって、宿主細菌から供給される基質 S-アデノシルメチオニン (SAM) が不足すると考えられる。そこで、細胞内 SAM 供給量を増やすため、*E. coli* 由来 SAM 合成酵素遺伝子を *Clostridium thermocellum* typeII 由来のドックリンと遺伝子工学的に連結し SAM-Doc を新規に構築した。

(3) 単位時間当たりのバイオエチレン生産量増加を目的に、菌体再利用による単位培養液あたりの細菌密度を高めたバイオエチレン連続生産プロセスの検討を行った。具体的には、6~24 時間のエチレン生成後の菌体を回収し、6~24 時間のバブリング培養による回復培養後、再度エチレンを生成させ、その生産量を GC で分析した。結果、最適なエチレン連続生成プロセスは、12 時間のエチレン生成と 24 時間の回復培養のサイクルであり、かつ、その上限は 7 サイクルであることを明らかにした(Fig. 3)。また、上限回数を制限する要因として、都度の回復培養により菌密度が 1.1 倍ずつ増加し、これがエチレン生産量の低下に影響したと考えられる。すなわち、培養液の希釈によるシアノバクテリア濁度の低減によって、再度、連続生産プロセスに供することが可能であることが示唆された。

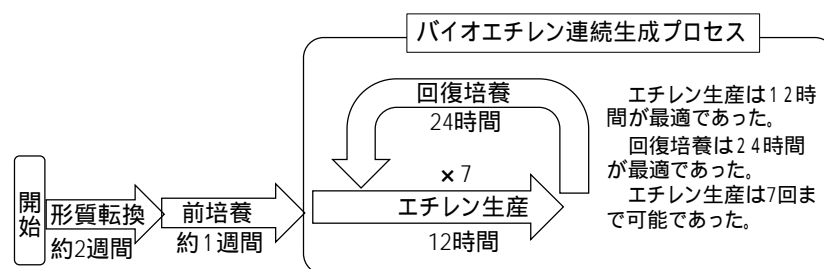


Fig. 3 本研究で確立したエチレン連続生成プロセス

(4) エチレン合成に関わる 2 段階の連続反応のうち、ACO の Vmax 値は ACS の約 270 分の 1 の値をもつ。すなわち、ACO は律速段階であり、かつ、その発現量は少ない。以上の課題に対して、タンパク質を高生産させる 10 アミノ酸程度のタグ配列を SOC2 株の ACO-Acdoc の N および C 末端に付加した SOC2-タグ株を構築することで ACO の高発現を試みた。結果、バイオエチレン生産活性が SOC2 株の 2.4 倍増大し、既存の生産株を超える生産能を獲得した。また、同様に、タンパク質高生産タグを付加した ACO をもつ SOC4-タグ株を構築し、これを保持するシアノバクテリアのバイオエチレン生産効率を GC で定量した結果、SOC4 株より 1.4 倍高い値を得た。すなわち、SOC4-タグ株は SOC2-タグ株よりタンパク質高生産タグの効果が低かった。また、SOC4-タグ株の培養過程において、その細胞増殖速度が SOC4 株より遅かった。以上から、シアノバクテリアの代謝経路に何らかの阻害要因の存在が示唆された。

(5) シアノバクテリアの CO<sub>2</sub> 固定化能およびエチレン生産能を定量し、CO<sub>2</sub> からエチレンへの物質変換効率を算出することを目的に、エチレン生産株の CO<sub>2</sub> 固定化能を野生株と比較した。結果、単位濁度あたりの 1 日の平均 CO<sub>2</sub> 吸収能を算出すると、SOC2 株の方が野生株より 1.3 倍高い CO<sub>2</sub> 吸収能を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakai K, Matsuzaki F, Wise L, Sakai Y, Jindou S, Ichinose H, Takaya N, Kato M, Wariishi H, Shimizu M	4. 巻 84
2. 論文標題 Biochemical Characterization of CYP505D6, a Self-Sufficient Cytochrome P450 from the White-Rot Fungus <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01091-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.01091-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Israeli-Ruimy V, Bule P, Jindou S, Dassa B, Moras S, Borovok I, Barak Y, Slutzki M, Hamberg Y, Cardoso V, Alves VD, Najmudin S, White BA, Flint HJ, Gilbert HJ, Lamed R, Fontes CM, Bayer EA.	4. 巻 10
2. 論文標題 Complexity of the Ruminococcus flavefaciens FD-1 cellulosome reflects an expansion of family-related protein-protein interactions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep42355.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神藤定生、内山友香、細田晃文、田村廣人
2. 発表標題 1Fp08 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良
3. 学会等名 日本生物工学会2018年大会(大阪)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神藤定生、中尾領亜、細田晃文、田村廣人
2. 発表標題 2p-148 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良
3. 学会等名 日本生物工学会2017年大会（東京）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神藤定生、内山友香、細田晃文、田村廣人
2. 発表標題 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会（名古屋）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神藤 定生、榊原 絢美、森澤 佑太、松井 健史、小池 和好、勝又 聡、細田 晃文、田村 廣人
2. 発表標題 タンパク質高生産タグを組み込んだエチレン生成シアノバクテリアの改良
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 高機能酵素複合体の高生産技術	発明者 神藤 定生、松井 健史、小池 和好、勝又 聡	権利者 名城大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-182357	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

遺伝子組換えシアノバクテリアによる二酸化炭素からのエチレン生成 <a href="http://www-agr.meijo-u.ac.jp/labs/nn020/research05.html">http://www-agr.meijo-u.ac.jp/labs/nn020/research05.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考