



Lactic acid and glycogen production from cyanobacteria by metabolic engineering and Utilization of cyanobacterial glycogen for ethanol production

ANCY JOSEPH

(Degree)

博士（学術）

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6077号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006077>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



Dissertation Abstract

Name: ANCY JOSEPH

Department: CHEMICAL SCIENCE AND ENGINEERING

Dissertation Title (If written in a foreign language, provide a Japanese translation as well.)

Lactic acid and glycogen production from cyanobacteria by metabolic engineering and utilization of cyanobacterial glycogen for ethanol production

代謝改変によるシアノバクテリアからの乳酸・グリコーゲン生産およびシアノバクテリアのグリコーゲンからのエタノール生産

Academic Supervisor: Akihiko Kondo

Increase in atmospheric carbon dioxide and global warming has attracted attention towards use of photosynthetic organisms that derive energy from carbon dioxide. Cyanobacteria (blue-green algae) are especially attractive because their photosynthetic and biomass production rates are higher than terrestrial plants, they do not require arable land, and can grow with minimal nutrient requirements, utilizing atmospheric carbon dioxide and sunlight. In addition, as cyanobacteria are prokaryotes, their metabolic processes are more readily amenable to genetic modifications designed to enhance the production of energy-rich compounds than those of eukaryotic algae. Cyanobacteria possess relatively small genomes, many of which have been sequenced. Thus, compared with eukaryotic algae, it is less complicated to utilize cyanobacteria in systems biology research.

To date, of all cyanobacteria, *Synechocystis* Sp. PCC 6803 is the best-characterized species for genetic engineering, due to its naturally transformability, and with its genome sequenced. In 1st chapter PCC 6803 was genetically modified for the production of lactic acid. Here, we engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803 to produce lactic acid using a lactate dehydrogenase (*ldh*) gene from different lactic acid-producing bacteria, namely, *Lactococcus lactis* (*ldhB* and *ldhX*), *Lactobacillus plantarum* (*ldhL* and *ldh*), and *Lactobacillus rhamnosus* (*ldhL*). Following the introduction of *lactate dehydrogenase* gene, its expression was confirmed in all strains by reverse transcription-PCR. Growths of mutant strains were not influenced by introduction of *ldh* genes. Lactic acid production varied from 0.03 to 0.04 mM concentration. In order to secrete the lactic acid produced inside the cell a lactate transporter gene (*lldp*) from *L. plantarum* was introduced to mutants harboring *ldh* gene. Co-expression of *lldp* with *ldhB* from *L. plantarum* or *ldhL* from *L. rhamnosus* led to the secretion of lactic acid into the medium with concentration of 0.17 ± 0.02 or 0.14 ± 0.02 mM after 18 days cultivation.

Cyanobacteria tend to accumulate carbohydrates during change in cultivation conditions or due to environmental factors. A broad understanding of primary metabolism is necessary to manipulate electron flux towards these products for bioenergy applications. In Chapter 2, therefore, we decided to investigate the mechanism for storing glycogen in cyanobacteria. Previous studies have shown that in PCC 6803 nitrogen depletion leads to accumulation of glycogen. 2-Oxoglutarate acts as a signalling pathway for nitrogen depletion.

A response regulator protein Rre37 acts as a regulatory protein for sugar catabolism, but its role in glycogen accumulation is still unknown. Therefore, methods are proposed to clarify the role of Rre37 using a Rre37 disrupted strain by metabolomic analysis and gene expression studies. In Rre37 disrupted strain, delay in accumulation of 2-oxoglutarate and glycogen was found under nitrogen depleted condition compared with wild type strain. Expression of sugar genes *glgC* (glycogen synthase) and *glgA* (glucose-1-phosphate adenylyltransferase) involved in glycogen accumulation (sugar anabolism) was reduced in *rre37* disrupted strain, from this it revealed that Rre37 controls the expression of sugar anabolic genes. In addition *icd* (isocitrate dehydrogenase) genes that are involved in the generation of 2-oxoglutarate, and *glnA* genes involved in GS-GOGAT system (glutamate-ammonia ligase), *gltB* gene (NADH-dependent glutamate synthase expression large subunit), *gltD* gene (NADH-dependent glutamate synthase small subunit) was reduced. It's known that *icd* and *glnA* are under the control of NtcA promoters, Low upregulation of *ntcA* gene have lead to reduction in *icd* and *glnA* gene regulation. However, NtcA promoter for *gltB* and *gltD* genes, related to the GOGAT system, has not been found. Therefore; Rre37 might play an important role in regulatory mechanism on expression of *gltB* and *gltD* during nitrogen starvation.

