

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05557

研究課題名(和文) 海洋性ラン藻における人工転写調節システムの開発とイソプレノイド生産への応用

研究課題名(英文) Development of artificial transcriptional regulation system in marine cyanobacteria and its application to isoprenoid production

研究代表者

蓮沼 誠久 (Hasunuma, Tomohisa)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：20529606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：増殖が速く、細胞の高密度化が可能で、耐塩性を有する海洋性ラン藻 *Synechococcus* 7002 を基本株として、物質生産のための代謝工学ツールを開発するとともに、オミクス技術を活用して宿主生産系の評価を行い、物質生産への応用を試みた。ツールとしてはプロモーター5種類、遺伝子導入のためのニュートラルサイト7箇所、転写因子3種類を揃え、Astaxanthinの含有率12mg/g、生産11 mg/L/d(世界最高値)を達成した。動的メタボローム解析を行ったところ、中央代謝フラックスの亢進を観測し、カロテノイド代謝変化が中央代謝と密接に関係していることを初めて明らかにした。有機酸生産にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed metabolic engineering tools for substance production in oceanic cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 which is fast growing, capable of cell densification and salt tolerance, as a basic strain. The host production system using omics technology was evaluated to be applied to the substance production. Five types of promoter, seven neutral sites for gene introduction, and three transcription factors were aligned to achieve Astaxanthin content of 12 mg/g and productivity of 11 mg/L/d. Dynamic metabolome analysis revealed for the first time that carotene metabolism alteration is closely related to central metabolism by observing enhancement of central metabolic flux. It also succeeded in organic acid production.

研究分野：代謝工学

キーワード：ラン藻 アスタキサンチン カロテノイド メタボローム解析 代謝工学

## 1. 研究開始当初の背景

CO<sub>2</sub>排出抑制による炭素循環の定常化、持続可能なエネルギー供給を実現するため、バイオマスの有効利用に期待がかけられている。特に、食糧や農耕地との競合が無く、通年の収穫が可能な藻類系バイオマスを利用できれば理想的である。さらに海洋性藻類を利用すれば、淡水の供給も不要になり、高塩濃度の培養環境は雑菌によるコンタミネーションのリスクを低減できる。

近年、遺伝子組換えにより、ラン藻(シアノバクテリア)に液体燃料や汎用化学品(エタノールやイソプレンアルデヒド、イソプレンなど)を生産させる代謝工学的研究が積極的に進められている。CO<sub>2</sub>を直接、有用物質に変換できる藻類プロセスは、出発原料として糖質の供給を要求する従来型の微生物醗酵プロセスと違い、究極の細胞工場(生体触媒)プロセスといえる。

しかしながら、現在の藻類細胞工場プロセスには以下の課題があり、実用化には至っていない。

- 増殖に伴う自己遮蔽効果で光エネルギーの吸収が困難となり、細胞密度が上がらない
- 急激な光照度変化や温度変化、高塩濃度などのストレスに弱く屋外培養に適さない
- 遺伝子発現量を制御できる遺伝子工学ツールが整備されておらず、目的物質の収率が低い
- 従来、生理・生化学的な研究の対象であり、物質生産の宿主として十分に開発されていない

葉緑体の起源と考えられるラン藻類は光合成等の生理・生化学的研究によく用いられ、*Synechocystis* sp. PCC 6803 や *Synechococcus* sp. PCC 7942 等のモデル株は相同組換えによる遺伝子導入が可能であるが、モデル株の有用物質生産性は、酵母や大腸菌等と比べて著しく低く、生産性を向上させるための研究はほとんど進んでいないのが現状である。

近年、遺伝子工学技術の進んだ大腸菌や酵母等では、ランダム変異やラショナルデザインによる人工プロモーターの開発や、global transcriptional machinery engineering (gTME) による転写因子の改変が加速的に進められている (Curran et al. Nat Commun, 2014, 5:4002)。Alper らは TATA 結合タンパク質 (SPT15) の改良で酵母のエタノール耐性の向上に成功している (Alper et al. Science, 2006, 314:1565-8)。一方、ラン藻では工学的な研究開発は進んでおらず、物質生産に資する転写機構の開発例は無い。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでの研究で、海洋性ラン藻

