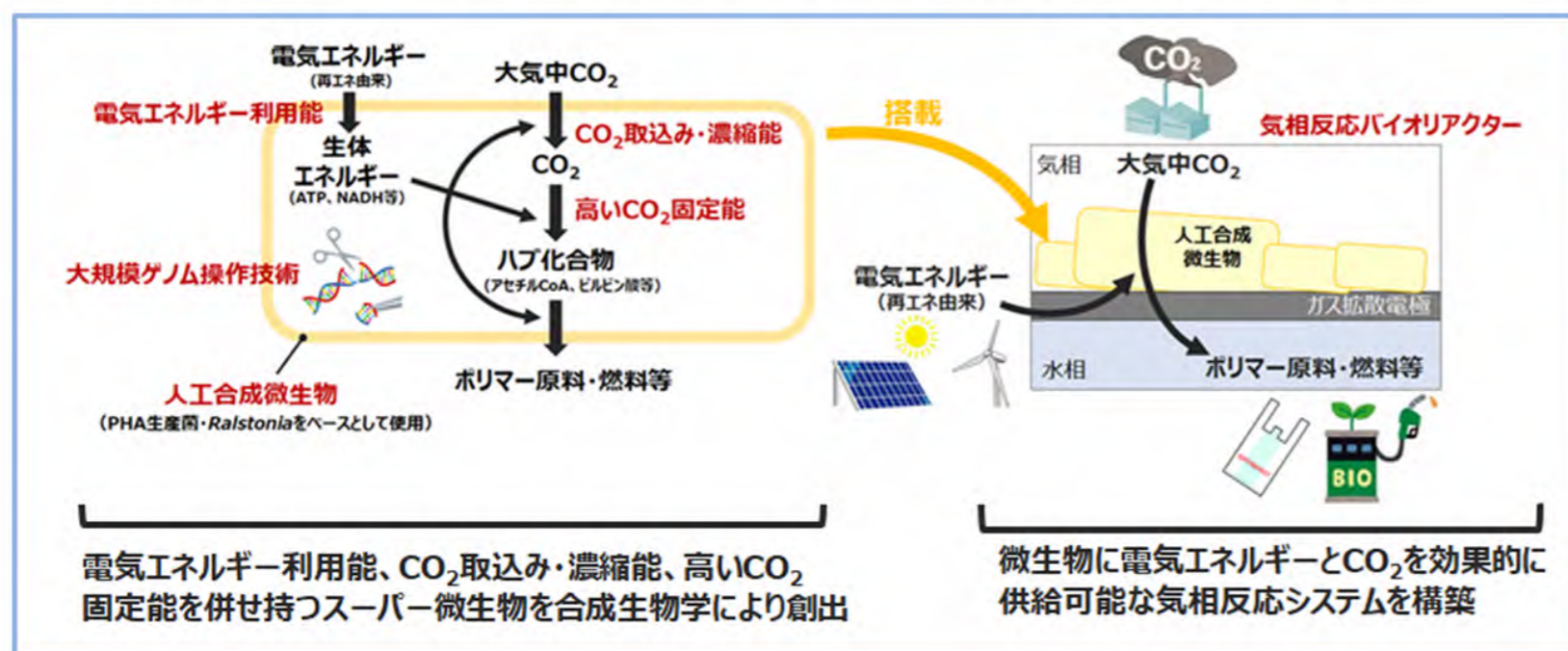


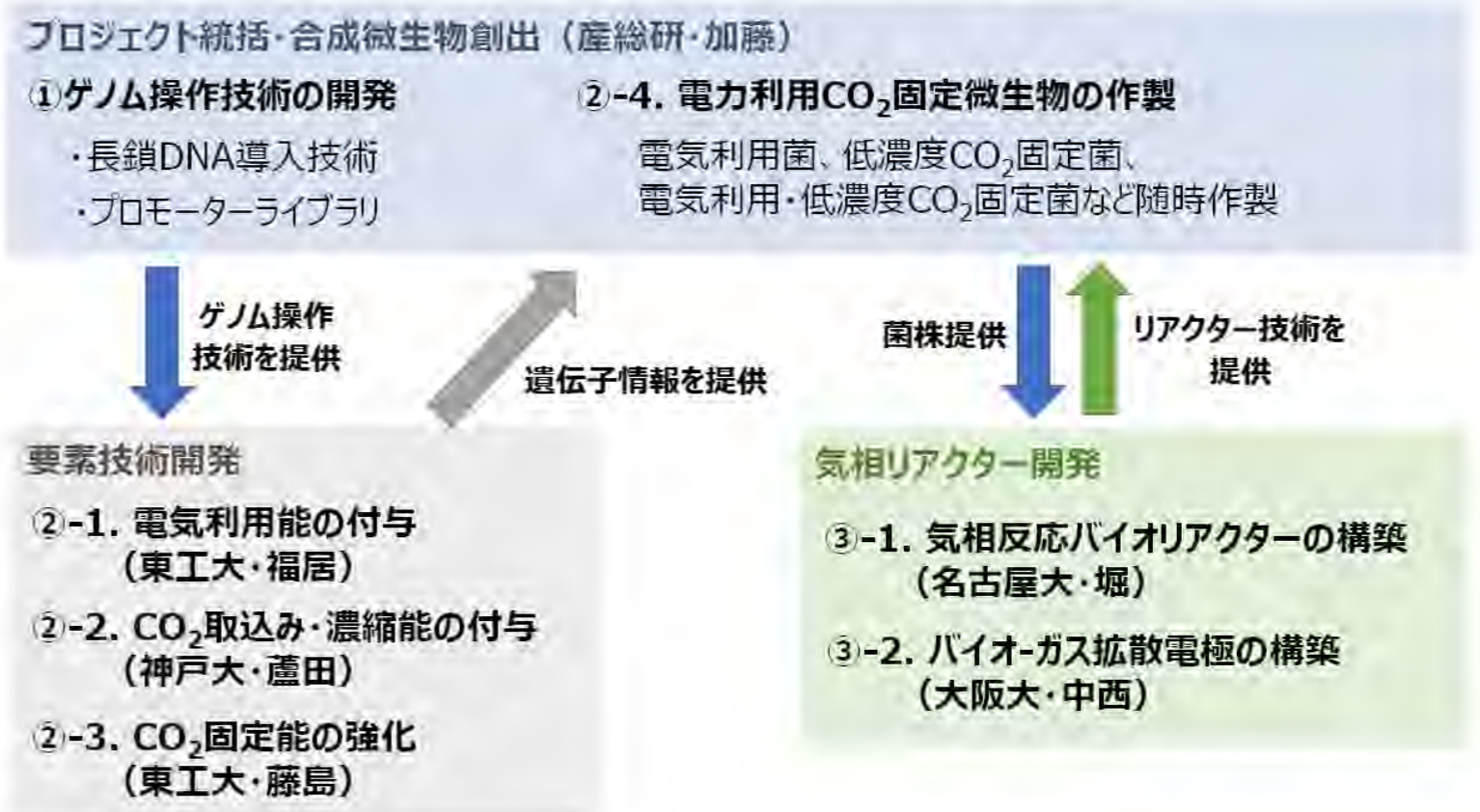
### 研究開発概要・PJ全体目標

- 微生物を用いた革新的なCO<sub>2</sub>資源化・ネガティブエミッション技術の開発
- 電気エネルギーを利用し大気中CO<sub>2</sub>を植物の50倍以上の効率 (1 m<sup>2</sup>あたり年間50 kgの大気CO<sub>2</sub>を吸収) で有用有機物に変換
- PJ達成目標 (2022年度): 「電気利用CO<sub>2</sub>固定微生物の人工合成」と「気相反応リアクターの構築」を実現し本技術の実証可能性を明確に示すこと



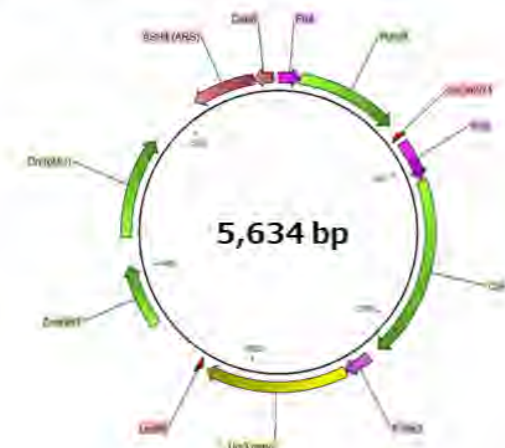
### 研究開発項目・実施体制

- PJ達成目標 (2022年度): 気相反応リアクターを使用し微生物による電気利用CO<sub>2</sub>固定の実証可能性を示す



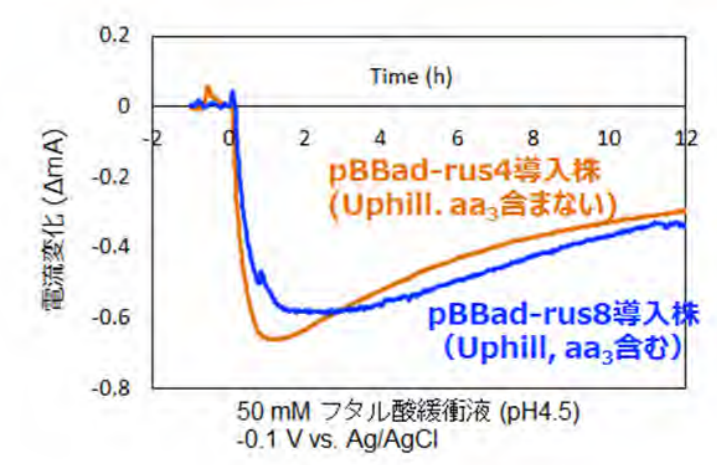
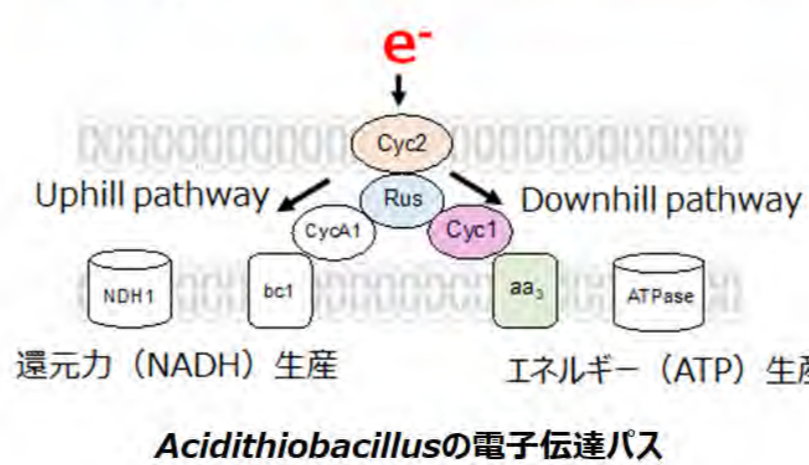
### 1. ゲノム操作技術の開発 (産総研)

- 本PJでの目標: *Ralstonia*の長鎖DNA導入技術を含むゲノム操作基盤技術の構築
- \* *Ralstonia*への長鎖DNA導入技術の開発  
目的: 多数の遺伝子群をゲノムに導入可能な遺伝子操作方法の開発  
成果: 酵母人工染色体をベースに長鎖DNA導入ベクターをデザイン  
ゲノムへの遺伝子導入法 (CreLoxP法) を *Ralstonia*に初めて導入
- \* プロモーターライブラリ開発  
目的: 導入した遺伝子を適切量発現させるのに必要なプロモーターを複数獲得  
成果: CO<sub>2</sub>固定条件下での網羅的遺伝子発現解析  
比色法による簡便なプロモーター活性評価系を構築  
CO<sub>2</sub>固定条件下で特異的に機能するプロモーターを8種、恒常発現プロモーター3種を特定