In metabolic analysis, metabolites in glycolytic pathway such as fructose -6-phosphate, 1, 6 bisphosphate fructose, glyceraldehyde 3 -phosphate were reduced by Rre37 disrupted strain compared with the wild strain, thus supports that Rre37 is related to the regulation of gene sugar catabolism. TCA cycle metabolites play a role as carbon sink under nitrogen starved condition. All the metabolites of the TCA cycle except citrate increased during nitrogen depletion in the wildtype strain, whereas oxaloacetate, fumarate, succinate, aconitate, and 2-OG decreased in Rre37 disrupted strain. From above findings we conclude that 1) Rre37 positively regulated glycogen anabolic genes, thereby accumulating glycogen. 2) Rre37 positively regulated sugar catabolism, and was involved in 2-OG accumulation. 3) Rre37 urged accumulation of TCA cycle metabolites such as malate, fumarate, and succinate. Here we showed that Rre37 is also involved in the regulation of nitrogen metabolism, and therefore, future studies could extend the roles of Rre37 into areas other than sugar metabolism in this cyanobacterium.

In Chapter 3, we tried to enhance the biomass and glycogen production by disruption of antenna protein. Photosynthetic efficiency is directly related to the size of light-harvesting antenna complexes and in response to light intensity antenna size is optimized. At high light intensities, the rate of photon absorption by the chlorophyll antenna molecules in the surface layer of microalgal and cyanobacterial cells in cultures or pond environments exceeds the rate of photosynthetic reactions, resulting in the dissipation or loss of excess photons and/or photoinhibition of photosynthesis. Minimizing, or truncating, the chlorophyll antenna size of the photosystems can improve photosynthetic solar energy conversion efficiency and productivity up to 3-fold. *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain has an antenna protein called phycobilisomes; it is possible to reduce the antenna protein by disrupting the *ApcE* protein that is part of a linker protein connected to the thylakoid membrane. The impact of disruption of *apcE* gene on biomass and glycogen accumulation has not yet been analysed. *ApcE* disrupted mutants were constructed and were cultivated under photoautotrophic conditions. Absorption spectra analysis showed a large reduction in phycobilisome. Biomass production of *apcE* gene-disrupted strain, was almost double (1.24 g-cell-dry weight/L) than that of wild type strain (0.75 g-cell-dry weight/L). In addition, glycogen content also increased from 11.1% of the wild-type strain, to 24.2% in *apcE* gene-disrupted strain. Thus, under photoautotrophic conditions, absorbed CO₂ would be utilized by the *apcE* gene-disrupted strain for cell growth, rather than the production of phycobilisomes. Together, these results demonstrate that antenna truncation by deleting the *apcE* gene was effective for increasing biomass production and glycogen accumulation under photoautotrophic conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

In chapter, 4 we investigated direct ethanol production from cyanobacterium *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using lysozyme and a recombinant amylase-expressing yeast strain to eliminate the need for biomass pretreatment and amylase hydrolysis. *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* is an attractive feedstock for biorefinery due to its highest growth rate and tolerance to high pH and salt. During environmental stress or change in cultivation conditions *Spirulina* tend to produce large amounts of α -polyglucan in the form of glycogen. Under nitrogen reduced conditions (3mM NaNO₃) it was found that glycogen content is increased up to 60.9%. Here we tried to utilize this glycogen directly from spirulina without any pretreatment by using a recombinant amylase-expressing yeast *S.*

(Name: Ancy Joseph NO.4)

cerevisiae strain, secreting α -amylase from *Streptococcus bovis* and displaying glucoamylase from *Rhizopus oryzae* on the cell surface was used for the direct production of ethanol. By using recominant yeast the ethanol production was 2.2 g/ L. Addition of lysozyme to the fermentation media with recominant yeast enhanced the ethanol production to 6.5 g / L. The total ethanol yield based glycogen consumption was 86% of theoretical yield, which to our knowledge, is the highest yield of bioethanol from an oxygenic photosynthetic microorganism.