*Synechococcus* sp. PCC 7002 (以後、*Synechococcus* 7002 と称する) が光独立栄養での高密度培養に適していることを見出してきた。例えば、高照度下での生育が可能で細胞密度は 9 g-乾燥重量/L に達し、海水レベルの塩濃度で最も高い増殖を示した。また、*Synechococcus* 7002 の遺伝子工学ツールは十分に整備されていなかったため、相同組換えに必要な遺伝子導入領域(ニュートラルサイト; NTS) の探索やプロモーターの検討を行い、多重遺伝子導入用ベクターを開発した。

そこで本研究では、高密度培養が可能でストレス耐性を有する *Synechococcus* 7002 を基本株として、遺伝子発現を自在に制御できる遺伝子工学ツールの開発と宿主の改良を行うこととした。

また、既に海洋性細菌より単離した CrtZ (-カロテンヒドロキシラーゼ) および CrtW (-カロテンケトラゼ) 遺伝子を *rbc* プロモーター下流に連結し、*Synechococcus* 7002 で発現させることにより、アスタキサンチンを生産させることに成功してきた。*Synechococcus* 7002 は本来、アスタキサンチンのような赤色色素を生産することは無いため、改良型の人工プロモーターを開発すれば、藻体の吸光スペクトルを測定することでプロモーター活性を簡単に評価することができると思われる。

本研究では、*rbc* や *psbA2* 等、主要遺伝子のプロモーターに配列改変を施すことにより人工プロモーターを開発し、アスタキサンチン生産系による評価を行うこととする。また本研究では、転写因子の導入にも取り組む。これまでの研究で、因子やレスポンスレギュレーターの過剰発現は、糖異化や有機酸・アミノ酸代謝系をシステムティックに変化させることが分かったため、さらに転写因子を改良し物質生産に適した宿主の開発を行う。人工転写因子により変化した代謝系は、申請者が開発してきたメタボロミクス技術や動的代謝プロファイリング技術等により解析し、包括的に評価する。

アスタキサンチンは市場価値が高く、医療・食品分野における有用物質であるため、モデル化合物として生産性の向上を目指す。さらに本研究ではイソプレンやファルネセンなど他のイソプレノイド類についても生産試験を行い、本研究で開発する人工転写調節系の汎用性を評価する。

## 3. 研究の方法

(1) *Synechococcus* 7002 でのアスタキサンチン生産

緑色蛍光タンパク質をレポーターとしてプロモーター活性の比較を行ったところ、活性の強度が *psbA2*, *petE*, *rbc*, *trc* の順であった。これらプロモーターの下流に海洋性細菌 *Brevundimonas* sp. 由来の CrtZ 遺伝子、CrtW 遺伝子を順に連結した DNA 断片をオペロンとして構築した。これを、*Synechococcus* 7002

の NTS に相同組換えにより導入し、カナマイシン耐性に基づく選抜を行った。得られた形質転換体でアスタキサンチンの生産が確認された。対象として、CrtZ および CrtW 遺伝子を含まず、カナマイシン耐性遺伝子カセットを有する DNA 断片を同じ NTS に導入した組換え株 (CT) を構築した。作出した組換え株は 100 mg/L カナマイシンを含む Medium A 培地にて、CO<sub>2</sub> 濃度制御下、光独立栄養条件で培養した。

## (2) プロモーターの検討と転写因子の導入による代謝改変

4 種類のプロモーター (*psbA2* プロモーター、*petE* プロモーター、*rbc* プロモーター、*trc* プロモーター) を用意して CrtZ/CrtW 遺伝子の上流に連結し、7 箇所の NTS (内生のプラスミド pAQ1 内に 4 領域、*acsA* 領域、*glpK* 領域) のどこかに相同組換えにより遺伝子導入した。また、3 種類の転写因子 (*Synechococcus* sp. PCC 7002 由来 SigE および SigC、*Synechocystis* sp. PCC 6803 由来 SigE) を挿入し、アスタキサンチン生合成遺伝子との共発現を行った。得られた組換え体のアスタキサンチン含有率とカロテノイド組成を調べた。