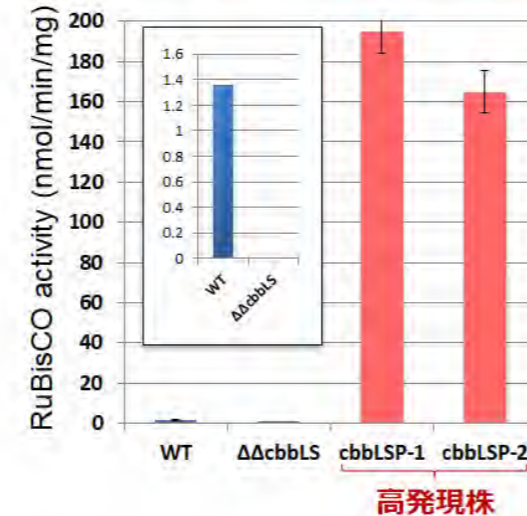
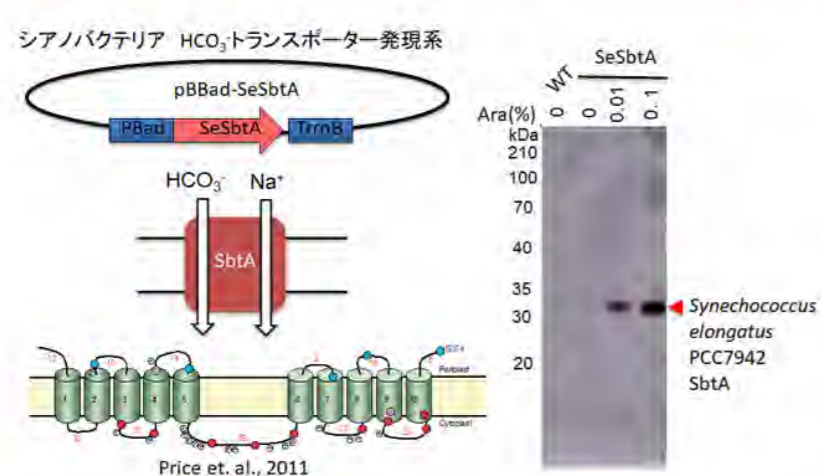
### 2-1. 電気利用能の付与 (東工大)

- 本PJでの目標: *Ralstonia*に異種微生物の電子伝達パスを導入し電流消費活性を付与する
- \* *Acidithiobacillus*由来電子伝達パスの導入  
目的: *Ralstonia*に異種微生物の電子伝達パス遺伝子を導入  
成果: Uphill経路のみ、Up/Downhill経路双方を導入した株を作製  
導入した遺伝子群の発現をRNAレベル、タンパクレベルで確認
- \* 導入株の電気化学測定  
目的: 電子伝達パス遺伝子の導入により電気利用能が付与されているかを確認  
成果: Uphill経路導入株で明確な電流消費活性を確認  
Up/Downhill経路導入株の電流消費活性、CO<sub>2</sub>固定活性を現在確認中



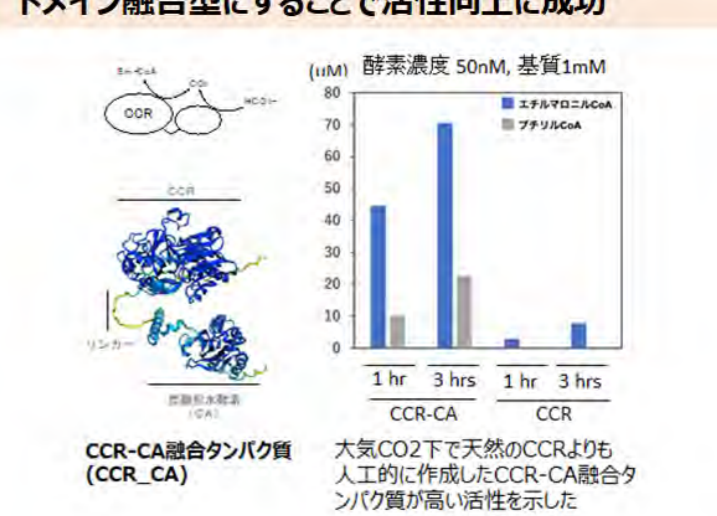
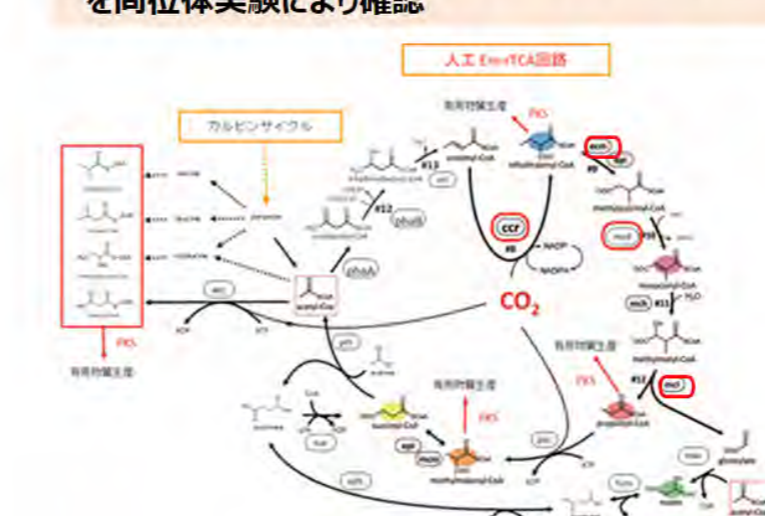
### 2-2. CO<sub>2</sub>取込み・濃縮能の付与 (神戸大)

- 本PJでの目標: *Ralstonia*に異種微生物のCO<sub>2</sub>固定酵素・濃縮系を導入し活性を付与する
- \* シアノバクテリア由来CO<sub>2</sub>濃縮系の導入  
目的: シアノバクテリア等が持つCO<sub>2</sub>濃縮系を *Ralstonia*で発現させ能力を付与する  
成果: シアノバクテリアの炭酸塩輸送タンパクを *Ralstonia*で発現させることに成功  
導入株のCO<sub>2</sub>取込み活性を確認中
- \* CO<sub>2</sub>固定酵素の発現強化  
目的: 内在性・外来性のCO<sub>2</sub>固定酵素 (RuBisCO) の高発現によりCO<sub>2</sub>固定能を強化する  
成果: 内在性のRuBisCOの高発現によりCO<sub>2</sub>固定活性、生育が向上することを実証  
より活性の高い外来性RuBisCOも検討中



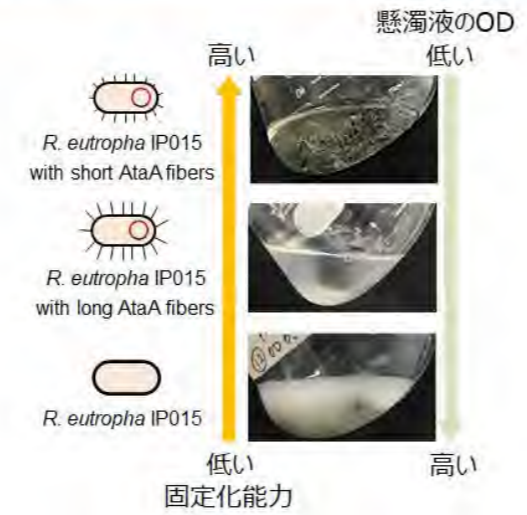
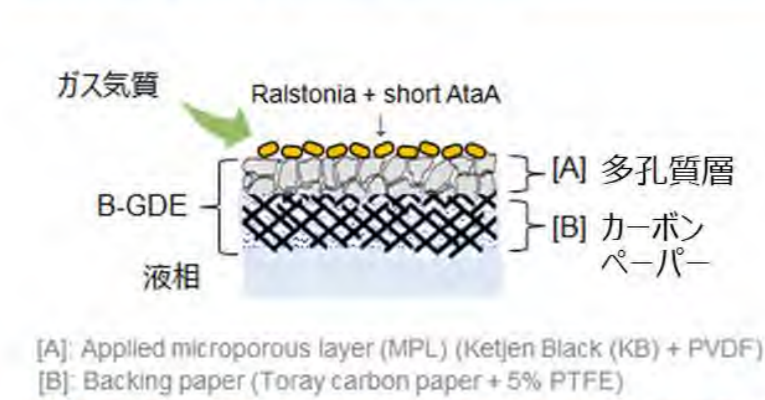
### 2-3. CO<sub>2</sub>固定能の強化 (東工大)

- 本PJでの目標: 半人工CO<sub>2</sub>固定経路の導入により*Ralstonia*のCO<sub>2</sub>固定能を強化する
- \* 半人工CO<sub>2</sub>固定経路のデザイン・導入  
目的: *Ralstonia*に外来のCO<sub>2</sub>固定酵素などを導入し半人工CO<sub>2</sub>固定経路を機能させる  
成果: 4遺伝子の導入により機能する半人工CO<sub>2</sub>固定経路 (Em-rTCA回路) をデザイン  
経路導入株を作製し、半人工経路によるCO<sub>2</sub>固定を同位体実験により確認
- \* CO<sub>2</sub>固定酵素の機能強化  
目的: Em-rTCA経路における2種のCO<sub>2</sub>固定酵素を改変し経路全体を強化する  
成果: CO<sub>2</sub>固定酵素CCRを炭酸脱水素酵素と融合させることで低濃度CO<sub>2</sub>条件下での活性向上に成功  
CO<sub>2</sub>固定酵素PCCを異種微生物由来酵素とのドメイン融合型にすることで活性向上に成功



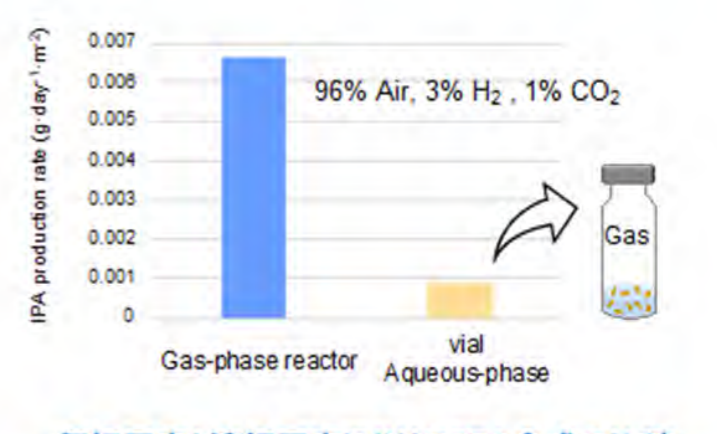
### 3. 気相反応リアクターの構築 (名大・阪大) 1

- 本PJでの目標: 気相反応バイオプロセスを確立し*Ralstonia*のCO<sub>2</sub>固定速度を向上させる
- \* バイオ-ガス拡散電極の開発  
目的: *Ralstonia*に電気・気体 (CO<sub>2</sub>)・液体 (栄養分) を供給可能な電極を開発  
成果: 燃料電池などに使用されているガス拡散電極をベースとしバイオ反応向けに改良  
多孔質層の樹脂・炭素粉末混合比の調整などにより適度なガス・液体拡散性を実現
- \* *Ralstonia*の電極付着性向上  
目的: 接着性繊維の導入により*Ralstonia*の電極付着性を向上させる  
成果: *Acinetobacter*由来の接着性繊維タンパク (Ata) の導入により*Ralstonia*の固体付着性を大幅に向上



### 3. 気相反応リアクターの構築 (名大・阪大) 2

- 本PJでの目標: 気相反応バイオプロセスを確立し*Ralstonia*のCO<sub>2</sub>固定速度を向上させる
- \* 気相反応リアクターの開発  
目的: *Ralstonia*に電気・気体 (CO<sub>2</sub>)・液体 (栄養分) を供給可能なリアクターを開発  
成果: 目的とする反応が可能リアクターをデザインし作製した
- \* 気相反応リアクターの優位性の実証  
目的: 気相反応リアクターにより*Ralstonia*のCO<sub>2</sub>固定速度を向上可能であることを実証  
成果: 水素とCO<sub>2</sub>からのイソプロパノール生産速度が液相反応と比較し大幅に向上可能であることが示された



## 1. ゲノム操作技術の開発 (産総研)

### ■ 背景:

*Ralstonia*はバイオポリマー生産菌としてよく研究されているが、本PJで必要となる大規模ゲノム操作技術は確立されていない

### ■ 本PJでの目標:

*Ralstonia*の長鎖DNA導入技術を含むゲノム操作基盤技術を構築する

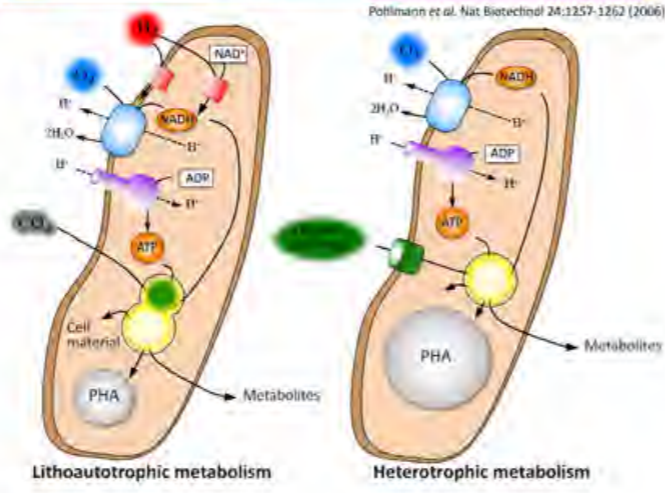
### ■ 研究開発内容:

