様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 ２５ 日現在

機関番号：３２６９２
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｈ０６００６・１９Ｋ２１１４７

研究課題名（和文）緑藻を利用した二酸化炭素から有用物質への直接的生産プラットフォームの構築

研究課題名（英文）Construction of a useful compound-producing platform directly from CO2 via green algae

研究代表者
中西　昭仁（NAKANISHI, Akihito）

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：６０６４０９７７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：グリセロール高生産株の創生のため、出芽酵母由来GPPを導入した発現ベクターpChlamy_4-GPPを構築した。NEPA-Geneを用いた形質転換系を設定、形質転換体を構築した。また高速液体クロマトグラフィーを用いたグリセロール定量評価系を立ち上げた。グリセロール生産評価に課題があり効率化を進めている。培養系では、クラミドモナス用の光培養系を6 Lにスケールアップした後、培養条件の最適化を図り、安定した培養を実証した。酵母のグリセロール資化性株の創出に関して、出芽酵母の選択培養後グリセロール資化性酵母no. 7株を取得した。ガスクロマトグラフィーを用いたエタノール生産評価系の構築も完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
クラミドモナスの形質転換体の構築に関し、既存の形質転換法では形質転換体が得られなかったため、NEPA-Geneを用いた形質転換系の最適化を図った。また出芽酵母由来のグリセロール資化性酵母を単離した。共培養系だけではなく、今後グリセロール資化性酵母の培養条件を最適化するとともに資化性能を向上させ、産業副産物として生産されるグリセロールの使用用途を拡充できる可能性がある。またこの度実験系として考案し研究を進めた緑藻-グリセロール資化性酵母の共培養系は、以後のCO2から直接的に物質生産できる可能性を有するという点で有意義であったと考えた。

研究成果の概要（英文）：Metabolic modification of C. reinhardtii was tried to construct glycerol-producing green algal strain. After creation of pChlamy_4-GPP with expression vector pChlamy_4 and S. cerevisiae GPP, C. reinhardtii/pChlamy_4-GPP was constructed by using transformation system with NEPA-Gene to enhance the transformation efficiency. To evaluate glycerol production, its evaluating system with HPLC was set up, and the extraction process of glycerol from C. reinhardtii is also being improved. Aspect of culturing system, after scaling up photo bioreactor for C. reinhardtii to 3 L, stable culturing was demonstrated with culture optimization. Regarding glycerol assimilating yeast, no. 7 strain was selected from S. cerevisiae cultured in medium including glycerol as a sole carbon source. The ethanol evaluating system was also constructed with GC.

研究分野：農芸化学

キーワード：クラミドモナス形質転換体の創出　クラミドモナスの効率的な光培養系の構築　クラミドモナス用の形質転換系の新規構築　グリセロール資化性酵母の単離　各種分析機器を用いた代謝物評価系の構築の完了

※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。

１．研究開始当初の背景

微生物による物質生産において常に問題となるのは、有用物質生産のための循環型資源の効率的な使用である。現在までに酵母の細胞表層工学をはじめ効率的な糖化系の構築が進められているが、微生物にとって利用しやすい炭素源代謝物をわざわざセルロースやデンプンのような高分子に変え、またそれら高分子からグルコースのような低分子に変えることは、大局的に見れば非常に無駄の多い工程である。そこで、独立栄養生物がつくる中間代謝物を物質生産性の高い従属栄養生物が効率よく利用できれば、二酸化炭素から直接的な物質生産を実施でき究極的な循環型資源の活用法となると考えた。

