

# 研究報告書

## 「光合成で駆動する新しい生物代謝」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 永島 賢治

### 1. 研究のねらい

光合成におけるエネルギー変換過程は、光化学反応中心と呼ばれる膜タンパク質複合体に結合したクロロフィルの特殊な二量体によって駆動されている。この二量体は基本的に強力な酸化剤としての性質を持つ一方、光を受けて励起されると一転して非常に低い酸化還元電位をあらわし、強力な還元剤として働く。すなわち、光励起されたクロロフィル二量体が放出する電子が、同じタンパク内に配置されたフェオフィチンやキノンへ次々と渡っていく一方、基底状態へ戻ったこの二量体の正孔は、特定の電子供与体から速やかに電子を受け取り埋められる。この繰り返しによって、クロロフィル二量体がいわば電子を汲み上げるポンプとしての役割を果たし、光合成電子伝達ひいてはプロトン濃度勾配の形成およびATP/NADHの合成系を駆動する。クロロフィル二量体の正孔を埋める電子供与体には生物進化を反映して多様性が有り、それに伴って光合成電子伝達の経路にもいくつかのパターンがあるが、電子が酸化還元電位の低いものから高いものへと流れていく点では共通している。本研究が目指すことは、クロロフィル二量体の酸化・還元につながる電子伝達タンパクを遺伝子操作で改変し、経路の人為的変更を通じて光エネルギーを本来とは異なる代謝系で利用するための技術を確立することである。

本研究で使用する紅色細菌(プロテオバクテリア)における主要な光合成電子伝達経路は循環的であることが知られている。この経路は光化学反応中心複合体、キノンプール、チトクロム*bcl*複合体、水溶性電子伝達タンパクの4つの要素から成り立っている。しかし、理論的には途中で様々な電子の出入りが可能であり、それは水溶性電子伝達タンパクもしくはキノンプールを介して起こり得る。紅色細菌は光合成以外にも酸素呼吸、イオウ化合物の酸化、脱窒(硝酸呼吸)などエネルギー代謝が多様であり、生育環境に応じて光合成電子伝達系と巧みにリンクさせることで複雑な電子伝達網を進化させてきたと考えられる。本研究では、この進化の過程を部分的に取り込んだ遺伝子操作を行い、光合成電子伝達経路の改変を試みる。近年飛躍的に増加しているゲノム情報も活用し、光エネルギーを物質生産や環境浄化に利用するためのブレークスルーを見いだす。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* のゲノム DNA の全塩基配列を決定し解析したところ、光合成関連遺伝子はもちろん、水素の酸化・還元や窒素酸化物の還元に関与する酵素遺伝子も見いだされた。水素の酸化( $H_2 \rightarrow 2H^+$ )に関与する酵素は Hup (uptake hydrogenase) と呼ばれ、この酵素をコードする遺伝子を除去した変異株を作成したところ、光合成培養により水素ガスの顕著な発生がみられた。亜硝酸を一酸化窒素へ還元する酵素 (Nir) の電子供与体が、光合成の反応中心複合体への電子供与体としても働くことも、一連の遺伝子欠損株作成を通じて

明らかになった。これらのことは光合成の電子伝達経路が、他のエネルギー代謝の電子伝達経路とリンクし得ることと、遺伝子操作を通じて電子伝達ネットワークのバランスを改変できる事を示している。一方で、光合成関連遺伝子を他の光合成細菌のものと比較し、分子系統解析を行ったところ、*R. gelatinosus* の光合成器官は進化の過程で遺伝子の種間水平移動により獲得されたことが示された。この進化過程を実験により再現することは、生物の光合成の利用技術の確立に繋がると考えられる。そこで、*R. gelatinosus* の光化学反応中心複合体の L、M、チトクロムサブユニットをコードする遺伝子 (*pufLMC*) を除去し、代わりに他の 7 種の紅色光合成細菌の *pufLMC* 遺伝子をそれぞれ導入した変異株シリーズを作成した。うち 3 つの変異株は光合成による生育能が復活し、進化の過程で起こったと考えられる光合成遺伝子の水平移動が実験室レベルで再現した。これら光合成機能の回復をもたらした *pufLMC* 遺伝子は、受容株である *R. gelatinosus* オリジナルのものと比較したとき、L サブユニットのアミノ酸配列で80%以上、M サブユニットでは70%程度以上の相同性があった。これらの値は光合成器官の交換や導入を成功させる目安になると思われる。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「光合成細菌の電子伝達経路改変」