- \* 大腸菌等で使用されている長鎖DNA操作ベクターの改良や、Cre-Loxシステム等の導入により数百kb相当の長鎖DNAの導入を実現
- \* 各遺伝子を適切量発現させるために必要なプロモーターライブラリを開発

### ■ 主な成果:

- ① *Ralstonia*長鎖DNA導入法の確立
- ② CO<sub>2</sub>固定条件における網羅的遺伝子発現解析
- ③ CO<sub>2</sub>固定条件で機能するプロモーターの特定

化学合成無機独立栄養細菌 *Ralstonia eutropha* H16株



## 1-①. 長鎖DNA導入法の開発

### \* 長鎖DNA操作法の検討



- ・酵母人工染色体YACをベースとし、*Ralstonia*で機能する長鎖DNA導入ベクターを開発 (数百キロ〜メガbpの長鎖DNAの導入が可能)
- ・エレクトロポレーションによるベクター導入法の検討
- ・制限酵素関連遺伝子の破壊株を作製 (組換え効率を50倍程度改善)

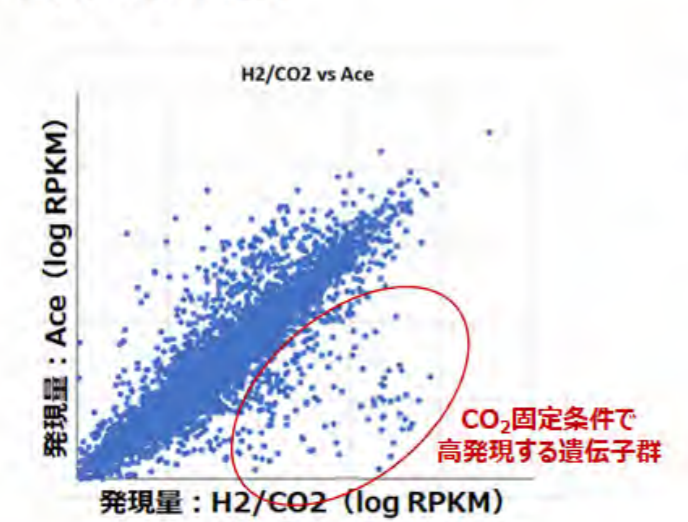
### \* 長鎖DNAのゲノム挿入法の確立



- ・Cre/LoxP法による効率的なゲノム挿入法を *Ralstonia*に初めて適用
- ・数十kbを超える長鎖DNAのゲノムへの挿入に成功
- ・最終的に使用する人工合成株を作製中

## 1-②. CO<sub>2</sub>固定条件での網羅的遺伝子発現解析

### \* CO<sub>2</sub>固定条件における網羅的遺伝子発現解析

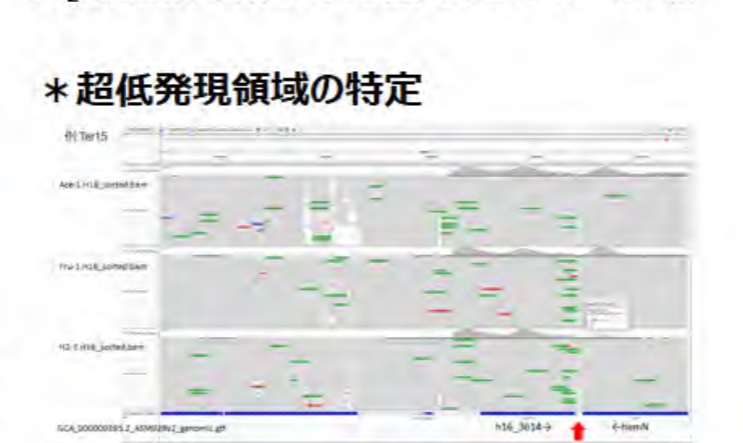


- ・CO<sub>2</sub>固定条件で有意に発現が上昇する遺伝子群を特定

### \* プロモーター候補の特定

発現量 (RPKM)	H2/CO2		Ace		Fold change		Chr_20cbb
	H2/CO2	Ace	Fru	H2/Ace	H2/Fru		
cbb_C2	7581	21	168	368	45		
hox_pla	2138	11	23	189	95		NAD-reducing hydrogenase
eelB_C2	647	5	18	125	35		三リン酸トランスポーター
ttt_C2	362	2	4	159	88		三リン酸トランスポーター

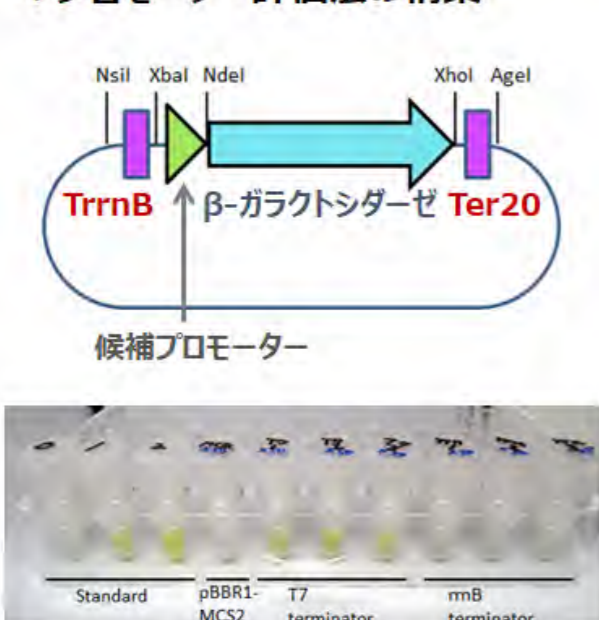
### \* CO<sub>2</sub>固定条件で特異的に発現するプロモーターの候補



- ・遺伝子発現を強力に止めるターミネーター、ゲノムへの遺伝子挿入時のターゲット領域を特定

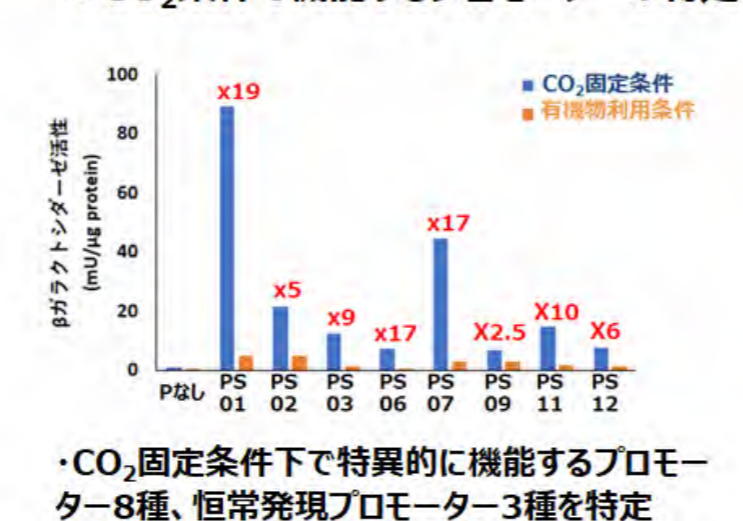
## 1-③. CO<sub>2</sub>固定条件で機能するプロモーター

### \* プロモーター評価法の構築



- ・比色法で簡単にプロモーター活性を定量できる評価系を構築

### \* CO<sub>2</sub>条件で機能するプロモーターの特定



- ・CO<sub>2</sub>固定条件下で特異的に機能するプロモーター8種、恒常発現プロモーター3種を特定

以上の成果を用いて電気利用能、高いCO<sub>2</sub>取込み・固定能、電極付着能を併せ持つ人工合成株を作製中

## 2. CO<sub>2</sub>取込み・濃縮能の付与 (神戸大)

### ■ 背景:

*Ralstonia*はRuBisCOを使用するカルビン・ベンソンサイクルによるCO<sub>2</sub>固定能を有しているが、その活性は低い

### ■ 本PJでの目標:

*Ralstonia*に異種微生物の無機炭素濃縮系を導入し、CO<sub>2</sub>取込み・濃縮能を付与する

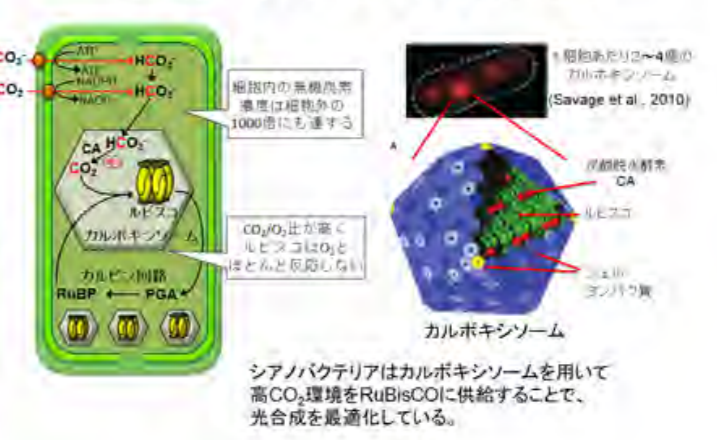
### ■ 研究開発内容:

- \* シアバクテリアなどで機能するCO<sub>2</sub>輸送タンパクなどを *Ralstonia*に導入し、無機炭素の取込み・細胞内濃縮能を付与する
- \* 内在、外来のRuBisCO高発現などにより大気CO<sub>2</sub>資源化能の強化を試みる

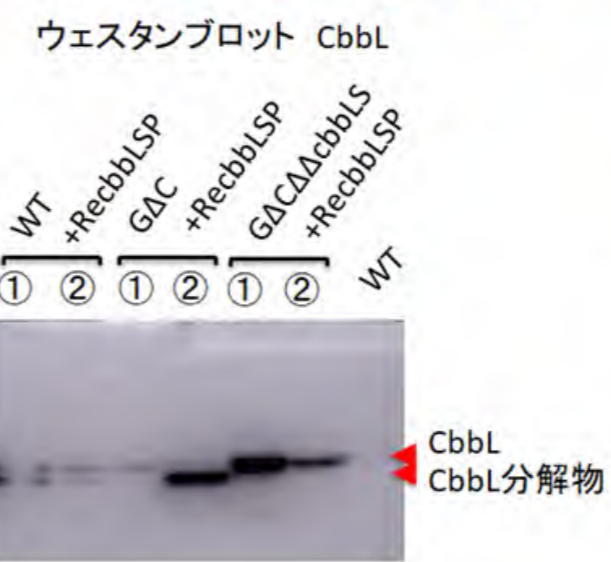
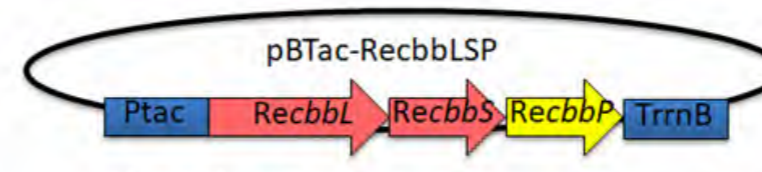
### ■ 主な成果:

- ① 内在性・外来性RuBisCOを高発現する *Ralstonia*株の作製
- ② RuBisCO高発現によるCO<sub>2</sub>固定活性向上を実証
- ③ 外来性炭酸塩輸送タンパクの発現