研究代表者は各培養条件における緑藻の代謝フローを ^{13}C 代謝フラックス解析で評価してきた。その際、培養条件によって緑藻の炭素源代謝フローを制御できることと、利用価値の高い糖の中間代謝産物を生産する特定の代謝フローを増強できることを明らかにした。しかし代謝フローではなく代謝物の利用に注目するとき、利用価値の高い糖の中間代謝物はリン酸化修飾を受け細胞内に滞留するため直接的な利用は困難である。リン酸化した中間代謝産物を利用するには細胞を破砕する必要があり、当然緑藻を死滅させることになるから、手間がかかる上に継続的な利用に難点がある。また、中間代謝産物は中間の代謝物である性質上プール量が非常に少なく、例えば培養環境を整えると比較的細胞内のプール量が多くなる glycerol 3-phosphate でも 170 μg·g-DCW^{-1} 程度に留まり、非常に少ない難点もある。これら難点の解決のため、代謝物そのものではなく代謝フローを利用し、従属栄養微生物が資化しやすい炭素源代謝物を生産しやすくし適切に脱リン酸化させ細胞外に流出させれば、それら炭素源を資化できる物質生産微生物の直接・継続的な有用物質の生産が可能ではないかと考えた。

そこで本研究では、グリセロール高生産緑藻株によって中間代謝産物としてグリセロールを生産させたのち、グリセロールを物質生産株に共有させるという、二酸化炭素からの直接的な共培養系プラットフォームを提唱した。また、本研究室は立ち上げの初年度であり、微生物の培養系はもとより、ガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーといった分析機器が未整備であった。緑藻の形質転換に関するシステムも未整備であった。

２．研究の目的

本研究では、優れた炭酸同化能を有する緑藻 *Chlamydomonas* sp.を用いて二酸化炭素から中間代謝産物のグリセロールを生産させたのち、安全性と物質生産性に優れた酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にグリセロールを共有させて有用物質を生産させるという、緑藻－酵母の共培養プラットフォームの構築を目的とした。この構築を目指す過程で、スタートアップの意に沿い、実験機器やプロトコルが殆どない状態から研究を進められる足場を固めることも目的とした。

３．研究の方法

Chlamydomonas reinhardtii に二酸化炭素から直接的に中間代謝産物であるグリセロールを高生産させるため、はじめに *S. cerevisiae* からゲノムを抽出し、PCR 法によって *glycerol 3-phosphatase* (*GPP*) を取得した。取得された *GPP* を精製後に *Chlamydomonas* 用発現ベクターpChlamy_4 に導入し、pChlamy_4-GPP の構築を試みた。次に構築された pChlamy_4-GPP を *C. reinhardtii* に導入するために、本研究室で新たにエレクトロポレーション法による *C. reinhardtii* 用の形質転換系を構築した。エレクトロポレーションには *C. reinhardtii* の各亜種に対して遺伝子の形質転換に実績のあった NEPA-Gene 社の NEPA21 を用いた。その際、電圧、電圧の減衰率、パルス幅、パルス

