

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05232

研究課題名(和文)新規Gas-to-Lipidsバイオプロセスの構築と最適化

研究課題名(英文)Construction and optimization of a novel Gas-to-Lipids bioprocess

研究代表者

秋 庸裕 (Aki, Tsunehiro)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・教授

研究者番号：80284165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CO₂から酢酸を生産する酢酸生成菌アセトバクテリウムと酢酸から有用油脂を生産する微生物オーランチオキトリウムを組み合わせた「Gas-to-Lipidsバイオプロセス」の効率化を図ることを目的とした。そのため、オーランチオキトリウムの酢酸代謝と脂質生産に関する基本特性をオミクス手法によって解析して育種標的を選定し、酢酸を基質とする油脂発酵の効率化に寄与する要因を明確化した。また、オーランチオキトリウムの遊走子の走化性について解析して、海洋生態系における物質循環の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「Gas-to-Lipidsバイオプロセス」は次世代火力発電施設や鉄鋼業などにおいて分離・回収される多量のCO₂をむしる資源として、多様な産業分野において有用となる油脂に高効率で変換してカーボンリサイクルを実現する有望なプロセスである。しかし、物質変換効率やかかるコストには依然として改善の余地があるため、更なる効率化に資する本研究の成果は持続的物質循環社会の実現をめざした実装開発に向けて非常に意義深いと言える。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to improve the efficiency of the Gas-to-Lipids bioprocess, which combines the Acetobacterium, which produces acetic acid from CO₂, and Aurantiochytrium, which produces useful lipids from acetic acid. To this end, we analyzed the basic characteristics of Aurantiochytrium regarding acetate metabolism and lipid production using omics methods to select breeding targets, and clarified the factors that contribute to the high efficiency of lipid fermentation using acetate as a substrate. In addition, we analyzed the chemotaxis of zoospores to clarify the role of this microorganism in the marine ecosystem and discussed material transformation in a complex culture system.

研究分野：生物学

キーワード：カーボンリサイクル 油脂発酵 オーランチオキトリウム

1. 研究開始当初の背景

オーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*) は菌類や藻類とは異なるストラメノパイル生物群ラビリンチュラ類の一属で、温帯～熱帯域の海洋に広く分布する従属栄養性の真核微生物である。高い生理機能を示すドコサヘキサエン酸 (DHA) を多量に蓄積することから、魚油に代わる供給源として注目されてきた。申請者らは、アスタキサンチンやスクアレンなどのイソプレノイド系炭化水素を生産する新種の発見や高生産変異株の単離、生合成酵素の構造機能解析、全ゲノム解析、形質転換法の開発などを通じて、本微生物をプラットフォームとする脂質生合成・生産研究を推進してきた。食品廃棄物や大型海藻など各種バイオマスを原料とした有用油脂生産系の研究で見いだしたオーランチオキトリウムの各種有機酸に対する高い資化性に着目した。特に顕著な資化性を示した酢酸は地球上で毎年 10^{12} kg が生産されると言われており、その主たる生産者であるホモ酢酸菌 (acetogen) が海洋土壤に分布することは、従来は不明であったオーランチオキトリウムの海洋生態系における栄養従属関係を示唆しており、それを模した複合培養系に発想が至った。

2. 研究の目的

食品廃棄物や大型海藻など各種バイオマスから有用油脂を生産するバイオリファイナリーシステムの研究で見出したオーランチオキトリウムの酢酸に対する高い資化性を基盤として、その主たる天然生産者であるホモ酢酸菌を組み合わせた複合培養系を構築する。このとき、オーランチオキトリウムの実生産利用で最大の懸念事項となるコスト高な炭素源をホモ酢酸菌から安価に供給できるならば、ホモ酢酸菌が資化しうる多様なバイオマスのみならず、世界的に削減が求められている CO_2 をも資源とする有用な油脂生産システムの構築が可能となる。そこで本研究では、当該システムの実用化に資する学術的基盤として、オーランチオキトリウムの酢酸代謝と脂質生産に関する基本特性、酢酸を基質とする油脂発酵の高効率化に寄与する要因、ホモ酢酸菌とオーランチオキトリウムの従属共生関係、の三点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

オーランチオキトリウムの酢酸代謝と脂質生産に関する基本特性を解明するため、まず、酢酸資化におけるオミクス解析によって育種ターゲット候補を絞り込んだ。また、油脂生合成系酵素や油脂蓄積を亢進する制御因子についても育種候補とした。次に、代謝系改変による油脂発酵の高効率化をめざして、油脂生合成系酵素の改変による新規経路の開発を試みた。このため、独自に確立した CRISPR-Cas9 系を適用して効率的に育種標的遺伝子を破壊し、その効果を評価した。さらに、ホモ酢酸菌とオーランチオキトリウムの従属共生関係を解析する手始めとして、オーランチオキトリウムの遊走子の走化性について解析した。遊走子の収集条件と方法をまず確立し、得られた遊走子を各種化合物に対する走化性試験に供した。

