

細胞増殖制御技術による 光合成的芳香族生産

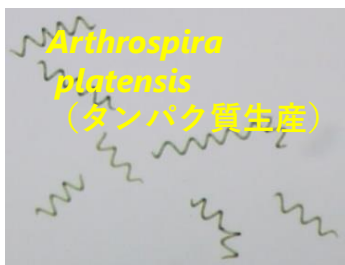
神戸大学 先端バイオ工学研究センター
教授 蓮沼 誠久

2024年3月7日



藻類によるバイオものづくりへの挑戦

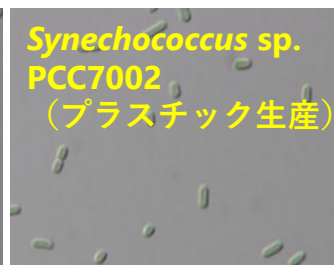
藻類は理想的なバイオマス



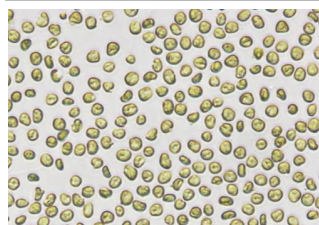
Arthrospira platensis
(タンパク質生産)



Synechocystis sp.
PCC6803
(コハク酸生産、
D-乳酸生産)



Synechococcus sp.
PCC7002
(プラスチック生産)



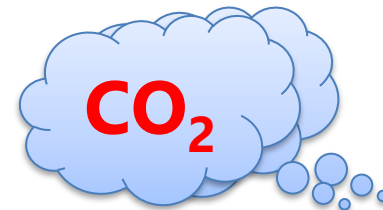
Pavlova sp.
(フコキサンチン生産)

Chlamydomonas sp.
(オイル、デンプン生産)



➤神戸大で培養の
最適化実績有

太陽光エネルギー



生物学的炭酸固定



- ✓ 機能性素材（色素など）
- ✓ バイオベース化学品
- ✓ バイオ燃料

藻類スマートセル

利点 1. CO₂から直接モノづくりができる

- 陸生バイオマスを原料とする問題（発酵前処理の必要性、収穫時期の制約、耕作地との競合）を回避できる

利点 2. 淡水資源が不要



開発されてきた藻株

Calipatria, California,
USA

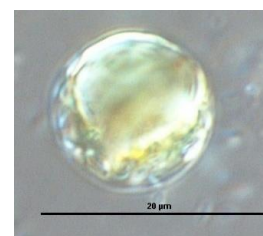


Outdoor cultivation (50 m²)

Fucoxanthin



Oil (TAG)



Chlamydomonas
sp. JSC4



バイオマスエネルギー技術研究開発／
戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発
事業／海洋性緑藻の**油脂生産技術**の研究開発
受託期間；H24-27
研究代表者；蓮沼誠久（神戸大学）

Kato et al. (2021) *Commun. Biol.* 4, 450

**Biodegradable
plastic**

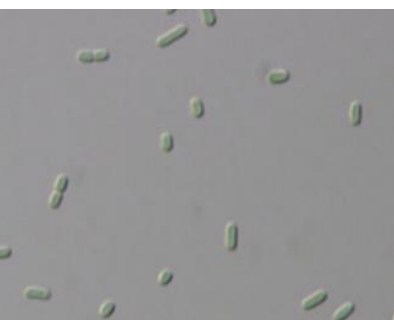
Astaxanthin



Pavlova sp. OPMS30543

Kanamoto et al. (2021) *Marine Biotechnol.* 23, 331

Yoshida et al. (2023) *Algal Res.* 72, 103144

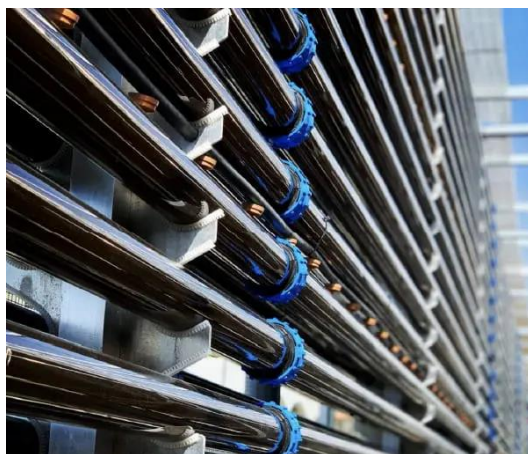
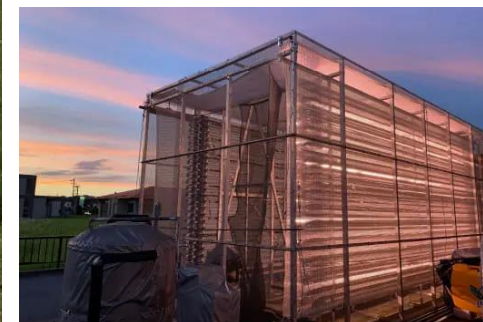
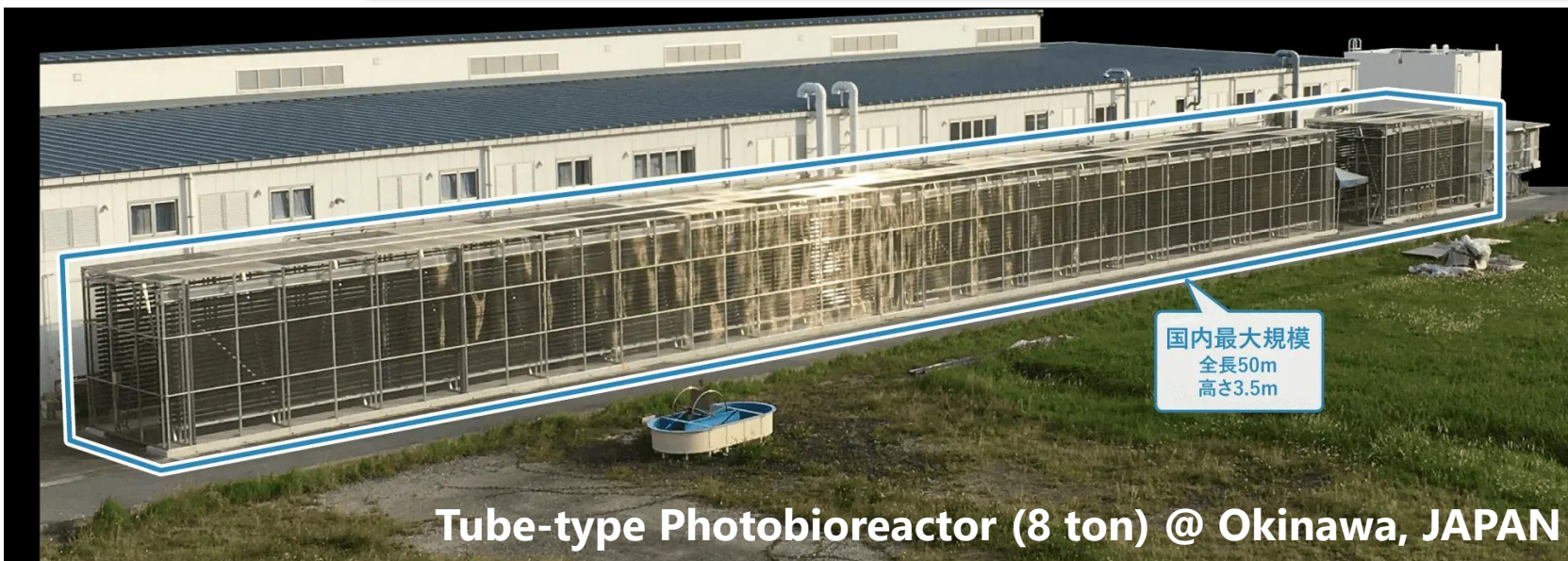