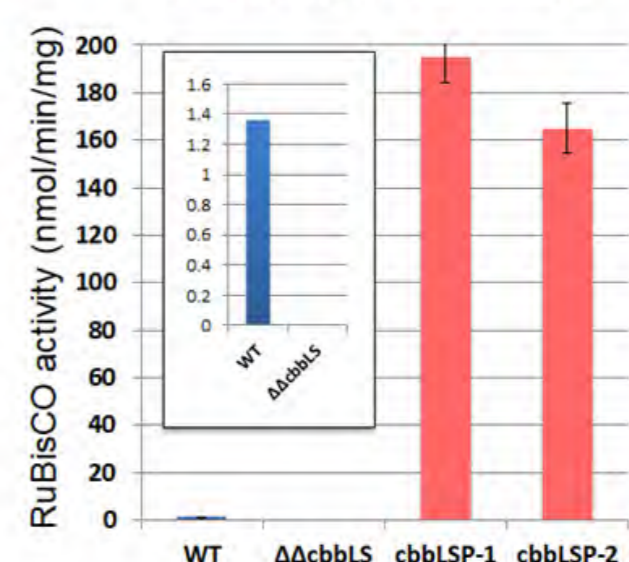
シアバクテリアの無機炭素濃縮系



## 2-①. RuBisCO高発現株の作製



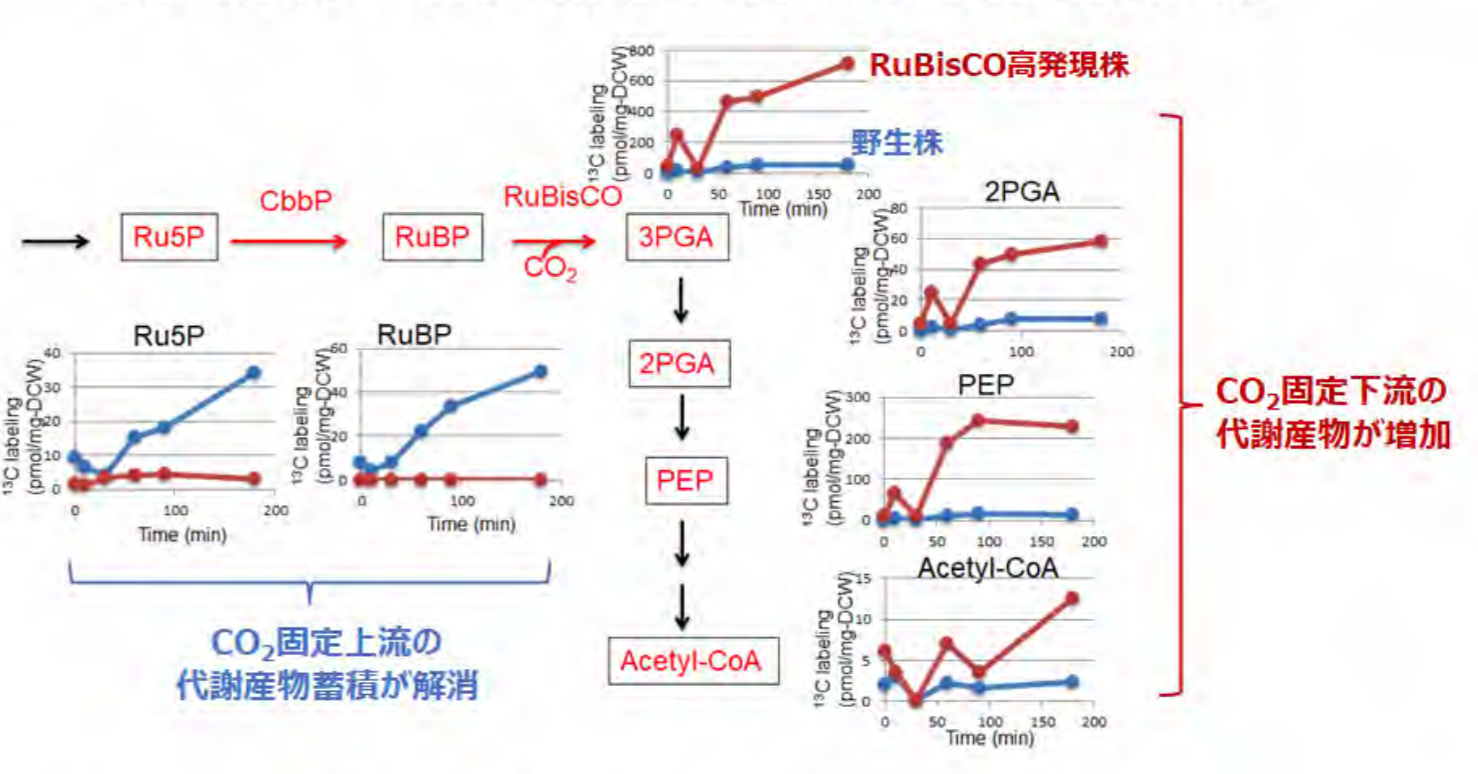
粗抽出液におけるRuBisCO活性



- \* 内在性RuBisCOの高発現によりCO<sub>2</sub>固定活性、生育が向上
- \* 活性の高い外来性RuBisCOについても実施中

## 2-②. RuBisCO高発現によるCO<sub>2</sub>固定活性向上

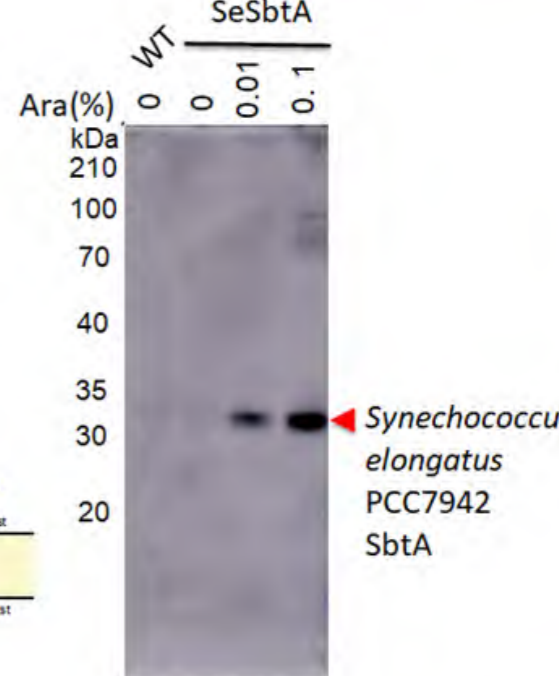
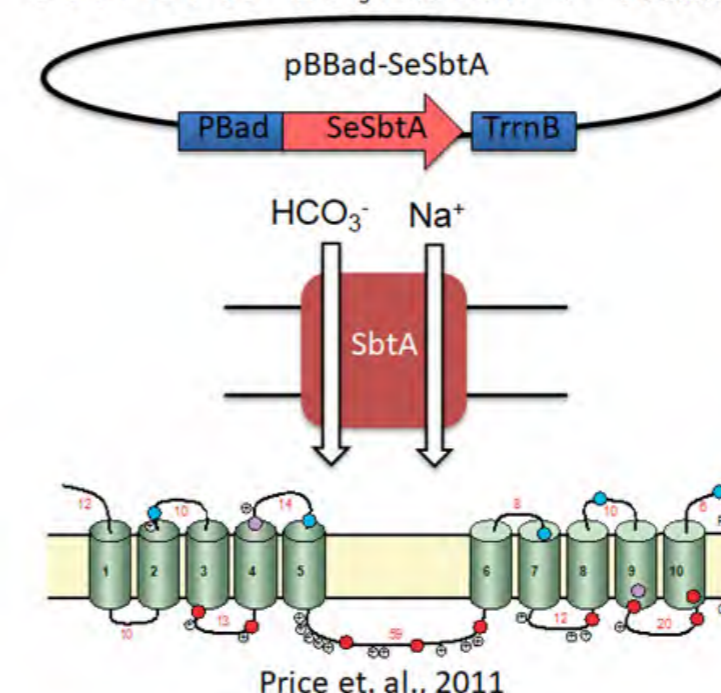
### ■ 動的メタボローム解析によるカルビンベンソンサイクル代謝産物量の測定



- \* 律速であったCO<sub>2</sub>固定反応が内在性RuBisCOの高発現により解消された

## 2-③. 外来性炭酸塩輸送タンパクの発現

シアバクテリア HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>トランスポーター発現系



- \* シアバクテリア由来の重炭酸塩輸送タンパクの *Ralstonia*での発現に成功
- \* CO<sub>2</sub>取込み能への影響を調査中

番号: A-7-3J

PJ: 電気エネルギーを利用し大気 CO2 を固定するバイオプロセスの研究開発

テーマ名: CO2固定能の強化及び電気利用能の付与

担当機関名: 東京工業大学

問合せ先: 藤島皓介 (fuji@elsi.jp)

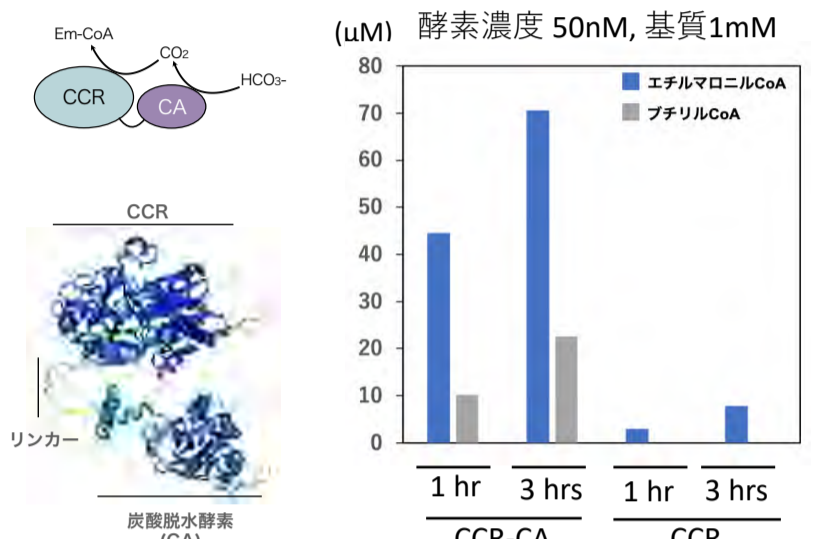


■本プロジェクトでの目標:

バイオプラスチックをはじめとする物質生産菌としてすでに注目・利用されている*Ralstonia eutropha* H16(*Reut*)をモデル微生物とし、本PJにおいて半人工合成経路としてエチルマロニルCoA回路構築に向けた遺伝子導入と回路の形成に不可欠な酵素CO2固定酵素の探索/強化を行う、また電気利用能を付与するために、鉄酸化細菌*Acidithiobacillus ferrooxidans*由来の電子伝達系に対応する一連の遺伝子を導入し、電気利用能の評価を行う。

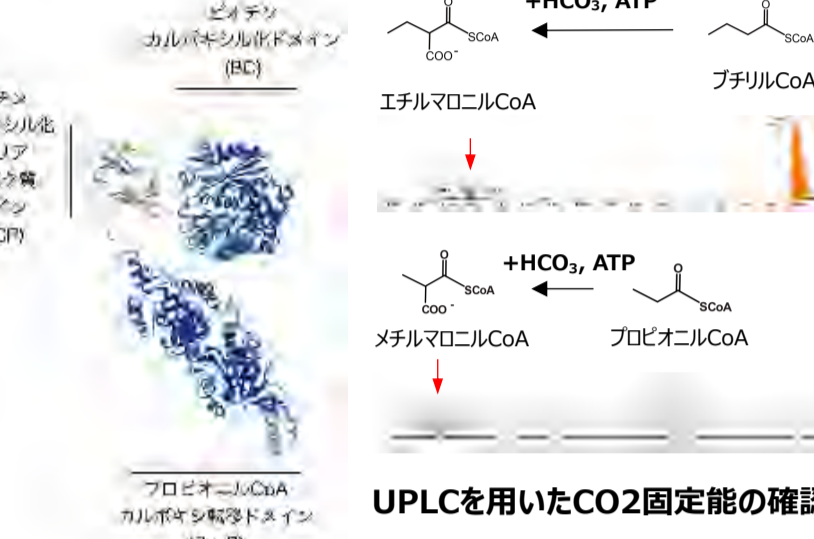
<CO2固定酵素の探索と強化>

*Methylorubrum*由来クロトニルCoAカルボキシラーゼ/タクターゼ(CCR)と珪藻由来の炭酸脱水素酵素(CA)の融合タンパク質の作成と活性評価



CCR-CA融合タンパク質 (CCR\_CA) 大気CO2下で天然のCCRよりも人工的に作成したCCR-CA融合タンパク質が高い活性を示した

*Rhodospseudomonas*由来ドメイン融合型のカルボキシラーゼ(LCC)を改変した人工プロピニルCoAカルボキシラーゼ(LCC\_PCCB)の作成及び代謝物の評価

