

**「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」研究  
領域 領域活動・評価報告書  
—平成26年度終了研究課題—**

研究総括 松永 是

1. 研究領域の概要

本研究領域は、藻類・水圏微生物を利用したバイオエネルギー生産のための基盤技術創出を目的とします。藻類・水圏微生物には、高い脂質・糖類蓄積能力や多様な炭化水素の産生能力、高い増殖能力を持つものがあることに着目し、これらのポテンシャルを活かした、バイオエネルギー創成のための革新的な基盤技術の創出を目指します。

具体的には、近年急速に発展したゲノミクス・プロテオミクス・メタボロミクス・細胞解析技術等を含む先端科学も活用し、藻類・水圏微生物の持つバイオエネルギーの生産等に有効な生理機能や代謝機構の解明を進めるとともに、それらを制御することによりエネルギー生産効率を向上させるための研究を対象とします。さらに、バイオエネルギー生産に付随する有用物質生産や水質浄化等に資する多様な技術の創出に関する研究も含みます。

将来のバイオエネルギー創成につながる革新的技術の実現に向けて、生物系、化学系、工学系などの幅広い分野から新たな発想で挑戦する研究を対象とします。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 10件(内、大挑戦型1件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「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」領域に設けた選考委員11名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>)の他、将来のバイオエネルギー創成につながる革新的技術の実現に向けて、生物系、化学系、工学系などの幅広い分野から新たな発想で挑戦する研究を重視した。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選考	書類選考	面接選考	採択数		
			10件	内訳	3年型
対象数	60件	28件			10件

( )内は大挑戦型としての採択数。

5. 研究実施期間

平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月(3年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議: 6回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成27年 1月	評価会開催
平成27年 2月	研究総括による事後評価
平成27年 3月	被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4) 「世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

## 9. 評価結果

本研究領域では、海産、淡水産の生物を用いてバイオエネルギー生産を行うための基盤技術の創出を目指す。バイオ燃料(例えばバイオディーゼル、軽油(アルカン、アルケン)、エタノール、メタン、水素等)の産生、もしくはこれらにつながる脂質、糖類等の産生に資する研究を対象とした。さらに、バイオ電池による電気エネルギーへの変換も含む。その実施体制としては、CRESTとさがけの2つのタイプで行っている。本研究領域の目的を達成するためには、様々な分野の研究者の有機的な協働と共に、新進気鋭の研究者の独創的な発想を活かした挑戦的なテーマによる成果が期待される。特に、さがけ研究では、オリジナリティを大事にした研究成果を強く求めた。各自期間内に多くの成果を取りまとめ、領域研究の進展に寄与したと評価される。今後、国際共同研究や社会実装に向けた提案など、相互の研究成果を融合した新たな展開が図ると共に、特許出願戦略の策定や他の競争的研究資金の獲得に向けた提案なども精力的に進めて頂きたい。

### 1. 新井 宗仁 研究者「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化」

ラン藻由来のアルカン合成関連酵素であるAARとADの網羅的変異解析を行い、ADの酵素活性を3倍に向上させる変異体を得ることができた。また、AARとADの機能発現機構や立体構造に関して様々な基礎的知見を得ることができ、今後、これらの酵素をラン藻によるアルカン合成に適用する上での基礎を築くことができた。非常に手間のかかる手法ながら、新しい考え方で酵素活性の向上にアプローチし、着実に研究を進めた点は評価できる。また、精力的に研究を実施し、研究者としてのスタイルができつつある。これは「さがけ」の成果である。

次には、高活性化した酵素をラン藻や大腸菌に導入して実際に応用へとすすめ、物質生産性として本成果を評価するところまで進められることを期待する。また、今後さらに、成果を論文としてまとめることが期待される。

### 2. 伊藤 卓朗 研究者「微細藻におけるオイル産生代謝機構の解明」(大挑戦型)

本研究は最新のメタボローム解析技術を用いて代謝モデルを構築し、遺伝子導入によりTAG生産量を向上させる事を目的とした研究であり、精力的にメタボローム解析や炭素代謝の推定に必要なタンパク質や核酸、二酸化炭素固定量などの測定を進めたが、藻類培養の再現性担保が難しく、遺伝子導入による代謝制御によるTAG生産量の向上には至らなかった。しかし、共同研究により得た株の解析により、代謝制御の原理解明には至っていないものの遺伝子導入により恒常的TAG生産が可能であることを示した。また、培養装置の改良の結果、培養の再現性が飛躍的に向上し、代謝解析の精度が向上した。

大挑戦型の研究としては、精力的に研究を進めたものの、藻類培養の再現性担保が難しく、タービドスタット光同調培養の開発に時間がかかり計画が遅れたため、研究者より大挑戦辞退の申し出があり、延長や増額は行わなかった。しかし、培養装置の開発により精度の高い解析が可能になったことから、今後の進展に期待する。

### 3. 岩坂 正和 研究者「水圏生物のマイクロミラーによるエネルギー変換伝達機能の獲得」

研究目標として掲げたマイクロミラーによる光エネルギーの制御を主軸としつつ、藻類のマイクロミラー機能を発見するという、領域のねらいに合致する成果を成し遂げたことは評価できる。

研究者自身と学生数名の実施体制で研究費を最大限活用して藻類培養や磁場実験をこなし、テンポの早い研究の進め方であったことが公表論文の数から察せられる。

また、植物生理学分野以外(電子工学)からの参入研究者として、領域会議では当初は異色の存在であったが、藻類のさまざまな結晶を試すようアドバイスを与えたこと、および本領域の CREST の研究チームやさきがけ研究者との交流を通し、次第にこの領域の研究者メンバーの一人として、藻類バイオエネルギーの効率的生産のヒントを獲得する道筋を切り拓いたようだ。

さきがけ研究者として採用されてから多くの共同研究を行い、バイオテクノロジーと電子工学を融合するポジションを得るなど、研究者としてのアクティビティーが急上昇している。

### 4. 梅野 太輔 研究者「超高効率でイソプレノイド燃料をつくる藻類の創製」

本さきがけ研究の成果が世界に認知され、国際学会の招待講演や多くの企業研究者など複数の共同研究に発展している。本研究において、カロテノイドの合成経路と、スクアレン合成経路(トリテルペン)の関連を明らかにするなど、さきがけ研究終了後に繋がる新しい研究の方向を見いだしたようであり、今後の進展に期待が持てる。しかしながら、本研究で作り出した変異体の数々を、シアノバクテリアに導入し、機能解析を行う段階であり、当初の提案目標の実現に向け、継続した研究が望まれる。

### 5. 得平 茂樹 研究者「糸状性シアノバクテリアを用いた細胞間分業による効率的バイオアルコール生産」

研究は順調に進展し、当初の目的は概ね達成できたと評価する。ヘテロシストの代謝工学によりエタノール生産能を付与し、さらに生産性を向上させることにも成功している。シアノバクテリアによる物質生産の報告は多くあるが、窒素固定型のシアノバクテリアであるアナベナを利用し、さらに細胞特異的な代謝工学を行った例は無く、研究の独自性は高い。しかし、エタノールの生産性という面では、改善の余地があり、本研究を工業的なエタノール生産に発展させるためには課題は多い。ヘテロシストによる物質生産には、嫌氣的細胞内環境などの他の微細藻類にはない特徴があり、その特徴をより活かすことができる物質の生産に取り組むことで、今後の研究が大きく展開する可能性がある。得平研究者は本さきがけ研究の成果が認められ、研究期間中に首都大学東京に准教授として着任した。また、本研究の成果を活かし、今後は当領域のCREST研究に分担者として参加する予定であり、研究者としても着実にステップアップしている。

### 6. 田村 隆 研究者「好気条件下で水素(H<sub>2</sub>)製造反応を触媒する[NiFeSe]型ヒドロゲナーゼの分子構築」

タンパク質の機能改変を目的とする分子設計において、一部のアミノ酸を置換するというミクロな視点ではなく、タンパク質全体の構造を対象として、タンパク質の分子進化という時間軸を過去にさかのぼるといふ斬新な発想で取り組んだことは、さきがけ研究に相応しいユニークな取り組みといえる。既存の[NiFeSe]ヒドロゲナーゼだけでなく未同定のセレン含有型もまだ多数存在することに着眼したことも、貪欲な情報収集と柔軟な発想の証左といえる。

学術的な基礎研究と共に社会のニーズ、将来的な技術開発も考慮したシーズ的な開発にも着手しており、こちらの展開も将来的に波及効果が期待できる。

残念ながら、研究期間内に研究成果を投稿論文にできなかった。困難な課題設定に集中して研究に取り組むことも大切であるが、中長期的な時間で計画的に研究成果を論文発表することにも配慮しなくてはならない。今後の研究の展開とともに発表促進をはかられたい。

### 7. 富永 基樹 研究者「生物界最速シャジクモミオシンを利用した植物成長促進システムの開発」

藻類が持つ特別な能力を他の生物に付与し、バイオマスの増産を図るといふユニークな発想で、基礎・応用面からインパクトのある成果を出せたと思われる。今後、淡水産藻類シャジクモミオシンを使った植物成長促進システムは、バイオマス増産の基盤技術として藻類を含む様々な資源植物への展開が大いに期待できる。

また、本さきがけ研究の成果が国内外で研究領域におけるトップランナーの1人として認知され、研究者としての飛躍につながった。今後は、早稲田大学に PI として、また、JST-先端的低炭素化技術開発(ALCA)を通じて、更なる研究の進展に期待する

### 8. 中澤 昌美 研究者「微細藻類ユーグレナの新規形質転換法の開発と応用」

ワックスエステル合成を向上させるという目標に向けて、形質転換法の開発と、代謝メカニズム解明に取り組んだ。代謝メカニズム解明の観点からワックスエステル合成向上を達成したという点は評価できる。論文成果の発表が少

し遅れているが、早期に成果をまとめることが期待される。今後は CREST 石川孝博教授チームに参画することで、ユーグレナによるバイオ燃料生産メカニズム解明という基礎的な知見からの成果創出をさらに加速させるとともに、実用化への展開が期待される。また、領域内外の研究者や領域アドバイザーとの研究交流を積極的に行っており、その成果が徐々に形になりつつある。今後の研鑽によってユーグレナ研究の中核となる人物となることを期待する。

#### 9. 成川 礼 研究者「多様な光スイッチの開発による細胞外多糖生産の光制御」

「多様な光スイッチの開発による細胞外多糖生産の光制御」というタイトルだが、「多様な光スイッチの開発」という点においては、大きな成果をあげたと評価できる。特に、色素結合領域の結晶構造決定と遠赤色光センサーの発見という研究成果については、それぞれ論文発表、プレスリリースを行っており、社会への波及効果という点でも優れている。ただし、開発した「多様な光スイッチ」を基にした「細胞外多糖生産の光制御」については、3年の期間では十分に研究を進展できなかったといえる。後者についても、期間終了後の進展を大いに期待している。また、成川研究者は本さがけ研究の成果が認められ、日本ゲノム微生物学会での研究奨励賞受賞、静岡大学へのプロモーション、科研費若手Aの予算獲得などに成功している。これらは成川研究者が今後、世界的に当該研究分野を牽引していく人材として有望であることを意味しており、本さがけ研究が成川研究者の飛躍につながったと確信している。

#### 10. 蓑田 歩 研究者「循環型エネルギーを利用した硫酸性温泉紅藻によるレアメタル回収システムの開発」

硫酸性温泉紅藻の *Galdieria sulphuraria* が、強酸性条件で、レアアースを高い効率で回収すること、そのメカニズムが従来、微生物のレアアースの回収の主要なメカニズムであったバイオソープションとは異なること、低濃度の金イオンを、高い効率で、細胞に回収することを示した。現在、レアメタルの社会的需要は高いのに対して、低濃度のレアメタルをリサイクルする方法は実現されておらず、社会的に関心の高い問題に取り組み、新しい知見を示したことは評価できる。今後、レアアースと金イオンの回収メカニズムを明らかにすることが期待される。

#### 5. 評価者

研究総括

松永 是 東京農工大学 学長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成26年3月末現在)

石倉 正治 王子ホールディングス株式会社研究開発本部開発研究所 室長

井上 勲 筑波大学生命環境系 教授

大倉 一郎 東京工業大学 名誉教授

大竹 久夫 大阪大学大学院工学研究科 教授

大森 正之 東京大学 名誉教授

嵯峨 直恒 弘前大学食料科学研究所 所長・教授

竹山 春子 早稲田大学理工学術院 教授

田畑 哲之 (公財)かずさDNA研究所 所長

民谷 栄一 大阪大学大学院工学研究科 教授

横田 明穂 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 教授

横山 伸也 鳥取環境大学環境学部環境学科

(参考)

件数はいずれも、平成27年3月末現在。

#### (1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	7	47	54
口頭	183	40	223
その他	33	24	57
合計	223	111	334

(2)特許出願件数

国内	国際	計
4	3	7

(3)受賞等

・成川 礼

日本ゲノム微生物学会 2013 年日本ゲノム微生物学会研究奨励賞 (H25.3)

(4)招待講演

国際 19件

国内 16件

別紙

「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」領域  
事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成27年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
新井 宗仁 (兼任)	ラン藻由来アルカン合成関連酵素の 高活性化 (東京大学)	東京大学大学院総合文化研究科 准教授 (同上)	40
伊藤 卓朗 (兼任)	微細藻におけるオイル産生代謝機構 の解明 (慶応大学)	慶應義塾大学先端生命科学研究科 特任助教 (同 特別研究員)	39
岩坂 正和 (兼任)	水圏生物のマイクロミラーによるエネ ルギー変換伝達機能の獲得 (広島大学)	広島大学ナノデバイス・バイオ融合 科学研究所 教授 (千葉大学大学院工学研究科 准教授)	40
梅野 太輔 (兼任)	超高効率でイソプレノイド燃料をつくる 藻類の創製 (千葉大学)	千葉大学工学部・共生応用化学科 准教授 (同上)	40
得平 茂樹 (兼任)	糸状性シアノバクテリアを用いた細胞 間分業による効率的バイオアルコール 生産 (首都大学東京)	首都大学東京大学院理工学研究科 准教授 (中央大学理工学部生命科学科 助教)	41
田村 隆 (兼任)	好気条件下で水素(H <sub>2</sub> )製造反応を触 媒する[NiFeSe]型ヒドロゲナーゼの分 子構築 (岡山大学)	岡山大学大学院環境生命科学研究科 教授 (岡山大学大学院自然科学研究科 准教授)	40
富永 基樹 (兼任)	生物界最速シャジクモミオシンを利用 した植物成長促進システムの開発 (早稲田大学)	早稲田大学教育・総合科学学術院 生物学専修 専任講師 (理化学研究所基幹研究所 専任研究員)	41
中澤 昌美 (兼任)	微細藻類ユーグレナの新規形質転換 法の開発と応用 (大阪府立大学)	大阪府立大学大学院生命環境科学 研究科 助教 (同上)	40
成川 礼 (兼任)	多様な光スイッチの開発による細胞外 多糖生産の光制御 (静岡大学)	静岡大学大学院理学研究科 講師 (東京大学大学院総合文化研究科 助教)	40
蓑田 歩 (兼任)	循環型エネルギーを利用した硫酸性 温泉紅藻によるレアメタル回収シス テムの開発 (筑波大学)	筑波大学生命環境系 助教 (東京薬科大学生命科学部 研究員)	40

# 研究報告書

## 「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 新井 宗仁

### 1. 研究のねらい

石油に代わる再生可能エネルギーを効率的に生産できる基盤技術の開発は、人類の持続的繁栄のために必須の課題です。藻類は、軽油や重油の主成分であるアルカンの生産能力が高いことから、非枯渇性資源であるバイオ燃料の生産源として注目されています。しかし現在、藻類によるバイオ燃料の生産効率は低く、その高効率化が急務となっています。

ラン藻によるアルカン合成には、アシルーアシル輸送タンパク質還元酵素(AAR)とアルデヒド脱カルボニル化酵素(AD)という2つの酵素が関与しています。AAR は、脂肪酸アシル ACP を基質としてアルデヒドを合成します。次に AD は、アルデヒドから軽油相当のアルカンを合成します。これらの酵素を大腸菌で共発現させると大腸菌がアルカンを合成可能になることから、AARとADがアルカン生合成の鍵を握っています。しかし、その酵素活性は低く、また、立体構造や機能発現機構も未解明でした。そこで本研究では、これら2つの酵素の立体構造や機能発現機構を解明するとともに、それに基づいて酵素活性を向上させた変異体を創出し、ラン藻によるアルカン合成を高効率化することを目的としました。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

本研究では、ラン藻由来のアルカン合成関連酵素である AAR と AD の活性を向上させた変異体を創出するために、次の A～E の研究を行い、下記の成果を得ました。

研究テーマ:

- A. AD の網羅的変異解析
- B. AAR の網羅的変異解析
- C. AD, AAR の立体構造解析
- D. 進化分子工学による高活性化
- E. ラン藻への導入

得られた成果:

- ・AD の酵素活性を3倍に向上させる変異体が得られた。
- ・様々な生物種由来 AAR の活性と基質特異性が明らかになった。
- ・AD と AAR の機能発現に重要なアミノ酸部位が明らかになった。
- ・NMR 法を用いたリガンド結合部位同定法を開発した。
- ・AD と AAR の立体構造とダイナミクスについての知見が得られた。
- ・AAR を高活性化するための進化分子工学的手法を開発した。
- ・野生型の AD と AAR をラン藻に導入し、アルカン合成量の増大を確認した。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「AD の網羅的変異解析」

*Nostoc punctiforme* PCC 73102 由来 AD (NpAD) の全部位を1つずつアラニンに置換した変異体 231 個を作成し、それらの活性を測定するという網羅的なアラニンスキャン変異解析を行いました。実験を高速化するために、AARとADを共発現させた大腸菌によるアルカン(アルケン)の合成量を酵素発現量で規格化し、酵素活性を求めました。その結果、ADの機能発現に重要な部位や、変異によって高活性化しうる部位が明らかになりました。1か所をアラニンに置換するだけで2倍近く活性が向上する部位もありました。また、このような高活性化変異部位を様々な種類のアミノ酸に網羅的に置換する飽和変異解析を行った結果(100 変異体以上を作成)、1アミノ酸置換だけで活性が3倍に向上する変異体が得られました(図1)。さらに、高活性変異体の可溶性を向上させるために多重変異体の作成も行いました。

ADタンパク質中にはフリーのシステイン残基が3つ存在します。これらが非天然のS-S結合を形成して凝集体形成や失活などを引き起こす可能性があるため、システイン残基の数を減らしたAD変異体を作成しました(論文発表2)。これらの変異と、上記の高活性化変異を組み合わせることにより、システイン残基数の少ない高活性型ADが得られると期待されます。

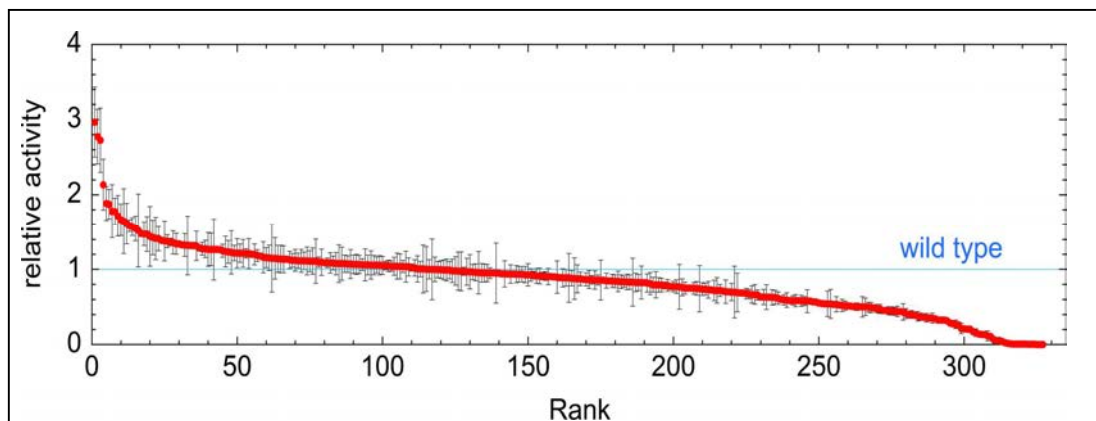


図1. アルデヒド脱カルボニル化酵素(AD)の網羅的変異解析によって得られた変異体の活性。300個以上の変異体を作成した。野生型との比活性の高い順に並べてある。

### 研究テーマB「AAR の網羅的変異解析」

まず、様々なシアノバクテリアに由来するAARを比較した結果、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 AAR (SeAAR) は酵素活性と可溶性が高く、アルカン生合成の実用化に有用であることがわかりました。また、由来する生物種によってAARの基質特異性が異なることが明らかになりました(論文執筆中)。SeAARとは基質特異性の異なる *Synechococcus* sp. PCC 7336 由来 AAR は可溶性が極めて低かったのですが、SeAARに近づけるようなアミノ酸置換を1つ導入するだけで可溶性が大幅に向上し、アルカン合成量の増大が可能になりました(論文執筆中)。

次に、最も高活性だったSeAARに対して、網羅的なアラニンスキャン変異解析を行いました(340個の変異体を作成)。その結果、AARの機能発現に重要な部位、特に、触媒活性に必須のシステイン残基やNADPH結合部位などが同定されました(論文執筆中)。また、AARよりも



ADの活性が低く、アルカン生合成における律速段階はADによる触媒反応であることが明らかになりました。

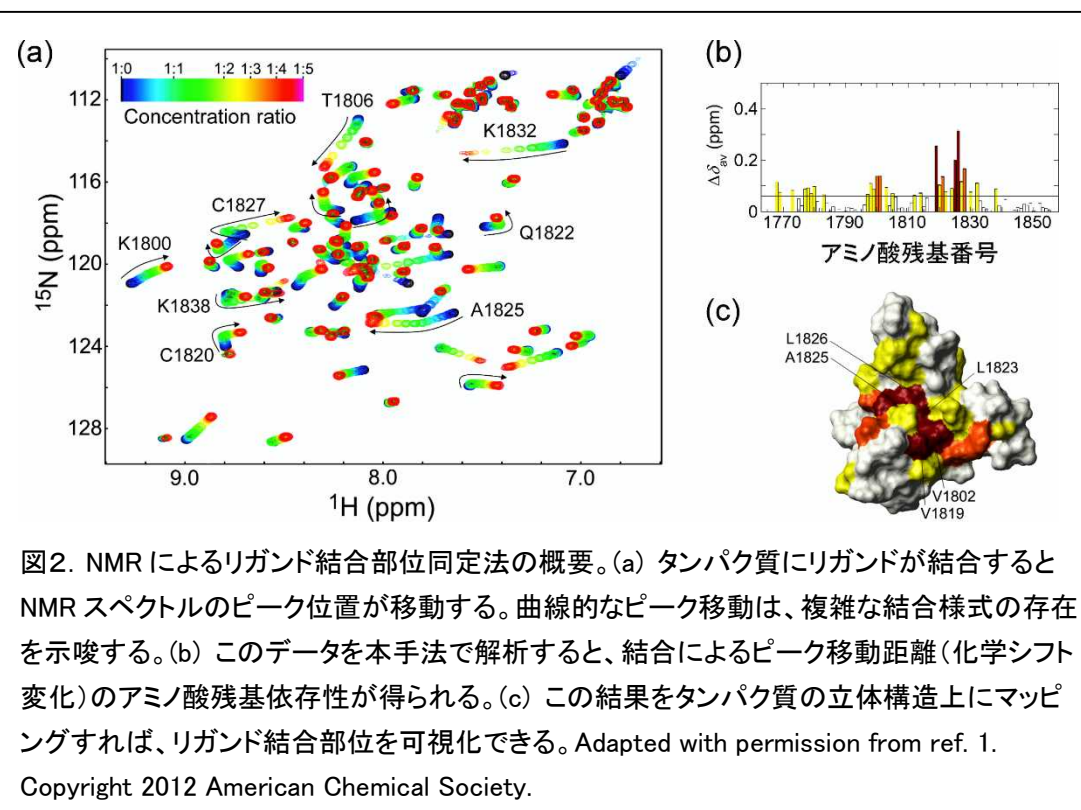
#### 研究テーマC「AD, AARの立体構造解析」

NMR法、X線結晶構造解析、X線溶液散乱法などの構造生物学的手法を用いて、AARとADの立体構造や基質結合部位の同定、および、機能発現に重要なダイナミクスの検出等を目指しました。