#### 1. 光合成細菌のゲノム情報解読

遺伝子操作による電子伝達経路の改変を遂行するに当たっては、対象とする生物材料の全遺伝子情報が必須である[著書1]。さきがけ研究開始前から(独)製品評価技術基盤機構とともに着手していた紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の全ゲノム DNA 塩基配列の決定作業を完了し、さきがけ研究に引き継いで、遺伝子情報解読も完了させた。塩基長は 5,043,253、遺伝子数は 4,706 で、細菌としてはやや大きなゲノムであった。水素発生に寄与するニトロゲナーゼ遺伝子群や、これに拮抗する Uptake ヒドロゲナーゼ遺伝子群の存在が確認された。末端酸化酵素は *aa<sub>3</sub>*、*cbb<sub>3</sub>*、*bd* の3つのタイプが確認されるなど、電子伝達経路の冗長性が示唆された。[論文4]

#### 2. 光化学反応中心への電子供与体欠落の影響を評価

紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* の光合成反応中心複合体は、光酸化されたバクテリオクロロフィル二量体を素早く再還元する4ヘム型のチトクロムサブユニットを含んでいる。この4ヘムチトクロムと、さらにこのチトクロムを還元する水溶性の高電位鉄-硫黄タンパク(HiPIP)や、水溶性チトクロム *c<sub>8</sub>* を欠損した多重変異株を作成したところ、光合成生育速度は野生株より顕著に遅くなったものの、他の電子供与体によりバクテリオクロロフィル二量体が直接再還元されることが閃光照射時間分解分光測定により示された。その再還元速度は  $t_{1/2}=3\sim6$  ミリ秒であり、野生株での再還元速度より10倍以上遅いものの複合体内のキノンからの逆反応(電荷再結合)よりは3~4倍速いため、光合成電子伝達が維持されたものと考えられた。このことは、バクテリオクロロフィル二量体を  $t_{1/2}=10$  ミリ秒前後以下で再還元することができれば、本来光合成以外で働く様々な電子伝達タンパクを供与体として使用できることを示唆する。[論文2]

#### 3. 光合成と亜硝酸酸化の電子伝達経路のリンク形成

紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* の光合成反応中心複合体への水溶性電子供与体は、

HiPIP、2種類のチトクロム  $c_8$ 、チトクロム  $c_4$  の4つが知られている。これらすべてを欠落した4重欠損株は光合成生育速度が著しく低いが、継代培養の過程で野生株並の生育速度まで回復した株が出現した。この回復株では亜硝酸を還元( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ )する酵素群の発現量が異常に高くなっており、この酵素群に含まれる NirM と呼ばれる水溶性チトクロム  $c$  が光合成反応中心への電子供与体としても働いていることが閃光照射時間分解分光測定により示された。この回復株を光照射下で培養し亜硝酸を加えたところ、野生株に比して約5倍の還元速度を示したことから、NirM を接点として光合成と亜硝酸還元電子伝達のリンクが可能であることが示された[論文1]。ゲノム中には  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の反応を触媒する酵素の遺伝子も見られることから、光による窒素酸化物の還元を活用できる可能性がある。

#### 4. 光合成による水素発生

ニトロゲナーゼによる窒素固定反応( $\text{N}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$ )には水素イオンの還元( $2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2$ )が副反応として伴うことが知られている。紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* のゲノム中にもニトロゲナーゼの遺伝子群が見られたことから、これを利用した光合成による水素発生を試みた。ゲノム中には拮抗反応( $\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ )を触媒する uptake ヒドロゲナーゼの遺伝子も見つかったので、この遺伝子を欠落させた変異株(*hupSL*)を作成して実験に用いた。通常の培養で用いる天然培地では有意な水素発生は見られなかったが、アスパラギン酸を唯一の窒素源とする合成培地で光合成培養したところ、増殖静止期以降に顕著な水素発生が認められ、30 mL の培養液から1週間で30 mL を記録した。これは、光合成による過剰な還元力が逆電子流(Reverse Electron Flow)を通じて NADH の蓄積につながり、さらにこの NADH がニトロゲナーゼの基質として使われたためと考えられた。[著書3, 4]

### 研究テーマB「光合成反応中心複合体の種間入れ替えと機能改変」

#### 1. ゲノム解析に基づく光合成の進化の過程

ゲノム情報が公開されている紅色細菌を対象に、光合成関連遺伝子産物のアミノ酸配列の比較と分子系統解析により、*R. gelatinosus* を含む一部の紅色細菌の光合成機能は、その祖先種が、進化の過程で光合成をする種から遺伝子水平移動によって獲得したことが改めて示された[論文4, 5, 著書2]。この進化過程を実験により再現する試みを続けることにより、光合成タンパクの種間交換や非光合成生物への光合成機能の付与が可能になると考えられた。