Synechococcus sp. PCC7002

Hasunuma et al. (2019) *ACS Synth. Biol.* 8, 2701-2709



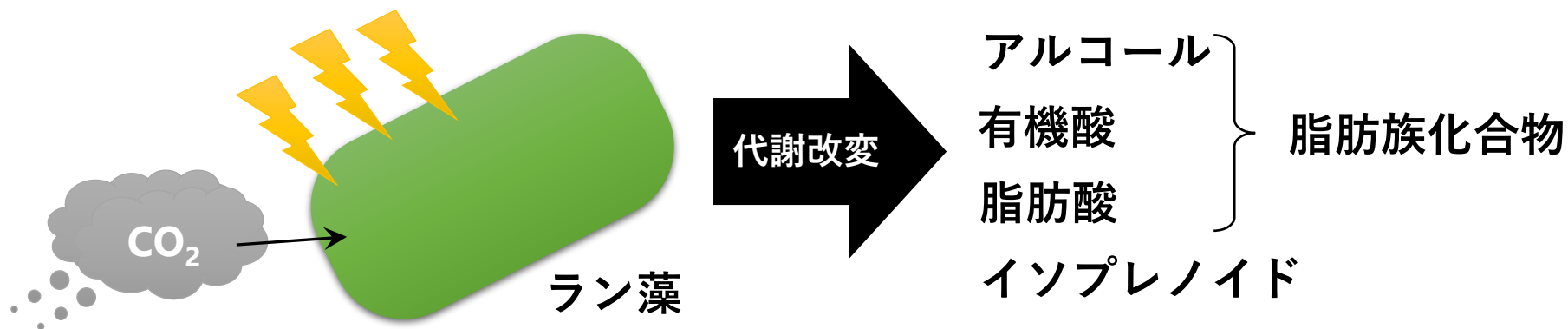
パブロバの商用大規模生産設備



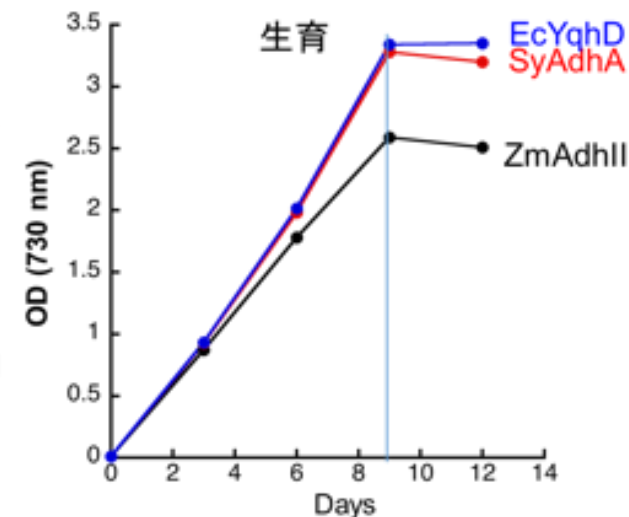
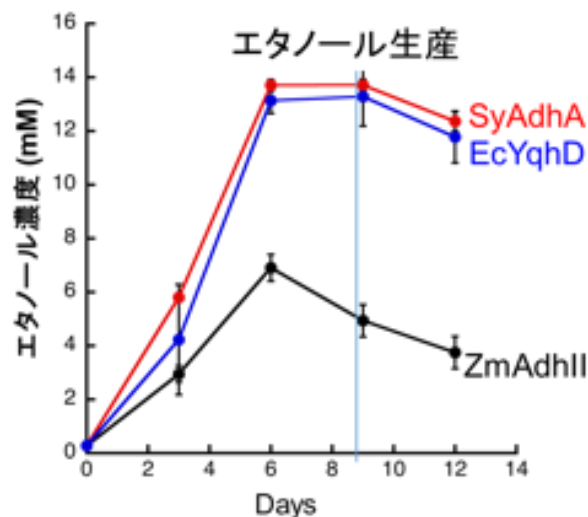
<https://pavlova.jp/photobioreactor/>

従来技術とその問題点

光エネルギーを利用したCO₂からの直接物質生産が可能



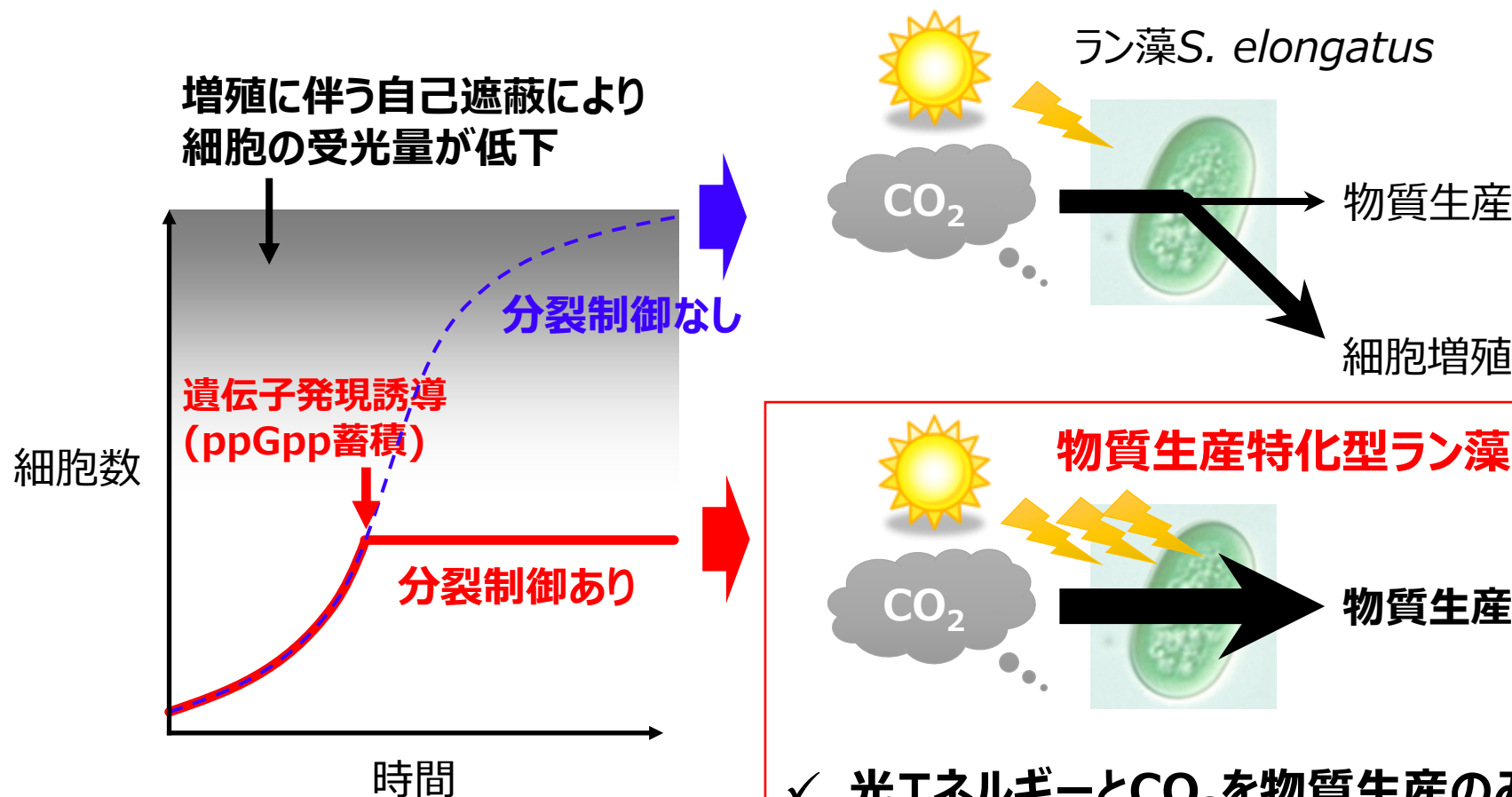
Product	Titer	Productivity
Ethanol	2.3 g/L	11 mg/L/h
Isopropanol	0.2 g/L	0.6 mg/L/h
1,3-PDO	0.3 g/L	0.9 mg/L/h
Isobutanol	0.6 g/L	2.9 mg/L/h
2,3-BDO	3.0 g/L	13 mg/L/h
Lactate	1.1 g/L	11 mg/L/h
3-HP	0.8 g/L	5.8 mg/L/h
Fatty acids	0.13 g/L	0.3 mg/L/h
Limonene	0.004 g/L	0.04 mg/L/h
Caffeic acid	0.0007 g/L	0.01 mg/L/h