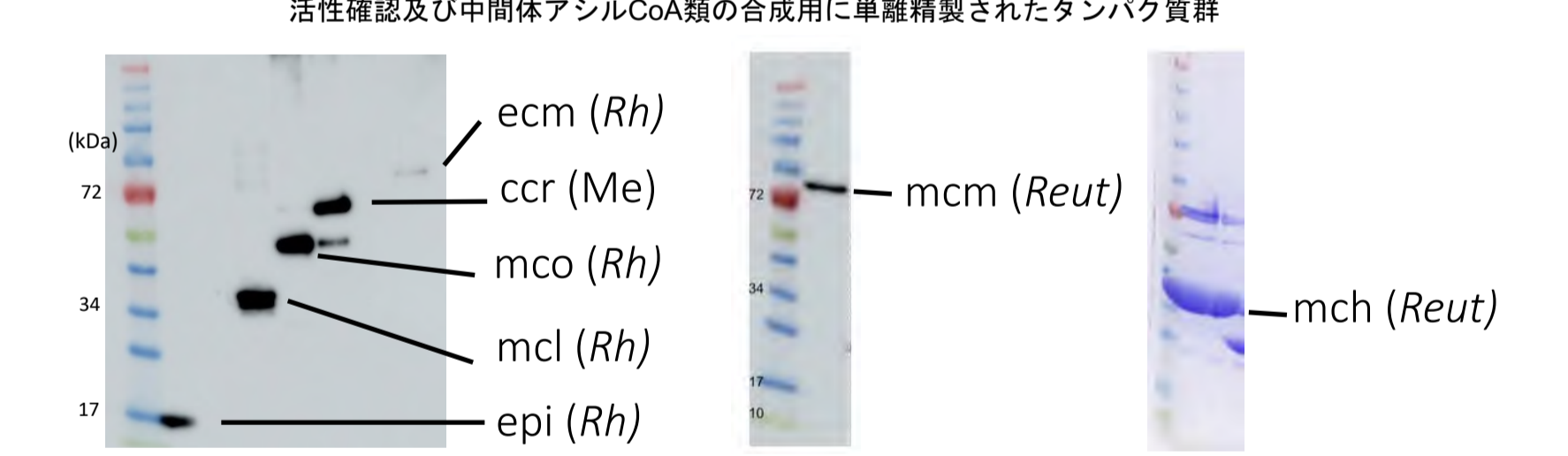
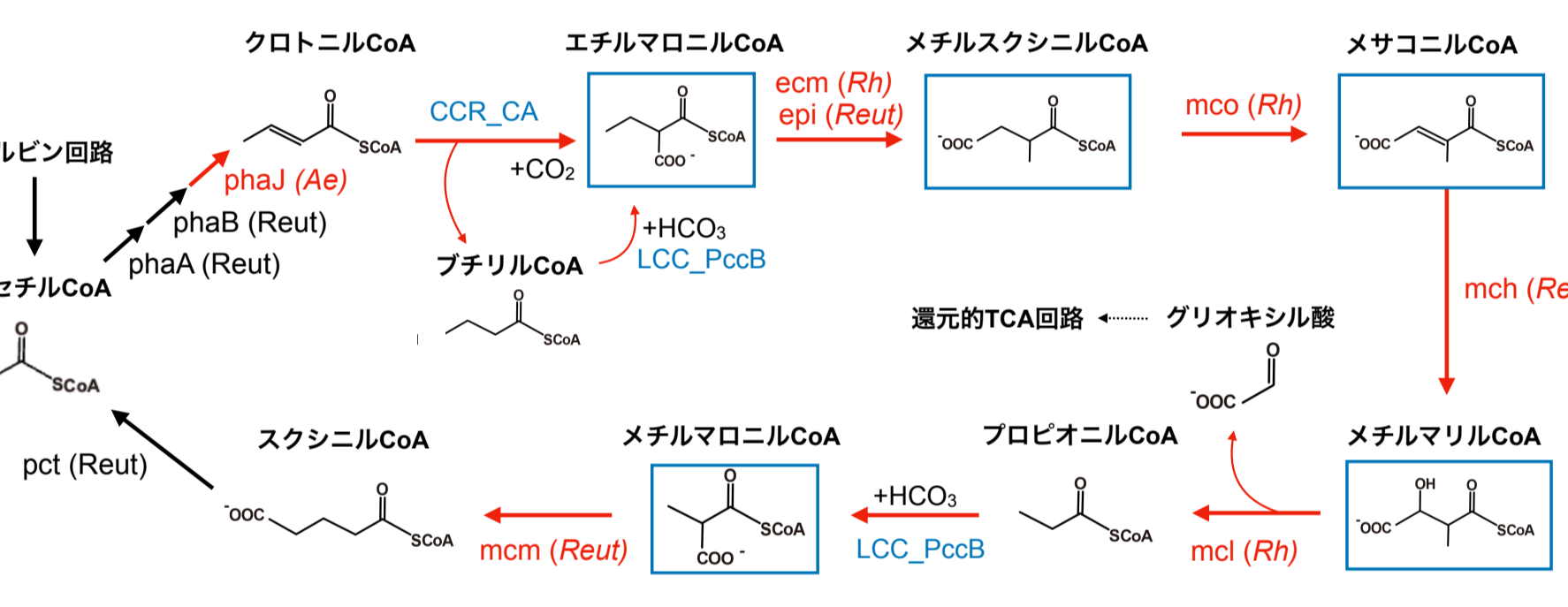


ドメイン融合型プロピニルCoAカルボキシラーゼ (LCC\_PCCB) LCC\_PCCBが半人工合成経路における2つのCO2固定反応に寄与することを確認

- 主な成果:
- CCR-CA融合タンパク質は低CO2濃度下で天然CCRよりも高い活性を持つことを確認した。
- 人工的にドメイン融合したカルボキシラーゼがCO2固定によりメチルマロニルCoA及びエチルマロニルCoAを合成できることを示した

<半人工CO2固定回路に寄与する酵素反応の試験管内検証及び中間体化合物の取得>

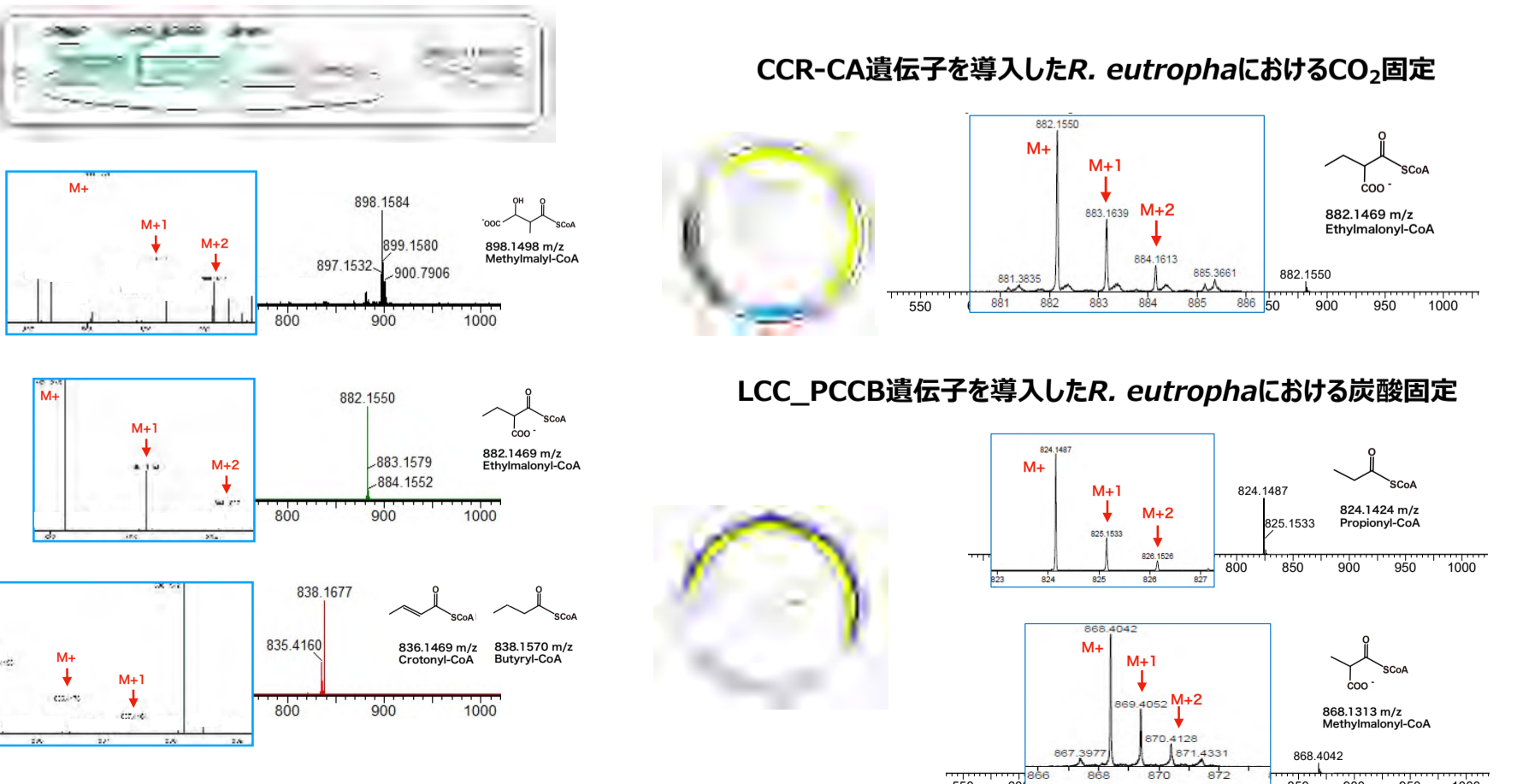
Legend for reaction types: blue box for LC-MS identified, red arrow for verified, green arrow for known, blue text for synthetic, red text for natural.



- 主な成果:
- 半人工合成回路におけるエチルマロニルCoA経路のうち、クロトニルCoAからスクシニルCoAに至る合計7反応を*Ralstonia*由来の酵素も含めて試験管内で反応が進むことを検証することに成功した。
- その過程で産業的に合成が困難な非売品の中間体アシル-CoA化合物を5種類合成・分取に成功した。

