

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02011

研究課題名(和文) 藻類バイオマスから化成品を生産する一貫バイオプロセスの構築

研究課題名(英文) Development of consolidated bioprocessing of macroalgae biomass to produce bioproducts

研究代表者

渥美 正太 (Atsumi, Shota)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：00712275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未利用海洋バイオマス資源から、バイオ化製品生産を生産する技術の確立を目指し、モデル大腸菌に代謝工学的手法により、褐藻バイオマスに含まれるアルギン酸成分から1,4-butanediolの生産能力を付与することを目的とした。研究成果として、DEHUを単一炭素源とした最少液体培地において組換え大腸菌の生育が確認出来たことから、DEHUの細胞内代謝経路への取り込みが出来たと考えた。一方で、DEHUから目的生産物質である1,4-butanediolへの効率的な生産には至っておらず、さらなる研究実施が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、褐藻主要成分であるアルギン酸の加水分解産物であるDEHUの有効利用についての報告は限定されており、本研究結果により、DEHUの化成品原料と成る1,4-butanediol合成への道筋を示すことが出来たと考える。また、DEHUの大腸菌細胞内における代謝経路についてもデザインした経路が機能していることが確認できたため、海洋バイオマス資源から化成品材料を生産するための種々の学術的知見が得られた。今後は、本経路の効率化によってより実践可能な褐藻バイオマスから1,4-Butanediol生産技術の向上を目指す。

研究成果の概要(英文)：We had attempted to convert a 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEHU) from alginate hydrolysates into 1,4-butanediol for the value-added chemicals production using engineered *Escherichia coli*, where the metabolic engineering approach was used for installing several gene cassettes. We observed the growth of the engineered *E. coli* strains in the presence of DEHU as a sole carbon source in the minimum medium, suggesting that these strains intake DEHU molecules through an added membrane transporter and metabolize it as carbon sources. However, to date, the efficiency of DEHU to 1,4-butanediol conversion by these strains is limited. Hence, further research needs to be done to achieve a more robust 1,4-butanediol production.

研究分野：合成生物学

キーワード：褐藻バイオマス アルギン酸 代謝工学 1,4-butanediol合成

1. 研究開始当初の背景

有用化成品のバイオ生産技術の確立には、標的とする化合物の合成に適した代謝経路を有する微生物が必要となる。これらの微生物は、自然環境サンプルからの単離、あるいは育種によって獲得されてきたが、多くの時間と労力を要する事が問題であった。しかし、代謝経路や酵素情報の蓄積、および遺伝子工学やゲノム編集技術の向上等から、代謝経路を設計し、大腸菌や酵母など扱いやすい微生物へ導入することによって所望の生産株を構築することが可能になってきた。また、陸域植物バイオマスからの有用物質の生産においては、高分子多糖やオリゴ糖から微生物の代謝可能糖であるグルコース等にまでホストの細胞外で分解するプロセスが必要になり、代表者はこれまでに植物バイオマス由来の糖成分の分解酵素である α -グルコシダーゼを細胞外に分泌させると共に、代謝経路改変を行った大腸菌を作成することで、糖成分から isobutanol を一気通貫生産することに成功していた (Atsumi et al. *Nature* 2008, Desai et al. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014)。

近年注目されている褐藻バイオマスは主にアルギン酸とラミナリン(グルカン+マンニトール)といった高分子から構成される (Fig. 1)。これら成分の分解には、それぞれ、アルギン酸リアーゼおよびラミナリナーゼが同定されている (Bianchetti, et al. *J Biol Chem* 2015; CAZyme database)。

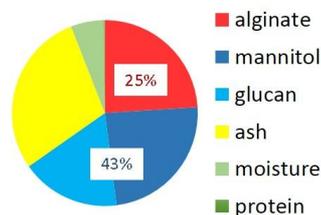


Fig. 1 褐藻の成分構成

したがって、褐藻バイオマス分解と、これまで申請者が行ってきた代謝経路を改変することで有用物質生産を行う大腸菌と組み合わせることで、褐藻バイオマスから化合物を生産する一気通貫バイオプロセスを構築することができる考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、褐藻中のラミナリンおよびアルギン酸を分解する酵素について検討し、分解によって生じる生成物を出発原料とし、代謝改変した大腸菌によって、高効率に有用物質を生産する技術の確立を目的とした。褐藻バイオマスから化合物を生産する一気通貫バイオプロセスを構築することで、海洋バイオマス利用への新たな筋道を与えることを目的とした。

