

「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

H27 年度  
実績報告書

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
  - ・含窒素化合物生産に資するシアノバクテリアの機能向上
    - ・ATP 生産効率の向上
    - ・増殖速度の向上
  - ・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 (東京工業大学フロンティア研究機構、教授)
- ② 研究項目
  - ・含窒素化合物生産及び回収技術の確立
    - ・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

### (3) 得平グループ

- ① 主たる共同研究者: 得平 茂樹 (首都大学東京・理工学研究科、准教授)
- ② 研究項目
  - ・糖代謝改変による含窒素化合物高生産
    - ・ヘテロシストにおける糖代謝改変とペントースリン酸経路の活性化

・ニトロゲナーゼ発現調節機構の解明

(4) 増川グループ

① 主たる共同研究者: 増川 一 (大阪市立大学・複合先端研究機構、特任准教授)

② 研究項目

- ・ヘテロシスト高頻度株の作成による含窒素化合物増産
- ・ヘテロシスト形成の分子機構の解明

## §2. 研究実施の概要

本研究では、光合成条件下で窒素固定を行うシアノバクテリアを改変し、含窒素化合物の生産工場とすることを目指している。この目的を達成するために、大気中の窒素を直接同化可能なシアノバクテリアの代謝改変を行い、細胞内で生産される含窒素化合物を細胞外に放出させる技術、および、放出された窒素化合物を触媒によって効率よく吸着・回収する技術の確立を目指している。

### (1) シアノバクテリアによる含窒素化合物の生産性の向上を目指して(久堀グループ)

糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120(以下、*Anabaena*)における窒素代謝系酵素の遺伝子発現制御技術を新規に確立し、窒素同化に重要なグルタミン合成酵素(GS)の発現制御を行った。そして、すでに本プロジェクトで得られているメチオニンスルフォキシミン耐性株においてGSの発現制御を行うことで、含窒素化合物を培地に放出させる技術を確立した(Higo, A. et al. 2016, *Plant Cell. Physiol.*)。

代謝系制御として重要なレドックス制御については、シロイヌナズナを光合成モデル生物としたチオレドキシシン動態の解明(Yoshida, K. et al. 2015, *J. Biol. Chem.*)、および、代謝系酵素の解析(Yoshida, K. and Hisabori, T. 2016, *Biochim. Biophys. Acta*)などの成果を上げた。また、*Anabaena*のレドックスシステムの網羅的な解析を行い、スカフォールドタンパク質であるNifUへの還元力供給の重要性を明らかにした(Nomata, J. et al. 2015, *J. Biochem.*)。さらに、学外との共同研究により、レドックス制御を受けるシアノバクテリアの翻訳因子の動態を明らかにした。

### (2) 含窒素化合物生産及び回収技術の確立(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。そして、当グループが見出した含窒素化合物を吸着・分離する固体触媒を大量製造する方法を確立した。この触媒を用いることによってシアノバクテリアが生成した含窒素化合物を吸着・分離するシステムのモデル装置を完成させ、作動することを確認した。

### (3) 糖代謝改変による含窒素化合物高生産 (得平グループ)

光合成を行うことができないヘテロシストは、窒素固定反応に必要なエネルギーを栄養細胞から受け取ったスクロースを代謝することで作り出している。そこで、栄養細胞におけるスクロース生産とヘテロシストにおけるスクロース代謝を活性化するため、それぞれの細胞における糖代謝系の改変を行った。これらの糖代謝系の改変により、窒素固定による含窒素化合物生産量が増加することが期待できる。

### (4) ヘテロシスト高頻度化と含窒素化合物増産 (増川グループ)

ニトロゲナーゼによる窒素固定(含窒素化合物生産)に特化した異型細胞ヘテロシストは、通常 10-20 細胞に 1 個の割合で形成されるが、そのヘテロシスト形成頻度を増加させ、含窒素化合物生産効率の向上を目指している。すでに、ヘテロシストの主要な活性化因子 HetR のランダム変異改

変により、ヘテロシスト頻度が増加するアミノ酸残基置換変異を複数同定している。そこで、それらの変異を利用して、含窒素化合物を自立的に放出する株から、ヘテロシスト頻度が増大する変異株を作出し、ニトロゲナーゼ活性の評価を行った。

#### 【主要論文】

- Akiyoshi Higo, Atsuko Isu, Yuki Fukaya, and Toru Hisabori, "Efficient Gene Induction and Endogenous Gene Repression Systems for the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120.", *Plant and Cell Physiology*, vol. 57, No. 2, pp.387-396, 2016
- Keisuke Yoshida, Satoshi Hara, and Toru Hisabori, "Thioredoxin Selectivity for Thiol-based Redox Regulation of Target Proteins in Chloroplasts.", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, No. 23, pp.14278-14288, 2015
- Jiro Nomata, Maki Maeda, Atsuko Isu, Kazuhito Inoue and Toru Hisabori, "Involvement of thioredoxin on the scaffold activity of NifU in heterocyst cells of the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120.", *Journal of Biochemistry*, vol. 158, No. 3, pp.253-261, 2015