なぜ生産量が上がらないのか？
⇒生産が対数増殖期のみで起こるため

新技術の特徴

➤ 「物質生産特化型」ラン藻の開発による光合成的芳香族生産



細胞分裂制御技術

対数増殖期で細胞分裂を止める一方、光合成による炭素同化と代謝を止めずに芳香族アミノ酸を生産する (特開2020-191851)

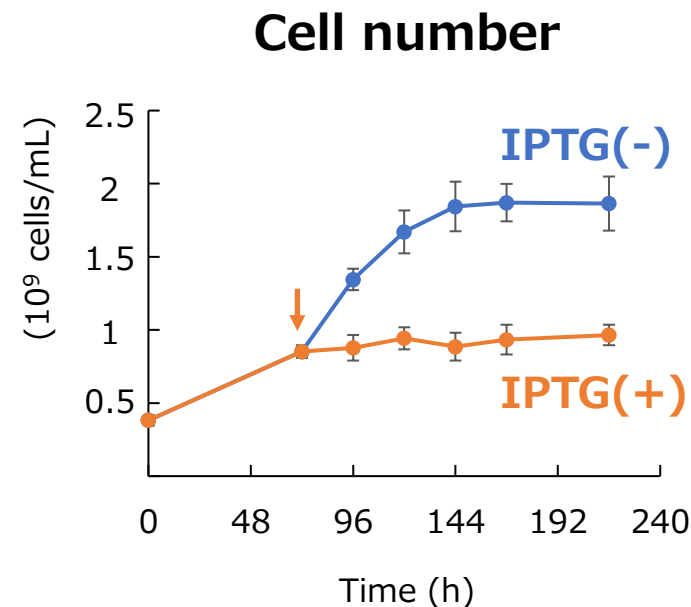
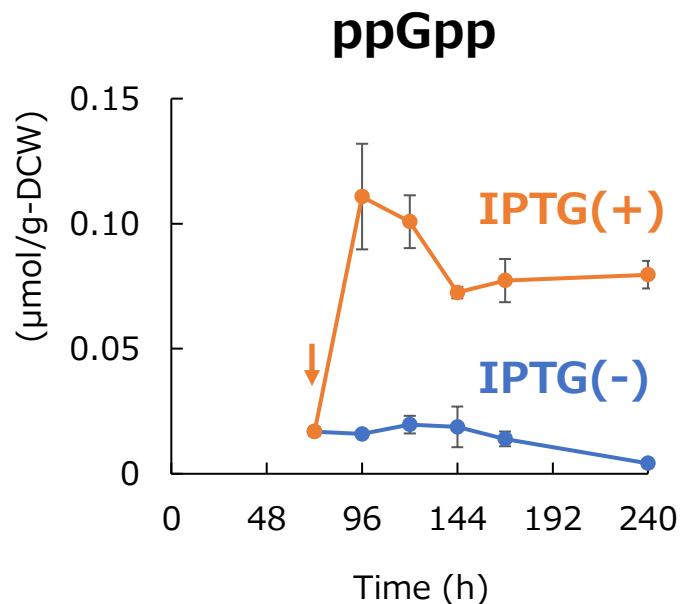
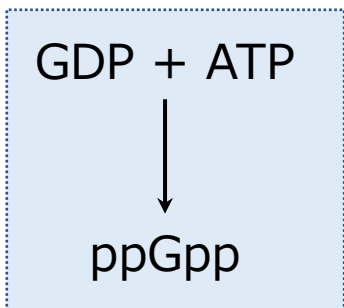
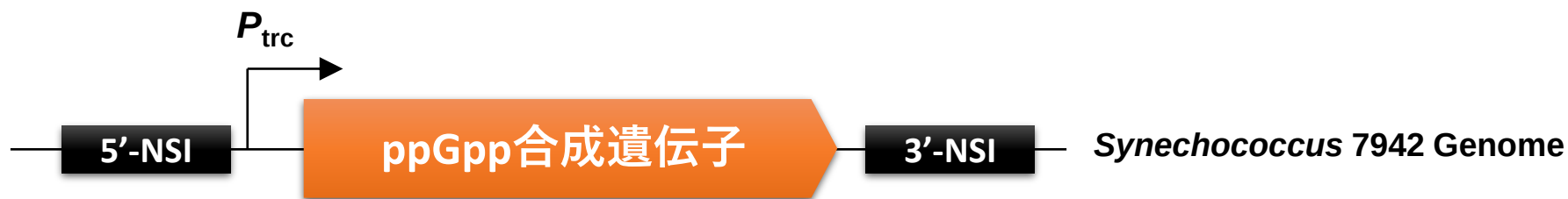
- ✓ 光エネルギーとCO₂を物質生産のみに使う
- ✓ 自己遮蔽効果が小さい密度を維持する