まず、NMR法により、酵素の基質結合部位の同定を目指しました。その際に、NMR法を用いてタンパク質上のリガンド結合部位を解析する新たな手法を開発しました。この手法では、特異値分解法とグローバル解析法という数学的手法を組み合わせ、NMR滴定実験のデータを解析することにより、複雑な結合様式であっても、リガンド結合部位と結合の強さを正確に求めることができます(図2)(論文発表1、著作物1)。開発された解析法をADとAARに適用することにより、基質や補酵素の結合部位や結合の強さを同定することができます。この情報に基づいて、結合部位周辺に様々なアミノ酸置換を導入し、酵素の高活性化が可能になると期待されます。

MIT9313由来ADの結晶構造は既知であったため、この構造に基づいた相同性モデリングにより*NpAD*の立体構造を予測しました。次に、*NpAD*の構造を用いた分子動力学シミュレーションにより、酵素活性に重要なダイナミクス(動きや揺らぎ)を調べました。この結果は、ADの高活性化変異を導入する上で有用です。

AARの立体構造は未知であったため、X線結晶構造解析による構造決定を目指しました。しかしAARは非常に凝集しやすい性質を持っていたため、結晶化は難航しました。最近、可溶性



の高い AAR を得ることができ、X線溶液散乱法や円二色性スペクトルによる構造解析も行いました。今後、この高可溶性 AAR の結晶化を進めていく予定です。一方、理論的な手法を駆使して AAR の立体構造予測を行った結果、上記の変異解析結果とコンシステントな立体構造モデルを得ることができました(論文執筆中)。

#### 研究テーマD「進化分子工学による高活性化」

ランダムに変異を導入して高活性変異体を迅速にスクリーニングする進化分子工学実験を行うために、AAR の酵素活性を大腸菌コロニーの発光で検出できるシステムを開発しました。現在、このシステムを用いて、AAR の進化分子工学実験を行っています。また、この手法は、高活性型 AD の進化分子工学実験にも適用可能です。

#### 研究テーマE「ラン藻への導入」

野生型の *SeAAR* と *NpAD* を染色体上に導入した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の変異株を作成しました。その結果、ラン藻によるアルカン合成量が2倍に増加することを確認しました。

### 3. 今後の展開

本研究により、ラン藻由来のアルカン合成関連酵素 AAR と AD の立体構造や機能発現機構、高活性化変異部位などが明らかになりつつあります。これらの基礎データを用いた変異解析(飽和変異、組み合わせ変異など)および進化分子工学実験によって更なる活性向上が可能と期待されます。得られた高活性型変異体をラン藻に導入することにより、ラン藻によるアルカン合成の高効率化が期待されます。

本研究では、ラン藻によるアルカン合成の最終段階にある酵素の最適化を試みました。今後、ラン藻によるアルカン合成の更なる高効率化のためには、AAR の基質合成までの過程にある様々な酵素の高活性化や、各酵素の発現量の調節、アルカン分泌系の構築など、ラン藻というシステム全体の最適化も必要です。また、タンパク質デザイン研究の最先端分野である新規高活性酵素の理論的設計にも取り組んでいきたいと考えています。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

本研究では、「タンパク質の立体構造に基づく合理的設計」と「網羅的変異解析に基づく経験的設計」の2つのアプローチ法により、ラン藻由来のアルカン合成関連酵素 AD と AAR の高活性化を目指して研究を開始しました。これらは相補的なアプローチであり、どちらか一方が困難であっても、酵素活性を確実に向上できると期待されました。研究開始当初は、両アプローチを並行して進めましたが、酵素の立体構造解析が難航したため、2年目以降は網羅的変異解析に基づく酵素高活性化に注力して研究を進めました。アルカン生合成における律速段階が AD による触媒反応であることが明らかになったため、特に AD の高活性化を目指しました。その結果、1アミノ酸置換だけで野生型の3倍の活性を持つ AD 変異体を得ることができました。また AAR については、進化分子工学的手法による高活性化を進めるための技術開発を行うことができました。さらに、AD と AAR を合わせて 1000 個近い変異体を用いた網羅的変異

解析によって、両酵素の機能発現に重要な部位などの基礎的な知見も多く得ることができ、今後、何本もの論文として発表していく予定です。立体構造解析についても、理論的手法の活用や高可溶性 AAR の探索などにより、有用な知見が得られつつあります。研究費は主に、アルカンを定量するための装置や細胞培養関係の装置、および、変異解析のための消耗品費等に使用し、適切に執行されたと考えております。

以上のように、AD と AAR の両酵素を、変異解析と構造解析の2つのアプローチで徹底的に研究することにより、「酵素の立体構造や機能発現機構の解明」および「酵素活性を向上させた変異体の創出」については、当初の目標は概ね達成できたと考えています。一方、本研究では、最終的には、高活性化した酵素をラン藻に導入し、アルカン合成の高効率化を達成することを目指していました。野生型の AD と AAR をラン藻に導入し、アルカン合成量の増大を確認する段階までは実施できましたが、今後、高活性化した AD と AAR の変異体をラン藻に導入し、ラン藻によるアルカン合成の飛躍的な高効率化の達成を実現することが課題として残されています。

本研究で用いた酵素 AAR と AD は、ラン藻や大腸菌などを用いて軽油相当のアルカンを合成する上で鍵となる酵素です。高活性化した AAR と AD をラン藻や大腸菌などに導入することにより、今後、石油に代わる再生可能エネルギーの効率的な生産の実現が期待されます。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

ラン藻由来のアルカン合成関連酵素であるAARとADの網羅的変異解析を行い、ADの酵素活性を3倍に向上させる変異体を得ることができた。また、AARとADの機能発現機構や立体構造に関して様々な基礎的知見を得ることができ、今後、これらの酵素をラン藻によるアルカン合成に適用する上での基礎を築くことができた。非常に手間のかかる手法ながら、新しい考え方で酵素活性の向上にアプローチし、着実に研究を進めた点は評価できる。また、精力的に研究を実施し、研究者としてのスタイルができつつある。これは「さきがけ」の成果である。

次には、高活性化した酵素をラン藻や大腸菌に導入して実際に応用へとすすめ、物質生産性として本成果を評価するところまで進められることを期待する。また、今後さらに、成果を論文としてまとめることが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. [Arai, M.](#), Ferreon, J.C., & Wright, P.E. Quantitative analysis of multisite protein ligand interactions by NMR: binding of intrinsically disordered p53 transactivation subdomains with the TAZ2 domain of CBP. *J. Am. Chem. Soc.* (2012) 134(8), 3792–3803.
2. Hayashi, Y., Yasugi, F., & [Arai, M.](#) Role of cysteine residues in the structure, stability, and alkane producing activity of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase. *PLoS ONE*. (2015) in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 新井宗仁、渡辺尚大、袖山浩平「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化」、日本化学会第 92 春季年会 JST さきがけ四領域国際シンポジウム、2012 年 3 月(横浜)
2. 新井宗仁、渡辺尚大、八杉文隆、灘広至郎「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化」、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月(神戸)
3. 新井宗仁「NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の定量解析法」、第 14 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「解離定数とストイキオメトリーを考えた分子間相互作用解析」、2014 年 6 月(横浜)(招待講演)
4. 新井宗仁「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の網羅的変異解析」、ラン藻ゲノム交流会 2014、2014 年 7 月(東京)(招待講演)
5. 新井宗仁、八杉文隆「Comprehensive mutagenesis reveals residues critical for aldehyde producing activity of acyl-ACP reductase」、第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月(札幌)

著作物

1. 新井宗仁「NMR によるタンパク質-リガンド相互作用の定量解析法」、生物物理 (2013) 53(6), 305-308.

# 研究報告書

## 「微細藻におけるオイル産生代謝機構の解明」

研究タイプ: 大挑戦型(延長無/増額無)

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 伊藤 卓朗

### 1. 研究のねらい

微細藻類が産生するオイル(主にトリアシルグリセロール; TAG)は、高い生産性が期待されることから軽油やジェット燃料の代替燃料原料として有望視されています。モデル緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス)は、多くのオイル産生藻類と同様に窒素栄養欠乏下において増殖を停止する代わりに TAG を油滴として蓄積します。一方、栄養充足下での対数増殖期には油滴がほとんど観察されないため、これらの藻類を用いて TAG を生産するためには 2 段階培養が必要になります。私は、培地に抗生物質を添加することでクラミドモナスが増殖を維持しながら恒常的に油滴を形成することを確認しました。代謝改変により増殖時の TAG 蓄積量を制御出来れば、1 段階培養による簡素な TAG 生産が可能になります。本さきがけ研究では、初めに、TAG 蓄積に関与する代謝変化を俯瞰的に調査するために質量分析計を用いて一次代謝物質からグリセロ脂質まで多数の代謝物質を一斉分析するためのメタボローム解析パイプラインを構築します。また、環境を厳密に制御可能なメタボローム解析用培養装置を開発し、様々な培養環境や遺伝子導入株における増殖特性を比較します。さらに、光同調培養により均質化された細胞集団を用いてメタボローム解析を行い、タンパク質や核酸などの主要細胞構成物質や顕微鏡観察による細胞形態、細胞計数機による細胞体積、酸素濃度測定装置による二酸化炭素同化能などの変化と統合して考察し、TAG 蓄積に伴う代謝変化を推定します。この知見を元に代謝改変を行うことで、TAG 生産能の向上が期待されます。本研究により得られる TAG 蓄積制御に関する知見は、窒素栄養欠乏下で TAG を蓄積する多くの藻類に応用できると考えます。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

微細藻類の代謝物質を俯瞰的に調査するため、グリセロ脂質を含む多数の代謝物質を効率的に一斉分析するメタボローム解析パイプラインを構築し、1 度のサンプリングで得られた細胞から 300 以上の代謝物質を一斉解析することに成功しました。トレボウクシア藻類を用いて対数増殖期と窒素栄養欠乏下での代謝解析を実施し、本手法の有用性を確認するとともに、クラミドモナスとの比較データとして中性脂質が増加する一方、アミノ酸を中心に多くの代謝物質が減少していることが分かりました(図 1、論文 1)。しかし、この過程で、連続光を用いたバッチ培養では反復実験における代謝物質の変動が大きいことが分かり。培養環境を厳密に制御可能なタービドスタット光同調培養装置を開発しました(図 2)。本装置を用いてクラミドモナスの窒素栄養欠乏下における代謝物質の変化を調べたところ、中性脂質はトレボウクシア藻類と同様に増加する一方、減少するアミノ酸は限定されることが分かりました。

抗生物質添加することでクラミドモナスのオートファジーが誘導され、僅かながら細胞増殖し

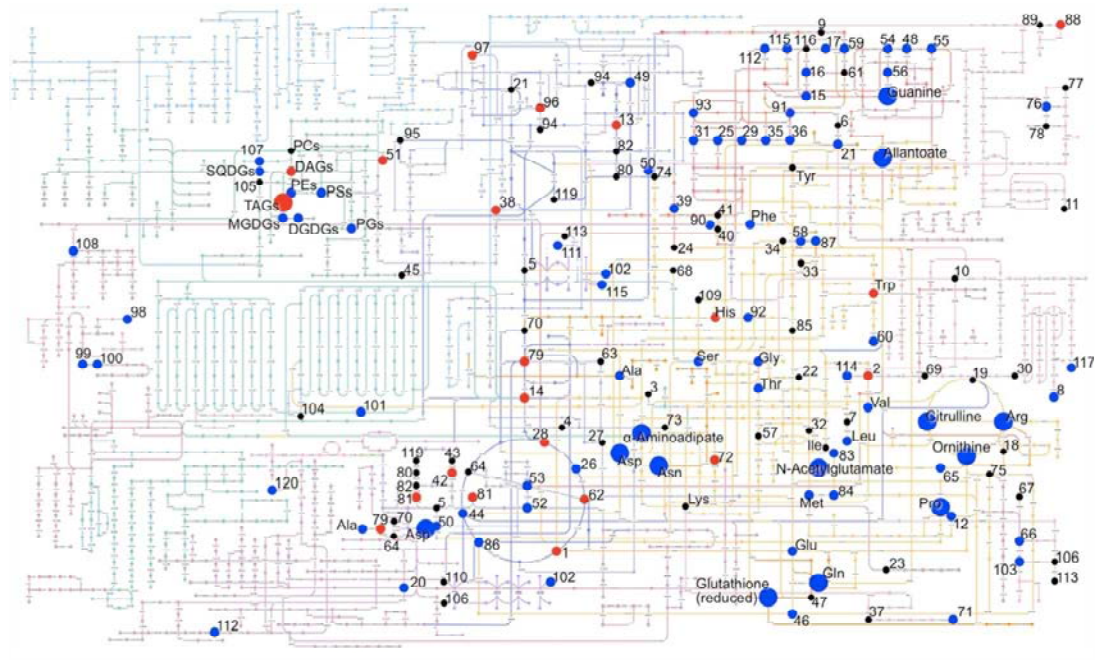
たまま油滴が形成されることを確認しており、継時的にメタボローム解析したところ、不飽和度の低いTAGが増加したのち、オートファジーが活性化すると同時期に不飽和度の高いTAGが増加する事が明らかになりました。増殖速度は一定に見えるものの抗生物質の効果は継時的に変化していると推測され、増殖とオイル蓄積の恒常性については検証が必要です。一方、**γ-グルタミルシス테인合成酵素過剰発現株 (GSH1-ox)** は、栄養充足下の対数増殖期においてデンプンを恒常的に蓄積することが知られています。本株が TAG も恒常的に蓄積している事を明らかにし、詳細なメタボロームを親株と比較し、デンプンと TAG の蓄積に関連すると推測される代謝物質の変動を確認しました。また、増殖速度と酸素発生量は減少しており、炭素貯蔵物質の生産により増殖が抑制された可能性があります。

本研究により、代謝制御の詳細は不明であるものの遺伝子導入による恒常的 TAG 蓄積が可能であると示すことができました。また、TAG 蓄積時に共通する代謝変化が存在するため、今後、この代謝変化に挑戦する予定です。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「メタボローム解析パイプラインの構築」

微細藻類の代謝を広範に調査するため、脂質を含む多数の代謝物質を効率的に一斉分析するメタボローム解析パイプラインを構築しました。1 度のサンプリングで得られた細胞から脂溶性物質と水溶性物質を抽出し、キャピラリー電気泳動-質量分析計によりアミノ酸や有機酸、糖リン酸などを、液体クロマトグラフィー-質量分析計により糖や脂肪酸、リン脂質、糖脂質、TAG などを分析することで、300 以上の代謝物質を一斉解析することに成功しました。トレボウクシア藻類を用いて対数増殖期と窒素栄養欠乏下での代謝解析を実施し、本手法の有用性を確認するとともに、研究テーマ B の比較データを得ました(図 1、論文 1)。中性脂質が増加する一方、アミノ酸を中心に多くの代謝物質が減少していることが分かりました。



## 図 1 トレボウクシア藻類における対数増殖期と窒素栄養欠乏下における細胞あたりの代謝物質の変化

KEGG Atlas 代謝マップ上に Pathway Projector を用いて可視化しました。増加を赤、減少を青、2 倍以上の変化を小さな色付き点、20 倍以上の変化を大きな色付き点で表しました。各点の物質名リストは膨大なため、論文 1 を参照してください。

### 研究テーマ B 「対数増殖期と窒素栄養欠乏下での代謝解析」

研究テーマ A および本テーマを進める中で、連続光を用いたバッチ培養では反復実験において代謝物質の変動が大きいことが問題となりました。そこで、光条件、温度、通気、細胞濁度などの培養環境を厳密に制御可能なタービドスタット光同調培養装置を開発しました(図 2)。本装置を用いてクラミドモナスの窒素栄養欠乏下における代謝物質の変化を調べたところ、トレボウクシア藻類と比較して中性脂質は同様に増加する一方、減少するアミノ酸が限定されることが分かりました。

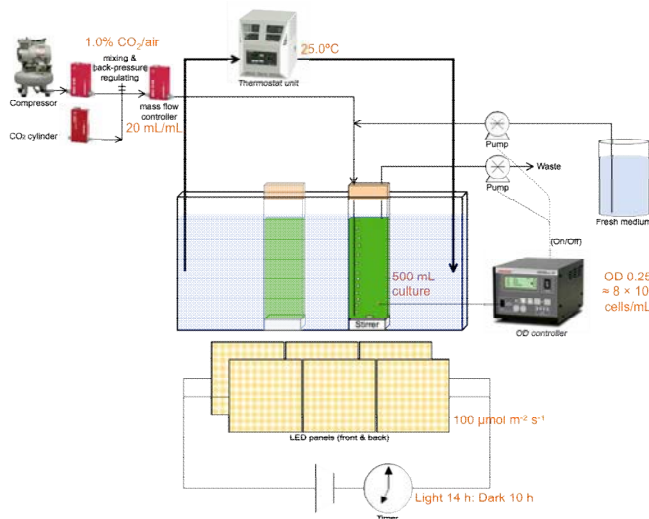


図 2 メタボローム解析用タービドスタット光同調培養装置

メタボローム解析に必要な細胞を対数増殖期において連続的に採集できる 500 mL 培養とし、光量子束密度、明暗周期、通気量、二酸化炭素濃度、温度、細胞濁度を厳密に制御可能です。

### 研究テーマ C 「抗生物質添加時の代謝解析」

抗生物質添加によりクラミドモナスのオートファジーを誘導することで、僅かながら細胞増殖したまま油滴が形成されます。継時的にメタボローム解析したところ、TAG 含有量の増加が確認されました。また、不飽和度の低い TAG が増加したのち、オートファジーが活性化すると同調して不飽和度の高い TAG が増加する事が明らかになりました。比較的一定の速度で増殖しているものの抗生物質の効果は継時的に変化しており、増殖とオイル蓄積の向上性については、さらなる検証が必要です。

#### 研究テーマD「恒常的油産生株の代謝解析」

γ-グルタミルシステイン合成酵素過剰発現株 (*GSH1-ox*) は、栄養充足下の対数増殖期においてデンプンを恒常的に蓄積します。本株が TAG も恒常的に蓄積している事を明らかにし、詳細なメタボロームを親株と比較し、デンプン代謝に関わる糖類、TCA 回路上の有機酸などの含有量が増加している事を明らかにしました。これらは、デンプンとTAGの蓄積に関連すると推測されます。一方、増殖速度と酸素発生量は減少しており、デンプンやTAGといった炭素貯蔵物質の生産により増殖が抑制された可能性があります。

#### 研究テーマE「代謝モデルをもとにした油産生制御株の作出」

研究テーマAからCの代謝解析結果を踏まえて、遺伝子工学によりTAG蓄積量を制御することが大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目であったと考えます。しかしながら、培養が不安定であった抗生物質添加と遺伝子導入株に対して反復精度の高い培養環境を整備する事と、グリセロ脂質の網羅的解析の分子予測精度を高める事に想定を大きく超える時間を要したため、代謝予測をもとにした遺伝子改変による高TAG産生株の作出には至りませんでした。しかし、研究テーマDにおいて、代謝制御の詳細は不明であるものの遺伝子導入による恒常的TAG蓄積が可能であると示すことができました。また、TAG蓄積時に共通する代謝変化が存在するため、今後、この代謝改変に挑戦する予定です。

### 3. 今後の展開

本研究では、油産生藻類のTAG蓄積時の代謝物質質量変化を俯瞰的に解析することに成功しました。これにより、恒常的TAG蓄積時は光合成により固定された炭素が優先的に貯蔵物質への向かうことが示唆されました。また、*GSH1-ox* の解析から遺伝子導入により恒常的TAG蓄積を実現できることが明らかとなりました。しかし、*GSH1-ox* は光量子束密度が上がると細胞が壊れやすいため、今後は、本研究により明らかになったTAG蓄積と連動する代謝物質質量変化を手掛かりに、増殖とTAG蓄積の割合を安定して制御する技術を開発し、栄養欠乏を伴わない野外培養において高効率に油を産生可能な株の作出を目指します。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究ではメタボローム解析などを用いて油産生藻類の代謝を俯瞰的に解析してTAG蓄積に関連する代謝経路を予測し、遺伝子導入によりTAG生産性の向上を目指した。特に、通常の増殖を停止するTAG蓄積とは異なり、増殖を維持した恒常的なTAG蓄積株の作出を目的とした。予期せぬ形で恒常的TAG蓄積株を得ため、本株を用いて代謝改変によるさらなるTAG蓄積量の拡大を目指したが、本株は培養が非常に難しく、安定した培養をするためのタービドスタット光同調培養装置の開発に時間を要した。これにより、飛躍的に精度の高い結果を得ることが可能になりTAG蓄積に関わる代謝の理解が進んだが、新たな遺伝子の導入には至らなかった。

研究実施体制は、メタボローム解析が膨大なデータ処理を必要とすることから2名の研究補助者を採用し、培養の条件検討などに2名の学生が参加した。研究費は、細胞計数機(シ



スメックス)、蛍光顕微鏡(オリンパス)、UPLC(アジレント)、酸素濃度測定装置(ハンザテック)を備品として購入し、本さがけ研究に必要な成果を得た。また、消耗品、人件費などは計画通り執行された。

本研究の成果は、これまで2段階の複雑な培養が必要だった多くの藻類に、1段階の簡素な培養によるTAG生産を提供できる可能性がある。これにより、生産現場では培養制御が容易になるほか、同じ培養槽から連続的に安定生産できるようになり、培養コストの大幅な削減に資すると考える。また、本領域の研究者とは、互いの技術を生かした共同研究を進めており、今後も、本さがけ研究テーマを発展させていきたい。

