

「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による  
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」  
平成23年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告
----------------

久堀 徹

東京工業大学・資源化学研究所・教授

ハイパーシアノバクテリアの光合成を利用した含窒素化合物生産技術の開発

## §1. 研究実施体制

### (1) 久堀グループ

- ① 研究代表者: 久堀 徹 (東京工業大学資源化学研究所、教授)
- ② 研究項目
  - ・ATP 生産効率の向上
  - ・成長速度の向上
  - ・シアノバクテリアによる含窒素化合物の生産(原グループと共同)

### (2) 原グループ

- ① 主たる共同研究者: 原 亨和 (東京工業大学ソリューション研究機構、教授)
- ② 研究項目
  - ・シアノバクテリアによる含窒素化合物生成条件の確立
  - ・含窒素化合物回収触媒の開発
  - ・含窒素化合物回収技術の構築

## §2. 研究実施内容

本年度は、含窒素化合物の生産に有効なハイパーシアノバクテリアを作成することを目指して、これに関連する遺伝子改変、変異タンパク質の生化学的な解析を実施した。また、すでにシアノバクテリア実験室株の培養液にアミノ酸合成経路の阻害剤を添加することによって実現している含窒素化合物の培養液への放出について、環境条件およびその回収条件を検討した。

### ① ATP 生産効率の向上(久堀グループ)

光合成生物の ATP 合成酵素の制御については、ここ数年でその分子機構を解明するのに必要なさまざまな基本情報が蓄積してきた。平成 24 年度は、ATP 合成酵素の回転軸部分が 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなる特徴的な構造であることに着目し、この部分に人為的に構造変化を導入することによる活性制御について研究を実施した。その結果、2 本の  $\alpha$ -ヘリックスの互いの相対的な位置をさまざまな位置で化学的に固定することによって、多くの場合、酵素の加水分解活性を 10 倍以上上昇させることに成功した。この変異による活性の生化学的な解析から、この活性上昇がこの酵素の特徴的な阻害様式である ADP 阻害(生産物阻害)を回避することで誘導されることが明らかになった<sup>1)</sup>。また、カビが生産する環状テトラペプチドの作用による本酵素の阻害と活性化の分子機構についても解析を行い、酵素分子あたり環状テトラペプチド分子 1 個の結合で完全な阻害が起こり、3 個の結合によって活性化が起こることを明らかにした(第 54 回日本植物生理学会年会発表)。これまで蓄積してきた活性制御可能な変異を細胞内の ATP 合成酵素に導入することによって ATP 合成効率をどの程度変化させることが出来るのかが、今後の課題である。合わせて、現在開発中の細胞内 ATP 量の変化を効率的にモニターする実験系を完成させ、ランダム変異によって細胞内 ATP 量が増加する株の取得も目指している。

### ② 光エネルギー利用効率の向上(久堀グループ)

光エネルギー利用効率の向上としては、強光耐性の付与を初期の目標として研究を実施している。光合成生物の強光耐性を強化するために、光エネルギーを捕捉するシステムの量と機能の制御、および、細胞内に発生する活性酸素種の抑制に重要なレドックスシステムの機能強化が重要であり、光合成微生物のレドックス制御機構の基礎研究も実施した。光エネルギーを捕捉するシステムの量と機能の制御については、変異株の調製を行っている。また、レドックス制御機構の基礎研究では、炭酸同化系の 2 番目の酵素であるホスホグリセレートキナーゼがチオレドキシンの制御を受ける酵素であることを生化学的に明らかにした<sup>2)</sup>(第 54 回日本植物生理学会年会発表)。強光ストレス・酸化ストレスに対する耐性付与については、関連タンパク質因子の過剰発現による機能強化を試みている。

### ③ ヘテロシスト形成能力の向上(久堀グループ・原グループ共同)

レドックス制御の改変による強光などへの耐性の向上を目指した研究から派生して、特定のチオレドキシンを破壊した *Anabaena* 株が、窒素飢餓条件移行後 48 時間でヘテロシスト形成に関して極めて特徴的な表現型を示すことを見いだした(第 54 回日本植物生理学会年会発表)。この形質は、還元剤存在下では誘導されないことから、細胞内のレドックス状態と密接に関わっていることが明らかになった。そこで、細胞内還元力の維持とヘテロシスト形成の関連性、および、ヘテロシスト細胞の機能向上について、どのような因子が有効かを現在調べている。