4 . 研究成果

オーランチオキトリウムにおける酢酸代謝と脂質生産に関する特性を細胞内代謝物および遺伝子発現のオミクス手法によって解析し、育種標的候補遺伝子を選別した。その結果、細胞内に取り込まれた酢酸は速やかにアセチル CoA に変換されて脂肪酸合成の基質となるが、糖質代謝で活性化するペントースリン酸経路が酢酸代謝では低調であることなどから、補酵素 NADPH の供給不足が推測された。また、脂肪酸分解に働く酵素系の活性化を促進する因子の亢進も認められ、育種標的となりうることが示された。

これらの知見をもとに、脂肪酸やカロテノイドの合成に対して特に効果が期待された標的遺伝子については、実際に CRISPR-Cas9 と gRNA からなる複合体を導入して破壊し、脂肪酸生産性への影響を調べた。その結果、各脂質の合成を阻害することが予測された因子については、それらの破壊によって確かに正の効果が認められた。ただし、グルコース以外の炭素源の代謝を統合的に制御する因子に関しては、むしろその遺伝子の破壊によって酢酸代謝が不活性化した。このことは、本因子が酢酸代謝において重要であることを示しており、逆に活性化することによって代謝亢進が期待できるため、今後の育種標的としては有力な因子であることが確かめられた。

以上のようにして定めた複数の育種標的を同時に改変するためのマーカーリサイクル法の確立に向けて、栄養要求性マーカーの候補を複数確保した。CRISPR-Cas9 システムの活用を念頭に、それらを利用した多重改変育種株の樹立を進めているところである。

さらに、遊走子の収集条件および方法を確立し、遊走子の各種化合物に対する走化性を調べたところ、数種のアミノ酸のほか、自然界に多く存在する化合物に対する走化性が認められ、そのような物質を介した物質循環について考察することができた。なかでも、陸上植物を構成するリグニンの構成要素に対して走化性を示したことは、真核微生物で初めての発見であるとともに、海洋生態系における炭素循環について深い示唆を与える成果であると言える。以上の研究成果はまた、今後、オーランチオキトリウムとホモ酢酸菌などの他の微生物との複合培養系をより効率化するための基礎的知見として活用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Horio, H. Takahashi, T. Kobori, K. Watanabe, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of gene reciprocity among lactic acid bacteria in yogurt by RNase H-assisted rolling circle amplification-fluorescence in situ hybridization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9061208	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 K. Watanabe, C.M.T. Perez, T. Kitahori, K. Hata, M. Aoi, H. Takahashi, T. Sakuma, Y. Okamura, Y. Nakashimada, T. Yamamoto, K. Matsuyama, S. Mayuzumi, T. Aki	4. 巻 131
2. 論文標題 Improvement of fatty acid productivity of thraustochytrid, <i>Aurantiochytrium</i> sp. by genome editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 373-380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.11.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 渡邊研志、秋 庸裕	4. 巻 98
2. 論文標題 オーランチオキトリウム属を活用したバイオリファイナリーによる有用脂質生産	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 472-476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Watanabe, M. Nishijima, S. Mayuzumi, T. Aki	4. 巻 71
2. 論文標題 Utilization of sugarcane bagasse as a substrate for lipid production by <i>Aurantiochytrium</i> sp.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Oleo Sci.	6. 最初と最後の頁 1493-1500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess22206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 秋 庸裕
2. 発表標題 Genomic breeding of oleaginous marine protist, <i>Aurantiochytrium</i> sp., for biorefinery processing
3. 学会等名 Lecture for students of the University of Santo Tomas (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋 庸裕
2. 発表標題 海洋油糧微生物オーランチオキトリウムのゲノム編集育種～油脂改質とバイオリファイナリー
3. 学会等名 JBA “未来へのバイオ技術” 勉強会：バイオ素材百花繚乱15～脂質と超小胞体のマジック (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Watanabe, M. Nishijima, S. Mayuzumi, T. Aki
2. 発表標題 Utilization of sugar cane bagasse as a substrate for fatty acid production by <i>Aurantiochytrium</i> sp.
3. 学会等名 2022 American Oil Chemists' Society Annual Meeting and Expo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Watanabe, G. Nakase, I. Uchiyama, M. Matsuura, K. Matsuyama, Y. Nakashimada, T. Aki
2. 発表標題 Composite biorefinery system and genome editing for carbon recycling
3. 学会等名 2nd World Congress on Oleo Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋 庸裕
2. 発表標題 カーボンリサイクルと有用脂質生産
3. 学会等名 第103回広島大学バイオマスイブニングセミナー・第108回広大ACEセミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Watanabe, G. Nakase, I. Uchiyama, M. Matsuura, K. Matsuyama, Y. Nakashimada, T. Aki
2. 発表標題 Microbial biorefinery and genome editing for carbon recycling
3. 学会等名 16th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 渡邊研志、秋 庸裕（分担）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 289
3. 書名 バイオエネルギー再燃	

1. 著者名 渡邊研志、秋 庸裕（分担）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 270
3. 書名 二酸化炭素利活用技術	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------