大挑戦型研究として、近年開発されたメタボローム解析による膨大なデータを基にした代謝改変技術の実現に挑戦したが、培養の安定性に難があったため新たな遺伝子導入まで進むことができなかった。しかし、培養を自在に制御できるようになり、代謝解析の精度が飛躍的に向上したため、TAG蓄積に関係する代謝経路の解析は格段に進み、現在は代謝改変による高TAG生産株の作出に集中している。培養不均質性は新しい手法に挑戦したからこそ見えた課題であり、時間はかかったものの、これを克服することにより再現性の高いデータを得ることができるようになった。今後、これを基に研究を発展させたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

本研究は最新のメタボローム解析技術を用いて代謝モデルを構築し、遺伝子導入によりTAG生産量を向上させる事を目的とした研究であり、精力的にメタボローム解析や炭素代謝の推定に必要なタンパク質や核酸、二酸化炭素固定量などの測定を進めたが、藻類培養の再現性担保が難しく、遺伝子導入による代謝制御によるTAG生産量の向上には至らなかった。しかし、共同研究をより得た株の解析により、代謝制御の原理解明には至っていないものの遺伝子導入により恒常的TAG生産が可能であることを示した。また、培養装置の改良の結果、培養の再現性が飛躍的に向上し、代謝解析の精度が向上した。

大挑戦型の研究としては、精力的に研究を進めたものの、藻類培養の再現性担保が難しく、タービドスタット光同調培養の開発に時間がかかり計画が遅れたため、研究者より大挑戦辞退の申し出があり、延長や増額は行わなかった。しかし、培養装置の開発により精度の高い解析が可能になったことから、今後の進展に期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. ITO Takuro, TANAKA Miho, SHINKAWA Haruka, NAKADA Takashi, ANO Yoshitaka, KURANO Norihide, SOGA Tomoyoshi, TOMITA Masaru. Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiohycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics*. 2013, 9, 178-187,

(2) 特許出願



研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Takuro Ito. “Technical expertise of the time-resolved metabolomics using stable isotope feeding”, 2nd International Joint Meeting of Alkenone Biosynthesis and Geoscience, 2014年2月, つくば市(招待講演)

Takuro Ito, Masanobu Nishikawa, Kenji Nakahigashi, Ken'ichi Ogawa, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. “Metabolome Analysis of the gamma-glutamylcysteine synthetase over-expressor *Chlamydomonas reinhardtii* Under High- and Low-Light Conditions.”, 10th International Phycological Congress, 2013年8月 Orlando, USA

Takuro Ito, Kazuya Igarashi, Tsukasa Murakami, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. “Metabolome Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* Under High- and Low-Light Conditions”, 15th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, 2012年6月 Potsdam, Germany

# 研究報告書

## 「水圏生物のマイクロミラーによるエネルギー変換伝達機能の獲得」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 岩坂 正和

### 1. 研究のねらい

さまざまな生物のもつ構造色は、屈折率の変化を利用して生物が生存淘汰するための生来備わった機能であり、遺伝的および自己組織化的に発現したものと考えられる。藻類や魚類は水中において太陽光を有効利用するための微結晶マイクロミラーを細胞表面付近で用いていると考えられるが、その生物学的機能は解明の途上にある。本さきがけ研究に取り組むきっかけは、魚類の体表に存在するグアニン結晶板がブラウン運動で引き起こすキラキラ光反射(flickering)が磁場で消える現象である。この水圏生物由来の微結晶の機能を解明するとともに、さまざまな藻類が産生する微結晶の光学特性を磁氣的に解明することを目標とした。

磁気に応答する水圏生物の代表的な物質として、これまで磁性バクテリアのマグネタイト(強磁性)の研究が目覚ましい発展をみせた。一方、本研究者がその磁気応答をみいだしたグアニンの場合は反磁性物質であるため、推測できるメカニズムとしてグアニン結晶板の磁化率異方性による磁場配向が挙げられる。魚類と同様に藻類も藻体表面に微結晶(外被結晶)を有するが、その磁場配向特性を調べた研究はみられない。特に藻類は太陽光を制御するためにこの微結晶を自ら産生していると考えられることが多い。しかし、植物生理的な光学機能の解明は十分に進んでいない。そこで、グアニン結晶板の光反射特性を磁気で制御する技術を確立することで、藻類外被結晶の光学機能解明を促進できると考えた。

今回の研究では、魚類の体表(鱗)の色素胞内のグアニン結晶、および藻類の外被結晶として構造色を呈する物体(本研究では“マイクロミラー”と表現する)を対象とし、その磁気応答性のメカニズムを解明すべく研究を進めた。水圏生物の微結晶が磁場によって回転する磁場配向メカニズムを解明し、結晶板の光散乱挙動を検出する手法を構築するため、魚類ウロコの色素胞に含まれるグアニン結晶板の磁場配向および構造色の高感度磁場応答を手掛かりとし、藻類の構造色提示部位における動的光散乱および構造色変化に対する磁場効果を藻類顕微分光解析装置により探索した。光合成機能を有する藻類の被殻成分の磁場配向を検出し、太陽光エネルギーを最適制御する藻類の天然光学素子の特性を解明し、得られた成果をバイオエネルギー生産効率化に導くための道筋を開拓した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

水圏生物に特有の水中“マイクロミラー(微結晶、マイクロクリスタル)”を利用した高効率の光



制御技術の創成を目指し、この新技術の核となる“マイクロミラーの磁氣的制御法”を開拓した。水圏生物のマイクロミラー(炭酸カルシウムやグアニンの微結晶)が太陽光を制御し効率的に利用されている可能性に着目し、その反磁性的な磁場配向と光特性との関連を詳細に調べた。魚類の色素胞内のグアニン結晶板の特異な光反射機能の解明(研究テーマA)を進めつつ、藻類の外被結晶のフォトニック結晶特性と磁場配向特性の解明(研究テーマB)を行った。これらのマイクロミラーが低摩擦・低エネルギーのロスによってブラウン運動を起こすメカニズムを磁場下での光計測によって考察し、このマイクロミラーの配向を磁氣的に制御する技術を確立した。この新技術を展開する研究(研究テーマC)では、マイクロミラーによる微細な光磁気制御がクロロフィル蛍光に与える影響を藻類で検証した。

(2) 詳細

(研究テーマA) グアニン結晶マイクロミラーの磁気応答

本研究の起点としたグアニン結晶板の精製プロセスを改良し、魚類(金魚、鯉)の鱗に付着している色素胞から均一な結晶板を分離精製するプロトコルを開発した。この結晶板を超伝導磁石および永久磁石の磁場下で高分解能観察可能な顕微鏡観察システムを構築した。そのシステムを用いたグアニン結晶板の光学特性解析の結果から、結晶板の表面が水に接しているときにブラウン運動が起きやすく光の flickering が増大すること、また、厚み 100nm の結晶板が光を 90 度曲げるプリズム特性をもつことが明らかとなった。X 線構造解析によりこのグアニン結晶板は幅 5 $\mu\text{m}$ 、長さ 20 $\mu\text{m}$ 、厚みが 70nm~100nm であり、X 線構造解析により無水結晶と水和結晶が混在している可能性が指摘できた。

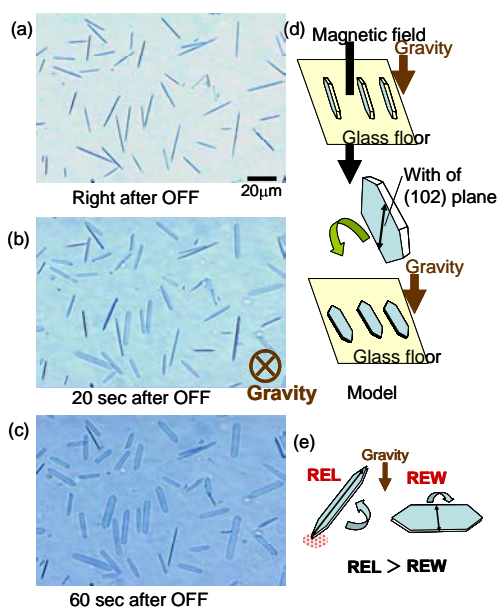


図1 永久磁石の磁場で重力方向に配向したグアニン結晶が、磁場オフ後に倒れていく様子を示す(左列)。右列は、反磁性磁気エネルギーと重力とが拮抗するモデル図。

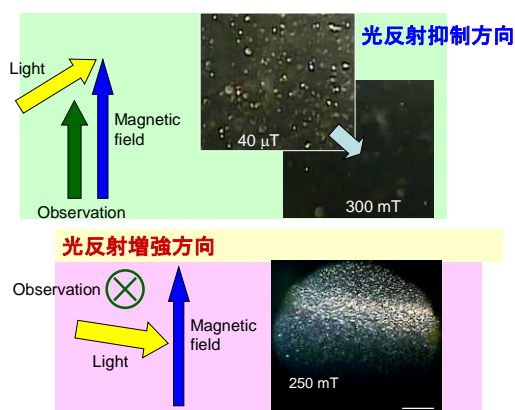


図2 水中に浮遊させたグアニン結晶集団の磁場配向による光反射増強と抑制。観察方向に垂直な方向からの光入射(暗視野)条件において、超伝導磁石内にて磁場をオン・オフした際、磁場が観察に平行な場合は光反射が抑制され、両ベクトルが直交する際には反射光が増強した。

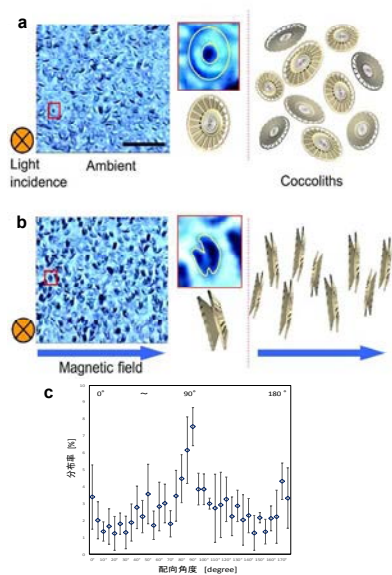


図3 藻類マイクロミラー(円石:ココリス)の磁場配向。磁場印加なし(a)および400mT磁場下での円石の配向状態。cは400mT磁場下での配向角度分布の偏りを示す。

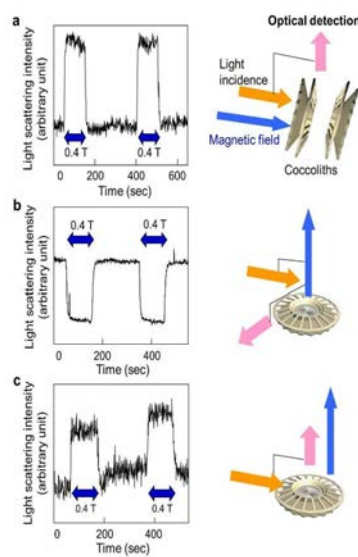


図4 円石を磁場配向させることで光の反射方向をコントロールした例。青矢印: 磁力線方向、オレンジ矢印: 入射光、ピンク矢印: 観察(採光)方向

反磁性のグアニン分子がシート状に積層しており、外部磁場を遮蔽する反磁性的分子の挙動による磁場配向が図1のように観察された。水中に結晶板を浮遊させた状態にて磁場と入射光の方向を組み合わせることで、反射光の抑制と増強を制御可能であることも明らかにした。

この結晶板一枚に磁場を印加し約20度回転させることで、瞬時に光の明滅を制御することに成功した。グアニン結晶板集団を水中に分散した浮遊型マイクロミラー液体を調整し、流体回路内で利用可能な光スイッチングを実現した。これまで数テスラ以上の強磁場が必要とされてきた反磁性磁場配向であるが、微結晶を水中で程よくブラウン運動させた結果、永久磁石で得られる数百ミリテスラ程度の磁場での回転制御を可能とした。

### (研究テーマB) 藻類マイクロミラーの磁気応答

円石藻 *E.huxleyi* が沈着する炭酸カルシウム結晶の複合体(ココリス)が、その円盤面の法線方向が磁力線に対し主に平行になる磁場配向を起こすことを発見した(図3)。炭酸カルシウムのカルサイト結晶の c 軸が磁力線に垂直になるような磁気回転運動が 400mT 以上の磁場下で生じるため、グアニン結晶とほぼ同様の光スイッチングが可能である。また、円石藻 *E.huxleyi* の表面の円石を磁場で配向させることで、直径約2 $\mu$ mの円石が光を効率的に反射し、光を波長分離する配位を明らかにすることに成功した。図4は円石の配向方向を磁場で変化させ、入射光の増減を藻類顕微分光システムで調べた例を示す。

以上の結果をもとに、円石藻の円石集団が光を遮蔽する配向角と光を細胞内へ導入しやすくする配向角について、その光波長依存性を議論することが可能となった。円石の円盤面に平行に入射した光は側方散乱が抑制され、かつ面の法線方向への反射は光波長依存性をもつ。円石の円盤面に垂直に入射した光は強く散乱されることが明らかとなった。

さらに、藻類由来セルロース微結晶や人工的に作製した核酸塩基結晶および尿酸結晶の磁場配向を比較して知見を拡充し、照射光、磁力線、観察方向の3つのベクトルの組み合わせによって微結晶の配列方向を高感度に検出することに成功した。

### (研究テーマC) マイクロミラー磁気変調によるバイオエネルギー生産効率化

研究テーマAとBで得られた成果をバイオエネルギー生産効率化に導くための道筋を開拓するための基礎研究として、円石藻 *P.carterae* のクロロフィル蛍光に対するマイクロミラー光反射の影響を調べた。グアニン結晶板を円石藻浮遊液に加え、波長 475nm のレーザー光で励起した際の 685nm での蛍光強度は、結晶板の添加量にほぼ比例した。この円石藻の周囲のグアニン結晶板を外部磁場で配向させた場合、研究テーマ A で得られた光反射異方性の原理に従った蛍光強度の異方性が得られた。従って、藻類細胞の近傍のマイクロミラーの配位角度を外部磁場でコントロールし光合成を効率化させる手法のヒントが得られたといえる。さらに、円石藻 *E.huxleyi* に対し、この細胞由来の円石を添加することによって、同様のクロロフィル蛍光強度のコントロールを円石の磁場配向で実現した。

## 3. 今後の展開

今回の研究成果をもとに、藻類および多くの生物のつくるマイクロメートルサイズの結晶板が光を目標の方向に向けて強く反射し、しかも永久磁石程度の低磁場で容易に回転制御できる条件を有する例をさらに多く示すことが可能と思われる。藻類がつくる結晶の中でも円石はグアニン結晶に匹敵する磁気応答性をもつため、藻類から得られる有用な天然マイクロ光学材料としてバイオセンサー等へ活用する道筋を切り拓くことは、産業応用上の付加価値を高めると期待される。そのためには、円石の炭酸カルシウム結晶の表面での屈折率を改良する手法の開発も必要であろう。

これら微結晶の磁気応答は、その回転特性と磁化率解析をもとに、反磁性とよばれる万物がもつ弱い誘導磁化（分子内での電子が外部磁場に対して起こす運動による磁気特性）が積分された結果であると説明できるが、詳細な機構を解明することは磁気物理化学の分野の知見としても有意義といえる。

特に、外被結晶をもつ藻類が太陽光を制御するしくみを理解する道筋を切り拓くことは重要である。強磁場を用いることで、藻体に付着した微結晶の光学機能の解析も可能と考えられる。また、光反射特性に改良を加えた人工微結晶を用いることで、藻類の光合成活性を促進するフォトバイオリクターの開発が期待できる。直径がマイクロメートル・オーダーの微細藻類の微結晶を単離し、マイクロ光学素子の部品として微小光学機械へ応用することも可能であり、他分野への波及効果も期待できる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、藻類および魚類由来の微結晶の構造と磁場による配向特性との比較を高感度に行う技術を創製し、この手法が水中でブラウン運動する微結晶の磁場配向検出法として普遍的に応用可能であることを明らかにできた。この手法は、円石が太陽光をどのように制御し円石藻の光合成に役立つのか理解することに寄与できると期待できる。しかし、本研究では、磁場を用いて円石の配位を制御するという手法上の有用性を示した段階であり、今後の研究展開において植物生理学的な意義を証明する段階が必要である。

水中でブラウン運動を行いつつ磁場に高感度応答する微結晶の新奇な知見を得ることに成功し、電磁工学的に新しい光エネルギー変換手法のモデル構築に至ったといえるが、その発電装置としての実用化はまだ遠いといえる。

一方、藻類の近傍に漂う微結晶による光反射環境が、光合成微生物にとって有効な光反応場(フォトバイオリクター)として機能するのでは?という仮説を支持する成果を得るに至った。この知見はさまざまな藻類の培養と光合成活性制御に有用と見込まれる。今後、藻類バイオエネルギー生産において効果的な微結晶の活用を、さらに推進して参りたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

研究目標として掲げたマイクロミラーによる光エネルギーの制御を主軸としつつ、藻類のマイクロミラー機能を発見するという、領域のねらいに合致する成果を成し遂げたことは評価できる。

研究者自身と学生数名の実施体制で研究費を最大限活用して藻類培養や磁場実験をこなし、テンポの早い研究の進め方であったことが公表論文の数から察せられる。

また、植物生理学分野以外(電子工学)からの参入研究者として、領域会議では当初は異色の存在であったが、藻類のさまざまな結晶を試すようアドバイスを与えたこと、および本領域のCRESTの研究チームやさきがけ研究者との交流を通し、次第にこの領域の研究者メンバーの一人として、藻類バイオエネルギーの効率的生産のヒントを獲得する道筋を切り拓いたようだ。

さきがけ研究者として採用されてから多くの共同研究を行い、バイオテクノロジーと電子工学を融合するポジションを得るなど、研究者としてのアクティビティーが急上昇している。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. M Iwasaka, Y Miyashita, M Kudo, S Kurita, N Owada. Effect of 10-T magnetic fields on structural colors in guanine crystals of fish scales. Journal of Applied

Physics. 2012, 111 (7), 07B316(1-3)
2. M Iwasaka, Y Miyashita, Y Mizukawa, K Suzuki, T Toyota, T Sugawara. Biaxial alignment control of guanine crystals by diamagnetic orientation. Applied Physics Express. 2013, 6 (3), 037002
3. M Iwasaka, Y Mizukawa. Light reflection control in biogenic micro-mirror by diamagnetic orientation. Langmuir, 2013, 29 (13), 4328-4334
4. Y Mizukawa, M Iwasaka. Electromagnetic Viability Control of Aquatics by the Combination of Weak Electric Currents and 10 T Magnetic Fields. IEEE Transactions on Magnetism, 2013, 49 (7), 3480-3483
5. M Iwasaka, Y Mizukawa, Y Miyashita. Rapid magnetic wiper featuring biogenic guanine particles: Magnetic non-contact switching of opto-fluidic mirrors featuring biogenic guanine crystals. Applied Physics Letters, 2014, 104 (2), 024108
6. Y Takeuchi, Y Miyashita, Y Mizukawa, M Iwasaka. Two-stage magnetic orientation of uric acid crystals as gout initiators, Applied Physics Letters, 2014, 104 (2), 024109
7. M Iwasaka, Y Mizukawa. Magneto-optical properties of biogenic photonic crystals in algae. Journal of Applied Physics, 2014, 115 (17), 17B501(1-3)
8. Y Miyashita, M Iwasaka, T Kimura. Microcrystal-like cellulose fibrils as the diamagnetic director for microfluidic systems. Journal of Applied Physics, 2014, 115 (17), 17B519(1-3)
9. Y Mizukawa, K Suzuki, S Yamamura, Y Sugawara, T Sugawara. Magnetic Manipulation of Nucleic Acid Base Microcrystals for DNA Sensing. IEEE Transactions on Magnetism, 2014, 50 (11), 5001904
10. Y Takeuchi, Y Sugawara, T Sugawara, M Iwasaka. Magnetic Rotation of Monosodium Urate and Urinary Tract Stones for Clinical Treatment Applications. IEEE Transactions on Magnetism, 2014, 50 (11), 6101204
11. Y Mizukawa, Y Ikemoto, T Moriwaki, T Kinoshita, F Kimura, T Kimura. Synchrotron Microscopic Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analyses of Biogenic Guanine Crystals Along Axes of Easy Magnetization. IEEE Transactions on Magnetism, 2014, 50 (11), 5001804(1-4)
12. Y Miyashita, Y Mizukawa, H Endo, M Iwasaka, Magnetically Controlled Biogenic Crystals as Photo-Bioreactors for Algae. IEEE Transactions on Magnetism, 2014, 50 (11), 5001504(1-4)
13. Y. Miyashita, M. Iwasaka. FDTD Analysis of Light Control by Magnetically Oriented Guanine Crystal Plates. IEEE Transactions on Magnetism, 2014, 50 (11), 5001404(1-4)



14. Yuri Mizukawa, Masakazu Iwasaka. Magnetic control of the inclination of biogenic guanine crystals fixed on a substrate. Journal of Applied Physics, 2015, in press
15. Masakazu Iwasaka, Yuri Mizukawa. Effect of intense magnetic fields on the convection of biogenic guanine crystals in aqueous solution. Journal of Applied Physics, 2015, in press
16. Yuka Takeuchi, Masakazu Iwasaka. Effects of magnetic fields on dissolution of arthritis causing crystals. Journal of Applied Physics, 2015, in press
17. Yuito Miyashita, Masakazu Iwasaka, Hirotochi Endo. Chlorophyll fluorescence control in microalgae by biogenic guanine crystals. Journal of Applied Physics, 2015, in press

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・千葉大学にて、グアニン結晶の光反射の磁気制御に関する論文(Langmuir, 2013)に関し、ニュース・リリースとして報道関係者への連絡と大学のHP掲載を行った。  
<http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/pdf/2012/20130313iwasaka.pdf>
- ・以下の学会にて招待講演を行った。
  - 日本磁気学会第38回学術講演会 S-3. Creation of novel materials and new analytical system using external magnetic field
  - 第64回コロイドおよび界面化学討論会で開催するシンポジウム
  - The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13)
  - 他

# 研究報告書

## 「超高効率でイソプレノイド燃料をつくる藻類の創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 梅野 太輔

### 1. 研究のねらい

テルペノイドは知られるだけで 55,000 を超える一大天然物群である。その中には、医薬、化成品、そしてディーゼル／ジェット燃料などとして価値ある化合物が数多く含まれている。注目すべきは、これだけ多様な分子骨格が、限られた共通の基質(C<sub>5-25</sub> ニリン酸)から、ひとつの酵素ファミリーによって1ステップで創られる点である。テルペノイドの燃料特性(セタン／オクタン価、凍結温度、蒸気圧など)は、その分子構造により大きく異なる。つまり、ひとたびテルペノイド燃料の効率的な生産システムを完成すれば、どんな内燃機関にも最適な燃料分子をオンデマンドに供給できる。また、最下流の合成酵素を取り替えるだけで、同一の経路を香料・医薬品、合成・天然ゴム原料など、多くのファインケミカルを合成できる。これをシアノバクテリアで効率的に働かせることができれば、これら燃料テルペノイドを二酸化炭素と太陽から超高効率に合成することができる。