Consolidating all the above we were able to construct mutants of PCC 6803 that can utilize atmospheric carbon dioxide for the production of building blocks for biochemical and biofuel. The knowledge of metabolic analysis and genetic engineering will open new paths for utilization of cyanobacteria for further usefull chemicals. A consolidated methodology for the production of ethanol from cyanobacterial glycogen would be economical and will reduce cost of production. This study gave useful implications for energy production using carbon dioxide

氏名	Ancy Joseph		
論文 題目	Lactic acid and glycogen production from cyanobacteria by metabolic engineering and utilization of cyanobacterial glycogen for ethanol production 代謝改変によるシアノバクテリアからの乳酸・グリコーゲン生産およびシアノバクテリアのグリコーゲンからのエタノール生産		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	近藤 昭彦
	副 査	教授	西野 孝
	副 査	教授	山地 秀樹
	副 査	准教授	田中 勉
要 旨			
大気中二酸化炭素濃度の増加とともに温暖化が進行している現状において、藍藻（シアノバクテリア）を利用して二酸化炭素よりエネルギーを得る技術が注目されている。これは、1）藍藻が光と簡単な栄養源のみを必要として二酸化炭素を吸収して生育できる性質を有している、2）作物と比べて藍藻の光合成効率は高く、かつ生育速度が速く耕作地を必要としない、事に起因している。本研究では・藍藻から有用エネルギーを生産する事、・藍藻の代謝についてメタボロミクス（代謝学）の観点から知見を得る事、を目的とした。 まず代表的な藍藻である<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803株を使用して、バイオプラスチックの原料である乳酸を生成する事を目的とした。<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803株はゲノムが解読されており、遺伝子改変が可能であるために使用した。乳酸を高効率に生成する細菌として乳酸菌が知られているが、乳酸菌の遺伝子を<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803株に用いた知見は得られていなかった。そこで乳酸菌<i>Lactobacillus lactis</i>や<i>Lactobacillus rhamnosus</i>由来のlactate dehydrogenase遺伝子(<i>ldhB</i>および<i>ldhL</i>)を初めて使用して<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803株に導入した後に、これらの遺伝子が発現している事を逆転写PCRにより確認した。これらの変異株および野生株の比増殖速度は0.03~0.04時間であり、生育には影響していない事を確認した。また、0.04mMの乳酸が<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803株内に生成している事も確認した。菌体内に生成した乳酸を菌体外に出すために<i>Lactobacillus plantarum</i>のトランスポーター遺伝子(<i>lldp</i>)を同時に導入した。その結果、二酸化炭素より<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803の変異株を使用して、18日の培養後に培地中に0.14~0.17mMのL-乳酸を生成する事に生成した。 藍藻そのものの自体や、藍藻中に蓄積するグリコーゲンを、バイオリファイナリー基質としてエネルギー物質を生成する事が可能である。そこで、藍藻のグリコーゲンを蓄積する機構を調べる事とした。<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803株において明らかにされてきたように窒素欠乏時にグリコーゲン蓄積が促される事は多くの藍藻で共通している。同時に2-オキソグルタル酸が蓄積し、2-オキソグルタル酸を介して様々な因子が関与して窒素欠乏シグナルが伝達される事が知られている。それらの因子の中でもRre37と呼ばれるタンパク質は、<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803において糖異化の働きを持つ遺伝子群を活性化する事以外の役割については明らかとなっていない。そこで、Rre37破壊株を使用して代謝学的知見を利用してRre37の役割を明らかにする事を目的とした。Rre37破壊株では窒素欠乏時に見られるグリコーゲンおよび2-オキソグルタル酸の蓄積が失われていた。グリコーゲンの蓄積に関与しているグリコーゲン同化遺伝子<i>glgA</i>(glycogen synthase)および<i>glgC</i>(glucose-1-phosphate adenylyltransferase)の発現が低下していた。以上の結果よりRre37がグリコーゲン同化遺伝子の発現を促す事によりグリコーゲンの蓄積に関与している事が明らかとなった。また、2-オキソグルタル酸の生成に関与している<i>icd</i>遺伝子(isocitrate dehydrogenase)や2-オキソグルタル酸からのGS-GOGATシステムに関与する<i>glnA</i>遺伝子(glutamate-ammonia ligase)、<i>gltB</i>遺伝子(NADH-dependent glutamate synthase large subunit)、<i>gltD</i>遺伝子(NADH-dependent glutamate synthase small subunit)の発現が低下していた。<i>icd</i>および<i>glnA</i>遺伝子は転写因子NtcAにより制御されている事が知られているが、<i>gltB</i>および<i>gltD</i>遺伝子のNtcAプロモータは発見されておらず、Rre37がGS-GOGATシステムの制御に関与している可能性が示唆され、今後の知見の蓄積が待たれる。代謝学的解析により解糖系にお			