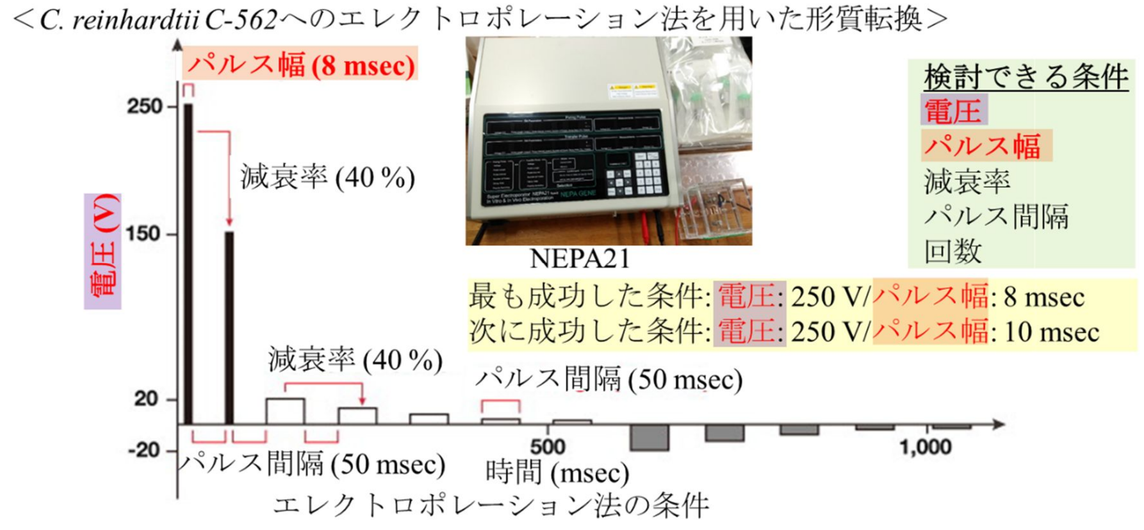

図１ エレクトロポレーション法の条件選抜

間隔を検討した（図 1)。最終的に最も効果が表れた条件で *C. reinhardtii* に対して pChlamy_4-GPP 導入のためのエレクトロポレーションを行った。

一方、グリセロール資化性酵母獲得のため、炭素源の制限培地中で *S. cerevisiae* の育種を多段階的に試みた（図 2、図 3)。具体的にはグルコースからグリセロールへと直接的に資化に関わる

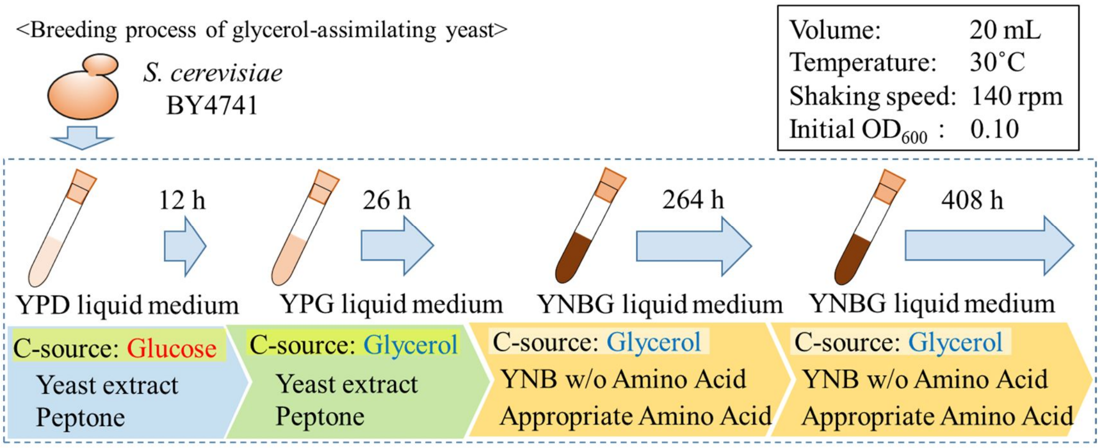

図 2 グリセロール資化性酵母の一時選抜方法

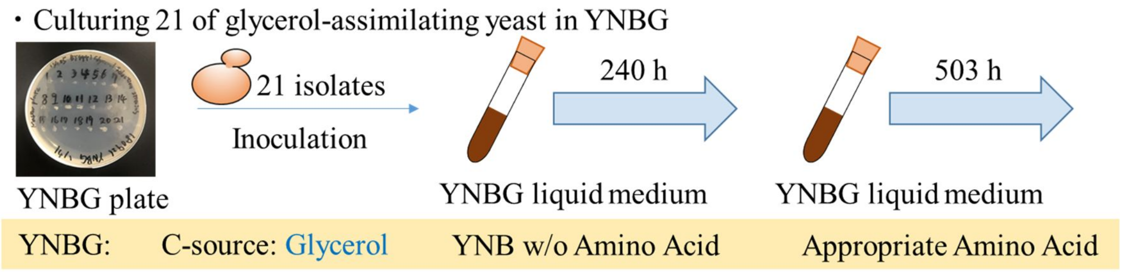

図 3 グリセロール資化性株の第二選抜方法

炭素源の制限を行った後、糖新生を考慮して Yeast extract + Peptone から Yeast nitrogen base へと窒素源の制限も実施した。以上の選抜方法を活用し、最終的にグリセロール資化性酵母の選抜を試みた。