テルペンの経路の代謝工学は、大腸菌や酵母を宿主とした前駆体経路の強化が飛躍的に進んだが、肝心のテルペン酵素の活性がボトルネックとなり、その生産効率は長らく頭打ちしている。また藻類での同様の試みは、もともとの中心代謝の力価の不足に加え、カロテノイドやフィトールなど、テルペン生産に競合する複数の経路が存在する。本研究では、まずはテルペン酵素の活性そのものを高めることによって、テルペンの微生物生産を打破することを目指した。また、作出したテルペン酵素をシアノバクテリア内でしっかり発現させるための遺伝子誘導系のデザインと実装も目指した。いずれもその本質はタンパク質からなる複数のパーツの機能改良である。本研究では、それぞれに適した「進化分子工学」の手法の開発から着手することにした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

テルペンは無色透明であり、しかも殆どは揮発性を持つため、その生成をハイスループットに計測することは困難である。一方で、テルペン合成の前駆体(プレニルニリン酸)は天然色素カロテノイドの前駆体でもある。このことを利用して、あらゆるテルペン酵素の細胞活性を、基質消費機能の間接的な読み出しとしてスコア化する手法を開発した(研究テーマ A)。これをスクリーニング原理として利用し、燃料テルペンとして注目される、ビスボレン、ファルネセン、ゲラニオール、ピネン、スクアレンの合成酵素の進化工学を試みた。その結果、ビスボレンやピネン酵素の高活性変異体を複数得ることに世界で初めて成功した(研究テーマ B)。

本研究を通して我々は、幾つかの「想定外」を経験した。ひとつは、本手法で作出した高活性型のゲラニオール合成酵素変異体の大腸菌での過剰発現は致死であることを見いだした

ことである。この致死性は前駆体供給経路を増強することによって回避できることが分かった。この現象を利用することによって我々は、期せずしてテルペンの前駆体供給経路の酵素の活性スクリーニング手法を確立することができた(研究テーマ C)。また、スクアレン合成酵素の細胞活性向上を目指して、上述の基質消費能をスクリーニングの過程で、ブドウ球菌由来のカロテノイド不飽和化酵素(CrtN)がスクアレンを直悦基質として色素をつくることを偶然発見した。この発見を皮切りに、燃料物質スクアレンとカロテノイド色素の代謝経路がどのように分岐したかについて貴重な情報を得ることができた(研究テーマ D)。また、さまざまな分子量のスクアレン化合物を細胞で効率的に合成することに成功した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「基質消費能をもとにしたテルペン酵素活性のスクリーニング手法」

酵素の活性向上には、進化工学的なアプローチが最も適切である。進化工学は、遺伝子レベルでのランダム変異の導入(ライブラリ化)と、それに続く機能選抜によって成立するが、スクリーニング手法の不在から、テルペン酵素の進化工学の実施は困難であった。

本プロジェクトでは、テルペン酵素の原料がカロテノイド色素の生合成経路と共通であることに着目した(下図)。すなわち、テルペン酵素をカロテノイド合成酵素と一つの細胞で共に発現させれば、両者が共通の原料(イソプレニル二リン酸)を取り合うことになる。

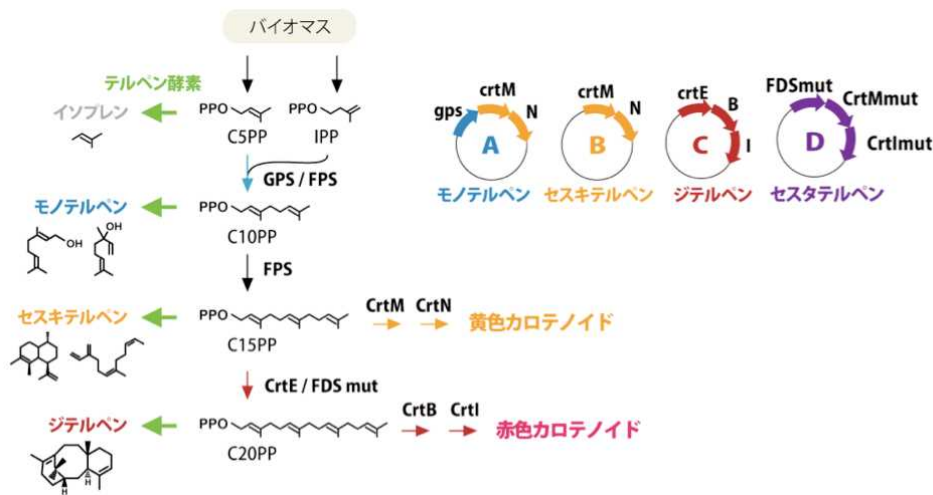


図 テルペン酵素の細胞内活性を指標に色識別するフォーマット

この状況では、より優れた細胞活性を示すテルペン酵素変異体は、その色素蓄積量が相対的に減る:そしてそれは寒天培地上のコロニーの色の变化として視認できるわけである。本原理に基づき、大腸菌内でテルペン酵素の活性をハイスループットにスクリーニングすることができる手法を確立した(文献 1)。本系のユニークなところは、それが基質消費能をスコア化する点にある:生産物の種類に関わらず、テルペン合成酵素ならばあらゆる酵素に適用可能である。また、スクリーニングプラスミドを巧妙にデザインすることによって、モノテルペンとセスキテルペン、そしてジテルペン活性を見分けることが可能であるため、テルペン酵素の基質・反応物特異性の改変などを可能とする。テルペン酵素の基礎的研究に広く貢献するものと期待される。

### 研究テーマB「テルペン酵素の活性進化と微生物生産への応用」

燃料テルペンとして特に有望視されているものとして、セタン価の高く曇点の低いビサボレンやファルネセンが挙げられる。上節の手法を用いて、これらの合成酵素の進化工学を行った。いずれも遺伝子のランダム化→機能選抜の手順によって、首尾よく種々の活性の改良された変異体を得た。その中には、発現ミュータント(酵素の性能は変わらないが副次的に翻訳効率があがったもの)も多く含まれていたが、酵素そのものの細胞活性を向上させる変異も数多く得ることができた。これらを組み合わせ、さらに性能の高い変異体を得ることに成功した。上記手法をうまく利用することによって、ゲラニオールやピネンなど、より低沸点のモノテルペン群の合成酵素の活性改良にも成功した。

こうして得たテルペン酵素変異体を、前駆体を強化するメバロン酸経路とともに大腸菌に導入したところ、フラスコ培地で250-900 mg/Lという高い生産性を達成することができた。

### 研究テーマC「基質枯渇の回避による上流経路の増強因子の選抜手法」

上で作出した高活性型のゲラニオール合成酵素変異体(M53)の性能調査の際、我々は、大腸菌内で単独で過剰発現は致死であることを偶然見いだした。最初はゲラニオールそのものの細胞毒性であると考えられたが、この致死性は、前駆体供給経路を増強する遺伝因子(ispA や idi など)の追加発現によって回避できることが明らかとなった。この現象をうまく利用することによって、安定して10,000倍以上の濃縮率を誇る画期的なテルペンの前駆体供給経路の酵素の活性選抜手法を確立することができた(特許1)。これはテルペン酵素のさらに上流の律速酵素の同定およびその活性改良の進化工学研究を、液体培地をつかった生死選抜によって行うことを可能とするものと期待される。

### 研究テーマD「スクアレン酵素の特異性変換」

スクアレンは潤滑剤や化粧品原料として広く需要があるのみならず、最近ではボトリオコッセンと並んで、藻類に由来する代表的炭化水素として注目されている。スクアレンはファルネシルニリン酸を二分子縮合してつくられるので、ビサボレンをはじめとするセスキテルペンのすくりーニングシステムによって活性改良できると考え、ブドウ球菌のカロテノイド経路との「競合」状態を大腸菌内に再現した。しかしこの酵素に限って、多く活性の高い(より白いコロニーを与える)変異体は全く得られなかった。最終的に我々は、カロテノイドの不飽和化酵素(CrtN)がスクアレンを直接基質として色素に転化していることを発見した(文献2)。

この発見によって、スクアレンの合成酵素活性は、生産物ベースで直接可視化できるようになった。これを利用して私たちは、スクアレンとフィトエンの創り分けがどのように実現しているかを明らかにすることができた(文献3)。また、その知見を利用して、非天然骨格をもつ(C35, C40, C45, C50など)種々のスクアレンの生合成経路を確立することに成功した。また、メバロン酸経路などの前駆体経路を追加導入することによって、乾燥菌体の230ppmまでスクアレン類を蓄積させることに成功した。

#### 研究テーマ E「シアノバクテリアへの実装のための遺伝子誘導系のシリーズ作成」

シアノバクテリアは藻類の中でも染色体工学技術が特に進んでおり、信頼できる発現系も複数報告がある。しかしそれでも、大腸菌に比べると、その代謝工学ツールはきわめてラインナップも性能も不充実である。特に外来遺伝子の発現レベルは、既知・未知の様々な制御ネットワークのもと、多くの場合、非常に低いレベルにとどまっている。

そこで本プロジェクトでは、大腸菌ファージ T7 系を基盤とした種々の遺伝子スイッチおよび回路を作成し、「大腸菌でつくって」「シアノバクテリアで動作確認する」歩留まりのよいワークフローの開発を試みた。ヌクレオシドキナーゼとカナマイシン耐性遺伝子を組み合わせた遺伝子発現系の進化デザインシステムを開発し(文献5)、数多くの T7 ベースのスイッチを何百も取り揃えることができた。これらは理論上、シアノバクテリアで働く「はず」の構成としている。これらの性能をシアノバクテリア内での組織的な評価・選別を行うことにより、シアノバクテリアの tried-and-true な代謝工学ツールを提供できるものと期待される。

### 3. 今後の展開

#### (1) シアノバクテリアへの実装とテルペン生産

本プロジェクトでは、燃料特性の異なるさまざまなテルペン炭化水素のより高活性な変異体を得ることができた。これらの「秀逸性」は大腸菌内では実証されている。本プロジェクトの最終段階として、シアノバクテリアに導入したとき、野生型の酵素に比べてどれほど細胞生産の向上につながるかに興味を持たれる。CO<sub>2</sub> から有価・燃料テルペンへの効率よい変換を目指してこれからも本プロジェクトを継続したいと考える。

#### (2) 前駆体供給経路の酵素も活性改良の対象に

テルペン合成酵素の活性改良の必要は広く認識されているが、じつは、メバロン酸経路・非メバロン酸経路に関わらず、微生物のイソプレノイド前駆体の供給経路のキャパシテイ(と伸びしろ)についての情報はきわめて乏しい。一般に増殖の遅い藻類は、それぞれの酵素の触媒活性も低いと想像される。本プロジェクトで偶然得た「基質枯渇とその回避による上流経路のスクリーニングシステム」(研究テーマ C:特許1)を使うことにより、藻類のイソプレノイド経路をなす酵素ひとつひとつの強化を行うことが可能となった。全体として代謝流量の高くない藻類において、これらの酵素の活性改良は、それが僅かなものであってもイソプレノイド経路への「引き込み」を強く促進するものと期待される。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

###### (研究者)

- ・ 本プロジェクトの当初の目的は、(1)テルペン酵素の強化 → (2) シアノバクテリアでの発現 → (3) テルペン生産効率の最高記録を樹立、という非常に単純明快なものであった。(1)は予定以上の達成、(2)(3)は道半ば、という自己評価である。
- ・ 本研究を通じて、申請者がなじみ親しんでいるカロテノイドの合成経路と、スクアレン合成経路(トリテルペン)の意外な関係が明らかになった。これをもとに、想定になかった新たなテーマが生まれたことは僥倖であった。今後5年にわたって研究室が総力で取り組むべきあらたなテーマに繋がったことは、研究者本人にとって、本さがけプロジェクトにおける最大のものであったと感じている。
- ・ 藻類に限らず、テルペンの微生物生産は世界中の研究室・企業が参画する競争の激しい分野である。どちらかという細胞工学主体で発展してきた本分野において、テルペン酵素そのものの機能向上をルーチンで行う機会を提供する本研究は、テルペン類の効率生産に大きく貢献するものと期待される。実際に、複数の国内との共同研究が始まっており、そして海外の企業・研究組織との協議が始まっている。

##### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

###### (研究総括)

本さがけ研究の成果が世界に認知され、国際学会の招待講演や多くの企業研究者など複数の共同研究に発展している。本研究において、カロテノイドの合成経路と、スクアレン合成経路(トリテルペン)の関連を明らかにするなど、さがけ研究終了後に繋がる新しい研究の方向を見いだしたようであり、今後の進展に期待が持てる。しかしながら、本研究で作り出した変異体の数々を、シアノバクテリアに導入し、機能解析を行う段階であり、当初の提案目標の実現に向け、継続した研究が望まれる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. M. Furubayashi, M. Ikezumi, J. Kajiwara, M. Iwasaki, A. Fujii, L. Li, K. Saito, and D. Umeno: A high-throughput colorimetric screening assay for terpene synthase activity based on substrate consumption. PLoS ONE, 9(3): e93317 (2014).
2. M. Furubayashi, L. Li, A. Katabami, K. Saito, D. Umeno: Construction of carotenoid biosynthetic pathways using squalene synthase. FEBS Letters, 588, 436–442 (2014).
3. M. Furubayashi, L. Ling, A. Katabami, K. Saito, D. Umeno: Directed evolution of squalene synthase for dehydrosqualene biosynthesis. FEBS Letters, 588, 3375–3381 (2014).
4. A. Katabami, L. Ling, M. Iwasaki, M. Furubayashi, K. Saito, and D. Umeno: Production of squalene by squalene synthases and their truncated mutants in Escherichia coli: J. Bioscience Bioengin., 119, 165–171 (2015).
5. M. Tominaga, K. Ike, S. Kawai-Noma, K. Saito, D. Umeno: Rapid and liquid-based selection of genetic switches using nucleoside kinase fused with aminoglycoside phosphotransferase, PLOS One, in press.

### (2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発明者: 梅野太輔 岩崎美希

発明の名称: テルペン合成酵素をコードする遺伝子のスクリーニング方法

出願人: 千葉大学

出願日: 2013/5/16

出願番号: 特願 2013-104412

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Development of the evolutionary design platform for genetic switches and circuits. Cold Spring Harbor Symposium ,Synthetic Biology (2012/11/29, 広州)
2. A Highly Specific synthetic metabolic pathways assembled from promiscuous enzymes. SB6.0 (2013/7/9–11, London)
3. Selection tools for the evolutionary engineering of genetic networks and genomic DNA. 1<sup>st</sup> SEED Meeting, (2014/7/14–17, Los Angeles).

ほか 招待講演 国内 11件 国際 8件

# 研究報告書

## 「糸状性シアノバクテリアを用いた細胞間分業による効率的バイオアルコール生産」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 得平 茂樹

### 1. 研究のねらい

大腸菌や酵母などの微生物を用いて、糖を原料に様々なアルコールを生産させるプロセスが開発されている。アルコールはガソリン添加物あるいは代換物としてのみならず、様々な化学品の原料として利用可能であり、化石燃料の使用量削減に大きく貢献すると期待されている。微生物を用いたアルコール生産プロセスでは、植物バイオマスを分解して得られる糖を原料として用いる。したがって、植物バイオマスの生産、分解、そして微生物によるアルコールへの転換といった複数のステップが必要となり、生産コストを押し上げている。

遺伝子操作が容易で、オミクスデータが充実しているシアノバクテリアは、光エネルギーを利用した二酸化炭素のバイオ燃料への直接転換を実現する微細藻類として注目されている。しかし、微細藻類によるバイオ燃料生産プロセスは、生産性が低く実用化には至っていない。私はその原因の一つが、これまで利用されてきた微細藻類が全て単細胞性である点にあると考えた。単細胞性の微細藻類では、光合成反応、各種生体構成物質の生合成、環境応答、そして増殖、分裂といった全ての生体プロセスを一つの細胞が行う必要があり、その上でバイオ燃料を生産している。そのため、代謝系とその調節システムが非常に複雑になっている。現在バイオマス資源として利用されている植物では、デンプンや油脂などの生産に機能分化した器官を形成することで、効率的な生産を実現している。したがって、微細藻類においてもバイオ燃料生産に特殊化した細胞を作り出すことができれば、生産の効率化が期待できる。数百の細胞が一列につながった糸状性のシアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120(アナベナ)は、機能分化した細胞ヘテロシストを形成して窒素固定を行う。ヘテロシストは光合成能や増殖、分裂能を失っており、隣接した栄養細胞から受け取った糖を利用して窒素固定によりアミノ酸を生産している。つまり、光合成や細胞増殖は栄養細胞が分担し、ヘテロシストはアミノ酸生産に特殊化している。そこで本研究では、ヘテロシストを代謝工学によりアルコール生産細胞へと作り換えることを目指す。光合成、増殖を担う細胞とアルコール生産を行う細胞とを分けることで代謝の効率化を図り、二酸化炭素を直接バイオ燃料へと効率的に変換する技術を開発する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ヘテロシストは糸状性のシアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120(アナベナ)が形成する分化細胞である。ヘテロシストは窒素固定に特殊化した細胞であり、光合成を行わない。隣接した栄養細胞が光合成で作出した糖を受け取り、その糖を利用して窒素固定を行い、アミノ酸を生産している。つまり、栄養細胞とヘテロシストは、光合成と窒素固定を細胞間で分業する



ことで効率的な物質生産を実現している。本研究ではヘテロシスト特異的な代謝工学により、光合成や増殖と物質生産の場を分離し、シアノバクテリアによる物質生産の新たな可能性を示すことを目指した。

DNA マイクロアレイ解析により同定したヘテロシスト特異的に発現するプロモーターを利用して、ヘテロシストにおいてエタノール生産経路を発現させることに成功した。その株では、ヘテロシストが形成される条件においてエタノールが生産されることを明らかにした。さらに、エタノール生産性を向上させるため、ヘテロシストでの代謝改変を行った。その結果、ヘテロシストの糖異化活性を増強することで、エタノール生産量を増加させることができることが示された。また、ヘテロシストの代謝改変により生産性が向上した株においては、栄養細胞での炭素固定を増加させることでさらに生産性が向上することも明らかとなった。したがって、ヘテロシストと栄養細胞それぞれ独自の代謝改変を組み合わせることで、生産性に対する相乗効果が期待できる。ヘテロシストはアナベナの生育に必須の細胞ではないため、自由な代謝デザインが可能である。生育・増殖と切り離されたヘテロシストを物質生産の場として利用することで、シアノバクテリアによる物質生産の可能性が大きく広がると期待できる。

## (2) 詳細

### (1) ヘテロシストにおけるアルコール生産系の構築

ヘテロシスト特異的な遺伝子発現制御技術を開発するためには、ヘテロシストのみで働くプロモーターを取得する必要がある。ヘテロシストで働いている遺伝子を網羅的に同定するため、まず DNA マイクロアレイ解析を行った。ヘテロシストと栄養細胞からなる糸状体から、ヘテロシストのみを回収し、そこから RNA を抽出した。そして、DNA マイクロアレイにより糸状体全体と単離ヘテロシストでの遺伝子発現プロファイルを比較解析した。その結果、ヘテロシスト特異的に発現していると思われる遺伝子を多数同定することに成功した(5. 主な研究成果リスト(1)-4)。それらの遺伝子に関して、5' -RACE 法により転写開始点を決定し、プロモーター領域を同定した。以上の研究により得られたプロモーター領域をクローニングし、アルコール合成経路や糖代謝系などの遺伝子をヘテロシストにおいて高発現させるためのベクターを作製した。

ヘテロシストにおいてエタノールを生産させるため、エタノール生産菌である *Zymomonas mobilis* のエタノール合成経路を構成する 2 個の酵素、ピルビン酸デカルボキシラーゼ (*pdh*) とアルコールデヒドロゲナーゼ (*adhA*) をヘテロシスト特異的に発現させた。*Z. mobilis* の *pdh* 遺伝子とシアノバクテリア *Synechocystis* PCC 6803 の *adhA* をヘテロシスト高発現プロモーター PhupS の下流にクローニングした。これらのコンストラクトをアナベナに導入し、形質転換体を得る事に成功した。アルコール合成経路を導入したアナベナを培養し、ヘテロシスト分化を誘導した後、培地中のエタノールをガスクロマトグラフにより検出したところ、エタノールを検出することができた。したがって、ヘテロシストにおいてエタノールを生産するアナベナを作り出すことに成功した。

### (2) ヘテロシスト特異的代謝改変によるアルコール生産性の向上

ヘテロシストにおけるエタノール生産性を向上させるために、ヘテロシストにおける糖代謝活

性の強化を行った。ヘテロシストにおいては、スクロースを解糖系で代謝することでエネルギーと炭素骨格が供給されている。そこで、スクロース分解酵素であるインベルターゼをコードする *invA*, *invB* 遺伝子、さらに解糖系を活性化する転写因子をコードする *sigE* 遺伝子をヘテロシストで過剰発現させ、糖代謝の活性化を試みた。ヘテロシスト特異的に高い活性を示す *nifB* プロモーターからこれら 3 個の遺伝子を発現するコンストラクトを作製し、染色体上のニュートラルサイトに導入することでヘテロシスト内での発現量を増加させた。それぞれの株におけるエタノール生産性を評価したところ、全ての株で生産性の増加が見られたが、特に *invB* 過剰発現株は高いエタノール生産性を示し、元の株のおよそ 2 倍のエタノールを生産した。以上のように、ヘテロシスト内での糖代謝を活性化することで、エタノール生産性を向上させることに成功した。エタノールはピルビン酸を出発物質に作られる。糖代謝の活性化によりピルビン酸合成量が増加したことが、エタノール生産量の増加につながったと考えられる。ヘテロシストにおいては、アラニンピルビン酸に変換するアラニンデヒドロゲナーゼ (*ald*) が高発現することが知られている。そこで、*ald* の発現増加のエタノール生産への効果を評価した。その結果、*ald* 発現増加株においても、エタノール生産量がおよそ 30% 増加した。ヘテロシスト内のピルビン酸合成量を増加させることが、エタノール生産性の向上につながる事が明らかとなった。

アナベナを使った代謝改変では、栄養細胞とヘテロシストでそれぞれ異なる代謝改変を施すことができるのが特色である。そこで、ヘテロシストにおける糖代謝の活性化と同時に、栄養細胞におけるスクロース合成の活性化に取り組んだ。ヘテロシストは光合成を行わないため、隣接した栄養細胞から光合成により合成されたスクロースを受け取り、窒素固定に利用している。栄養細胞でのスクロース合成量を増加させることで、ヘテロシストが利用できるスクロースが増え、さらにヘテロシストでのスクロース代謝が活性化すると期待できる。アナベナは塩ストレスによりスクロースを適合溶質として蓄積することが知られている。そこで、塩ストレス条件下でのスクロース合成を制御するメカニズムの解明に取り組んだ。その結果、転写因子 *OrrA* がスクロース合成系の遺伝子発現を制御していることを明らかにした(5. 主な研究成果リスト(1)-2)。さらに、*orrA* 遺伝子の過剰発現株では、スクロース合成系の遺伝子の発現が上昇し、細胞内のスクロース量が増加することが示された。*orrA* 過剰発現株を用いて、上記のヘテロシストにおける糖代謝改変を行うことで、エタノール生産性向上への相乗効果が期待できる。