➤ 光合成微生物では、ppGpp蓄積が細胞増殖を停止させるメカニズム、光合成に及ぼす影響、代謝に及ぼす影響、などは不明であった

光合成微生物

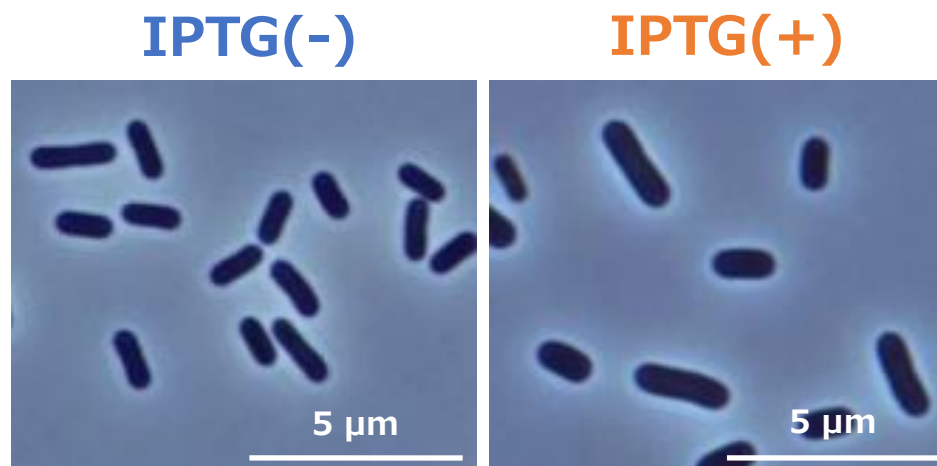
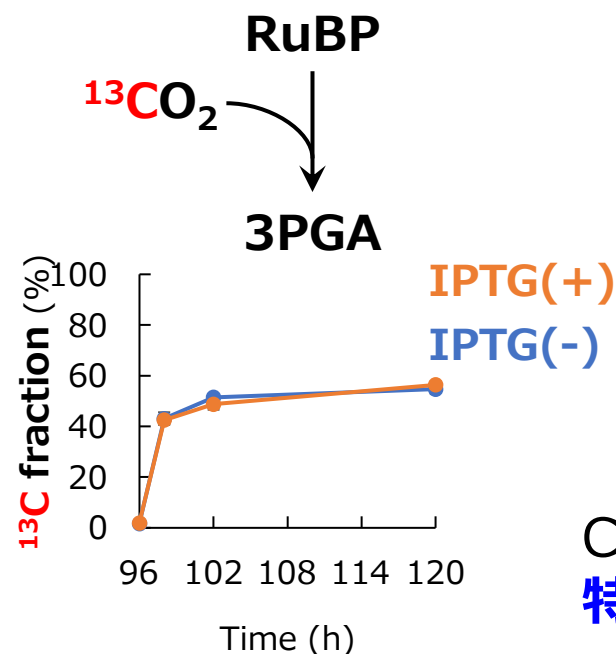
Synechococcus elongatus PCC7942

- 高い増殖速度 (4.9 h Doubling time)
- 遺伝子組換え可
- モデル生物としての知見が集積
- 発現誘導の調節が容易

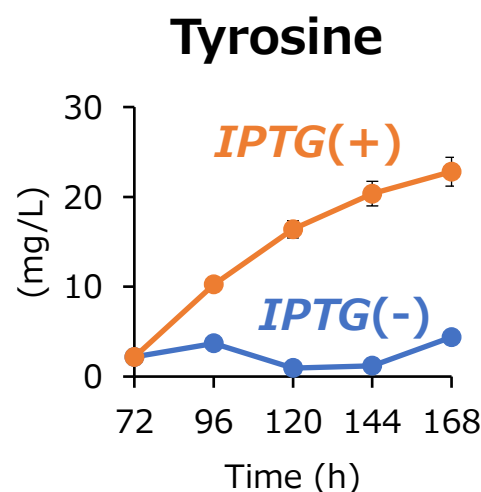
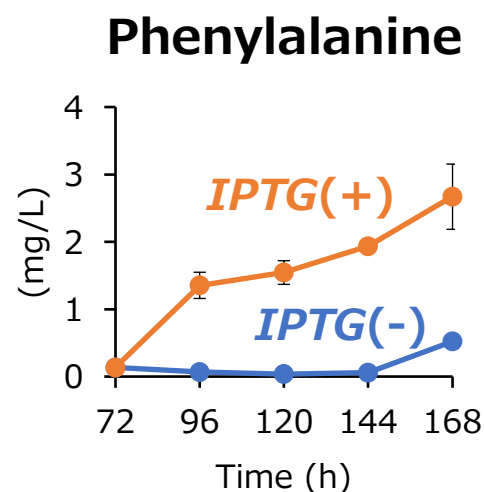