3. 研究の方法

Fig.1 で示した通り、褐藻バイオマスは主にアルギン酸とラミナリン(グルカン+マンニトール)から構成される (Fig. 1)。これら成分の分解には、それぞれ、アルギン酸リアーゼおよびラミナリナーゼが同定されている。しかしながら、本バイオマスの酵素分解については、長年精力的に研究開発が行われてきたセルロース等の植物バイオマスの酵素分解に比べ、情報が限られているため、より高効率に酵素分解するための条件を検討する必要がある。ラミナリンはラミナリナーゼによってグルコースにまで分解されることが確認されているため、分担者が報告しているエキソ型ラミナリナーゼを使用する

(Bianchetti, et al. *J Biol Chem* 2015)。これについては大腸菌でタンパク質発現することを既に確認している。一方、アルギン酸はエクソ型およびエンド型アルギン酸リアーゼによって、4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEHU) モノマーに分解される。エンド型アルギン酸リアーゼについては研究分担者が最近高活性の酵素をほうこくしている (Takasuka et al. *ChemBioChem* 2023)。そこで、本研究ではまず、エキソ型アルギン酸分解酵素について検討を行なった。データベースを基に、エクソ型アルギン酸分解酵素を探索し、2種のアルギン酸リアーゼ遺伝子を合成し、大腸菌によるタンパク質発現に成功した。得られたアルギン酸リアーゼについて、アルギン酸の分解機能を明らかにした。

他方、褐藻バイオマスからの有用物質生産は、これまでラミナリン酵素加水分解産物に含まれるグルコースについては微生物利用によって様々な化合物の報告がある一方で、アルギン酸酵素加水分解産物である DEHU モノマーについては、化合物生産のための代謝工学的技術が確立されていない。そこで、研究代表者がこれまでに開発した 1,4-butanediol 生産用に代謝改変した大腸菌を利用することで、グルコースとともにアルギン酸酵素加水分解産物のモノマーである DEHU から 1,4-butanediol を生産することが可能になると考えた。

以上、細胞外分解と細胞内代謝工学を組み合わせることで、褐藻中のラミナリンおよびアルギン酸を分解する酵素によって生じるグルコースおよび DEHU を出発原料とし、代謝改変した大腸菌によって、高効率で 1,4-butanediol を生産し、褐藻バイオマスからの有用物質の一気通貫生産技術の確立を目指した。

4 . 研究成果

褐藻バイオマス主要成分アルギン酸から DEHU モノマーの生産

エクソ型アルギン酸分解酵素を探索し、2種のアルギン酸リアーゼ遺伝子を合成し、大腸菌によるタンパク質発現に成功した。アルギン酸から DEHU 生成の確認には、薄層クロマトグラフィーで分析した。研究分担者が最近報告したエンド型アルギン酸分解酵素 (E7A エンド型酵素) (Takasuka et al. *ChemBioChem* 2023) に、本研究で見出したエクソ型酵素 (ccPL17) を加え分解する事で、アルギン酸から DEHU が生成できた (Fig. 2)。また分解反応をスケールアップする事で、以降の実験を実施した。