### (3)ヘテロシスト分化の制御機構

上記のようにヘテロシストを利用した物質生産系の構築に成功したが、その利用をさらに進めるためにはヘテロシスト分化や糖代謝系の制御に関する分子レベルでの理解を深める必要がある。本研究では、スクロース合成系だけでなく、ペントースリン酸経路を構成する遺伝子の発現制御の分子機構を明らかにした。また、ヘテロシスト分化の制御に関しても、新たに RNA ポリメラーゼのシグマ因子である *SigC* が重要な役割を果たすことを見いだした(5. 主な研究成果リスト(1)-1)。さらに、ヘテロシスト内を嫌気的な環境にし、窒素固定酵素ニトロゲナーゼの発現誘導を制御する転写因子を同定することにも成功している。これらの研究成果は、ヘテロシストにおけるさらなる代謝改変や生産の場である細胞数の調節など、生産の効

率化につながると期待できる。

### 3. 今後の展開

本研究では、シアノバクテリアの分化細胞であるヘテロシストを用いて、光合成とバイオ燃料生産の場を分離することに成功した。ヘテロシストは増殖・分裂が停止した細胞であり、生存に必須の細胞ではない。そのため、その代謝系の改変には制約が無く、バイオ燃料生産の反応場としての利用が容易である。本研究でも行った代謝改変に留まらず、合成生物学的手法を用いた全く新規の代謝系を構築することも可能な細胞として期待できる。また、代謝系の酵素には酸素感受性が高いものが多く知られており、酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアを利用した物質生産の一つの課題となっている。しかし、ヘテロシストは、隣接した細胞で光合成が行われていても細胞内を嫌氣的に保つことができる。ヘテロシストは、単細胞性のシアノバクテリアでは実現が難しい、嫌氣的な環境を必要とする代謝経路による物質生産を可能にする細胞として期待できる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

本研究では、アナベナのヘテロシスト特異的な代謝工学により、エタノールを生産させることに成功した。さらに糖代謝系の改変により、生産性を向上させることにも成功した。また、基礎的な面でも、アナベナの糖代謝調節機構の解明、ヘテロシスト分化制御機構の解明につながる複数の成果を挙げた。研究は順調に進み、当初の研究目的は概ね達成することができたと考える。微細藻類による二酸化炭素からのバイオ燃料生産に対する社会全体の期待は増している。本研究の成果は、ヘテロシストという生存に必須ではない細胞を利用することで、単細胞性の微細藻類では難しい合成生物学的な代謝デザインによる物質生産にアナベナを利用して実現できる可能性を示している。酸素発生型の光合成を行う微細藻類が作り出す嫌氣的な細胞という特徴もあわせ、微細藻類での生産が通常では難しい物質の生産にはヘテロシストの利用が特に有効であると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

##### (研究総括)

研究は順調に進展し、当初の目的は概ね達成できたと評価する。ヘテロシストの代謝工学によりエタノール生産能を付与し、さらに生産性を向上させることにも成功している。シアノバクテリアによる物質生産の報告は多くあるが、窒素固定型のシアノバクテリアであるアナベナを利用し、さらに細胞特異的な代謝工学を行った例は無く、研究の独自性は高い。しかし、エタノールの生産性という面では、改善の余地があり、本研究を工業的なエタノール生産に発展させるためには課題は多い。ヘテロシストによる物質生産には、嫌氣的細胞内環境などの他の微細藻類にはない特徴があり、その特徴をより活かすことができる物質の生産に取り組むことで、今後の研究が大きく展開する可能性がある。得平研究者は本さきがけ研究の成果が認め

られ、研究期間中に首都大学東京に准教授として着任した。また、本研究の成果を活かし、今後は当領域のCREST研究に分担者として参加する予定であり、研究者としても着実にステップアップしている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Ehira, S., Miyazaki, S. (2015) Regulation of genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by a group 2 sigma factor SigC. *Life* **5**:587-603.
2. Ehira, S., Kimura, S., Miyazaki, S., Ohmori, M. (2014) Sucrose synthesis in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 is controlled by the two-component response regulator OrrA. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:5672-5679.
3. Ehira, S., Ohmori, M. (2014) NrrA directly regulates expression of the *fraF* gene and antisense RNAs for *fraE* in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* **160**:844-850.
4. Ehira, S. (2013) Transcriptional regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Russ. J. Plant Physiol.* **60**:443-452.
5. Ehira, S., Ohmori, M. (2012) The redox-sensing transcriptional regulator RexT controls expression of thioredoxin A2 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **287**:40433-40440.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

「Regulation of glycogen catabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120」 Physiology and Biotechnology of Microalgae, Moscow, Russia, Oct. 2012

招待講演

「多細胞性シアノバクテリアを用いた細胞間分業によるバイオ燃料生産」 広島大学サステナブル科学シンポジウム、広島、2012年11月

日本ゲノム微生物学会 第5回研究奨励賞 (平成24年3月)

第3回日本光合成学会大会 ポスター賞 (平成24年6月)

中央大学学術研究奨励賞 (平成25年3月)

# 研究報告書

## 「好気条件下で水素 (H<sub>2</sub>) 製造反応を触媒する [NiFeSe] 型ヒドロゲナーゼの分子構築」

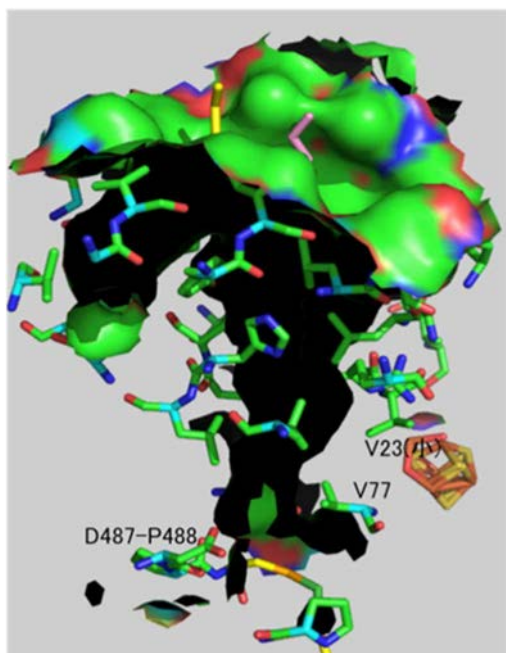
研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 田村 隆

### 1. 研究のねらい

燃料電池は、「もの」を燃やさずにエネルギー需給を図る発電法として、21 世紀のエネルギー戦略を描く上で重要な選択肢として期待されている。しかし水素社会の構築のためには、解決すべき技術的課題も多く残されている。水素と電力の相互変換を担う触媒として白金触媒に替わる安価で優れた触媒が必要であり、天然ガスの燃焼に依存しない水素製造法も求められる。水素の生産・消費を可逆的に触媒するヒドロゲナーゼは、僅かな濃度の分子状酸素 O<sub>2</sub> によって強く阻害されるので、微生物酵素を利用することの実現性は極めて乏しいとされてきた。近年、ごく少数の硫酸還元菌が生産する [NiFeSe] 型ヒドロゲナーゼ ([NiFeSe]Hase) は 2% 程度の酸素には耐性を示し、水素製造能力を維持できることが報告された。本酵素は活性中心の Ni-Fe 錯体の Ni を支える Cys 残基の 1 つがセレンシステイン (SeCys) 残基に置換されており、SeCys の強い還元力によりこのような酸素耐性を示す。この発見により、ヒドロゲナーゼには本質的に避けられない問題と思われていた酸素感受性が、活性中心への酸素の接近を阻止することで解決できることが示された。本研究では、[NiFeSe]Hase の酸素耐性をさらに高めるために、本酵素を頑強かつ隙間のない分子構造に改変する分子設計を目的とした。ヒドロゲナーゼはタンパク質の内部の活性中心と表面の間に gas cavity と呼ばれる水素/酸素の通り路を持つ。これまで [NiFe] 型ヒドロゲナーゼの酸素耐性を向上させるために、Gas Cavity を閉じる研究が取り組まれてきたが、数個のアミノ酸残基を置換しても限定的な効果しか得られず、もっと抜本的で斬新なタンパク質の



[NiFeSe]Hase の Gas Cavity 構造

分子設計法が望まれてきた。そこで本研究では、データベース上に蓄積された膨大な微生物ゲノム情報を収集して、[NiFeSe]Hase が経てきた分子進化を過去にさかのぼるシミュレーションを計画した。Gas Cavity は SeCys を獲得したことによって拡大してきたという仮説のもと、祖先型タンパク質の構造を復元できれば、Cavity が閉じた構造にたどり着くと考察したからである。本研究では、系統樹解析から予測された祖先型酵素のアミノ酸配列から立体構造を構築して、分子動力学計算により原子レベルでの精密な構造を算出する。そして硫酸還元菌を宿主として設計した酵素を発現させて、精製アフィニタグ付加を利用した簡便な酵素精製法を検討する、或いは組換え大腸菌による異種発現も検討し

てヒドロゲナーゼを取得する方法も検討する。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究の成果として、目標として掲げた「Gas cavity を閉じた構造を設計する」ことは、当初の計画で見込んだとおり「分子進化を過去にさかのぼれば、Gas Cavity が閉じた構造に辿り着く」という予想に合致した。しかし、想定外の展開として、閉じた構造は過去に存在しただけでなく、現在でも Cavity が閉じた[NiFeSe]Hase が存在する事が示された。当研究開始時には、*D. vulgaris* 由来(結晶構造 2wpi.pdb)と *D. baculatum* 由来(1cc1.pdb)のみが[NiFeSe]Hase であったが、より高い有用性(=高い酸素耐性)を持つ[NiFeSe]Hase を持つ硫酸還元菌の存在を見いだした。



新規[NiFeSe]Hase  
を生産する硫酸還元  
菌の収集と利用

本研究では、上記の(A)[NiFeSe]Hase の Gas Cavity 構造計算に加えて、下記の3項目を具体的な研究成果として得つつあり、今後発表する見通しである。まず、すでに確立された[NiFeSe]Hase 以外にも9種類の硫酸還元菌が[NiFeSe]Hase を持つことを系統解析と構造計算によって予測したが、これを(B)実験によって証明しつつある。*D. alaskensis*, *D. salexigens* などからも[NiFeSe]Hase を同定しており、さらに解析データを蓄積している。つぎに[NiFeSe]Hase の分子進化を解析する過程において、これまでほぼ不可能とされてきたバクテリアの系統解析が、[NiFeSe]ヒドロゲナーゼをもつ種限定という制限つきながらも(C)系統進化の道筋が辿れることを示した。バクテリアでは、属・種の系統解析が不可能とされる主な理由は、遺伝子(群)が水平伝播によって種を越えて移行するためであり、親から子への垂直な遺伝だけで系統が成り立つ高等生物のように「種の起源」を遡ることができない。しかし、このセレン含有型酵素ではオパールコドン UGA 解読機構に関わる特殊事情によって垂直な系統関係が強く支持される。これは学術的発見なので、論文投稿している。最後に、高い酸素耐性を持つと予想された新規な[NiFeSe]Hase を簡便かつ低コストに調製するために [NiFeSe]Hase 遺伝子に(D)精製用のアフィニティタグ配列を導入する方法を検討した。大腸菌からの接合伝達によって人工遺伝子を送り込み、相同組換えによってわずか24 bpの塩基配列(アミノ酸残基8個分)を[NiFeSe]ヒドロゲナーゼに書き込むだけで、酵素の一本釣りが可能になる。

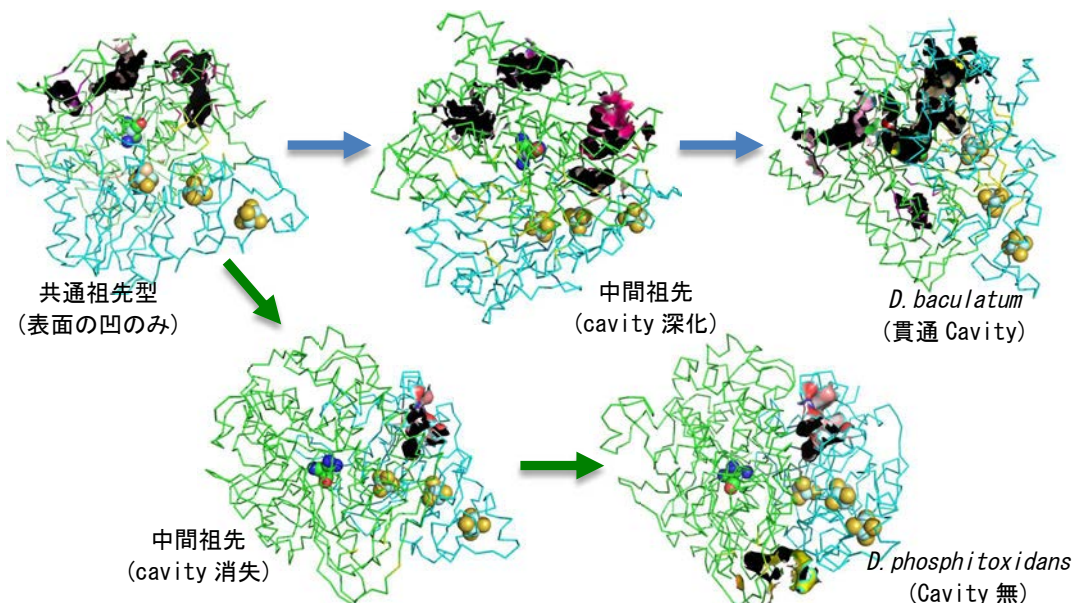
本研究により [NiFeSe]Hase の分子進化に関わる学術的な知見、新規[NiFe]Hase の発見や簡便調製法などの技術的なブレイクスルーがもたらされることが期待できる。

## (2) 詳細

### 研究テーマ (A) 分子動力学計算による分子進化と Gas Cavity 構造計算

微生物ゲノム情報の中から[NiFeSe]Hase 遺伝子, および高い相同性を有する[NiFe]Hase の遺伝子配列を 88 本, Phi-BLAST により抽出した。Muscle と GUIDANCE を用いた精密なアライメント作業を経て, BootStrap300, GTR+GI 進化モデルを適応した精度の高い系統樹解析をおこなった。その結果, 現存する[NiFeSe]Hase は, 分子進化の中で[NiFe]Hase から発生, 分岐した共通祖先に由来する子孫群と示された。共通祖先から現存のセレン型酵素に至る中間の祖先酵素の塩基配列も Ancescon プログラムによって算出した。ここまでは, タンパク質の分子進化を解析する基本に忠実なアプローチ。

当さがけ研究では, ここで得られたアミノ酸配列をすべてタンパク質の立体構造に起こす課題にチャレンジした。アミノ酸配列からタンパク質の立体構造を導くことは, 相同性が高く X 線結晶構造解析がすでに完了した鋳型構造があれば「ホモロジーモデル」を得ることが出来る。しかし, ホモロジーモデルはかなり粗く予測された構造なので, 本研究ではこれを出発点として, タンパク質分子内の物理化学的な相互作用を最適化するシミュレーションを取り入れ, 大規模な分子動力学計算を導入して水溶媒中での安定構造に導く計算を行った。セレンシステイン(SeCys)という特殊なアミノ酸残基が含まれるために SeCys のための新しいパラメーターも開発した。またソフトウェアの工夫だけでなく, 計算機の購入に際しては, ゲーム機のグラフィクス情報処理に使用される分散型プロセッサ-GPGPU を装備した先進的なマシンを特注して, これを十二分に活用した。計算効率をフルに上げて取り組んだが全構造計算を完了するまでに, 3年の時間と労力を要した。

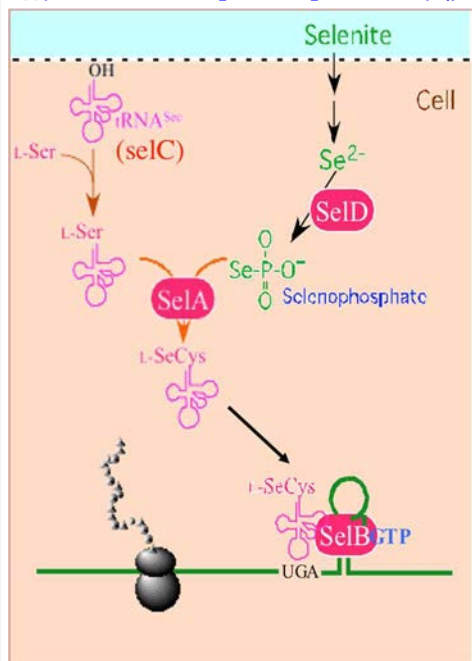


生育環境に対応して Gas Cavity が深化(青矢印)または消失(緑矢印)する分子進化の一例

## 研究テーマ B 新規[NiFeSe]Hase の検出と同定

[NiFeSe]ヒドロゲナーゼの SeCys 残基はオパールコドン UGA としてコードされており、ゲノムデータベース上では、大サブユニットの C 末端がトランケートされた形で登録されている。これを SeCys として読み直せば、UGA に続く相同配列を経て、新たな終止コドンに行き当たる。これらの新規[NiFeSe]Hase の実験的確認を得るために、超遠心分離機で膜画分に濃縮した [NiFeSe]Hase を Native PAGE 上で活性染色と ICP-MS によって化学的に同定する手法を確立した。ICP-MS を利用した超微量解析技術によりネイティブ酵素から Se を同定できた。*D. vulgaris*, *D. baculatum* など、すでに確立されたセレン含有ヒドロゲナーゼと共に *D. salexigens*, *D. africanus* から予想通りに [NiFeSe]Hase を同定した。数多くの新規ヒドロゲナーゼの発見を一網打尽に進めている。

## 研究テーマ C [NiFeSe]Hase の系統解析が示す硫酸還元菌の「種の起源」



セレン含有酵素が持つ特異な事情として、UGA を SeCys と翻訳する際にセレノソームと呼ばれる遺伝子群 (*selA*, *selB*, *selC*, *selD*) が働く。さらに UGA に続く mRNA の配列が SECIS エlement と呼ばれる特殊なステムループ構造を持つことも、分子認識に必須である。これら因子は互いに接触しながら作動するので、共進化の拘束を強く受ける。実際にセレノソーム遺伝子群の系統解析を行うと、系統関係は並行していた。さらに決定的なことは、これらの諸因子をコードする遺伝子はゲノム上に広くばらばらに散在しているので、水平伝播による「丸ごとの移行」は起こりえない。つまり [NiFeSe]Hase と関連遺伝子群は細菌でありながら、「種の系統」を辿ることが許される、極めて重要なマーカー遺伝子であることが示された。

## 研究テーマ D 簡易な[NiFeSe]調製法の開発

[NiFeSe]型ヒドロゲナーゼの構造計算の結果、現存する硫酸還元菌の中には、タンパク質の表面から活性中心への Gas Cavity を持たないものが見つかった。それらは腸内細菌 *D. piger*, *B. wadsworthia*, そして、浅海から分離された *D. phosphitoxidans* などである。Gas Cavity が大きな酵素は水素を効率的に電気に変換する能力が期待される。Gas Cavity を持たない酵素はさらに高い酸素耐性が期待できるので水素製造には有用と期待できる。これらの塩基配列を一部、書き換えて 8 アミノ酸残基(24bp)を書き込むだけでタンパク質の精製アフィニティタグ配列を導入することが出来るので、そのような改変を行うための接合伝達ベクターを構築した。嫌気チャンバー内で大腸菌から *D. vulgaris*, *D. baculatum*, *D. alaskensis* への接合伝達を接合を行うことにより遺伝子を送り込む方法は確立した。さらに1回目の相同組換えを起こしてタグ配列を含む遺伝子断片をゲノム上の [NiFeSe]ヒドロゲナーゼと結合させることも成功したようなので、「DNA 配列の軽微な変更による酵素調製の大きな成果」が期待できる



### 3. 今後の展開

#### 研究テーマ A 及び C 計算化学を活用したタンパク質分子進化研究の開拓

タンパク質の分子進化は塩基配列、アミノ酸配列などの一次構造で議論されており、本研究で取り組まれたように、配列情報を立体構造に起こして分子進化の意義を考察したのは、初の取り組みである。現存しない祖先型酵素、現存するが構造解析がなされていない未同定のホモログ酵素について立体構造をシミュレーションした。本研究では、棲息する環境に適應してその形を大きく変えてきた Gas Cavity にターゲットを絞ったことが、成功の鍵であったと考えられる。

酵素の分子進化を立体構造に基づいて考察するこのような取り組みをさらに[NiFe]ヒドロゲナーゼの分子進化にも適應して、そこに形成される Gas Cavity の変遷として考察を拡げたい。タンパク質の分子進化研究は国内外に厚い研究者層があるが、一次構造から立体構造を予測することは、まだ懐疑的な研究者も少なからず含まれると予想される。新しい解析手法を持った新参の挑戦者としてこの分野で研究を展開して行きたい。立体構造から分子進化を考察する新しい発想と、その裏付けとなる計算化学に関わる技術を深めたい。

#### 研究テーマ B および D [NiFeSe]ヒドロゲナーゼの生産工場としてのタグ付加

ヒドロゲナーゼは、優れた生体触媒であるがそれを調製するためのコストを削減するには1段階で簡便に酵素精製ができることが重要である。本研究で完成間近なタグ付加型酵素は、培養した菌体を超音波破碎して、アフィニティタグカラムに通すだけで精製が可能である。生産菌は嫌気性菌なので培養に当たっては攪拌を必要とすることもなく、温度も室温程度で生育可能なので熱源も必要ない。培養ボトルを密閉して静置して培地が黒く濁れば、そこから[NiFeSe]Hase を迅速に調製できる。タグ付加の遺伝子改変を受けた生産菌のそのものは生物特許として権利化が出来るので、開発者は独占的实施権を確保して、第三者と競合するリスクを負うことなく開発に取り組むことが出来る。生体触媒の優れた点は、燃焼による完全償却が可能で、価格が安いこと、さらに酸化還元両方向に触媒となる可逆性、酸素には弱い、汚水、硫化物などに侵されることなく、下水・海水からでも水素を生産することができるなど白金系人工触媒にはない利点が多い。付加したタグは、精製だけでなく電極への固定と配向制御にも使うことが出来る。

#### 創薬ターゲットとしてのヒドロゲナーゼの構造研究

本研究では、藻類バイオ領域の研究課題として水素エネルギーの製造または活用に関わるヒドロゲナーゼの構造研究に取り組んできた。その一方、本酵素はピロリ菌やサルモネラ菌がヒトに感染する上で、重要な役割を担う病原因子でもある。ピロリ菌が pH の低い胃の中で生存する戦略としてウレアーゼを介したアンモニア生産がよく知られているが、[NiFe]Hase もまたピロリ菌の酸耐性には欠かせない生存戦略の1つである。ピロリ菌の宿主であるヒトはヒドロゲナーゼを持たないので、これを強く阻害する薬剤は選択毒性を発揮することが期待できるので、ヒドロゲナーゼは創薬のターゲットとなる。同様にサルモネラ菌が胃の中で生存する上でも、やはり[NiFe]型ヒドロゲナーゼが必須の遺伝子であることも報告されている。これら病原菌の[NiFe]ヒドロゲナーゼは、ネイティブな酵素の精製も異種発