④ 遺伝子改変による含窒素化合物の生産(久堀グループ・原グループ共同)

窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 株に含窒素化合物を生産させることを目指して、標的とする酵素の活性中心への変異導入、標的酵素の遺伝子プロモータ領域を標的とした発現量制限を実施した。これらの研究により、前者では色素形成に異常をもった変異株が得られた。後者の方法では、標的酵素の発現量を 50%程度まで抑制することに成功した。また、標的酵素の抑制因子を高発現させて標的酵素の機能を抑制する方法についても、研究を進めている。

⑤ 藻類培養液からの含窒素化合物回収技術の確立(原グループ)

野生型シアノバクテリアによる光合成依存の含窒素化合物生産、および、培地中に放出される含窒素化合物を回収技術の確立を目的として研究を推進した。

まず、野生型シアノバクテリアに代謝系酵素特異的阻害剤(X)を添加することによって、野生型シアノバクテリアによる含窒素化合物生産の可能性を検討した。Xの添加量が少ない場合、当該シアノバクテリアは光照射下で生産した含窒素化合物を培地に放出することはなく、時間と共にバクテリアの個体数が増加することが確認された。Xの添加量が増加するにつれて時間に対するバクテリアの増加率が低下し、培地に放出される含窒素化合物量が増加した。最適量の添加では120時間以上にわたって含窒素化合物が定常的に培地に放出された。この時の量子収率(630 nm)は1%を越えることが明らかになった。120時間を越えるとバクテリアは急速に増加するため、含窒素化合物の放出は観察されなかった。なお、Xの添加量が最適量を上回るにつれて、死滅するバクテリアが多くなり、培地中への含窒素化合物の放出が低下した。

また、本研究では、シアノバクテリアが放出した含窒素化合物を高効率で回収・分離する新プロセスを開発した。このプロセスの要として、当該グループが見出した水中機能固体ルイス酸触媒Zの可能性を検討した。Zは豊富に存在する安価な資源から容易に合成でき、溶媒に不溶な固体材料であり、その表面には水中で塩基と結合できるルイス酸点が高密度に存在する。最適以上のZは、シアノバクテリアが上記最適条件で水中に放出する含窒素化合物全てを迅速に(30分以内)吸着することを見出した。さらに、Zが吸着した含窒素化合物は、常温の水中に炭酸ガスを吹き込むことによって簡単にZから遊離することが確認された。以上の結果は、Zを使うことにより、シアノバクテリアが水中に放出した含窒素化合物を高効率・低エネルギー消費で分離・回収できることを示している。さらにZの性能を高めるため、その形態をナノチューブとして再構築した材料の開発に成功した<sup>3)</sup>。Zはルイス酸点しか持たないが、当該材料はZと同量のルイス酸点をもつだけでなく、ルイス酸点と同量のブレンステッド酸点をもつことが明らかになった。ブレンステッド酸点もアンモニアを吸着できるため、当該材料はZの2倍量のアンモニアを吸着できることが予想される。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表)

##### ●論文詳細情報

1. Ei-Ichiro Sunamura, Hiroki Konno, Mari Imashimizu, Mari Mochimaru, Toru Hisabori, “A conformational change of the  $\alpha$  subunit indirectly regulates the activity of cyanobacterial  $F_1$ -ATPase”, *J. Biol. Chem.* vol. 287, No.46, pp.38695-38704, 2012 (doi:10.1074/jbc.M112.395053)
2. Yu Tsukamoto, Yuko Fukushima, Satoshi Hara, Toru Hisabori, T. “Redox control of the activity of phosphoglycerate kinase in *Synechocystis* sp. PCC6803”, *Plant Cell Physiol.* vol. 54. No. 4, pp.484-491, 2013 (doi: 10.1093/pcp/pct002)
3. Masaaki Kitano, Emiko Wada, Kiyotaka Nakajima, Shigenobu Hayashi, Souichi Miyazaki, Hisayoshi Kobayashi, and Michikazu Hara “Protonated titanate nanotubes with Lewis and Brønsted acidity: Relationship between nanotube structure and catalytic activity”, *Chem. Mater.*, 2013, 25 (3), pp 385–393 (DOI: 10.1021/cm303324b)