「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

H25 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. 研究実施の概要

本研究では、含窒素化合物の生産工場として働くことの出来るハイパーシアノバクテリアを創出し、大気中の窒素を固定し培地中に含窒素化合物として放出させる技術、および、放出された窒素化合物を触媒によって効率よく回収する技術を確立することにより、光合成をベースとした含窒素化合物の工業生産への道を拓くことを目指している。昨年度に引き続き、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株を樹立することを目指して、変異株の取得を行った。また、レドックスおよび ATP 合成の代謝過程の生化学的な解析、および、細胞内代謝過程のモニター系の確立を行った。さらに、含窒素化合物を含む培養液からの回収技術の開発を行った。

(1)シアノバクテリアによる含窒素化合物の生産と生産性の向上を目指して(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、回転軸であるγサブユニットをN 末端側とC 末端側の二つのユニットに分断することにより、加水分解活性が数倍から数十倍に上昇することを新たに見いだした。この変異、および、昨年度までに見いだした ATP 合成酵素の活性を変化させることの出来る制御機構の複数の変異を、それぞれシアノバクテリアに導入し、細胞レベルで ATP 生産に影響が見られるか否かを検証している。また、この制御機構の解析をさらに進めるツールとして開発されたアゾ基を導入した ATP アナログを用いて、ATP 合成酵素の光制御に成功した。

レドックス制御については、細胞内レドックス制御のキープレイヤーであるチオレドキシンの生化学的性質に焦点を絞って研究を行い、標的酵素との相互作用の速度論的解析により、なぜ還元型チオレドキシンが特異的に標的を認識できるのかに関する基本原理を見いだした。さらに、チオレドキシンの標的認識能力を包括的に理解するために、様々な生物種での標的タンパク質の網羅的解析も行った。細胞内において、還元力授受に重要なチオール基の動態、および、細胞内の酸化還元状態を把握するために、新規チオール修飾化合物の合成と新規蛍光タンパク質の開発に成功した。

シアノバクテリアを用いた含窒素化合物生産を実現するためのシアノバクテリアの改変については、昨年度に引き続きニトロゲナーゼの下流の酵素の発現抑制、その酵素の活性中心への変異導入、ランダム変異などの戦略を用いて目的とする含窒素化合物高生産株の取得を行った。その結果、通常生育条件で自立的に目的化合物を培地に放出する株の取得に成功した。また、ヘテロシスト内部でチオレドキシンが供給する還元力が窒素固定の鍵酵素であるニトロゲナーゼの生合成に重要な役割を果たしていることを見いだした。

(2)シアノバクテリアによる含窒素化合物生成条件の確立(原グループ)

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の可能性を詳細に検討した。豊富で安価なZは、シアノバクテリアの培地中の含窒素化合物でさえ、効率的に吸着することが明らかになった。さらにZが吸着した含窒素化合物は、特定の条件で簡単に遊離でき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。

§3. 成果発表等

（3－2） 原著論文発表

論文詳細情報（国際）

1. Sunamura EI, Kamei T, Konno H, Tamaoki N, Hisabori T.
   Reversible control of F_1-ATPase rotational motion using a photochromic ATP analog at the single molecule level.
   Biochem Biophys Res Commun. 2014 Mar 4. pii: S0006-291X(14)00396-9.
   (doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.117)

2. Hara S, Hisabori T.
   Kinetic analysis of the interactions between plant thioredoxin and target proteins.
   Front Plant Sci. 2013 Dec 18;4:508. (doi: 10.3389/fpls.2013.00508).

3. Yoshida K, Noguchi K, Motohashi K, Hisabori T.
   Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria.
   Plant Cell Physiol. 2013 Jun;54(6):875-92. (doi: 10.1093/pcp/pct037).

4. Hara S, Nojima T, Seio K, Yoshida M, Hisabori T.
   DNA-maleimide: an improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a specific protein.
   Biochim Biophys Acta. 2013 Apr;1830(4):3077-81.
   (doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.012).

（3－2） 知財出願

① 平成 25 年度特許出願件数（国内 2 件）
② CREST 研究機関累積件数（国内 2 件）