#### 2. 光化学反応中心複合体遺伝子の種間交換

紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* の光化学反応中心複合体の L、M およびチトクロムサブユニットをコードする遺伝子(*pufL*, *pufM*, *pufC*)を除去した欠損株(光合成生育不可)に対し、系統的に遠・近とり混ぜた7種の紅色光合成細菌 *Phaeospirillum molischianum*, *Acidiphilium rubrum*, *Blastochloris viridis*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Roseateles depolymerans*, *Allochrochromatium vinosum* の相同遺伝子(*pufLMC*)をそれぞれ導入したところ、少なくともこのうちの3種、*P. molischianum*, *R. depolymerans*, *A. vinosum* の遺伝子導入により光合成による生育能が回復した。このことは光合成遺伝子の種間水平移動という進化過程を人工的に再現できたことを示す。ただし、これら反応中心入れ替え変異株の光合成生育速度は親株に比較すると最大10倍程度遅かったため、その原

因を明らかにすべく生菌を用いた閃光照射時間分解分光測定を行った。親株では閃光照射により光酸化した反応中心が、主に 1 ミリ秒以下の速い反応で再還元されたが、3つの変異株のうち特に生育速度の遅い2株では 5~10 ミリ秒の遅い再還元として観察された。この再還元速度は、上記 A-2 で示唆された電荷再結合の速度より若干早いため、光合成電子伝達が辛うじて維持されたものと思われる。

### 3. 紅色光合成細菌の反応中心複合体への水分解機構の導入

葉緑体やシアノバクテリアの光化学系 2 では、光エネルギーによって水を酸化して電子を獲得する。この反応に関与するルーメン側のペプチド部位6カ所を、紅色光合成細菌の反応中心複合体の対応部位に、交換・導入した変異株シリーズを作成した。これら変異株に酸素発生能は認められなかったが、分光測定では変異反応中心が合成されていることが示唆された。光化学系 2 の D1 サブユニット C 末端領域を導入した株では、遅いながらも光合成による生育が可能であった。

### 3. 今後の展開

- ・研究成果 B-2 を発展させ、近縁な非光合成細菌に光合成遺伝子クラスターを導入し、バクテリオクロフィル *a* と反応中心複合体の合成系を確立し、かつ機能させることを目指す。具体的には、紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* を供与菌、これと近縁で水素代謝能を持つ *Ralstonia eutropha* を受容菌として使用することを計画している。光合成遺伝子クラスターは約 40 kb と規模が大きいため、これを約 20 kb の二つに分け、それぞれを *R. eutropha* の常時発現する遺伝子のすぐ下流に繋げる形で導入するなど、確実な発現に向け工夫する。
- ・やはり研究成果 B-2 で確立した実験系を活用し、特殊な環境下で生育する難培養性の光合成細菌や、環境サンプル中で DNA としてだけ存在が認められる光合成細菌など、希少で研究対象となりにくい光化学反応中心複合体を大量に合成させ、機能と構造の解析に供する。これら特殊な環境条件でのみ増殖するような生物のタンパクからは、強酸・強アルカリ、高熱、高塩濃度などに適応した機能・構造の特徴が見いだされる可能性があり、工業的な光合成の利用を目指すときに有用な情報となり得る。
- ・研究成果 A-4 のさらなる発展として、ニトロゲナーゼに還元力を供給する NADH を過剰に蓄積させることで水素発生能を引き上げる変異を付加することを試みる。NADH 消費の主要な反応は炭酸固定反応と考えられるので、その初期反応を触媒する RubisCO の酵素遺伝子欠損変異株の作成を皮切りに、研究成果 A-1 のゲノム情報を活用して多重欠損変異株を作成し、水素発生の増大を目指す。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

紅色光合成細菌の種間で実際に反応中心遺伝子の入れ替えを試み、70%程度以上のアミノ酸配列相同性があれば、異種反応中心複合体による光合成生育が可能であることを示せたことが、本研究で最大の収穫であった。これまで、同属の極めて近縁な種間でのみ成功例があった反応中心タンパクの入れ替え実験が、思いのほか遠縁なものまで可能であることを示せた事は画期的であった。非光合成生物に光合成機能を導入するという最終目標へ至る