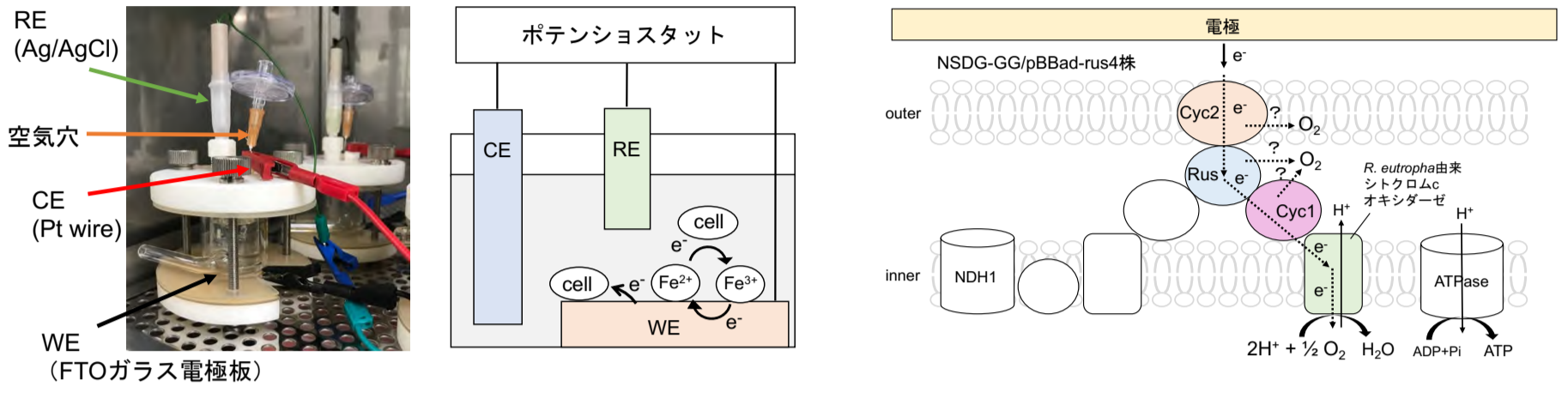
<エチルマロニルCoA回路関連遺伝子の導入と代謝解析>

Em-CoA回路に関連した4遺伝子を導入した*R. eutropha*における代謝物分析

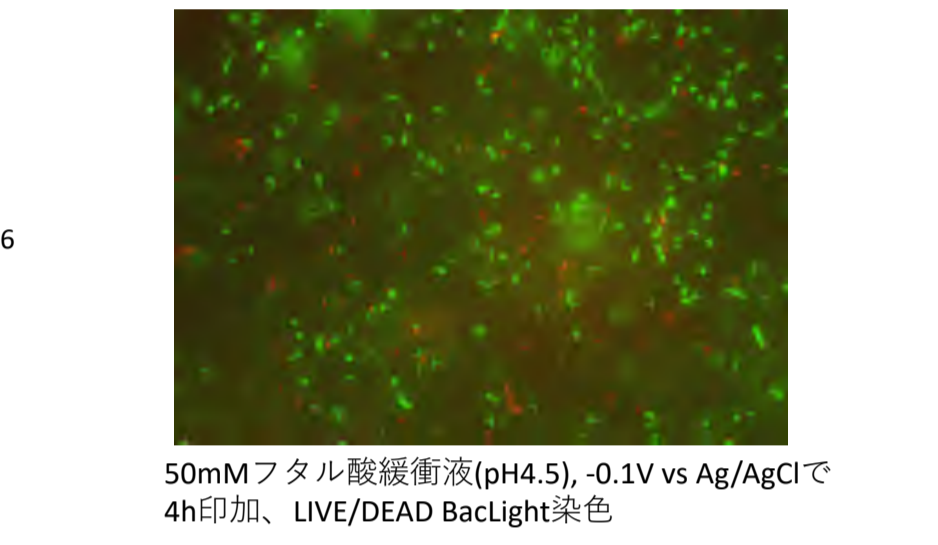
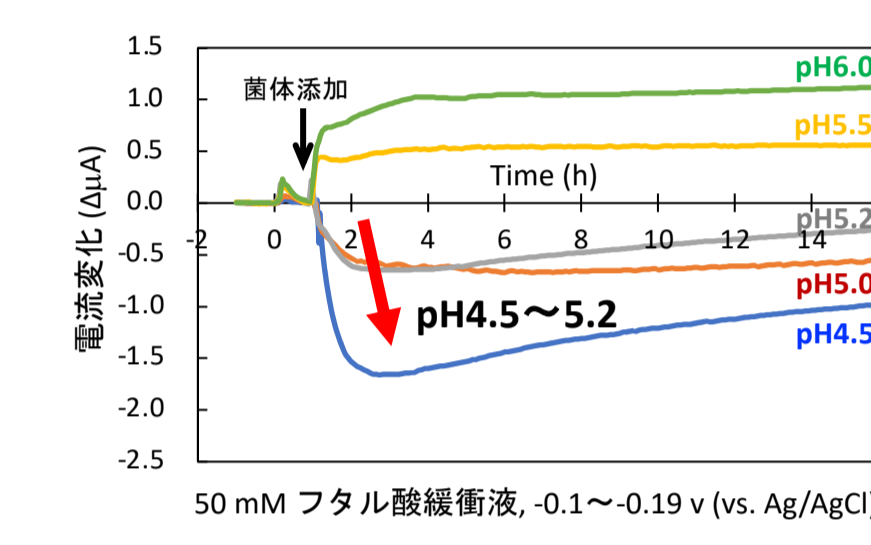


- 主な成果:
- ccr, ecm, mco, mclの計4つの遺伝子及び、本PJで作成した人工酵素(CCR-CA, LCC\_PCCB)をそれぞれ導入した*R. eutropha*株を準備し、炭素同位体(C13)ラベルした炭酸塩を培養時に加えたところ、LC-MSにより細胞抽出液中から同位体ラベルされたEm-CoA回路に関連したアシルCoA化合物(M+1, M+2)を同定した。

<Ralstonia電子伝達系導入株の作製と電気化学測定>

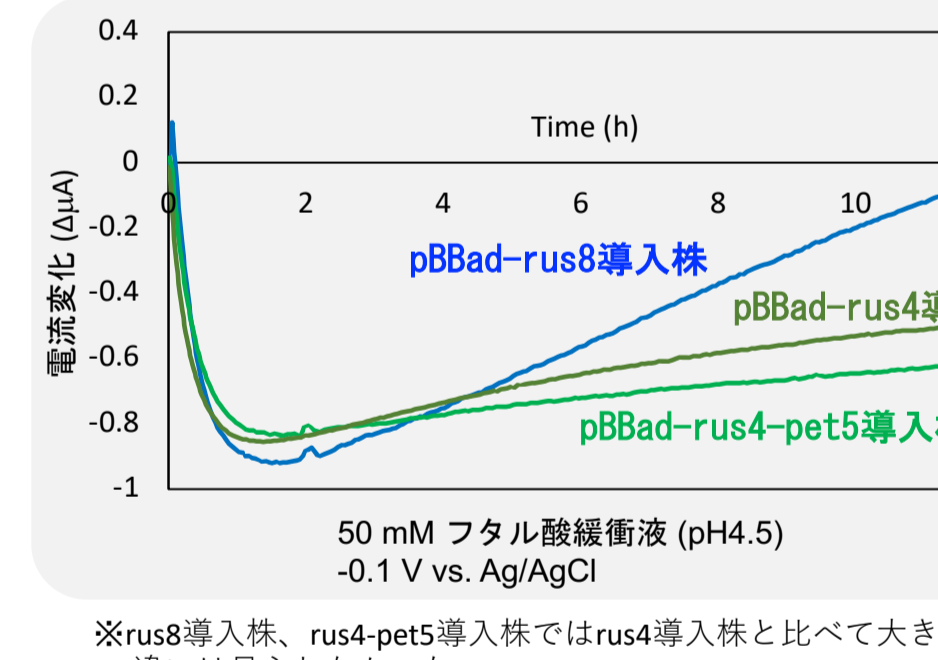
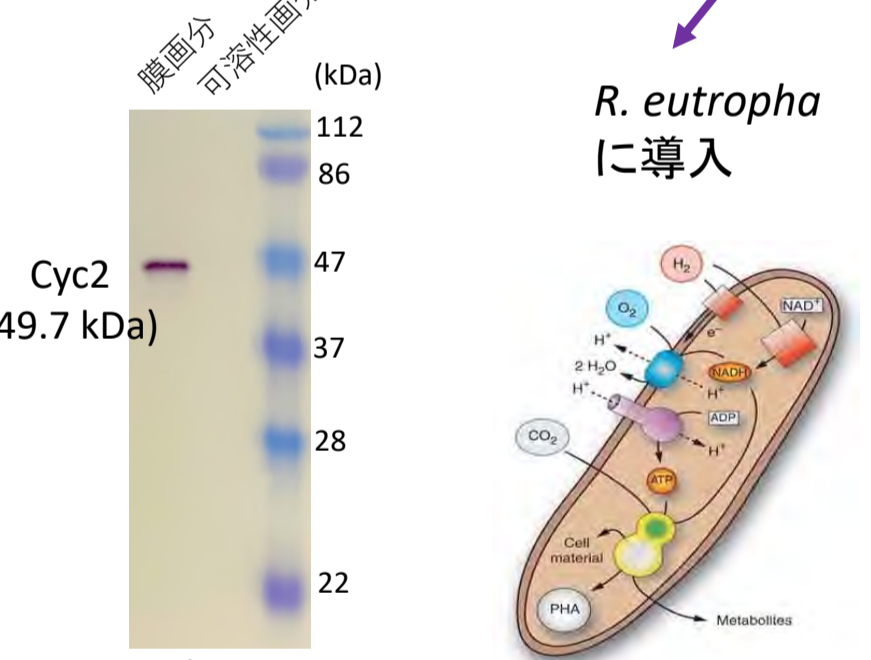
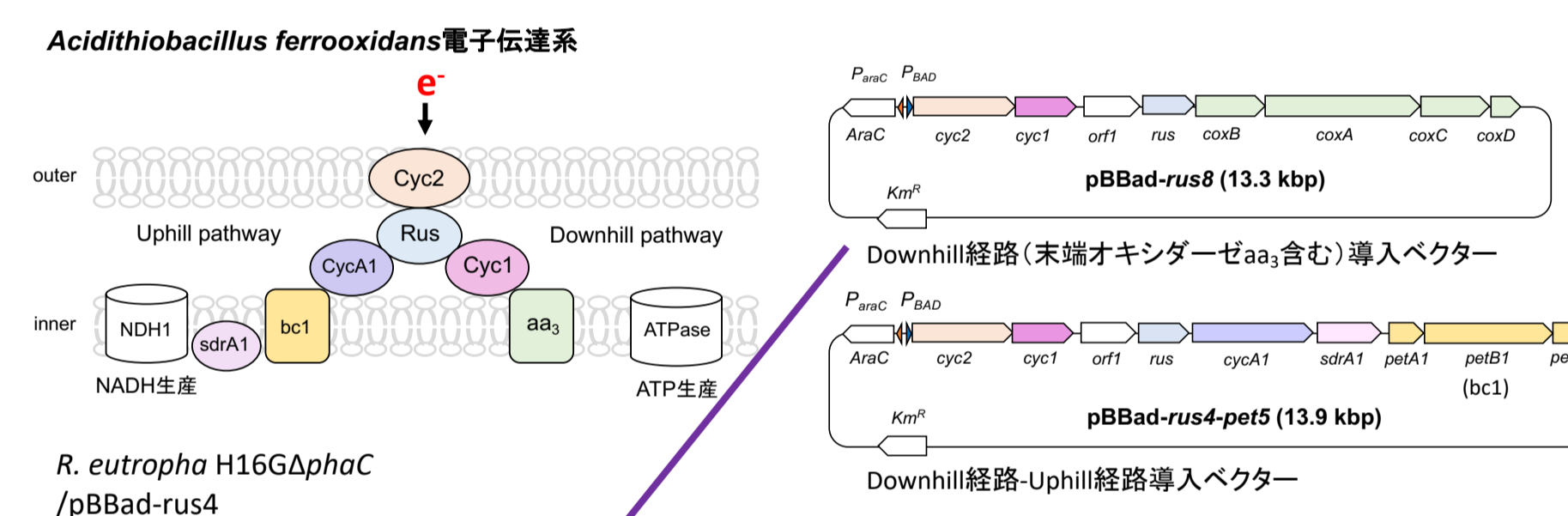


電子伝達系導入株 (pBBad-rus4導入株)



- フタル酸緩衝液pH4.5条件 (生存の細胞多数) におけるカソード電流を検出

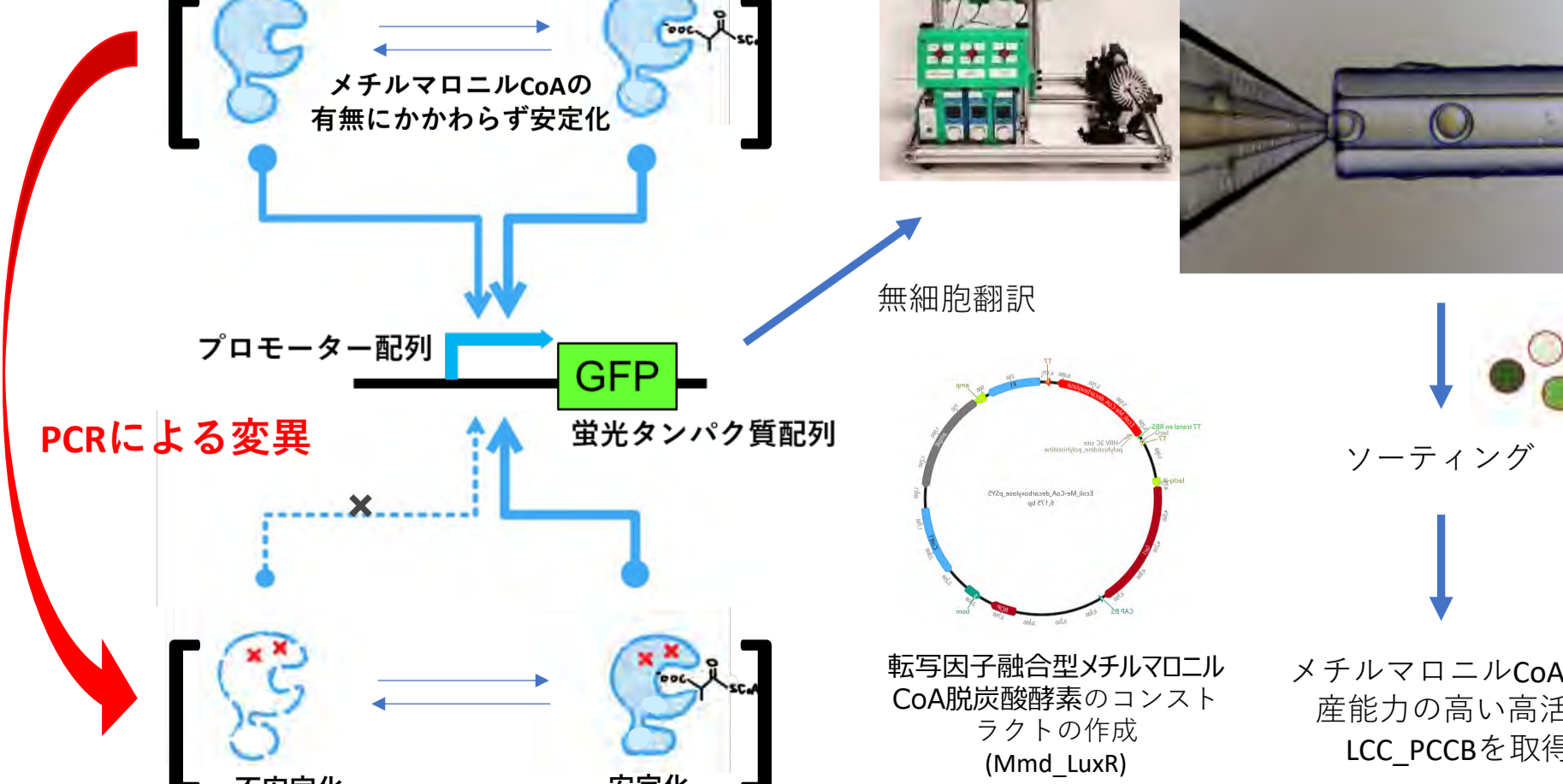
<鉄酸化細菌由来の電子伝達系遺伝子群を導入したRalstoniaの電気化学測定>