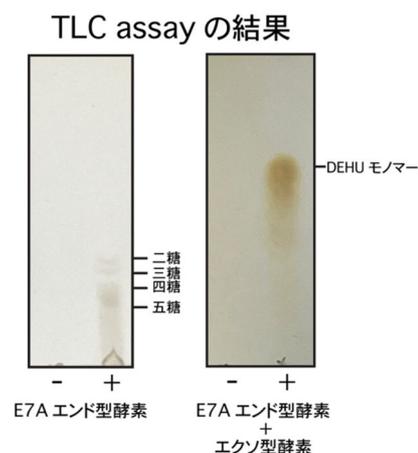


Fig. 2. 精製アルギン酸に E7A エンド型酵素およびエクソ型酵素を加える事で DEHU モノマーを生成した。

組換え大腸菌による DEHU からの 1,4-Butanediol 合成実験結果

DEHU 輸送タンパクについては、既報 (Wargacki et al. *Science* 2012) の遺伝子 (DEHU Transporter) を遺伝子合成し、これをプラスミド (*kan^R*) にクローニング後、大腸菌株 (*Δicd*) に形質転換した。この *icd* 欠損株は、2-ketoglutarate が生成されない為、グルコースのみを炭素源にした最小培地では増殖できない。しかし、本研究でデザインした経路に 2,5-dioxopentanonate を 2-ketoglutarate に変換する XylA を加えるとこの経路がアクティブだった場合、DEHU から 2-ketoglutarate が生成される為、この株は、グルコース

と DEHU を炭素源とする最小培地で生育できる。更に、この経路の活性が高いほど、増殖が速くなると予想された為、活性の高い酵素の同定に *icd* 欠損株の生育アッセイを用いた。DEHU から 2,5-dioxopentanoate への生成に大腸菌ゲノムにはない遺伝子を 4 つまで絞り込んだ。それら 4 遺伝子のうち 2 遺伝子について、それぞれ 4 種類と 5 種類の異なる配列を遺伝子合成で調整し、残りの 2 遺伝子については既報の遺伝子を用い、*icd* 欠損株に導入した。合計 20 種の組換え大腸菌株を作成し、DEHU とグルコースを炭素源とした生育アッセイにおいて 4 株で生育を確認した。そのうち、最も生育が良かった TT021 株に 2,5-dioxopentanoate を 1,4-butanediol に変換するのに必要な Kdc と Adh をコードする遺伝子を導入し、DEHU から 1,4-butanediol が合成される事を確認した (Fig. 3)

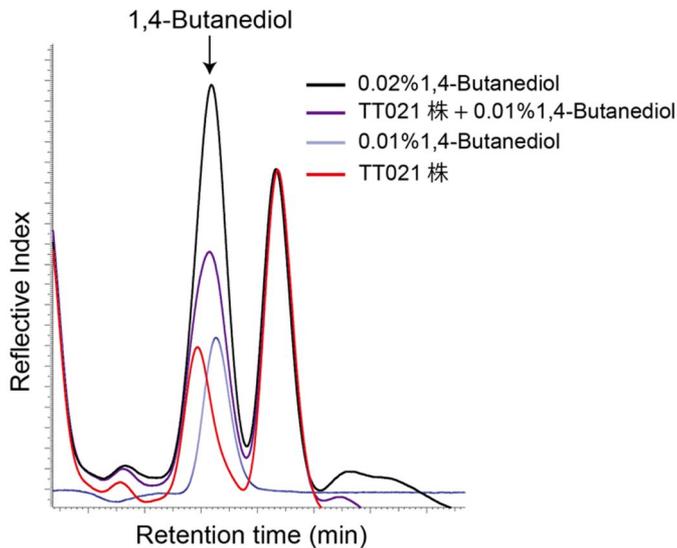


Fig. 3. 4 遺伝子を組み込んだプラスミド (*amp^R*) を保持する形質転換体 TT021 株について、DEHU を炭素源として生育後、1,4-Butanediol の合成を HPLC (RI 検出) で確認した。0.02% 1,4-Butanediol (黒線) 0.01% 1,4-Butanediol (青線) TT021 株サンプル (赤線) と TT021 株に 0.01% 1,4-Butanediol をスパイクした結果 (紫線) を示す。

本研究成果から、初めてアルギン酸酵素加水分解産物 DEHU を化成品材料である 1,4-Butanediol に変換することができた。今後は、本経路の効率化によってより実践可能な褐藻バイオマスから 1,4-Butanediol 生産技術の向上を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shota Atsumi
2. 発表標題 Biological Synthesis of Chemicals from CO2
3. 学会等名 3rd International Solar Fuels Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	堀 千明 (Hori Chiaki) (50722948)	北海道大学・地球環境科学研究所・准教授 (10101)	
研究分担者	高須賀 太一 (Takasuka Taichi) (70748409)	北海道大学・農学研究所・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------