現も実現していない。創薬デザインには、立体構造予測と化合物ライブラリを用いた in silico のドッキングシミュレーションによるリード化合物探索が有用な知見となる。本研究で確立したヒドロゲナーゼの立体構造シミュレーション技術は、医薬品開発などの方面でも社会的インパクトをもたらす可能性がある。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

研究課題(A)として掲げた Gas Cavity 構造計算は、大筋、予想通りの展開になったので、ストーリーそのものを破綻させずに構造計算を完結することが出来た。タンパク質の構造計算そのものは比較的、順調に進展したといえる。投稿論文を期間内に投稿しなかったが、「現存する[NiFeSe]ヒドロゲナーゼが、共通祖先[NiFeSe]Hase から派生した子孫達である。」という大前提そのものを支持する解析データが必要になった。そのような、サポートデータの整備に、さらに日数を要したため、論文投稿は予定より遅れてしまった。しかし論文を強化する上で避けることは出来ないヤマだったと思われる。このサポート解析とは、研究テーマ(C)として上記に記述した内容で、これは MD 計算の投稿論文の中に含めて投稿する。

研究テーマ B とそれに派生したテーマ D は、完成間近ではないかと思われる。アフニティタグを付けた酵素を発現し続ける宿主は、水素社会構築にむけた開発研究にも寄与できることが期待できる。

##### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

タンパク質の機能改変を目的とする分子設計において、一部のアミノ酸を置換するというミクロな視点ではなく、タンパク質全体の構造を対象として、タンパク質の分子進化という時間軸を過去にさかのぼるという斬新な発想で取り組んだことは、さきがけ研究に相応しいユニークな取り組みといえる。既存の[NiFeSe]ヒドロゲナーゼだけでなく未同定のセレン含有型もまだ多数存在することに着眼したことも、貪欲な情報収集と柔軟な発想の証左といえる。

学術的な基礎研究と共に社会のニーズ、将来的な技術開発も考慮したシーズ的な開発にも着手しており、こちらの展開も将来的に波及効果が期待できる。

残念ながら、研究期間内に研究成果を投稿論文にできなかった。困難な課題設定に集中して研究に取り組むことも大切であるが、中長期的な時間で計画的に研究成果を論文発表することにも配慮しなくてはならない。今後の研究の展開とともに発表促進をはかられたい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. 田村 隆, 量子化学が解き明かすヒドロゲナーゼの触媒機構, ビタミン/バイオフィクターと生命科学 86 (7), 412-414 (2012)

2. 田村 隆, 浅野香織 鉄硫黄クラスター形成に関わる硫黄輸送システム, ビタミン/バイオ  
ファクターと生命科学 88(2) in press (2014)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

富士通計算化学ユーザーフォーラム 2012

「スパコンはタイムマシン? ~蛋白質の分子進化を過去に遡るシミュレーション~」

2012 年 12 月

国際学会発表

1. Molecular evolution of [NiFeSe]Hydrogenase simulated by phylogeny and Molecular Dynamics. 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine. (第 10 回セレンの生物・医学シンポジウム) ドイツ・ベルリン, 2013 年 9 月 14-18 日
2. Molecular evolution of gas cavity in [NiFeSe]Hydrogenase resurrected *in silico* by ancestral sequence estimation and 3D modeling by molecular dynamics simulation. The Fourth International Conference on Cofactors (ICC4) (第 4 回 国際補酵素会議) イタリア・パルマ, 2014 年 8 月 25-28 日

# 研究報告書

## 「生物界最速シャジクモミオシンを利用した植物成長促進システムの開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 富永 基樹

### 1. 研究のねらい

植物では、“原形質流動”とよばれる活発な細胞内輸送がみられる。この運動はモータータンパク質ミオシンが、オルガネラや小胞に結合し ATP 加水分解のエネルギーを使ってアクチン骨格上を運動することによって発生している。

動物の細胞内輸送速度が $\sim 1 \mu\text{m}/\text{sec}$  程度であるのに対し、高等植物の原形質流動は $\sim 10 \mu\text{m}/\text{sec}$  を発生する。特に、淡水産藻類であるシャジクモ(*Chara corallina*)の細胞(細胞ひとつが 10cm 以上に成長する)では、 $70 \mu\text{m}/\text{sec}$ (動物の 100 倍、高等植物の 10 倍)に達する原形質流動が行われている。流動速度はミオシンの運動速度を反映しており、シャジクモミオシンは生物界最速のモータータンパク質として知られている。

植物個体に視点を移した場合、光合成や窒素固定・硝酸還元の場合(ソース)から生長・貯蔵の場合(シンク)への物質移動、あるいは、植物ホルモンや細胞壁前駆体、二酸化炭素といった成長関連物質の輸送に原形質流動の速度が大きく寄与している可能性が考えられる。例えば、植物は、葉、茎、根、子実(果実)などの性格を異にする多数の器官から成り立っているが、葉の光合成によって生成された光合成産物は、そのほとんどが葉に貯蔵されるのではなく、莢さや、子実などへ移動し貯蔵される。光合成産物のみならず、植物成長に関連する物質は、原形質連絡を介して幾層もの細胞間を移動するシンプラスト経路を必ず通過しなければならない。しかしながら、単純拡散のみでは非常に時間がかかる。原形質流動は、シンプラスト経路における能動的輸送を促進するポンプとして機能している可能性が考えられる。従って、ポンプの駆動力であるミオシンの運動速度を人工的に速くすれば、植物の成長を促進できる可能性がある。

本研究のねらいは原形質流動の駆動力であるミオシン XI の速度を人工的にコントロールし、植物の成長制御システムの確立を目指すことにある。本システムは、植物普遍的な原形質流動の駆動力として保存されているミオシンを改変する手法である。従って、樹木を含めたあらゆる有用植物への転用が容易な汎用性の高いシステムであり、将来的には様々な植物に本システムを転用することで、二酸化炭素の削減、食物の増産、バイオマスエネルギー生産の効率化等への展開が大きく期待できる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シロイヌナズナにおいて、原形質流動の主な駆動力として知られるミオシン XI-2 と XI-K に、速度の異なる他種ミオシンのモータードメインを融合することで、速度改変型キメラミオシン XI を開発した(図 1)。生物界最速シャジクモミオシン XI のモーターを融合した高速型ミオシン

XI-2 の発現は、細胞サイズの増大に伴い植物を大型化することが明らかとなった。対して、ヒトミオシン V のモーターを融合した低速型ミオシン XI-2 の発現は、細胞サイズの減少に伴い植物の小型化を引き起こした。植物サイズとミオシン速度のリニアな相関から、原形質流動速度が植物サイズを規定している支配因子の一つであることが明らかとなった(図 2, Tominaga et al., Developmental Cell, 2013)。

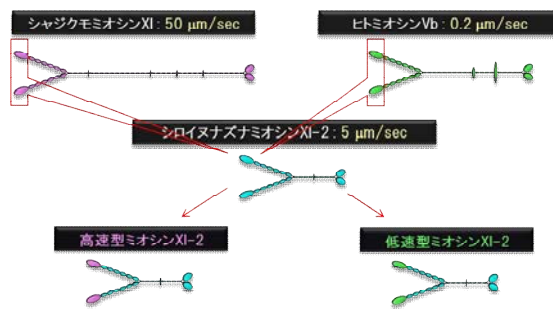


図1. 速度改変型ミオシンXIの開発

更に、高速型ミオシン XI-K の発現も植物の大型化を引き起こしたが、大型化は高速型 XI-2 とは異なる発達段階、組織で現れることが明らかとなった(図 3)。すなわち



図2. 速度改変型ミオシンXI-2による植物サイズの変化

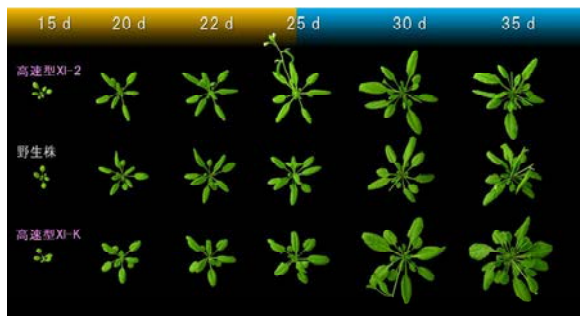


図3. 高速型ミオシンXI-2とXI-Kで植物大型化に対する効果が異なる

高等植物は、駆動力のミオシン XI を時間空間的に使い分けることで、原形質流動を介して自らの成長を制御している事が示唆された。

原形質流動は、藻類から高等植物まで見られる植物普遍的な細胞内輸送システムである。加えて、ミオシンの運動機能領域は高度に保存されていることから、高速化・低速化は様々な有用植物のミオシンに適用することが可能である。例えば、茎で低速型ミオシン XI、葉で高速型ミオシン XI を発現させることにより、背丈が低く風や雨に対する倒状に強いが、収穫量の多い作物を人工的にデザインすることも可能になり得る。さらに、既存の植物増産技術と本高速化技術を併用することで、相乗効果によるバイオマスの更なる増産が期待できる。将来的にこの技術をバイオマスエネルギーや食糧に関連した資源植物に適用することで、効果的かつ普遍的な植物増産システムとしての展開が期待できる。

## (2) 詳細

### 研究テーマ 1「植物大型化の強化」

(1A) 原形質流動に関与する複数のミオシンの同時高速化による、植物の大型化強化。

- ミオシン XI-K の高速化による植物の大型化を見出した。
- 高速型 XI-K による大型化は、高速型 XI-2 とは異なったタイミングと場所で現れることが明らかとなった。
- 現在、高速型 XI-2 と高速型 XI-K の同時発現株を作製中。

(1B) ミオシン発現量の増幅による、植物の大型化強化。

- 過剰発現プロモーターによる高速型ミオシン XI の発現は、植物にとって致死的な影響が出た。

- 適切な発現量、あるいは発現場所のコントロールが不可欠であることが明らかとなった。

## 研究テーマ 2「植物組織特異的サイズ制御システムの確立」

(2A) 低速型キメラミオシンによる、植物小型化。

- 低速型 XI-2 の発現により、植物が小型化することが明らかとなった。
- 低速型 XI-K の発現は、植物の小型化を引き起こさなかった。
- ミオシン XI-2 と XI-K が、植物の発達段階の異なったタイミングで機能していることが示唆された。
- 植物が、原形質流動の駆動力であるミオシン XI-2 と XI-K を時間・空間的に使い分けることにより、自身のサイズを制御している可能性が示された。

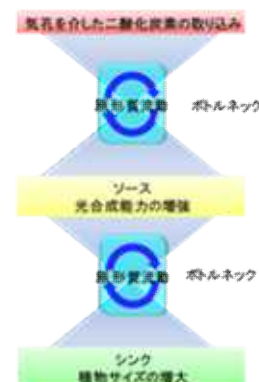
(2B) 高速型・低速型ミオシンの組織特異的発現による植物サイズ制御システムの確立。

- 過剰発現型プロモーターによる高速型ミオシン XI の発現が致命的に作用したことから、速度改変型ミオシンの組織特異的発現には検討が必要であることが明らかとなった。

### 3. 今後の展開

原形質流動の高速化技術を様々なバイオマス資源植物で適用することができれば、固体当たりの植物バイオマスを増産することが可能になると考えられる。これにより、単位面積・時間当たりの二酸化炭素吸収量が増大できると共に、得られたバイオマスからカーボンニュートラルなエネルギーの増産が達成できる。

またシンク(生長・貯蔵の場)への物質輸送を活性化させる本技術は、ソース(代謝や光合成の場)を増強した数ある既存の植物増産技術と併用することで、その効果を飛躍的に増強することが期待できる。逆に、ソースのみの活性化では、“原形質流動がボトルネック”となり植物全体に対する効果が限定的になっている可能性が考えられる。今後、原形質流動高速化をバイオマス増産の基盤技術として確立し、将来的には他の増産技術との併用により樹木や藻類を含めたあらゆるバイオマス資源植物の増産を目指す。



#### A. 分子レベル(ミオシン XI の更なる高速化)

“現・高速型シャジクモ-シロイヌナズナキメラミオシン XI-2”の運動速度は、約 16 $\mu$ m/sec である。野生型シロイヌナズナミオシン XI-2 の運動速度は、約 7 $\mu$ m/sec であることから、約 2 倍の高速化が実現している。しかし、シャジクモミオシン XI 本来の速度(約 70 $\mu$ m/sec)を考えると、少なくとも約 10 倍の高速化が期待できる。そこでアミノ酸レベルでの分子設計を見直すことで、更なる高速性能を備えた“新・高速型ミオシン XI”の開発を目指す。

#### B. シロイヌナズナ(基本原理の解明)

原形質流動が何を輸送することによって植物の大きさを規定しているのかについては、いま

だ明らかになっていない。今後、様々な植物で実用化を試行する場合、基本メカニズムの理解は、トラブルシューティングなどにおいて不可欠となる。そのため、ライフサイクルが短く、分子生物学的アプローチが容易なモデル植物シロイヌナズナを用いて基本メカニズムの解明を行う。

また、高等植物は、それぞれ十種類以上のミオシン XI 遺伝子を持つ。シロイヌナズナにも13種類のみオシン XI 遺伝子が存在することから、現在高速化を施しているミオシン XI-2 以外の高速化がバイオマス増産に重要な植物の大型化(種子や地下部など)を促す可能性が考えられる。他種類のミオシン XI の高速化を試み、バイオマス増産に資するミオシン XI の同定を試みる。

### C. 他の植物(バイオマス資源植物の大型化)

草本のみならず樹木や藻類など様々なバイオマス資源植物で原形質流動の高速化を実施し、二酸化炭素固定量の増大による温室効果ガスの削減およびバイオマス増産を達成する。

## 4. 評価

### (1) 自己評価

(研究者)

#### 研究目標の達成状況

- ・原形質流動の高速化による植物の大型化、低速化による植物の小型化を立証できたことで、原形質流動が植物サイズを規定する制御因子であることを明らかにできた。
- ・また、ミオシン XI-K の速度変化から、原形質流動が単なる植物内の攪拌だけでなく、時間・空間的制御によって、植物のサイズを制御している可能性を示唆できた。
- ・200 年前の発見以来大きな謎であった原形質流動の機能を解明した基礎面、バイオマス増産の基盤技術としての応用面でインパクトのある成果を出せたと思っている。
- ・速度変化型ミオシンの過剰発現や、組織特異的発現により、サイズコントロールを試みた。しかしながら、ミオシンの発現量や部位に依存して植物に致死的影響があることが明らかとなった。この結果は、植物における原形質流動の機能を解明するうえで非常に重要なヒントになり得ることから今後の課題としていきたい。

#### 研究の進め方

- ・研究補助員
  - 多くの形質転換植物を作製することができた。
  - 結果、バイオマス増産に資するミオシンメンバーを複数同定することができた。
- ・湿度コントロール付き人工気象器
  - 当初はオーバースペックかと思ったが、湿度に対する感受性の違いから、二酸化炭素原因説を提唱することができた。
- ・高速型共焦点顕微鏡
  - 原形質流動の速い動きをリアルタイムで捉えることが可能となった。
  - 細胞内での輸送速度の変化を捉えることができたため、論文アクセプトの際の大きな判断材料となったと思われる。

### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

- ・さきがけ研究による成果をプレス発表することで、ニュース、全国紙をはじめ様々なメディアに取り上げていただくことができた。
- ・また、以前の分子レベルでの研究も含め、原形質流動の機能を分子から個体レベルまで明らかにした点が国際的に高く評価され、国際シロイヌナズナ会議(ICAR)に招待され基調講演を行うことができた。
- ・さきがけでの研究成果をベースとし、社会実装を目指した研究開発提案を JST-ALCA に採択いただくことができた。今後、イネを初め藻類、樹木など様々な資源植物への展開を進める予定である。

シャジクモミオシン XI を利用した原形質流動の高速化は、あらゆる植物のバイオマス増産を可能とする高い汎用性・独自性を備えた革新的システムとなり得ると考えている。しかしながら、本格的な社会実装に向けて今後解決していかななくてはならない課題は多い。

- ・原形質流動の速度変化により植物のサイズを規定している本当の原因物質はなにか？  
現在、二酸化炭素や光合成産物を候補として考えているが、それを立証するための研究が不可欠である。
- ・シロイヌナズナのみならず、あらゆる植物で原形質流動高速化の効果は得られるのか？  
現在、資源植物の一例としてイネでの効果を検証中である。今後は、樹木や藻類など様々な有用植物で効果を検討していかななくてはならない。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

藻類が持つ特別な能力を他の生物に付与し、バイオマスの増産を図るというユニークな発想で、基礎・応用面からインパクトのある成果を出せた。今後、淡水産藻類シャジクモミオシンを使った植物成長促進システムは、バイオマス増産の基盤技術として藻類を含む様々な資源植物への展開が大いに期待できる。

また、本さきがけ研究の成果が国内外で研究領域におけるトップランナーの1人として認知され、研究者としての飛躍につながった。今後は、早稲田大学に PI として、また、JST-先端的低炭素化技術開発(ALCA)を通じて、更なる研究の進展に期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Motoki Tominaga, Atsushi Kimura, Etsuo Yokota, Takeshi Haraguchi, Teruo Shimmen, Keiichi Yamamoto, Akihiko Nakano, and Kohji Ito. Cytoplasmic Streaming Velocity as a Plant Size Determinant. Dev. Cell. 2013, 27, 345-352, Selected for F1000prime
2. Ralph P. Diensthuber, Motoki Tominaga, Matthias Preller, Falk K. Hartmann, Hidefumi Orii,



Igor Chizhov, Kazuhiro Oiwa, and Georgios Tsiavaliaris. Kinetic mechanism of Nicotiana tabacum myosin-11 defines a new type of a processive motor. JFASEB J. 2013, 29, 81-94

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 富永 基樹

発明の名称: 成長増強植物及びその作出方法

出 願 人: 独立行政法人 理化学研究所

出 願 日: 2012/1/5

出 願 番 号: 13/344574

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

**主要な学会発表**

招待講演(海外)

1. Motoki Tominaga

Molecular mechanism and physiological function of cytoplasmic streaming.

25th International Conference on Arabidopsis Research,

University of British Columbia, Vancouver, Canada, 2014, August, 1

招待講演(国内)

1. 富永基樹

植物ミオシン:高次機能を担う分子メカニズム

神谷宣郎先生 生誕百周年記念シンポジウム

大阪大学@豊中市・大阪 2013 年 7 月 13 日

2. 富永基樹

原形質流動速度の人工的改変による植物のサイズ制御

シンポジウム「細胞を創る操る」

奈良先端科学技術大学院大学 ミレニアムホール@奈良市・奈良 2013 年 11 月 28

3. 富永基樹

原形質流動による成長制御から考える植物の光戦略

公開シンポジウム「多様な光合成の世界」

近畿大学 農学部 奈良キャンパス@奈良市・奈良 2014 年 5 月 30

4. 富永基樹

動かない植物の細胞内運動の謎

学習院大学生命科学シンポジウム「生命の秘密を解く鍵をもとめて」

学習院大学@目白・東京 2014 年 5 月 31 日



## 著作物

### 総説

Motoki Tominaga and Akihiko Nakano. Plant-specific myosin XI, a molecular perspective.  
Front. Plant Sci. 3 : 211, DOI: 10.3389/fpls.2012.00211

### 解説

#### 1. ライフサイエンス新着論文レビュー (First Author's)

原形質流動は植物の大きさの決定因子である  
富永基樹, 伊藤光二, 2013

#### 2. 生物物理.

富永基樹, 伊藤光二  
ミオシン速度は植物サイズを決定する. 2014, 54 : 259-261

## プレスリリース(文部科学省@東京 2013年11月8日)

### プレス発表

JST・理研・千葉大 (<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131112/index.html>)

植物の大きさを制御する新たな手法を発見  
～植物の原形質流動の本質的な役割を解明～

### 全国ニュース

NHK「あさイチ」11月27日(水), AM9:02～  
遺伝子操作で植物の大きさ自在に

### 全国紙

- ・産経新聞, 11月12日朝刊, 社会面  
遺伝子操作で細胞質制御  
植物のサイズ制御に成功
- ・朝日新聞, 12月19日朝刊, 科学面  
葉の成長のカギ解明  
理研など 細胞内の流れに違い
- ・日経新聞, 11月12日朝刊, 科学技術面  
植物の細胞を制御, 葉の面積に変化
- ・日刊工業新聞, 11月12日朝刊, 科学面  
遺伝子操作で物質輸送現象制御  
植物サイズ人工改変

# 研究報告書

## 「微細藻類ユーグレナの新規形質転換法の開発と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 中澤 昌美

### 1. 研究のねらい

微細藻類であるユーグレナは、45%までの高濃度二酸化炭素下においても光合成により良好に生育する。ユーグレナは光合成や外部の炭素源から得た余剰の炭素を貯蔵多糖である $\beta$ -1,3グルカン、パラミロンとして細胞内に蓄積する。細胞が低酸素状態にさらされると、パラミロンを速やかに分解し、脂肪酸-脂肪アルコールエステルであるワックスエステルを生産する。ユーグレナが生産するワックスエステルは二重結合を持たず、酸化安定性が高いという特徴がある。主成分はミリスチン酸ミリスチル(C14:0-C14:0Alc)である。この化合物から調製したバイオディーゼルは、比較的軽質であるためジェット燃料への活用が期待されているが、実用に向けては収量の向上およびさらなる組成の改質が望まれている。そのためには、代謝改変の基盤技術を確立するとともに、未解明な点の多いワックスエステル合成経路の酵素を同定することおよび代謝メカニズムを理解することが必須である。

本研究では代謝改変によるユーグレナワックスエステルの増産および改良に向けて、ユーグレナ核ゲノム形質転換法を開発し代謝改変ユーグレナ獲得のための基盤技術を創成すること、さらにワックスエステル合成機構を解明し、代謝改変ターゲットを選定することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ユーグレナが生産するバイオ燃料、ワックスエステルを増産・改良するために、ユーグレナ核ゲノム形質転換法の開発による代謝改変基盤技術の開発、および、ワックスエステル合成経路の同定及び代謝メカニズムの理解、を目指した研究を行った。

形質転換法の開発においては、遺伝子導入法の最適化(エレクトロポレーションおよびアグロバクテリウム法(特許出願中)の利用)、導入遺伝子エレメントの新規開発、薬剤選択の最適化によって導入遺伝子由来 mRNA を安定に転写する系を開発した。