## (3) *Synechococcus* 7002 におけるアスタキサンチン生産が代謝メカニズムに与える影響の評価

組換え体から抽出した RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行った。また、細胞内代謝物を抽出し、*Synechococcus* 7002 に含まれる水溶性代謝産物の量を測定するメタボローム解析を行った。分析はキャピラリー電気泳動・質量分析系 (CE-MS) を用いて行った。さらに、安定同位体炭素を含む <sup>13</sup>C<sub>2</sub> を用いた *in vivo* ラベリングを行い、一定時間標識を行った細胞から抽出した水溶性代謝産物の同位体存在比を経時的に調べることで、水溶性代謝産物のターンオーバーを網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

作出した組換え *Synechococcus* を用いてゲノム PCR を行い、導入した遺伝子によるセグリゲーションが完了していることを確認した。組換え体から脂溶性成分を抽出し、HPLC-PDA (Abs<sub>450</sub>) に供して色素分析を行ったところ、アスタキサンチンの生産が確認された。中でも、*psbA2* プロモーター下流に連結し、pAQ1 に挿入した時に最も高いアスタキサンチン含有率を示すことが明らかとなった。

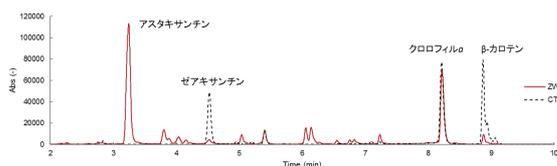


図1 ZW 株 (赤実線) および CT 株 (黒破線) から抽出した脂溶性画分を HPLC-PDA に供した際に得られたクロマトグラフ。

この株を ZW 株と命名し、以後の詳細な解析に供することとした。ZW 株では、ゼアキサンチンやカロテンの存在量が極端に減少し、カロテノイドの中ではアスタキサンチンが最も蓄積していた (図1)。ZW 株は深い緑色を呈しており、見た目上もの変化も見られた (図2)。

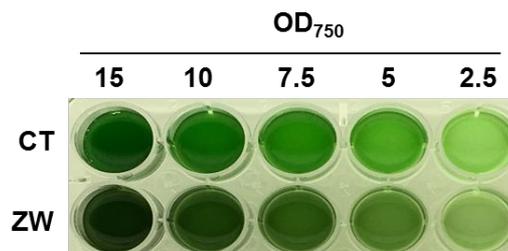


図2 各 OD における ZW 株と CT 株

CrtZ/CrtW 遺伝子を *rbc* プロモーター下流に連結した構築では、アスタキサンチン含有率が ZW 株の半分に低下し、ゼアキサンチンやカロテンの含有率は CT 株の 40% であった。したがって、*Synechococcus* 7002 が元々蓄積するカロテノイドとアスタキサンチンの生産はトレードオフの関係にあることが明らかになった。

次に、培養条件がアスタキサンチンの生産に及ぼす影響を調べた。具体的には光強度、CO<sub>2</sub> 濃度、窒素源 (NaNO<sub>3</sub>) 濃度、培養温度をパラメーターとして、ZW 株を用いて、培養条件がアスタキサンチンの生産性に及ぼす影響を調べた。光強度は 400 μmol photons/m<sup>2</sup>/s までアスタキサンチン含有率と正の相関を示し、これ以上高くすると導入した遺伝子の欠落が起こりやすいことが明らかとなった。この光環境下では 4% (v/v) CO<sub>2</sub> 条件でアスタキサンチン生産性が最も高く、窒素源として 4.25 g/L NaNO<sub>3</sub>、温度 30 で培養を行うこととした。その結果、アスタキサンチン含有率は 12 mg/g-DCW に達し、含有率と単位時間当たりの細胞密度変化で得られるアスタキサンチン生産性は 11 mg/L/d であった。この値は、アスタキサンチン生産藻として既に実用化されている *Haematococcus pluvialis* で報告されている生産性よりも高い。

光合成活性を酸素発生速度で調べたところ、ZW 株では 11% 程度傾向が見られたものの、CT 株との間に統計的に有意差は無かった。また、96 h の培養期間において細胞密度の違いは見られなかった。電子顕微鏡を用いて形態観察を行ったところ、ZW 株は長軸が伸びて細胞が肥大化し、野生株に見られたグリコーゲン顆粒が減少している傾向が見られた (図3)。