- 誘導性発現ベクターの作製と導入、qRT-PCRおよびウェスタンブロットングによるCyc2発現の確認

<高活性LCC\_PCCBの取得に向けたタンパク質センサーの開発>

メチルマロニルCoAをセンシングするタンパク質センサー(mmd\_LuxR)のスクリーニング

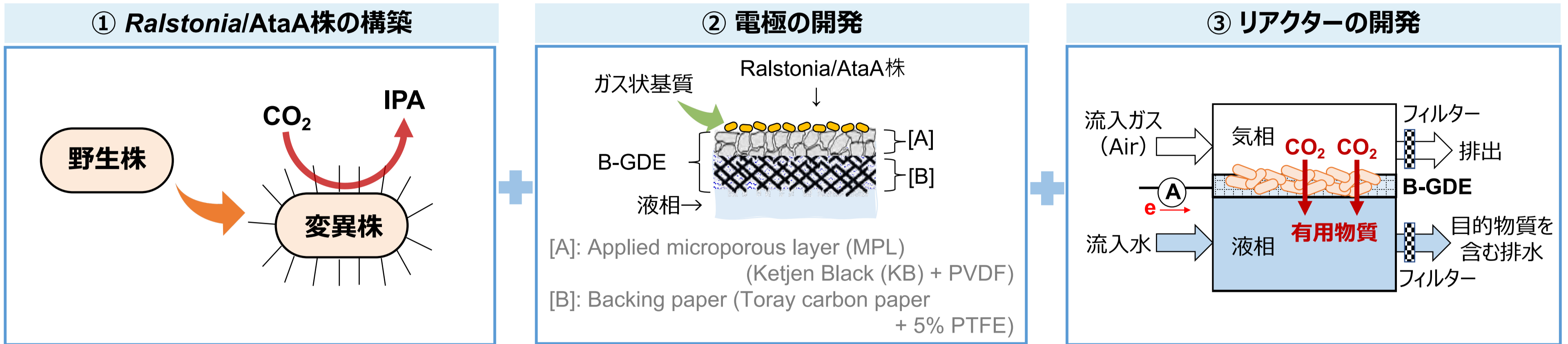


- LCC\_PCCBの基質であるエチルマロニルCoAが存在下でのみ構造安定化する転写因子融合型メチルマロニルCoA脱炭酸酵素をデザインし、コンストラクトを作成した。

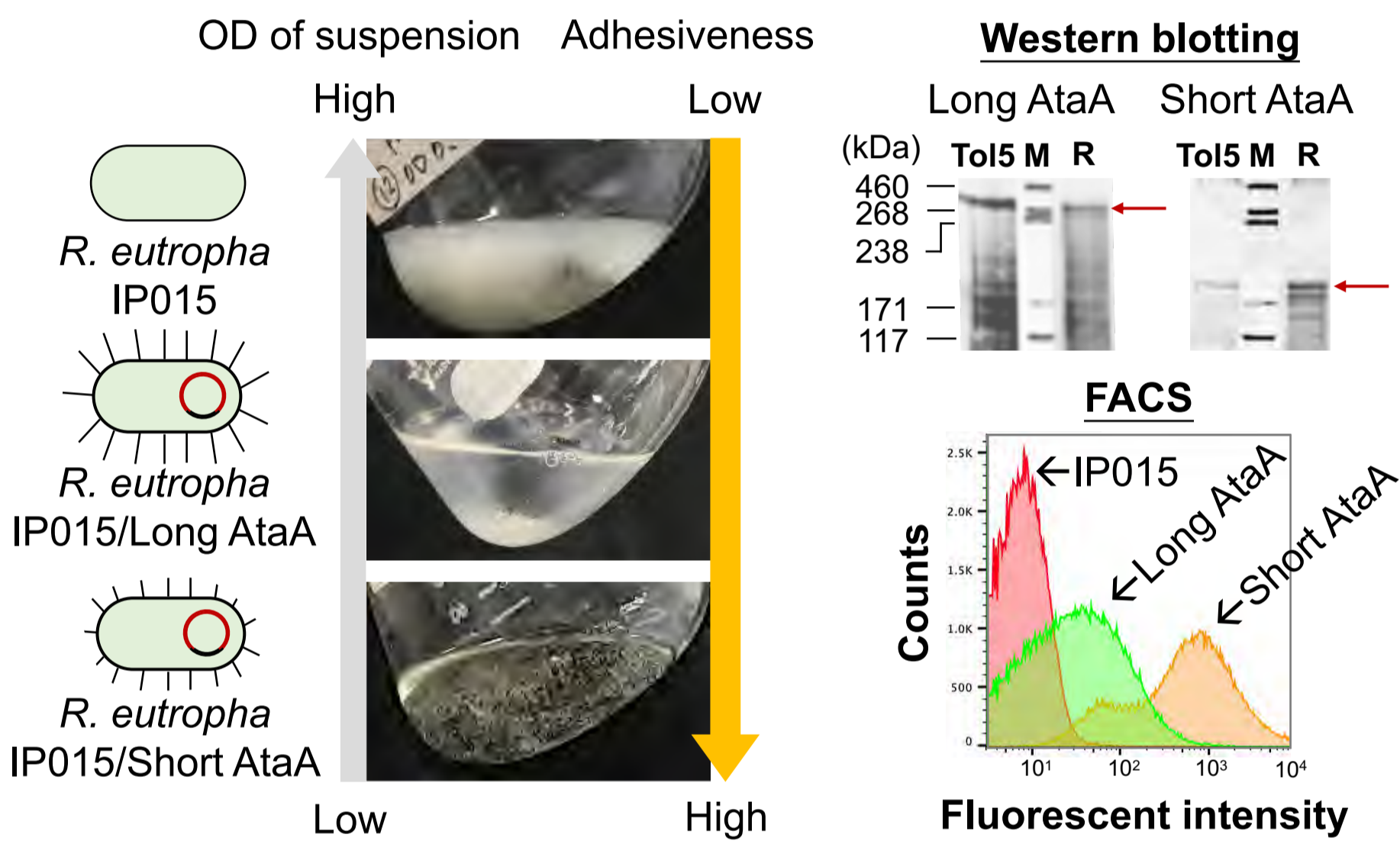


## プロジェクトの目的

気相バイオリアクターとガス拡散電極の融合技術による *Ralstonia* を用いた CO<sub>2</sub> 固定化効率の向上



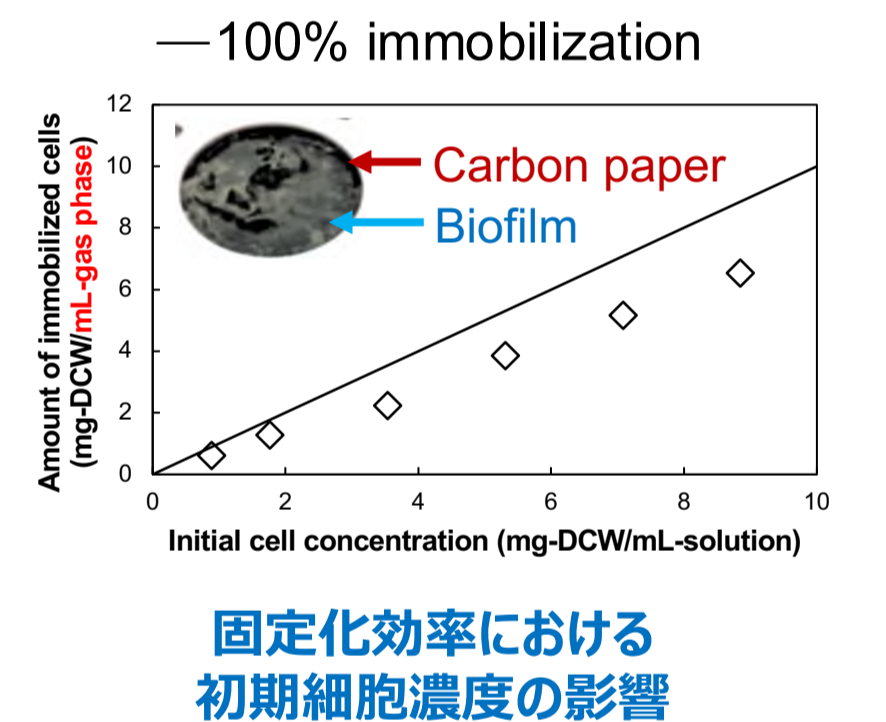
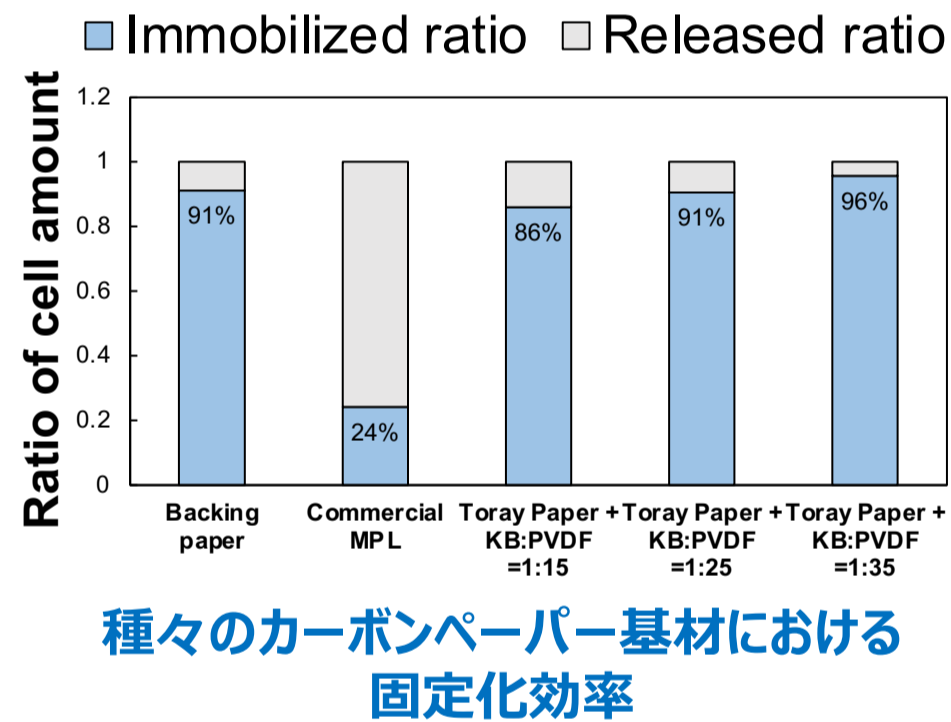
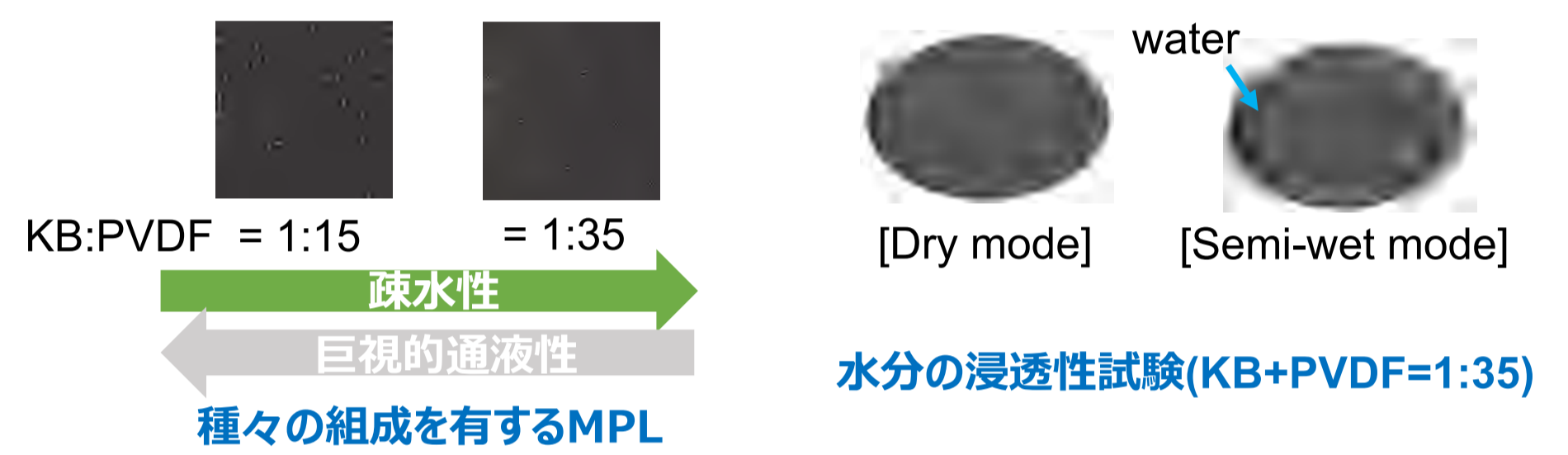
### 高い付着性を持つ *Ralstonia* 変異株の構築