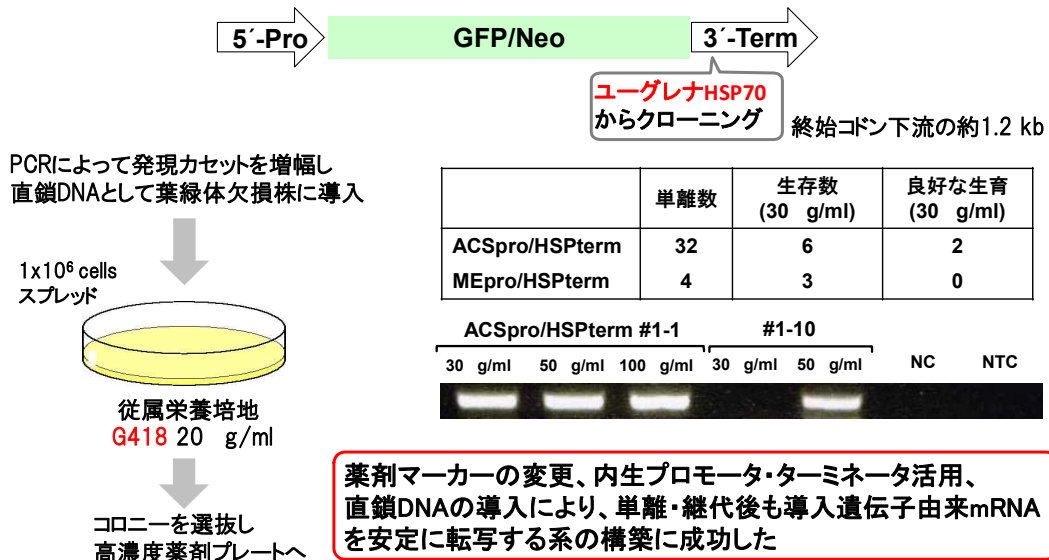
ワックスエステル合成機構の解明においては、RNAi による遺伝子ノックダウン技術をユーグレナに適用し、ワックスエステル合成の律速段階となりうる因子を 2 種同定した。さらに、遺伝子サイレンシングによって、ワックスエステルの組成を改変し、バイオ燃料としての性質を向上させることに世界で初めて成功した。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A 「ユーグレナ核ゲノム形質転換法の開発による代謝改変基盤技術の開発」

これまで未開発であったユーグレナの核ゲノム形質転換法を開発するために、選択薬剤および導入方法の検討、ユーグレナに適した新たな導入 DNA の構築を行い、形質転換体を単離・

継代後も導入遺伝子由来 mRNA を安定に転写する系の構築に成功した。図中ではエレクトロポレーション法での導入について記載した。また、アグロバクテリウム法によるユーグレナへの遺伝子導入にも取り組み、形質転換法に関する特許を取得した[成果リスト特許 1]。



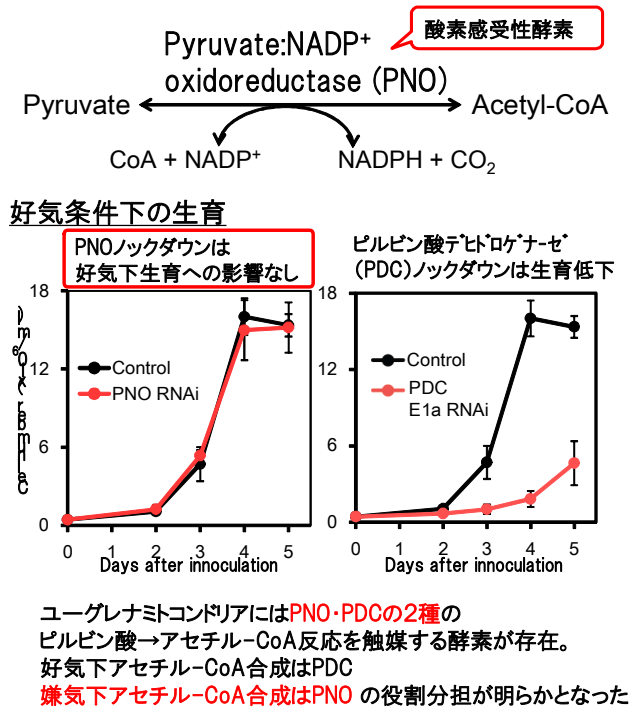
図：ユーグレナ形質転換系の開発

### 研究テーマB「ワックスエステル合成経路の同定及び代謝メカニズムの理解」

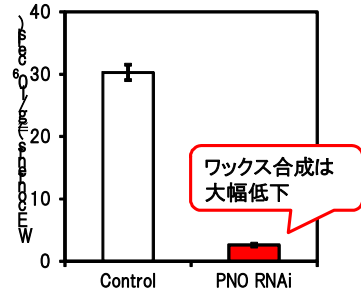
ユーグレナが低酸素状態でのワックスエステルを合成する経路として、貯蔵多糖パラミロンの分解、解糖での ATP 産生、ミトコンドリアでのアシル-CoA 合成、小胞体でのエステル化反応によるワックスエステル合成という過程が予想されてきた。しかし、経路を構成する酵素の分子情報は、ほとんど不明であった。ワックスエステルを増産するためには、どの経路が律速となっているかを解明することが重要である。従来の生化学的な情報を総合すると、ユーグレナにはパラミロン分解から解糖系への能力は充分あるが、ピルビン酸以下の代謝物の利用速度が律速となり能力が発揮できていないことが予想された。そこで、本研究ではワックスエステル合成経路の律速段階を明らかにし、生産量の向上に資する知見を得るため、ピルビン酸からアシル-CoA 合成過程の酵素を発現抑制することにより、律速過程の推定を行った。

#### 1) ピルビン酸からアセチル-CoA への変換反応

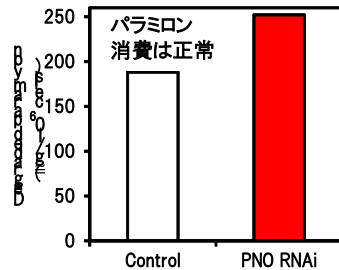
ユーグレナのミトコンドリアには、ピルビン酸からアセチル-CoA への変換を触媒する酵素として、一般的な生物が有するピルビン酸デヒドロゲナーゼ多酵素複合体(PDC)に加え、ピルビン酸:NADP<sup>+</sup>酸化還元酵素(PNO)の存在が知られている。PNO は、ワックスエステル合成過程で機能すると考えられてきたが、詳細は不明であった。本研究において、RNAi により遺伝子発現を抑制することによって両者の機能を調べた結果、好気下でのアセチル-CoA 合成はPDC、嫌気・低酸素下でのアセチル-CoA 合成はPNOという役割分担をしていることが明らかとなった。さらに、PNO のノックダウンではパラミロンの消費は正常であったが、ワックス合成が大幅に低下しており、PNO がワックスエステル合成経路における律速段階のひとつである可能性が示唆された。



**WE合成量(低酸素24 h)**



**パラミロン減少量(低酸素24 h)**

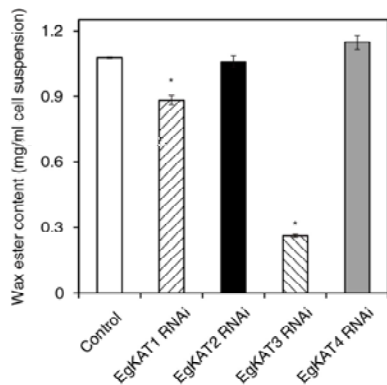


図： PNO ノックダウンはワックスエステル合成を低下させる

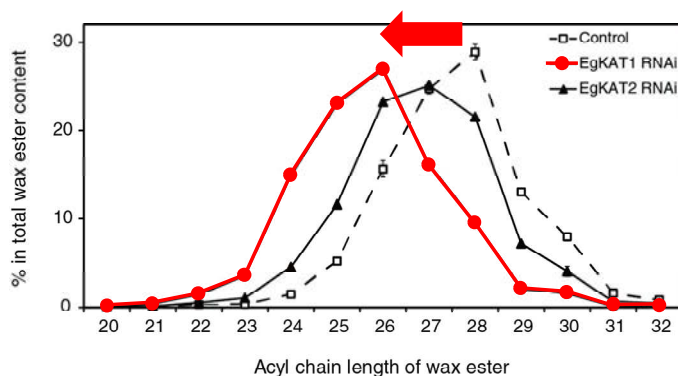
2) ミトコンドリアにおけるアシル鎖伸長反応 [成果リスト 3]

ワックスエステルは、ミトコンドリアでATPを必要としない *de novo* 脂肪酸経路を経て合成される。この反応は脂肪酸β酸化の逆反応であることが知られていたが、関連する酵素の分子情報は全く不明であった。本研究では、アセチル-CoAによるアシル鎖伸長反応を触媒する3-ケトアシル-CoA チオラーゼ(EgKAT)に着目した。データベース情報から、ユーグレナが6種類のEgKATアイソザイムを持つことを見出し、それぞれをRNAiによって発現抑制することで、機能の解析を行った。その結果、ワックスエステル総量を大幅に低下させるアイソザイムEgKAT3を見出した。本酵素の触媒する短鎖アシル CoA の伸長反応がワックスエステル合成における律速段階である可能性が示唆された。

さらに、EgKAT1 および 2 のノックダウン細胞は、通常よりも短いワックスエステルを作ることを見出した。ワックスエステル総量の変化に及ぼす影響は小さかった。短縮化したワックスエステルの構成成分をもとに、市販の脂肪酸メチルエステルおよび脂肪アルコールを混合したモデル燃料を調製し、熱測定を行った結果、凝固点が 8°C、融点が 12°C低下することが明らかとなった。世界で初めて代謝改変によってワックスエステルの組成を、目的に沿って改変することに成功した。



EgKAT3 RNAiで  
ワックスエステル総量大きく低下



EgKAT1, 2のRNAiで鎖長短縮

= EgKAT1と2は  
長鎖アシル-CoA伸長に機能

ワックスエステルの改質に成功

図：EgKAT アイソザイムノックダウンはワックスエステルの量・質を変化させる

### 3. 今後の展開

本研究により、ユーグレナ核ゲノム形質転換法の基盤情報が得られたとともに、ユーグレナがワックスエステルを生産するメカニズムの一端が明らかとなった。ワックスエステル合成における律速段階候補を明らかにしたことで、今後は代謝の強化によるワックスエステル生産の向上を達成することを目指す。また、現在は非公開の成果であるが、他の代謝調節方法によりワックスエステル合成を向上させることにすでに成功している。今後、メカニズムを詳細に解析することによりワックスエステルの生産向上への基盤を構築し、実用化レベルへの展開を目指す。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究は、ユーグレナが生産するバイオ燃料、ワックスエステル生産量を倍増させる、という目標のもと、ユーグレナ核ゲノム形質転換系の開発およびワックスエステル合成機構の解明を目指した研究を進めてきた。今回開発を進めた核ゲノム形質転換系は、今後のユーグレナ研究における基盤技術となりうる。実際の代謝改変に用いるため、さらに改良を進める必要がある。ワックスエステル合成機構の解明については、律速過程となりうる反応をはじめて見出すことに成功したとともに、ワックスエステル組成を代謝工学的に改良することに成功した。さらに、非公開成果であるが、代謝の調節によってワックスエステル生産量を倍増させることにより、当初の数値目標を達成することができた。これは、ユーグレナによるバイオ燃料の実用化に向けて、重要な成果であると考えている。

研究進展として、形質転換系の開発に多くの時間を要したため、研究成果の論文発表が遅れていることを大きな課題として、さきがけによって得た成果を早急に論文発表する。研究を進める中で、研究期間の最後の半年にワックスエステル合成機構の解明におけるブレークスルーを得ることができた。目の前の現象に真摯に向き合って、そこから可能な限りの情報を獲得し、共同研究者と徹底的に議論する、という「科学者として当たり前のこと」の重要性を改めて気付くことのできたさきがけの3年半だった。今後、さきがけ「PRESTO」=少し急いで、の気持ちを持ち続け、研究を進めて行きたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

ワックスエステル合成を向上させるという目標に向けて、形質転換法の開発と、代謝メカニズム解明に取り組んだ。代謝メカニズム解明の観点からワックスエステル合成向上を達成したという点は評価できる。論文成果の発表が少し遅れているが、早期に成果をまとめることが期待される。今後はCREST石川孝博教授グループに参画することで、ユーグレナによるバイオ燃料生産メカニズム解明という基礎的な知見からの成果創出をさらに加速させるとともに、実用化への展開が期待される。また、領域内外の研究者や領域アドバイザーとの研究交流を積極的に行っており、その成果が徐々に形になりつつある。今後の研鑽によってユーグレナ研究の中核となる人物となることを期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takumi OGAWA, Takeshi FURUHASHI, Atsushi OKAZAWA, Rai NAKAI, Masami NAKAZAWA, Tobias KIND, Oliver FIEHN, Shigehiko KANAYA, Masanori ARITA, Daisaku OHTA, "Exploration of Polar Lipid Accumulation Profiles in *Euglena gracilis* Using LipidBlast, an *in silico* Constructed MS/MS Spectral Library" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78(1) 14-18 (2014).
2. Takeshi Furuhashi, Takumi Ogawa, Rai Nakai, Masami Nakazawa, Atsushi Okazawa, Adchara Padermschoke, Kazuki Nishio, Masami Yokota Hirai, Masanori Arita, Daisaku Ohta, "Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography-mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia" *Metabolomics* 11 175-183 (2015).
3. Masami Nakazawa, Hiroko Andoh, Keiichiro Koyama, Yomi Watanabe, Takeo Nakai, Mitsuhiro Ueda, Tatsuji Sakamoto, Hiroshi Inui, Yoshihisa Nakano, Kazutaka Miyatake, "Alteration of wax ester content and composition in *Euglena gracilis* with gene silencing of 3-ketoacyl-CoA thiolase isozymes" *Lipids in press*.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 中澤 昌美、春口 大樹、上田 光宏、宮武 和孝

発明の名称: 形質転換ユーグレナ及びその製造方法

出 願 人: 公立大学法人大阪府立大学、株式会社ユーグレナ

出 願 日: 2013/12/25

出 願 番 号: PCT/JP2013/084618

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Masami Nakazawa, Mitsuhiro Ueda, Hiroshi Inui, Yoshihisa Nakano, Kazutaka Miyatake  
“Biofuel production in CO<sub>2</sub>-absorbing microalgae *Euglena gracilis*” JST さきがけ研究  
領域合同国際シンポジウム「持続する社会を先導する光科学：環境・エネルギー・機  
能材料」2012 年 3 月



# 研究報告書

## 「多様な光スイッチの開発による細胞外多糖生産の光制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 成川 礼

### 1. 研究のねらい

本研究提案は、これまでに私が同定してきた新規光センサー群を利用し、光受容部位と制御系との新たな組み合わせを創出し、転写活性や酵素活性を光により厳密に制御することで、シアノバクテリアにおいて高効率な物質生産系の確立を目指します。これまでに私は、シアノバクテリアから紫／緑色光センサー、青／緑色光センサー、赤／緑色光センサーなど多様な新規光質センサーを同定してきました。また、これらの光センサーが走光性や光依存的な細胞凝集などの光応答現象を制御していることも解明されつつあります。光センサーの光感知機構や細胞レベルでの制御機構について、さらなる基礎的な解析を進めることで、後述する光スイッチ開発のための基盤データ取得を目指します。

緑色光や遠赤色光は光合成にあまり利用されないため、これらの光を制御光として用いることで、光合成活性をあまり損なうことなく光質制御が可能です。また、化学物質添加による制御では、物質を除くことが困難な故に、操作が不可逆ですが、光による制御は培地に何も添加する必要がなく、培地の再利用により何度も制御が可能である点でも非常に有用です。これらの特性に着目し、まずは、緑色光と遠赤色光の間で変換する光スイッチを開発します。光感知からのシグナル伝達としては、セカンドメッセンジャーに着目します。特に、c-di-GMP を結合して活性化するセルロース合成酵素が同定されているため、c-di-GMP 合成型光スイッチの開発を目指します。また、cAMP 結合型転写因子とその結合 DNA 配列がよく分かっているため、転写制御系として、cAMP 合成型光スイッチの開発を目指します。これらの制御系を組み合わせることで、代謝フローを改変しつつ、酵素活性を直接的に制御し、高効率な生産系構築が期待されます。将来的には、セルロース合成酵素以外の糖転移酵素に関しても、光による制御を試みることで、より汎用性のある制御系を構築したいと考えています。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

光合成生物は光をエネルギーとして利用し、それ故に最重要な情報としても認識し、高度な光応答機構を備えています。一方、光合成による物質生産を産業化するには、生産効率向上が必須です。シアノバクテリアにおいては、主に、シアノバクテリオクロムと呼ばれる光センサーが、多様な光質を感知し、走光性や光依存的な細胞凝集等を制御していることが解明されつつあります。本研究では、シアノバクテリオクロムによる光感知機構の解明・受容光質の改変・光センサーと制御系の新たな組合せの創出を通じ、シアノバクテリアにおいて、細胞外多糖、特にセルロースの生産を光で制御する系の構築を目指しました。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A: 遠赤／緑色光変換型光スイッチの開発に向けて

光合成による物質生産を光で制御する際、光合成の生産性を維持するためには、光合成の光質と制御の光質を分離する必要があります。開発対象のシアノバクテリアは青・橙～赤色光を光合成に用いるため、遠赤色光と緑色光を制御光として用いることで、光合成の生産性を下げずに光による制御が可能になると期待できます。そこで、本研究では、遠赤色光と緑色光の間で変換する光スイッチの創出を目指し、以下の研究を行ってきました。開発土台として、これまでに光変換機構の解明が進んでいる、赤／緑色光変換型光センサーを選定しました。

1. 赤／緑色光変換型光センサーの機構・構造解明 (Narikawa R et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013)

赤／緑色光変換型光センサーである AnPixJg2 の赤色光吸収型の結晶構造を決定しました。これにより、色素とタンパク質の相互作用の詳細が明らかとなり、特定の光質を吸収する仕組みに対する理解が深まり、吸収光質改変に向けた情報基盤が整ったといえます。

2. 赤／青色光変換型光センサーの発見 (Narikawa R et al. Biochemistry, 2014)

赤／緑色光変換型サブファミリーの中から、赤／青色光変換型光センサー (AM1\_1186g2) を発見しました。AM1\_1186g2 の赤色光吸収型は赤／緑色光変換型と同様ですが、赤色光照射により、過渡的にシステイン残基が色素と共有結合を形成することで、青色光吸収型に変換することを見いだしました。

3. 遠赤／橙色光変換型光センサーの開発 (特願 2014-202984, Narikawa R et al. Sci. Rep., 2015)

赤／緑色光変換型光センサーは本来、フィコシアノビルリンという色素を結合しますが、それよりも長波長の光を吸収する色素であるビリベルジンを結合するタンパク質を、アカリオクロリスというシアノバクテリアから探索しました。その結果、AM1\_1557g2 がフィコシアノビルリンだけでなく、ビリベルジンも高効率で結合し、遠赤色光と橙色光の間で変換することを見いだしました。

### 研究テーマ B: セカンドメッセンジャーを介した光制御

セカンドメッセンジャーを介した情報伝達は、情報の増幅・拡散に有利なため、c-di-GMP と cAMP に着目し、その制御系の理解と新たなスイッチの開発を目指しました。

1. c-di-GMP を介したセルロース生産制御機構の解明 (Enomoto et al. J. Biol. Chem., 2014 の一部)

先行研究として、好熱性シアノバクテリアにおいて、低温光条件下でセルロースを蓄積し細胞が凝集すること、青色光依存的 c-di-GMP 合成酵素がその凝集を制御することが明らかになっていました。私は、セルロース合成酵素に存在する推定 c-di-GMP 結合ドメインを欠失させることで、この光依存的細胞凝集が消失することを見いだしました。また、青／緑色光センサ

一型 c-di-GMP 合成酵素の色素結合領域を、赤／緑色光センサー型に置換することで、緑色光下で c-di-GMP 合成が活性化されるキメラタンパク質の取得に成功しました。

## 2. 光スイッチによる cAMP 生産制御系の構築

赤／緑色光変換型光センサードメインと cAMP 合成酵素ドメインとの融合タンパク質を、リンカーの長さを変えた形で網羅的に作製し、赤／緑色光条件下での活性を測定しました。その結果、赤色光下で cAMP 合成が活性化されるキメラタンパク質の取得に成功しました。

## 3. 今後の展開

このように本研究では、シアノバクテリアの光感知機構の解明とそれを基にした光スイッチの開発を行ってきました。研究テーマ A に関しては、新規に発見した赤／青色光センサーにビリベルジンを結合させることができれば、遠赤／緑色光スイッチが構築可能と考えています。また、研究テーマ B の成果を基に、cAMP によるセルロース合成酵素遺伝子の転写制御と c-di-GMP によるセルロース合成酵素や他の代謝酵素の活性制御を組み合わせ、シアノバクテリア細胞内でセルロースの生産を光制御できると考えています。まだ開発途上ではありますが、今後、さらに解析を進めることで、光合成の生産性を下げることなく、光によって細胞外多糖生産を光制御できると考えています。また、細胞外多糖を蓄積すると細胞は凝集しますので、物質生産と共に細胞回収も行うことができ、より効率的なシステムが構築できると期待しています。今回は、セカンドメッセンジャーに絞って光制御系構築を目指しましたが、将来的には、多様な酵素ドメインに光センサーを融合することで、様々な代謝の光制御系構築をしていきたいと考えています。

## 4. 評価

### (1) 自己評価

(研究者)

私の研究では、「光受容」と「セカンドメッセンジャーを介したシグナル伝達」を要素技術として、最終的には、それらを組み合わせることでセルロース生産の光制御系の構築を目指しました。要素技術の開発については、三年間でそれぞれ成果を出すことができたと自負しています。特に前者に関しては論文 3 本を出すことができました。また、まだ論文としてまとまる段階にはありませんが、構想当初には予想していなかったような成果も得られています。研究実施体制としては、2 年間研究補助者を雇用することで、研究を大幅に加速することができました。また、HPLC、分光光度計、光源、細胞培養器、細胞破碎機などを購入することで、適切に実験環境を構築することができました。研究期間中に研究成果に関してプレスリリースを二回行い、特許も一件出願中であり、社会への波及効果も大きいと考えています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

「多様な光スイッチの開発による細胞外多糖生産の光制御」というタイトルだが、「多様な光スイッチの開発」という点においては、大きな成果をあげたと評価できる。特に、色素結合

領域の結晶構造決定と遠赤色光センサーの発見という研究成果については、それぞれ論文発表、プレスリリースを行っており、社会への波及効果という点でも優れている。ただし、開発した「多様な光スイッチ」を基にした「細胞外多糖生産の光制御」については、3年の期間では十分に研究を進展できなかったといえる。後者についても、期間終了後の進展を大いに期待している。また、成川研究者は本さきがけ研究の成果が認められ、日本ゲノム微生物学会での研究奨励賞受賞、静岡大学へのプロモーション、科研費若手 A の予算獲得などに成功している。これらは成川研究者が今後、世界的に当該研究分野を牽引していく人材として有望であることを意味しており、本さきがけ研究が成川研究者の飛躍につながったと確信している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Narikawa R, Ishizuka T, Muraki N, Shiba T, Kurisu G, Ikeuchi M. Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2013, 110, 918–923.
2. Narikawa R, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Fushimi K, Ikeuchi M. A new type of dual-Cys cyanobacteriochrome GAF domain found in cyanobacterium *Acaryochloris marina*, which has an unusual red/blue reversible photoconversion cycle. Biochemistry, 2014, 53, 5051–5059.
3. Enomoto G, Nomura R, Shimada T, Ni-Ni-Win, Narikawa R, Ikeuchi M. Cyanobacteriochrome SesA is a diguanylate cyclase that induces cell aggregation in *Thermosynechococcus*. J. Biol. Chem., 2014, 289, 24801–24809
4. Narikawa R, Nakajima T, Aono Y, Fushimi K, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Itoh S, Sato M, Ikeuchi M. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll d-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. Sci. Rep., 2015, 5, 7950