興味深いことに総カロテノイド含有率が CT 株と比べて 3.3 倍（培養 96 h 後）に増加していることが明らかになったため、CrtZ/CrtW 遺伝子の発現が中央代謝経路に及ぼす影響を調べることにした。

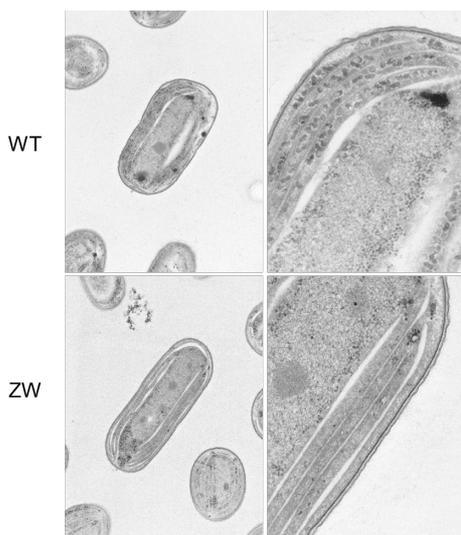


図3 培養開始 72 h 後の透過型電子顕微鏡像

メタボローム解析を行ったところ、ZW 株では 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) やホスホエノールピルビン酸 (PEP) が多く蓄積していることが分かり、カロテノイド前駆体の供給能力が上がっている可能性を示唆する結果が得られた。ラン藻においてカロテノイドは、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸が縮合して形成するデオキシキシルロースリン酸 (DXP) から、MEP 経路を経て生合成される。興味深いことに ZW 株では DXP ならびに MEP 経路中間代謝物の MEcPP および HMBPP が高蓄積していることが分かり、カロテノイド前駆体の供給能力が上がっていることを支持する結果が得られた。

この仮説を確かめるために、 $^{13}\text{C}_2$  を用いた *in vivo* ラベリングを行った。光独立栄養条件下で生育中の細胞を回収して安定同位体炭酸ガスを含む培地に移し、30 分間の培養の過程で経時的にサンプリングを行い、CE-MS を用いて細胞内代謝物の同位体標識率を調べた。その結果、3-PGA や PEP だけでなく、カルビン回路の代謝物であるフルクトース 6-リン酸やフルクトースビスリン酸において、 $^{13}\text{C}$  の取込み速度が上がっていることが明らかになった。この結果は中央代謝経路のターンオーバー速度が速くなっていることを示唆している。

次に、トランスクリプトーム解析を行ったところ、MEP 経路に関連する DXP シンターゼと DXP レダクトイソメラーゼをコードする遺伝子の発現量が増加していることが明らかとなった。

これらの結果から、アスタキサンチンを高生産する ZW 株では中央代謝フラックスが

亢進していることが強く示唆された。本研究は、カロテノイド代謝改変が中央代謝と密接に関係していることを世界で初めて明らかにした (2018 年 8 月論文投稿予定)。

ZW 株に対して、転写因子の共発現を行った *Synechocystis* sp. PCC6803 由来 SigE を導入した組換え株においては、カンタキサンチンを 48%蓄積していることが明らかになった (図 4)。

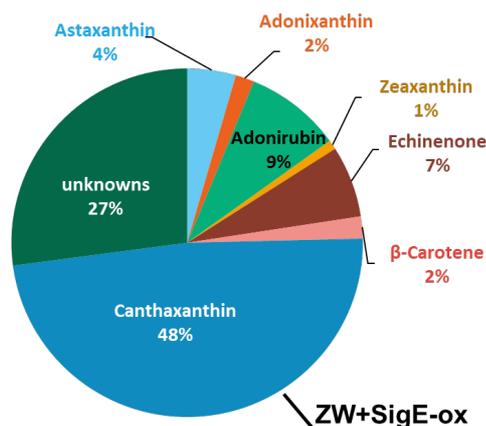


図4 異種ラン藻由来 SigE 過剰発現株におけるカロテノイド組成

興味深いことに希少カロテノイドであり、かつアスタキサンチンよりも市場価値が高いと言われているアドニルピンを 9%蓄積していることが分かった。アスタキサンチンの含有率は 4%に低下していた。加えて、未同定のカロテノイドを蓄積していた。因子の導入は新規カロテノイドを生産できる可能性を秘めており、ZW 株にどのような代謝改変が起きたのか、さらなる研究が必要である。