ppGpp合成遺伝子の誘導により、ppGppを蓄積させ、細胞分裂を停止させることに成功

新技術の特徴



CO₂固定が継続し、細胞サイズが増大することを発見した
特徴① 分裂停止後も代謝活動は継続する



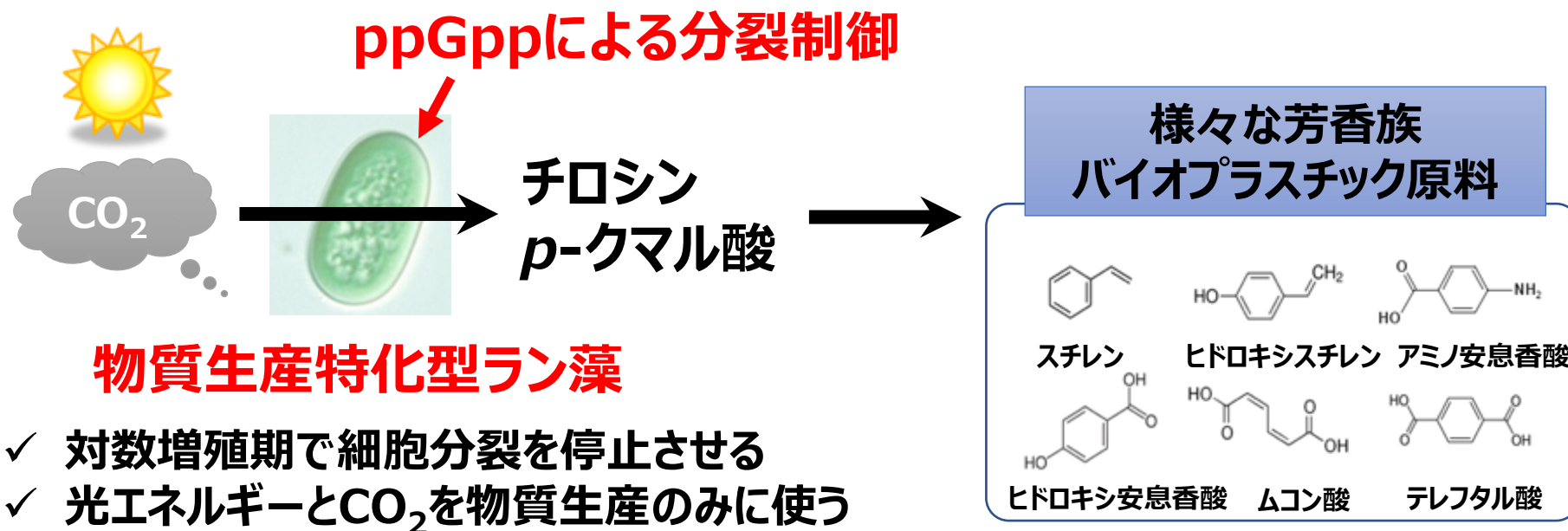
特徴② 芳香族アミノ酸（特にチロシン）を多く細胞外に放出することを発見した

→ **芳香族バイオプラスチック原料の生産に適している**

新技術の特徴

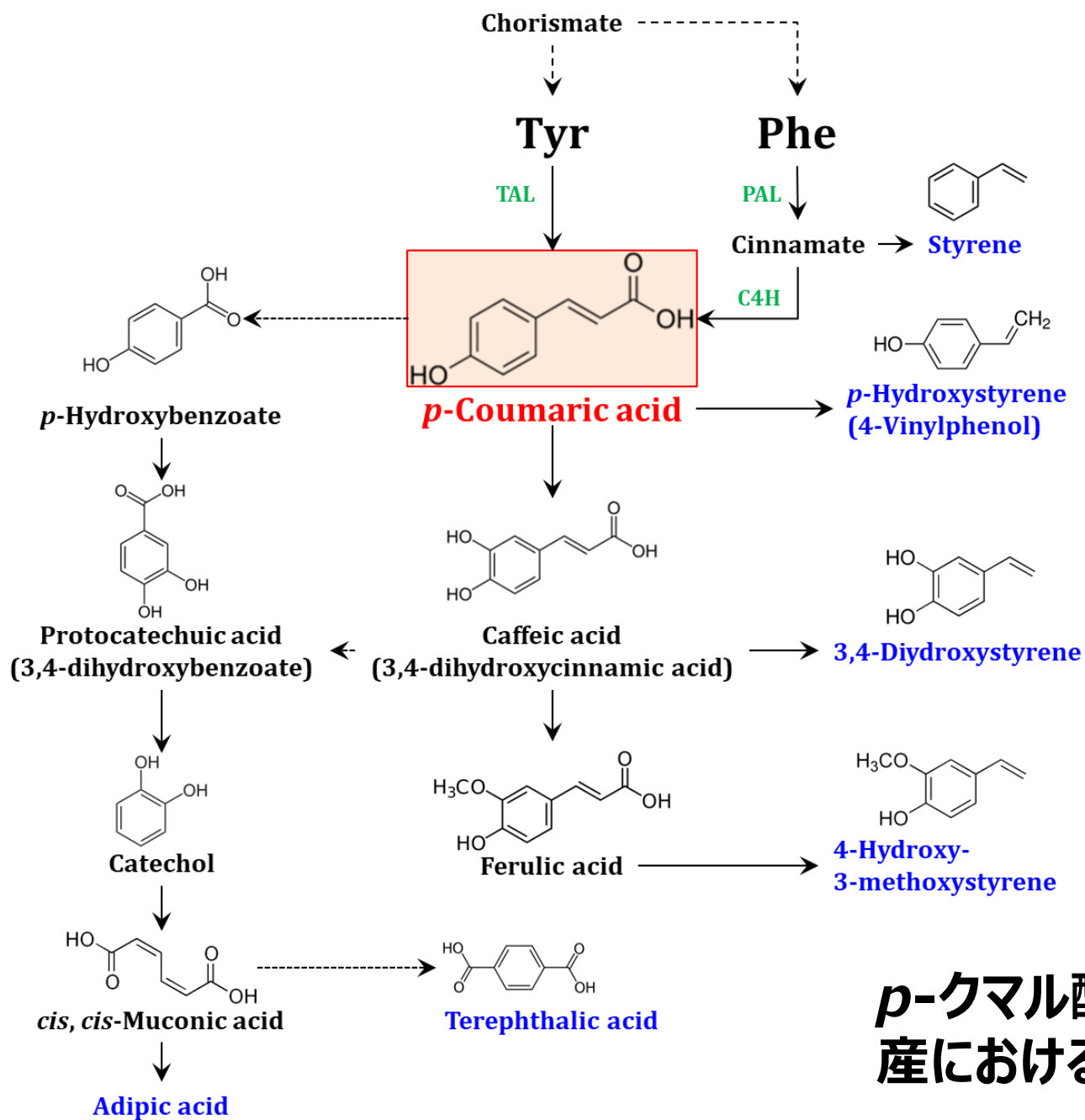
研究の狙い：ppGppによる制御メカニズムの理解を深め、「物質生産特化型」ラン藻を構築し、芳香族化合物（特にチロシンと