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.  
発 明 者: 成川 礼、佐藤守俊、池内昌彦  
発明の名称: 蛍光を発する複合体  
出 願 人: 静岡大学  
出 願 日: 2014/10/1  
出 願 番 号: 2014-202984

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

2013 年日本ゲノム微生物学会研究奨励賞

プレスリリース



1. 「新規光受容体シアノバクテリオクロムの立体構造決定 ―光による細胞制御へ期待―」  
(2012年12月18日)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20121218/index.html>

2. 「遠赤色光を吸収する光変換・蛍光タンパク質を発見 ～光スイッチや蛍光プローブへの応用に向けて～」(2015年1月22日)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150122-2/index.html>

# 研究報告書

## 「循環型エネルギーを利用した硫酸性温泉紅藻によるレアメタル回収システムの開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 蓑田 歩

### 1. 研究のねらい

レアアースや金といったレアメタルは、資源リスクや環境負荷低減の観点から、そのリサイクルが重要な課題となっています。しかしながら、一般に、金属廃液は多種の金属を含む酸性溶液であり、その中に、ごく低濃度で含まれるレアメタルの選択的回収は、難しい問題です。

レアメタルのリサイクルを行おうとする場合、通常、ベースメタルと呼ばれる鉄や銅などの金属が大量に存在する酸性廃液中から、ごく少量しか含まれていないレアメタルを回収することになります。

一般に、微生物による金属回収は、化学薬品やイオン交換樹脂を利用する方法に比べて、コストが安く、環境に優しい技術として知られています。微生物による金属回収は、細胞表面の電荷の静電作用による、細胞表面への金属の吸着 (バイオソープション) が主要な現象として知られています。しかし、これらの方法では、(1) 複数の金属が存在すると、細胞表面の電荷の取り合いになってしまい、回収効率が低下する、(2) 酸性条件では、細胞表面の負電荷が、正電荷を持つ水素イオンによってブロックされてしまい、正電荷をもつ金属の低濃度での回収効率が大きく低下してしまうため、微生物による実際の金属廃液からのレアメタルの回収が難しいという問題が存在しました。

草津などの硫酸酸性温泉に生息する *Galdieria sulphuraria* はイデユコゴメ類に属し、他の生物が増殖できない高温・酸性環境で効率よく増殖すること、高いストレス耐性をもちます。これらの特徴のため、大量培養が容易で、実用化に非常に有利です。また、彼らの生息する高温酸性条件は、非常に金属の溶けやすい環境であり、高い金属耐性を持つこと[Yoshimura E et al. (1999) Soil. Sci. Plant Nutr 45, 721-724]、非常に薄い濃度(6 ppm)の銅を高い効率で回収するということが報告されていました[Alhf W(1988) Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 512-513]。

そこで、本研究では、*G. sulphuraria* を利用して、金属廃液中のレアメタルを選択的に回収することを最終目標として研究を進めました。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

レアアースと金の酸性条件での回収に取り組みました。

レアアースの回収について、*G. sulphuraria* は、有機物を利用して増殖することができるため、5つの異なる培養条件に適応する性質を利用して、培養条件を変えることで、レアアースの選択的回収を試みました。

10種類の金属を低濃度(各 5 ppm)で含む酸性溶液中から、ハイブリッド自動車のモーターなどに使われるレアアースである、ネオジウム( $Nd^{3+}$ )、ディスプロシウム( $Dy^{3+}$ )を効率良く回収でき

る培養条件を探したところ、100%窒素通気で、暗所では有機物のみを代謝する準嫌気従属栄養条件では、複数の金属が存在するにもかかわらず、銅とともに、レアアース( $\text{Nd}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ )が高い効率で細胞に回収されることがわかりました。さらに、pH を 1.0 に下げることにより、銅は細胞に回収されないのに対して、レアアースが高い効率で細胞に回収されることがわかりました。一般に、微生物のレアアースの回収は、細胞表層のカルボキシル基などの負電荷に正電荷をもつレアアースが結合するため、生物活性に依存しないことが知られています。*G. sulphuraria* の準嫌気従属栄養条件でのレアアースの回収は、生物活性が低下する低温条件や死細胞では起こらないことから、微生物で広く知られる細胞表層での金属の結合とは異なるメカニズムで生じており、それには、生物活性が必要であることが明らかになりました。

金イオンの回収について、*G. sulphuraria* が、非常に低い濃度(0.5 ppm)の金イオンを 10 分以内に、90%以上の効率で細胞に回収することを明らかにしました。さらに、25 ppm 以上の濃度では、金イオンが細胞に回収されるだけでなく、金イオンの還元による金ナノ粒子の形成が起きることがわかりました。また、金イオンの回収は、レアアースと異なり、生物活性が必要なく、短時間で起こることから、バイオソープションによるものであることがわかりました。

現在、金属廃液に含まれる数 ppm のレアメタルは、廃棄されているのが現状です。本研究では、金属廃液と同じ酸性溶液中で、*G. sulphuraria* が低濃度のレアメタルを効率的に回収することを示しました。今後、そのメカニズムの解明や実用化に向けた取り組みを行うことで、将来的に、現在、廃棄されているレアメタルのリサイクルに貢献する環境にやさしい技術に繋がることが期待されます。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「酸性条件下での低濃度のレアアースの効率的な回収」

我が国のレアアースの埋蔵量は、30 万トンと言われており、その 10 パーセント相当のリサイクルができれば、年間輸入量を賅うことができます(米国鉱山局データ 2008 年、2010 年年間輸入量データ)。レアアースの中でも、ネオジウム( $\text{Nd}^{3+}$ )、ディスプロシウム( $\text{Dy}^{3+}$ )は、ハイブリッド自動車のモーターなどに使われる超強力磁石としての需要が高い金属です。

*G. sulphuraria* は、イデユコゴメの中で、唯一、有機物を食べて増殖することから、複数の培養条件に適応することができます(図 1)。最初に、ネオジウム( $\text{Nd}^{3+}$ )、ディスプロシウム( $\text{Dy}^{3+}$ )、銅( $\text{Cu}^{2+}$ )、鉄( $\text{Fe}^{2+/3+}$ )、アルミニウム( $\text{Al}^{3+}$ )、コバルト( $\text{Co}^{2+}$ )、マンガン( $\text{Mn}^{2+}$ )、亜鉛( $\text{Zn}^{2+}$ )、クロム( $\text{Cr}^{3+}$ )、ニッケル( $\text{Ni}^{2+}$ )の 10 種類の金属を低濃度(各 5 ppm)で含む酸性溶液中から、ハイブリッド自動車のモーターなどに使われるレアアースである、 $\text{Nd}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ を効率良く回収できる培養条件を探しました。その結果、検討した 5 つの培養条件(①光合成のみで増殖する光独立栄養条件、②光合成と有機物の代謝の両方を行う光混合条件、③暗所では有機物のみを



図1 *Galdieria sulphuraria*は、有機物を利用して増殖することができ、光独立栄養条件①、光混合栄養条件②、従属栄養条件③、100% $\text{CO}_2$ 通気による準嫌気条件での光独立栄養条件④、100% $\text{N}_2$ 通気による準嫌気従属栄養条件の5つの培養条件に適応することが可能である。

ハイブリッド自動車のモーターなどに使われるレアアースである、 $\text{Nd}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ を効率良く回収できる培養条件を探しました。その結果、検討した 5 つの培養条件(①光合成のみで増殖する光独立栄養条件、②光合成と有機物の代謝の両方を行う光混合条件、③暗所では有機物のみを

代謝する従属栄養条件、④100%二酸化炭素通気条件で、光のみを利用して増殖する準嫌気独立栄養条件、⑤100%窒素通気で、暗所で有機物のみを代謝する準嫌気従属栄養条件)のうち、⑤の条件において、Cu<sup>2+</sup>、Nd<sup>3+</sup>、Dy<sup>3+</sup>が、約70%の高い効率で回収されることがわかりました(図2)。⑤の嫌気条件で、Cu<sup>2+</sup>が高い効率で細胞に回収されることは、30年前の研究結果(Alhf 1983)と一致しました。それに加えて、⑤の条件では、複数の金属が存在するにもかかわらず、酸性条件で、低濃度(5 ppm)のNd<sup>3+</sup>とDy<sup>3+</sup>が高い効率で細胞に回収されることがわかりました。

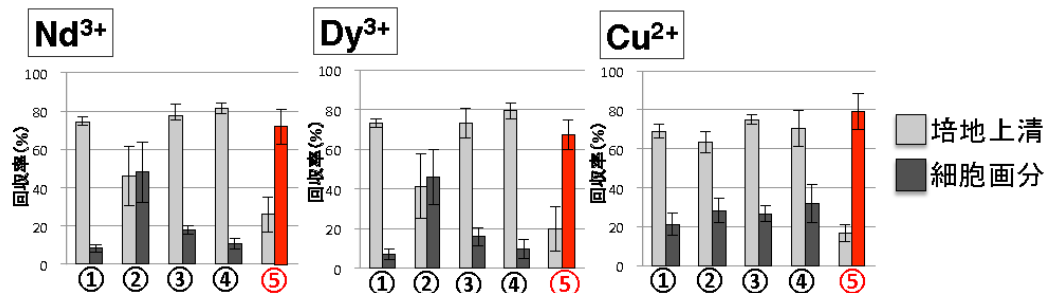


図2 10種類の金属(Nd<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>, La<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>)を各5 ppmの濃度で含む40mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH2.5)中から、⑤の準嫌気条件では、細胞画分にレアアース(Nd<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>)と銅(Cu<sup>2+</sup>)が高い効率で分布した。

次に、⑤の条件で、酸性の培養液に、ランタン(La<sup>3+</sup>)を含むレアアース(Nd<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>, La<sup>3+</sup>)とCu<sup>2+</sup>の4種を加えると、0.5 ~5 ppmという非常に低い濃度では、80-100%の効率で細胞にレアアースとCu<sup>2+</sup>が回収されました。さらに、pHを1.0に下げることにより、レアアースが選択的に細胞に回収されることがわかりました(図3)。

この様なレアアース回収のメカニズムを知るためのステップとして、⑤の培養条件で上記4元素を回収した *G. sulphuraria* の元素の蓄積状態を位相差顕微鏡を用いて検討したところ、レアアースとCu<sup>2+</sup>の蓄積は細胞内部で生じていることが確認できました。

さらに、*G. sulphuraria* の細胞の活性が高い40°Cと、活性が低くなる4°Cの条件、および、活性を持たない死んだ細胞で、レアアースと銅の回収効率を検討したところ、4°Cと死んだ細胞では、回収効率が大きく低下しました(図4)。

バイオソープションは生物活性を必要としない細胞表層での反応であり、温度の影響を受けないことが知られていることから、*G. sulphuraria* による、⑤の培養条件でのレアアースと銅の回収は、バイオソープションとは異なるメカニズムで生じており、それには、生物活性が必要であることが明らかになりました(論文1)。

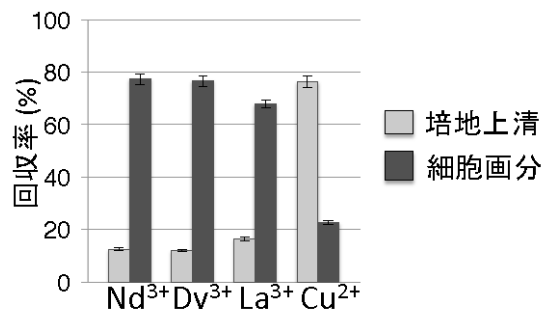
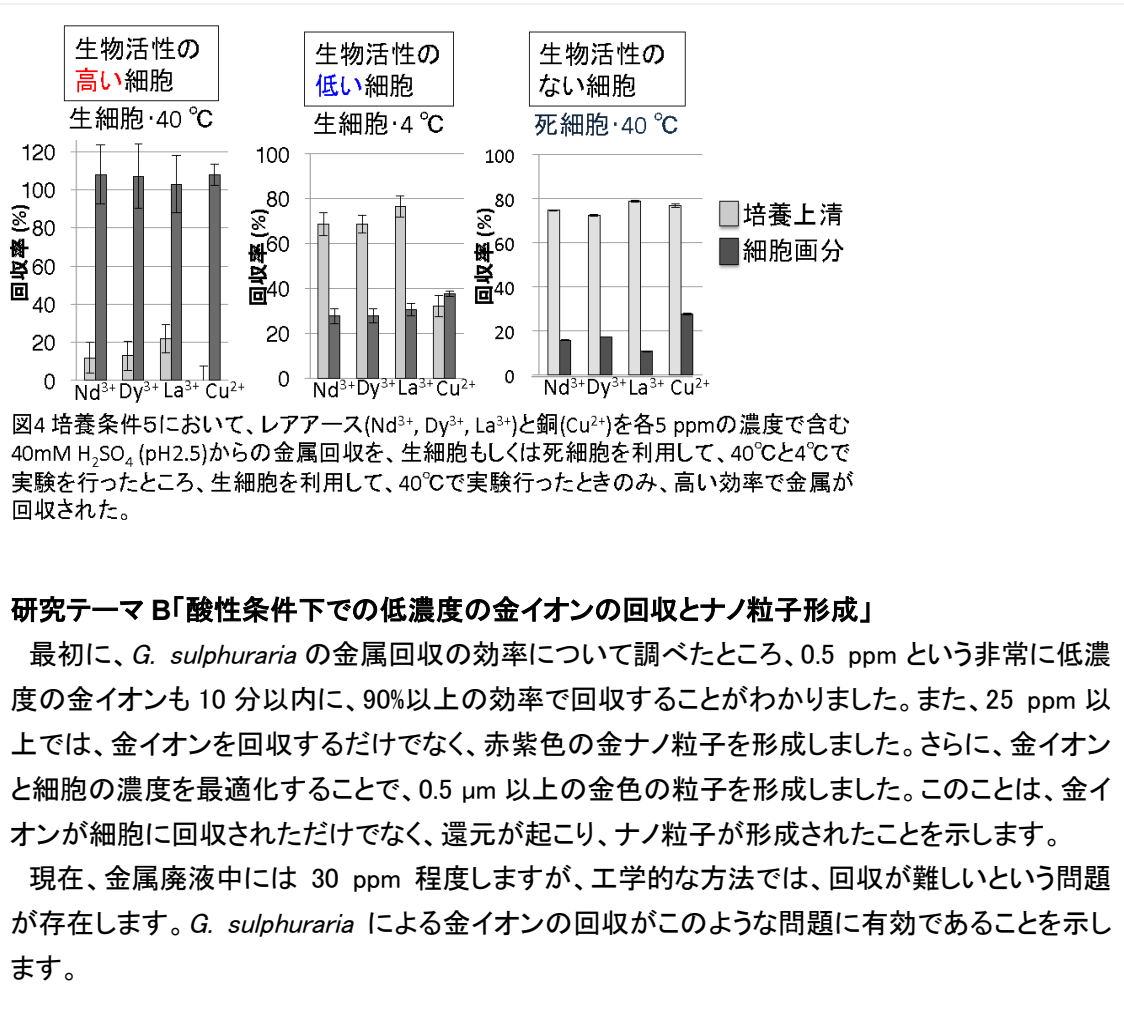


図3 準嫌気条件下、pH1の条件で、レアアース(Nd<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>, La<sup>3+</sup>)と銅(Cu<sup>2+</sup>)を添加したところ、銅の細胞への回収率が低下するのに対して、レアアースの回収率は低下しなかった。





### 研究テーマ B「酸性条件下での低濃度の金イオンの回収とナノ粒子形成」

最初に、*G. sulphuraria* の金属回収の効率について調べたところ、0.5 ppm という非常に低濃度の金イオンも 10 分以内に、90%以上の効率で回収することがわかりました。また、25 ppm 以上では、金イオンを回収するだけでなく、赤紫色の金ナノ粒子を形成しました。さらに、金イオンと細胞の濃度を最適化することで、0.5 μm 以上の金色の粒子を形成しました。このことは、金イオンが細胞に回収されただけでなく、還元が起こり、ナノ粒子が形成されたことを示します。

現在、金属廃液中には 30 ppm 程度ですが、工学的な方法では、回収が難しいという問題が存在します。*G. sulphuraria* による金イオンの回収がこのような問題に有効であることを示します。

### 3. 今後の展開

*G. sulphuraria* が、金属回収が通常難しい強酸性条件で、レアアースと金を高い効率で回収することを示しました。今後は、これらのメカニズムを明らかにしていきたいと思えます。

レアアースの回収は、主に、バイオソープションとは異なるメカニズムで起こっており、今後は、他の生物が生育できない強酸性環境で生物活性を維持できる、*G. sulphuraria* のもつユニークなレアアース回収のメカニズムを明らかにしていきたいと思えます。その一方で、金イオンの還元回収は、生物活性が必要なく、レアアースの回収とは異なるメカニズムでした。生物活性を伴わない金イオンの回収や還元は、自然環境中や、他の微生物や植物を用いた研究でも報告されており、*G. sulphuraria* における金イオンの回収や還元のメカニズムを明らかにすることで、他の生物とも共通する新しいメカニズムが知ることができればと思えます。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究以前も、微生物において、バイオソープションによる高効率でのレアアースの回収は報告されていましたが、その回収は、アルミニウムなどの他の金属の存在と、pHの低下

によって、回収効率が大きく下がることが報告されていました。研究報告会で頂いたアドバイスにより、低濃度での回収に的を絞ることで、本研究で、*G. sulphuraria* が、アルミニウムを含む複数の金属が存在する酸性条件で、ごく低濃度のレアアースの回収できること、また、その回収メカニズムがバイオソープションとは異なる生物作用であることがわかったことは、有意義でした。実際に、プレスリリースにより、新聞等への掲載や、企業からの問い合わせ、国際会議の招待講演依頼があったことから、社会的に高い関心を集める情報を発信することができました。その一方で、研究を進める中で、ナノ粒子化した金属の評価や、回収メカニズムの解明について、当初、予定していた生化学的な実験ではなく、化学分析や専門的な機器分析が必要になりました。このさきがけ期間中に、新たに、各専門的な機器分析を助けてくれる共同研究者をみつけることができたので、現在、報告できていないメカニズムの解明についても早急にまとめて報告したいと思います。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

硫酸性温泉紅藻の *Galdieria sulphuraria* が、強酸性条件で、レアアースを高い効率で回収すること、そのメカニズムが従来、微生物のレアアースの回収の主要なメカニズムであったバイオソープションとは異なること、低濃度の金イオンを、高い効率で、細胞に回収することを示した。現在、レアメタルの社会的需要は高いのに対して、低濃度のレアメタルをリサイクルする方法は実現されておらず、社会的に関心の高い問題に取り組み、新しい知見を示したことは評価できる。今後、レアアースと金イオンの回収メカニズムを明らかにすることが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Minoda A, Sawada H, Suzuki S, Miyashita S, Inagaki K, Yamamoto T and Tsuzuki M, "Recovery of rare earth elements from the sulfo-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria* using aqueous acid." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2014) 99 (3) 1513-1519
2. Miyashita Si, Groombridge AS, Fujii S, Minoda A, Takatsu A, Hioki A, Chiba K and Inagaki K Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* (2014) 29. 1598-1606
3. Shiratake T, Sato A, Minoda A, Tsuzuki M, Sato N, Air-Drying of Cells, the Novel Conditions for Stimulated Synthesis of Triacylglycerol in a Green Alga, *Chlorella kessleri*. *PLoS One* (2013) 8(11): e79630

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 3 件

1.

発 明 者: 都筑幹夫、佐藤典裕、蓑田 歩、今泉 厚

発明の名称: トリアシルグリセロールの製造方法  
出願人: (株)セラバリュース 出願日: 2013/02/25  
出願番号: PCT/JP2013/054701,2013

2.

発明者: 蓑田 歩、山本 高郁  
発明の名称: 金属の回収または除去方法、および脂質または色素の生産方法  
出願人: 山本 高郁  
出願日: 2012/2/01  
出願番号: PCT/JP2012/005866,2012

3.

発明者: 都筑幹夫、佐藤典裕、蓑田 歩、今泉 厚  
発明の名称: トリアシルグリセロールの製造方法  
出願人: (株)セラバリュース  
出願日: 2012/02/09  
出願番号: 特願 2012-042604

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 蓑田 歩・澤田仁美・鈴木園枝・五十嵐健輔・桑原朋彦・都筑幹夫  
硫酸性温泉紅藻 *Galdieria sulphuraria* における金イオンのミネラルゼーション、  
2014/9/12-14 第 78 回植物学会(東京)
2. 附 星宇・伊藤恵美・蓑田 歩 硫酸性温泉紅藻 *Galdieria sulphuraria* の高 CO<sub>2</sub> 条件への適応についての生理学的解析、2014/9/12-14 第 78 回植物学会(東京)
3. 鈴木園枝・伊藤恵美・米田広平・吉田昌樹・Randeep Rakuwal・蓑田 歩  
硫酸性温泉紅藻 *Galdieria sulphuraria* の鉄欠乏応答の生理・生化学的解析、2014/9/12-14  
第 78 回植物学会(東京)
4. 伊藤恵美・蓑田 歩  
硫酸性温泉紅藻 *Galdieria sulphuraria* の硫酸耐性機構についての生理学的解析、  
2014/9/12-14 第 78 回植物学会(東京)
5. 蓑田 歩、山本高郁、都筑幹夫 「循環型エネルギーを利用した硫酸性温泉紅藻 *Galdieria sulphuraria* によるレアメタル回収システム」 日本鉄鋼協会 環境・エネルギー・社会工学部会シンポジウム「パイロリサイクル2」 2012 (松山)
6. 蓑田 歩、山本高郁、都筑幹夫  
硫酸性温泉紅藻 *Galdieria sulphuraria* によるランタノイドの回収、2012/10/24、生物工学会(神戸)
7. 蓑田 歩  
バイオテクノロジーによるレアメタル回収、日本鉄鋼協会 環境・エネルギー・社会工学部会シンポジウム「パイロリサイクル2」 2012/3/29、(横浜)
8. MINODA, Ayumi; ITAYAMA, Sho; YAMAMOTO, Takaiku; TSUZUKI, Mikio

Characterization of a metal metabolism in a thermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria* 日本化学会第 92 春季年会 JST さきがけ四領域国際シンポジウム、2012/3/26-28、(東京)

プレスリリース

2014 年 10 月 1 日 筑波大・JST・産総研・大阪大 共同プレスリリース「硫酸性温泉紅藻が強酸性条件下でレアアースを効率的に吸収する」

2014 年 10 月 2 日 財経新聞に掲載

2014 年 10 月 2 日 日本産業新聞に掲載

2014 年 10 月 3 日 マイナビニュース、Yahoo ニュースに掲載

2014 年 10 月 4 日 日本経済新聞（北関東版）に掲載

2014 年 10 月 22 日 官庁通信に掲載

2014 年 10 月 24 日 科学新聞に掲載