本研究は、増殖が速く、細胞の高密度化ができ、耐塩性を有する海洋性ラン藻 *Synechococcus* 7002 をプラットフォーム株として代謝工学を行うことで、高機能性カロテノイドであるアスタキサンチンを世界最高レベルで生産することに成功するとともに、オミクス技術を活用してラン藻宿主生産系の評価を行い、新規のメカニズムを提唱することができた。加えて、代謝改変に有用な遺伝子工学ツールを得ることで、ラン藻物質生産のさらなる向上への貢献が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Hasunuma T, Matsuda M, Kato Y, Vavricka CJ, Kondo A. Temperature enhanced succinate production concurrent with increased central metabolism turnover in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabolic Engineering*. 査読有 in

press (2018)  
doi: 10.1016/j.jymben.2018.05.013.

Nambu-Nishida Y, Sakihama Y, Ishii J, Hasunuma T, Kondo A. Selection of yeast *Saccharomyces cerevisiae* promoters available for xylose cultivation and fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 査読有 (2018) 125(3):306-310.  
doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.09.013.

蓮沼 誠久、バイオリファイナリー実現を加速する先端バイオ技術と情報技術の融合、アグリバイオ、査読有、1巻、2017年、pp.24-29

加藤 悠一、蓮沼 誠久、微細藻類を利用したバイオ燃料とカロテノイド類の生産、レーザー研究、査読有、11巻、2016年、pp.731-734.

蓮沼 誠久、代謝プロファイリング法の微生物育種技術への応用、Journal of Environmental Biotechnology、16巻、2016年、pp.51-58.

〔学会発表〕(計9件)

Takaki A, Hasunuma T, Enhancement in central metabolism and carotenoid biosynthesis by photosynthetic astaxanthin production in the recombinant marine cyanobacterium, 18th International Symposium on Carotenoid (2018)

蓮沼 誠久、代謝工学的手法による海洋性ラン藻でのアスタキサンチン生産、第31回 カロテノイド研究談話会、2017年

高木 綾子、蓮沼 誠久、近藤 昭彦、アスタキサンチン生産能を付与した高増殖性ラン藻のトランスクリプトミクスおよび動的メタボロミクス、第69回 日本生物工学会大会、2017年

Hasunuma T, Development of dynamic metabolic profiling and its application to fuel and chemical production in algae, The 9th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology (APCAB 2016) (招待講演)

高木 綾湖、蓮沼 誠久、近藤 昭彦、海洋性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 を用いたアスタキサンチン生産技術の開発、生物工学会若手会、2016年

高木 綾湖、蓮沼 誠久、近藤 昭彦、代謝工学によるアスタキサンチン産生海洋性ラン藻の開発と代謝メカニズムの解明、日本農芸化学会大会、2017年

蓮沼 誠久、藻類を利用したバイオエタノール、バイオベース化学品生産、平成27年度 新資源生物変換研究会シンポジウム(招待講演)、2016年

蓮沼 誠久、藻類を利用した燃料・化学品生産技術の開発、レーザー学会(招待講演)、2016年

蓮沼 誠久、動的代謝プロファイリング技術の開発とバイオリファイナリーへの展開、第340回 細胞工学研究会(招待講演)、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ  
[http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/research\\_inv.html](http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/research_inv.html)

【微細藻類・シアノバクテリアを利用した有用物質生産】ラン藻を利用した有用物質生産の意義について紹介している。

受賞

高木 綾子、日本生物工学会若手会夏のセミナー・企業家マインド養成バイオリダーズ研修にてベストバイオリダーズ賞(金賞)、2016年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓮沼 誠久 (HASUNUMA, Tomohisa)  
神戸大学・大学院科学技術イノベーション研究科・教授  
研究者番号: 20529606

(2) 研究協力者

Robert Sidney Cox  
神戸大学・大学院工学研究科・特命助教