-クマル酸）を生産する



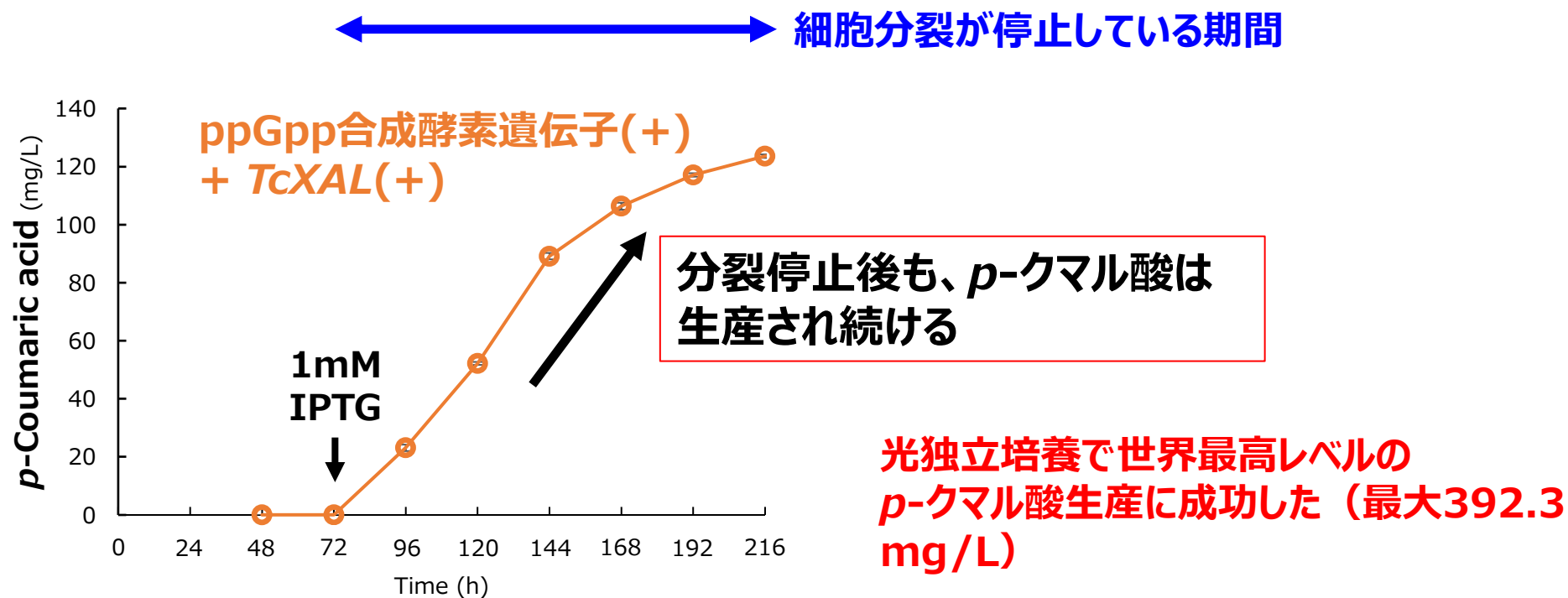
本研究のゲームチェンジング性

ラン藻の細胞周期、細胞増殖の理解と制御に基づく物質生産能力の向上（従来、物質生産は代謝経路や代謝制御の改変に依存してきた）



p-クマル酸は有用芳香族生産におけるハブ化合物

新技術の特徴

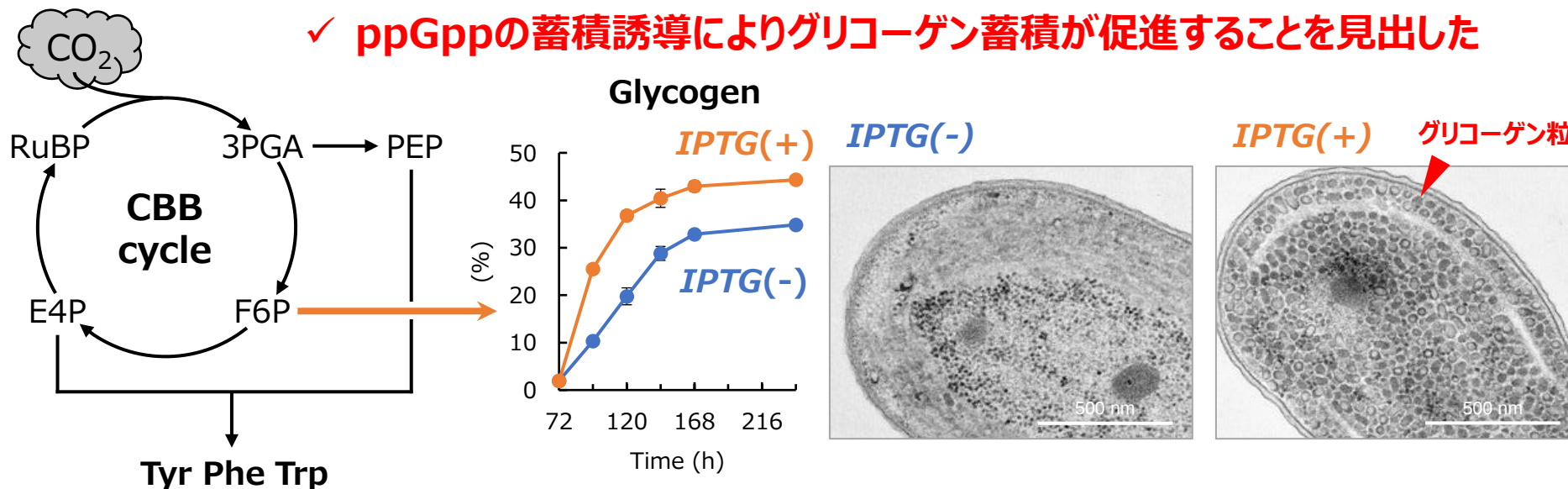


TcXAL遺伝子の導入によりチロシンから*p*-クマル酸を合成できることを見出し、分裂停止細胞において*p*-クマル酸を生産することに成功した

ムコン酸、ヒドロキシスチレン、フェルラ酸も世界最高値を達成した

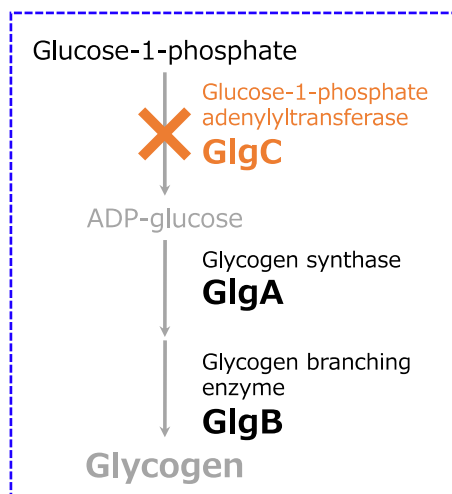
新技術の特徴

✓ ppGppの蓄積誘導によりグリコーゲン蓄積が促進することを見出した

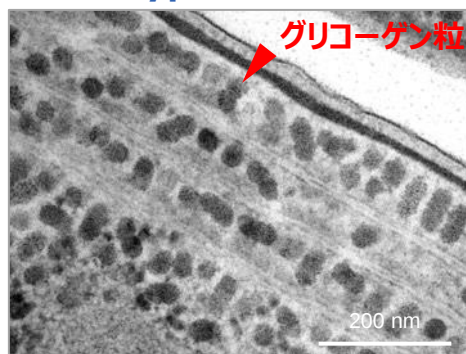


【課題】炭素リソースが芳香族生産以外に多く使用されている

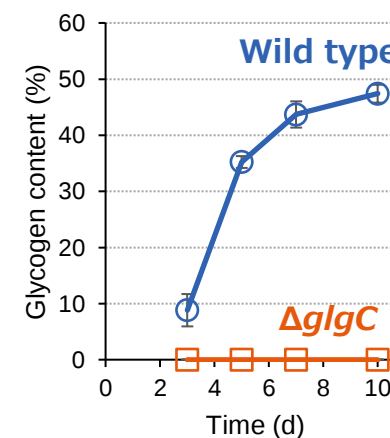
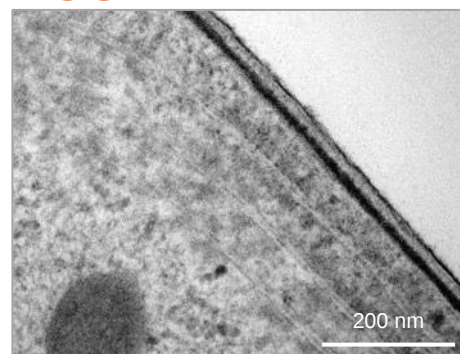
➤ グリコーゲン蓄積を解消することで芳香族アミノ酸生産が向上するか検証した



Wild type



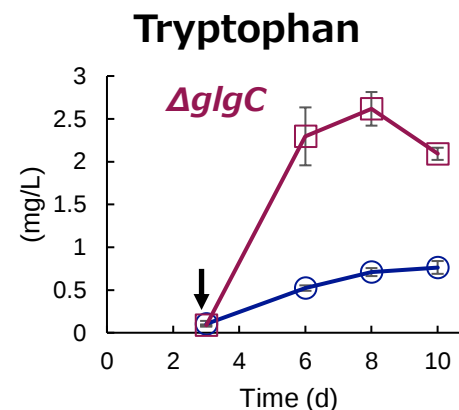
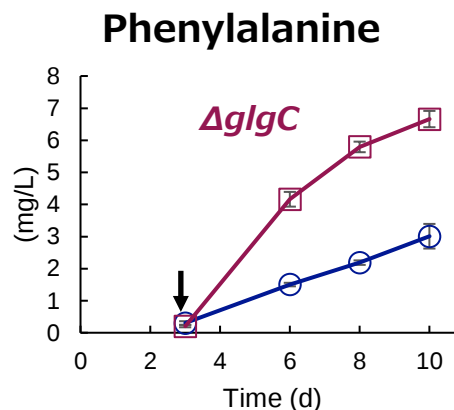
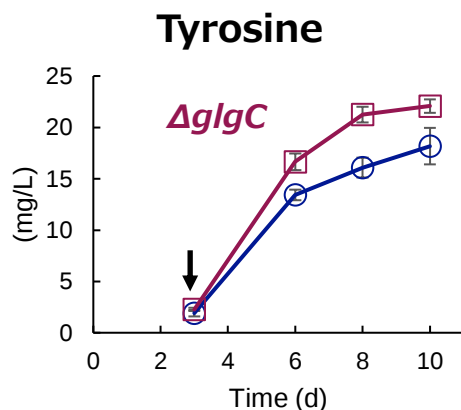
Δ glgC