さらに、*C. reinhardtii* 用の光培養系を 100 mL で 1 本培養できる規模から 2 L で 3 本培養できる規模にまでスケールアップを試みた。スケールアップに関しては光量の調整と窒素源濃度を特に注視しカスタマイズした。更には、高速液体クロマトグラフィーを用いたグリセロール定量評価系、ガスクロマトグラフィーを用いたエタノール定量評価系を立ち上げ、これらの定量評価を行った。

４．研究成果

PCR 法によって取得した *GPP2* を pChlamy_4 に導入し、pChlamy_4-GPP を構築した。その後、NEPA-Gene 社の NEPA21 を用い、*C. reinhardtii* に対する形質転換について最も効果が表れた条件でエレクトロポレーションを行い、抗生物質ゼオシンを含む選択培地上で *C. reinhardtii*/pChlamy_4-GPP の生育を確認した（図 4)。

グリセロール高生産株の創生のため *Chlamydomonas reinhardtii* の代謝改変を試みた。*S. cerevisiae* から *glycerol 3-phosphatase* (*GPP*) を取得し *Chlamydomonas* 用発現ベクター pChlamy_4 に導入して pChlamy_4-GPP を構築した。形質転換効率を高めるため NEPA-Gene を用いた形質転換系を設定し、*C. reinhardtii*/pChlamy_4-GPP を構築した。グリセロールの抽出後の評価のため、HPLC を用いたグリセロール定量評価系を立ち上げた。緑藻によるグリセロール生産を評価したが、生産評価の最適化に課題があり効率化を進めている。培養系では、100 mL で 1 本培養できる規模から 2 L で 3 本培養できる規模にまでスケールアップを試みた。酵母のグリセロール資化性株の創出に関して、*S. cerevisiae* の選択培養後グリセロール資化性酵母 no. 7 株を取得し評価した(図 5)。GC を用いたエタノール生産評価系の構築も完了した。研究を進

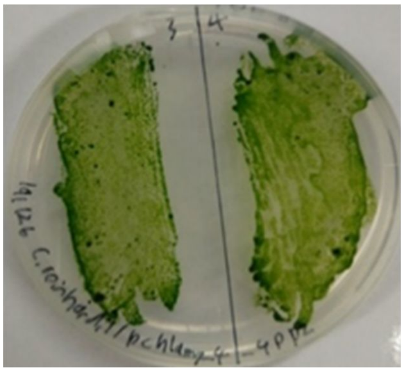

図 4 選択培地中で生育する *C. reinhardtii*/pChlamy_4-GPP2

める上で培養系、形質転換体の創生系、その創生系を利用した *C. reinhardtii*/pChlamy_4-GPP の創生、分析評価系を構築し、研究を進められる足場を固めた。研究機関に採用されたばかりの研究者の当座のスタート支援に資する研究活動スタート支援は、研究代表者の研究背景に合致し、真意に正に沿うものであった。

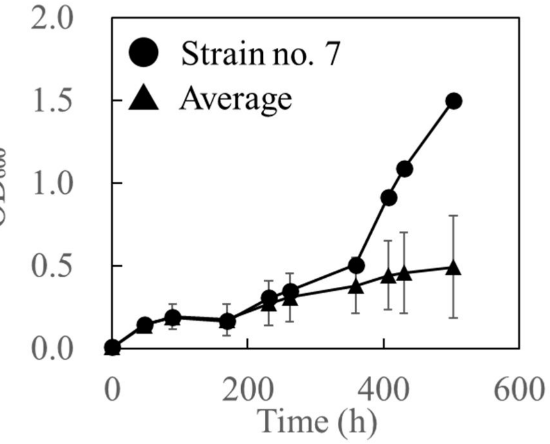

図 5 グリセロール資化性株の増殖

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　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Kuan Zhang, Akihito Nakanishi, Isao Karube
２．発表標題 Generation of a glycerol-assimilating strain of Saccharomyces cerevisiae and its direct ethanol production from glycerol
３．学会等名 2019年度 日本生物工学会 年次大会
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