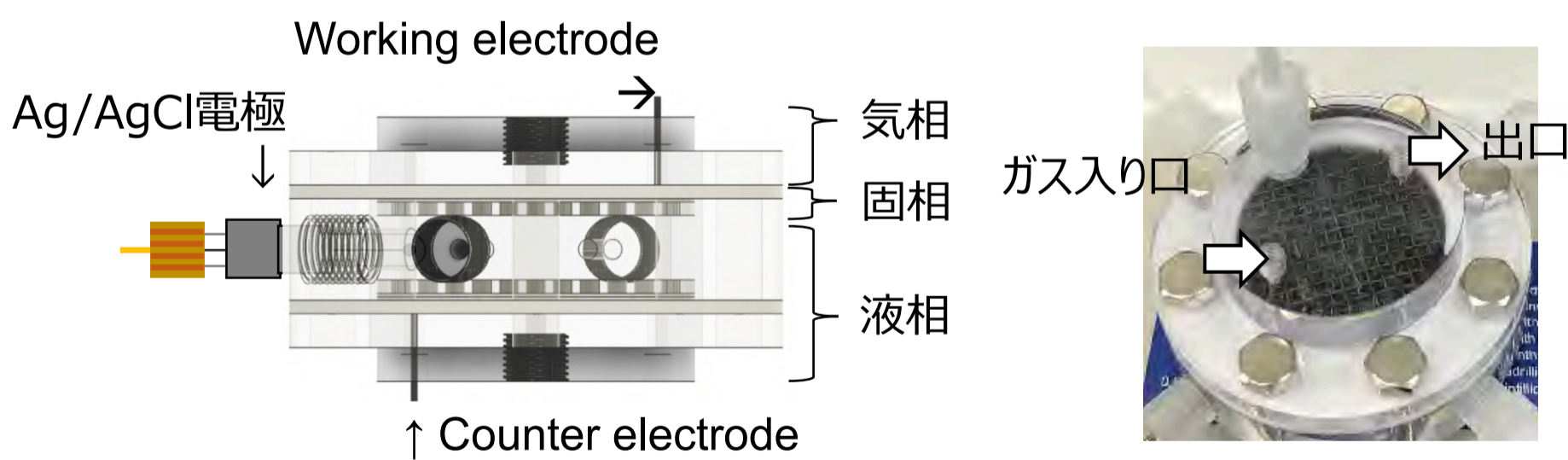
AtaA, a trimeric autotransporter adhesin from *Acinetobacter* sp. Tol 5

	Fiber length (nm)	Fiber size (kDa)	Vector
Long AtaA	Full-length (FL)	261	pBBad
Short AtaA	40% of FL	100	pBBad

### 細胞固定化に向けた電極の開発

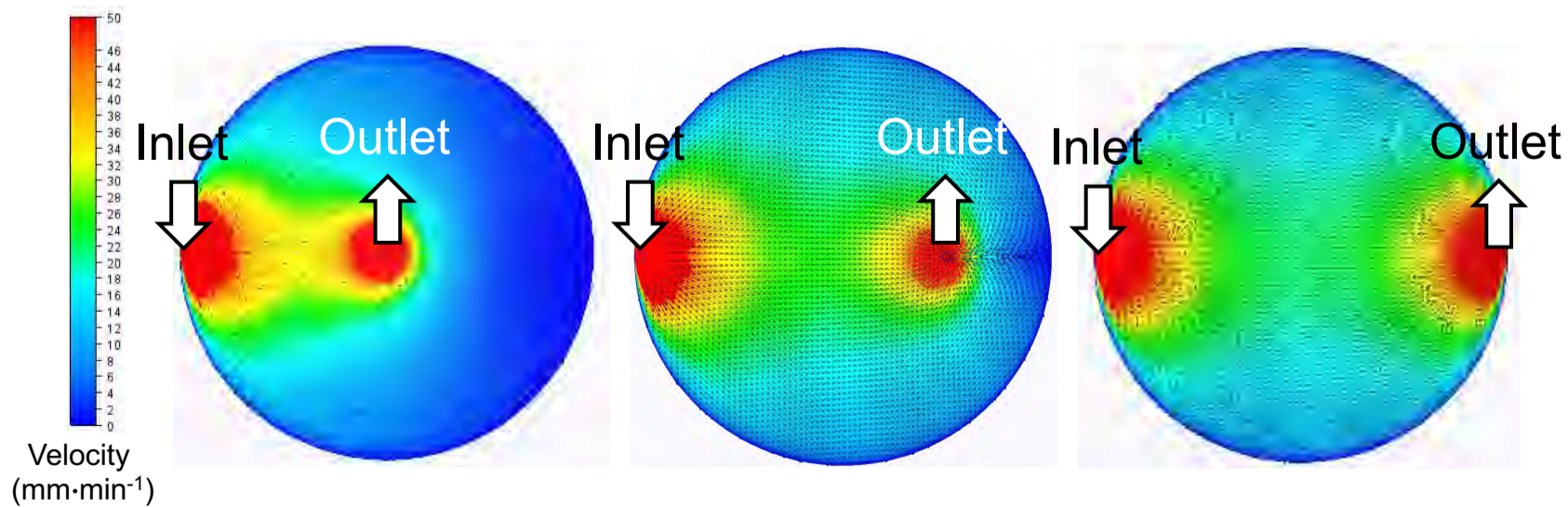


### CO<sub>2</sub> バイオ変換に向けたリアクターの開発



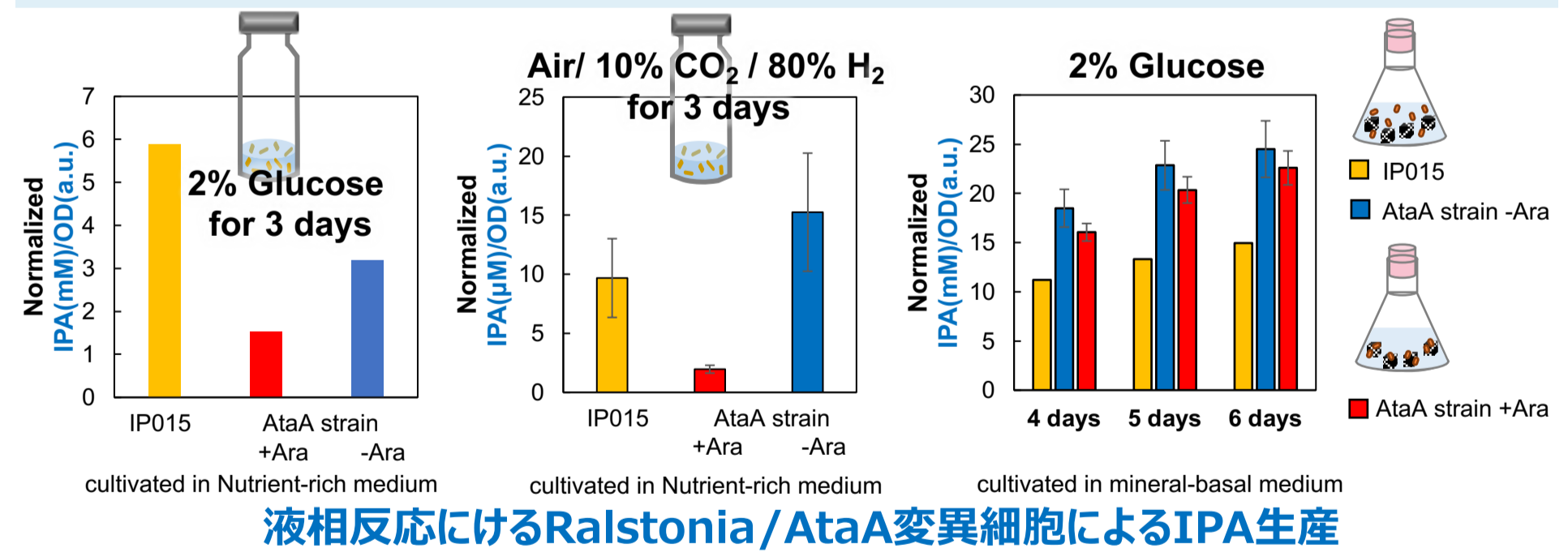
### 気相バイオリアクターの構成

### 実際に用いるリアクター

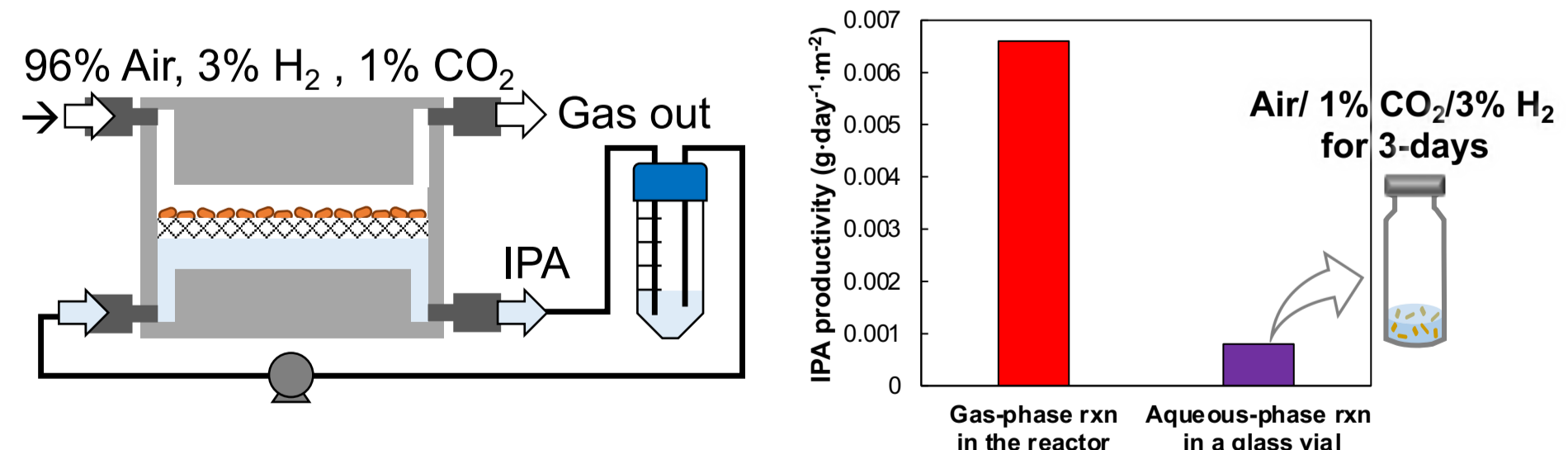


数値流体力学計算によるガスチャンバー内のガス流動パターンの一様分布におけるガスの流入/流出位置の最適化

### *Ralstonia* / AtaA株によるIPA生産



### 液相反応における *Ralstonia* / AtaA 変異細胞による IPA 生産



気相反応と液相反応における IPA 生産効率の比較

## Conclusion

1. *Ralstonia eutropha* IP015 細胞表面における高付着性を保持した Short AtaA ファイバーの発現に成功した。
2. 修飾された MPL の層によって最適化された B-GDE は水の浸透制御に対する機能性を示し、かつ細胞の固定化量を向上させた。
3. 1% の CO<sub>2</sub> と 3% の H<sub>2</sub> を含む大気中で液相反応と比較してより高い IPA の生産を示した。