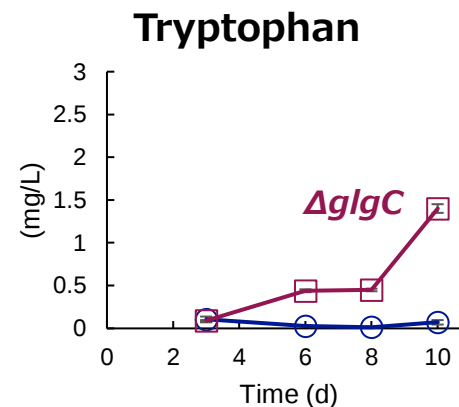
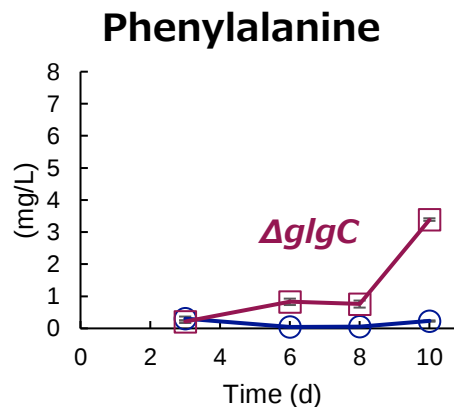
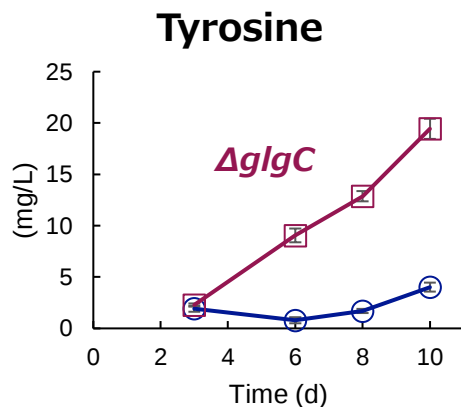
新技術の特徴

細胞分裂制御の応用①（さらなる高生産、他の分子種への拡張）

ppGpp合成
酵素遺伝子
(+)



ppGpp合成
酵素遺伝子
(-)

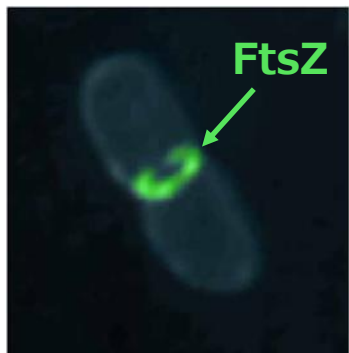


- ✓ グリコーゲン欠損により、アミノ酸の放出が向上した（ppGpp誘導の有無に限らず）
- ✓ グルタミン酸は著量生産した

（特開2024-008564、Kato et al. Commun. Biol. in press）

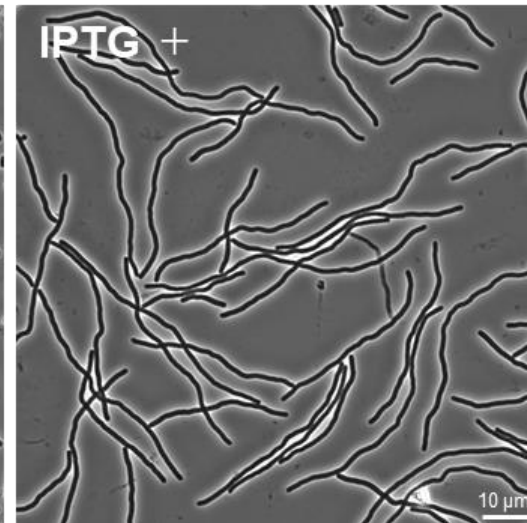
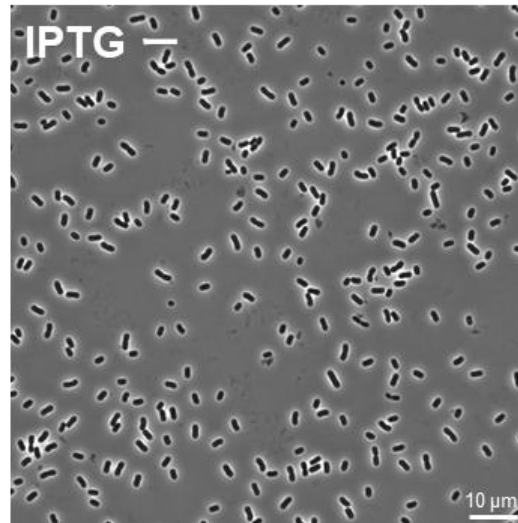
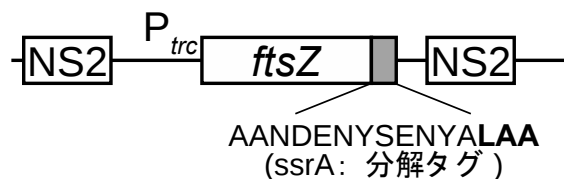
新技術の特徴

細胞分裂制御の応用②（細胞の巨大化）



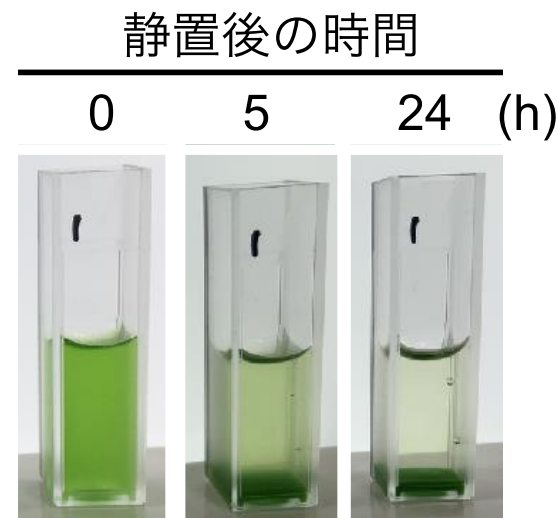
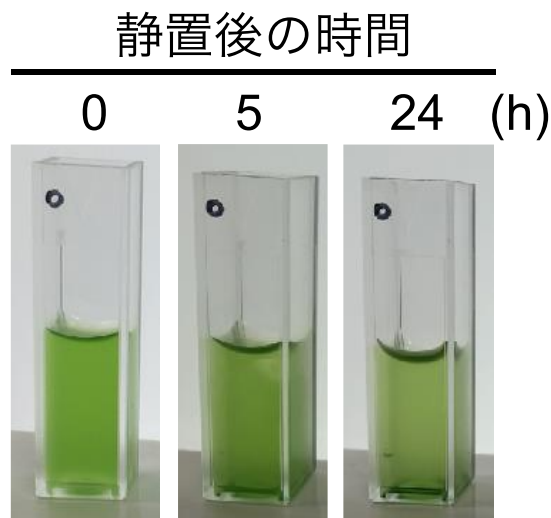
(Ghigo et al.
Mol. Microbiol. 1999)