氏名	Ancy Joseph
いてフルクトース 6 リン酸、フルクトース 1,6 ビスリン酸、グリセルアルデヒド 3 リン酸の蓄積が野生株と比べて Rre37 破壊株で減少しており、Rre37 が糖異化の遺伝子の制御に関連している事を裏付ける結果となった。さらに TCA サイクル関連の代謝物であるオキサロ酢酸、フマル酸、コハク酸、アコニット酸の蓄積も Rre37 破壊株で失われていた。TCA サイクル関連の代謝物は窒素欠乏時に炭素源としての役割を果たす事が知られており、Rre37 が TCA サイクル関連の代謝物の蓄積に関与している事が示唆された。以上の結果より窒素欠乏時の <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 株における Rre37 の新規の役割として 1) グリコーゲン同化遺伝子を正に制御してグリコーゲン蓄積を促している、2) 糖異化を正に制御して 2-オキソグルタル酸の蓄積を促している、3) TCA サイクル関連の代謝物の蓄積に関与している、事が明らかにされた。	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 株の生育を増加させ、さらにグリコーゲンの蓄積を増加させる事が望まれている。一方、緑藻においてアンテナタンパク質を破壊する事により生育を増加させた知見が存在していた。アンテナタンパク質は光を過剰に利用するため表層の菌体の生育が促進される結果、深層の菌体の生育を抑制して全体の増殖を抑制してしまう。<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 株はフィコビリソームと呼ばれるアンテナタンパク質を有しているが、チラコイド膜に接続させるリンカータンパク質の一部である ApcE タンパク質を破壊する事によりアンテナタンパク質を減少させる事が可能である。しかし、その生育やグリコーゲン蓄積への影響に関しては不明であったため、これを明らかにする事を目的とした。大気で 12 日間培養した結果、野生株では 0.75 g-cell-dry weight/L であったが、<i>apcE</i> 遺伝子破壊株では 1.24 g-cell-dry weight に増加していた。倍化時間は野生株と <i>apcE</i> 遺伝子破壊株で、それぞれ 21.3 および 24.9 時間と変わらなかったが最大の菌体密度が増加している事が明らかとなった。また、グリコーゲン含量も野生株の 11.1% から、<i>apcE</i> 遺伝子破壊株では 24.2% に増加していた。<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 株は窒素欠乏時にグリコーゲンを蓄積すると同時に窒素分の多いアンテナタンパク質を分解する事が知られており、アンテナタンパク質の破壊はグリコーゲン蓄積にも有効である事が明らかとなった。	
最後に耐塩性を有する <i>Arthrospira</i>(<i>Spirulina</i>) <i>platensis</i> 中のグリコーゲンを基質として藍藻から直接のエタノール生成を試みた。<i>A. platensis</i> は細胞壁が弱くグリコーゲンの抽出が容易であるために使用した。グリコーゲンを蓄積する培養条件を検討した結果、3mM NaNO₃ と比較的に窒素分の低い条件にてグリコーゲン含有率が 60.9% にまで増加する事を見出した。<i>A. platensis</i> を直接、アミラーゼ表層提示酵母に供したところ、エタノール生成量は 2.2 g/L と芳しいものではなかった。そこで、さらにリゾチームを加えた結果、6.5 g/L のエタノールを生成する事に成功した。この時のグリコーゲンからのエタノール生成効率は 86% に達しており、緑藻中グリコーゲンからの最も高いエタノール生成効率を達成する事に成功した。	
本研究は、藍藻（シアノバクテリア）について、生理学的解析手法を用いて代謝プロセスを研究したものであり、乳酸・グリコーゲンの蓄積について重要な知見を得た。さらに、遺伝子工学的手法を用いてバイオリファインリーのための原料として利用できる事を示し、二酸化炭素を利用したエネルギー生産に対して価値ある知見を集積した。提出された論文は工学研究科学論文評価基準を満たしており、学位申請者 Ancy Joseph は、博士（学術）の学位を得る資格があると認める。	