FtsZ-LAAが細胞を巨大化させることを発見した

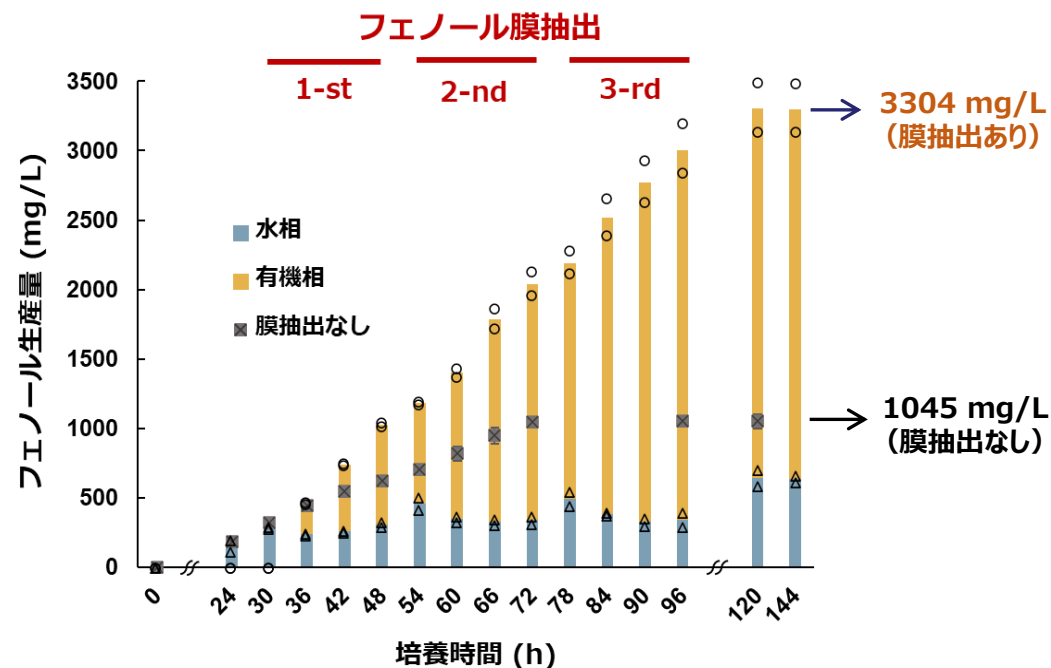
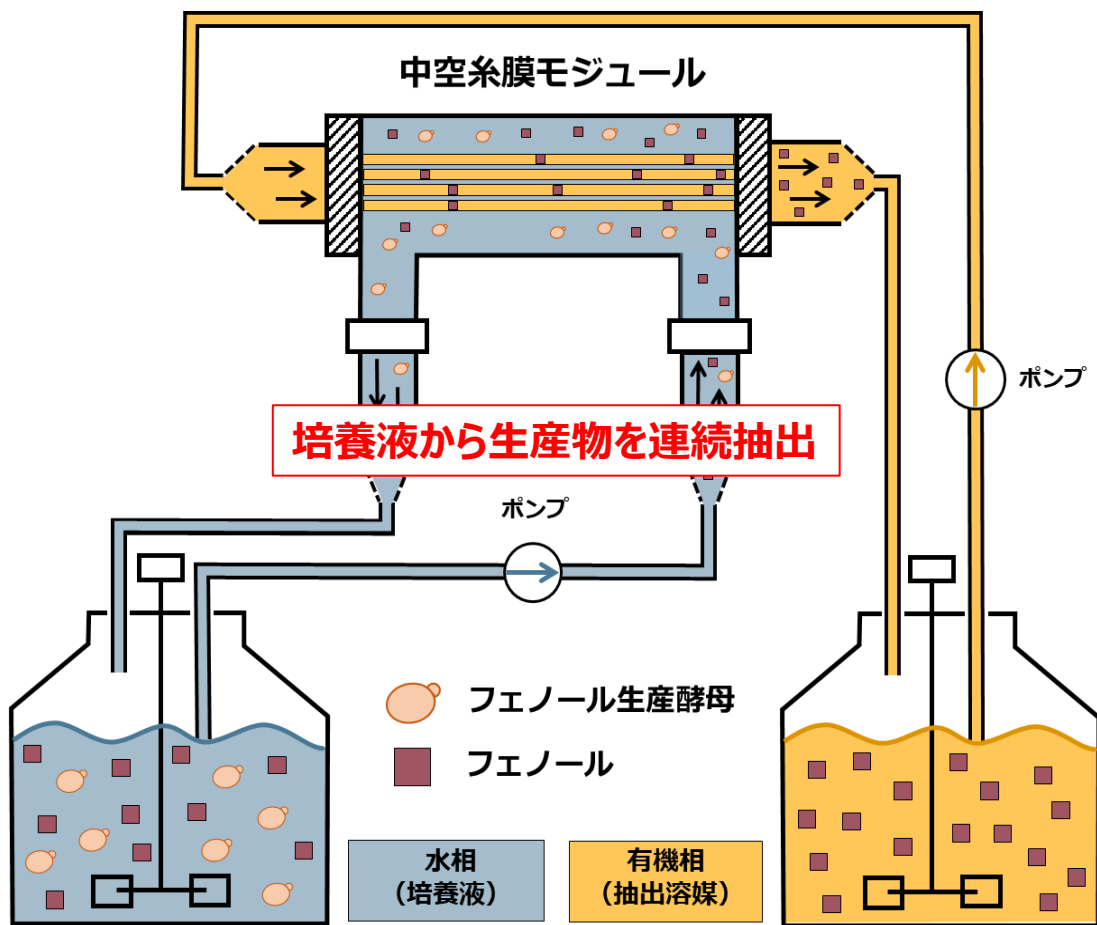


巨大細胞は速やかに沈殿した

→ 培養液からの細胞回収を容易にする技術を開発した
(特開2023-111439)



芳香族回収技術の検討



膜抽出システムを用いることで、微生物培養液から毒性のある化合物を連続抽出する技術を開発。

酵母によるバイオフェノール生産量を3倍向上させることに成功

想定される用途

- CO₂を原料とした物質生産
- バイオマス、糖質、脂質をフィードストックとしない物質生産
- プラスチック原料、エンブラ原料、ナイロン原料、高機能性素材原料の市場への供給
- バイオものづくりは地球規模課題の解決と経済発展の共存に貢献する

実用化に向けた課題

- 物質生産特化型細胞の構築には成功。
- 代謝改変を利用した生産経路の最適化によるターゲット物質の生産量の更なる向上を行う段階にきた。
- 今後、実験データを充実させることで、生産特化状態を長時間持続させる培養条件の検討が必要。
- 実用化に向けて、スケールアップ技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- 実用化に向けた、培養検討、スケールアップ試験のデータ取得。
- 培養技術を有する企業との連携を希望。
- CO₂からのモノマー生産を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 芳香族化合物を生産する方法
- 出願番号 : 特願2019-101419
- 出願人 : 神戸大学
- 発明者 : 蓮沼誠久、蘆田弘樹、大林龍胆

- 発明の名称 : 環境負荷の低い物質生産方法
- 出願番号 : 特願2022-13299
- 出願人 : 神戸大学
- 発明者 : 蓮沼誠久、蘆田弘樹、大林龍胆、秀瀬涼太、稲邊宏輔

- 発明の名称 : アミノ酸および／または有機酸を製造する方法
- 出願番号 : 特願2022-110536
- 出願人 : 神戸大学、静岡大学
- 発明者 : 蓮沼誠久、加藤悠一、秀瀬涼太、蘆田弘樹、大林龍胆

産学連携の経歴

- 2011年-2014年 JSTさきがけ事業に採択
- 2012年-2016年 NEDOバイオマスエネルギー技術開発事業に採択
- 2016年-2019年 内閣府ImPACT事業に採択
- 2016年-2021年 NEDOスマートセルプロジェクトに採択
- 2016年-2020年 ASTEPシーズ育成タイプに採択
- 2019年- JST未来社会創造事業に採択
- 2023年- JST革新的GX技術創出事業に採択（分担）

お問い合わせ先

神戸大学

研究推進部連携推進課知財グループ

T E L 0 7 8 - 8 0 3 - 5 9 4 5

F A X 0 7 8 - 8 0 3 - 5 3 8 9

e-mail ksui-chizai@office.kobe-u.ac.jp