道筋は付けられたと思う。進化の過程を実験によって辿るというアプローチの仕方が功を奏したと言えるのではないだろうか。さらに、今回確立した反応中心入れ替えのシステムは、特殊な環境に生息する研究困難な種の光合成を研究する強力な手段にもなるという、思わぬ活用法も見いだされた。一方で、既存の光合成細菌のエネルギー代謝ネットワークを遺伝子操作によって改変するという、研究タイトルの「新しい生物代謝」に象徴されているテーマに関しては、光合成と水素発生または光合成と亜硝酸酸化のリンク形成を可視化するという形で一定の成果を見たが、結局は拮抗反応の破壊という従来のアプローチに留まってしまったことはやや悔いが残るところである。本来目指したのは酵素タンパクの立体構造情報に基づいて機能を計画的に調整することにあつたが、そのための労力の大部分は光化学系 2 反応中心の水の酸化機能を紅色細菌の反応中心へ付与することを目指す作業に費やしてしまった。こちらは結局、マンガクスターの再構成や酸素の発生という画期的成果に結びつかなかった。ただし、変異をペプチド単位でダイナミックに導入した反応中心タンパクの合成自体は実現できたと思われるので、今後の微調整によっては一転して成果につながる可能性を残したことは救いであろう。

(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)。

永島賢治博士は、紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の全ゲノム解析をはじめとする自身による先端研究の実績を基礎に、進化の過程を部分的に取り込んだ遺伝子操作により、光合成電子伝達経路の改変に挑戦し光エネルギーを物質生産や環境浄化に利用するためのブレークスルーを見いだそうという意欲的な研究提案を行い採択された。

さきがけ研究開始後も紅色光合成細菌の全ゲノム解析を継続し遺伝子情報解読を完了させている。全ゲノム解析の結果、ニトロゲナーゼの遺伝子群や拮抗反応を触媒する uptake ヒドロゲナーゼの遺伝子に注目し遺伝子操作技術を駆使することにより変異株を作成して高効率の水素発生に成功している。

粘り強い研究努力の結果、特筆すべきは、光合成遺伝子の種間水平移動という進化過程を実験により再現することに成功したことであろう。紅色光合成細菌の種間で実際に反応中心遺伝子の入れ替えを試み、70%程度以上のアミノ酸配列相同性があれば、異種反応中心複合体による光合成生育が可能であることを示した。これは光合成遺伝子の種間水平移動という進化過程を人工的に再現できたことを意味しており、極めてインパクトの大きい研究成果と考えられる。非光合成生物に光合成機能を導入する明確な足掛かりが得られたと評価できる。実際に、葉緑体やシアノバクテリアの光化学系2のペプチド部位を、紅色光合成細菌の反応中心複合体の対応部位に、交換・導入した変異株シリーズを作成するなど意欲的な研究展開を行っている。これまでの研究成果を基礎に今後いっそうの展開が大いに期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Nagashima S, Shimada K, Verméglio A, Nagashima KVP (2011) The cytochrome $c_8$ involved in the nitrite reduction pathway acts also as electron donor to the photosynthetic reaction center in <i>Rubrivivax gelatinosus</i> . <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>1807</b> , 189–196
2. Verméglio A, Nagashima S, Alric J, Arnoux P and Nagashima KVP (2012) Photo-induced electron transfer in intact cells of <i>Rubrivivax gelatinosus</i> mutants deleted in the RC-bound tetraheme cytochrome: Insight into evolution of photosynthetic electron transport. <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>1817</b> , 689–96
3. Kondo M, Iida K, Dewa T, Tanaka H, Ogawa T, Nagashima S, Nagashima KVP, Shimada K, Hashimoto H, Gardiner AT, Cogdell RJ and Nango M (2012) Photocurrent and electronic activities of oriented-His-tagged photosynthetic light-harvesting/reaction center core complexes assembled onto a gold electrode. <i>Biomacromolecules</i> <b>13</b> , 432–438
4. Nagashima S, Kamimura A, Shimizu T, Nakamura S, Aono E, Sakamoto K, Natsuko Ichikawa N, Nakazawa H, Sekine M, Yamazaki S, Fujita N, Shimada K, Hanada S and Nagashima KVP (2012) Complete genome sequence of phototrophic beta-proteobacterium <i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144. <i>J. Bacteriol.</i> <b>194</b> , 3541–3542
5. Okubo T, et al. (2012) Complete genome sequence of <i>Bradyrhizobium</i> sp. S23321: Insights into symbiosis evolution in soil oligotrophs. <i>Microbes Environ.</i> <b>27</b> , 306–315

(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)

著書

1. 永島賢治 (2011) 環境ゲノム DNA から新しい生物機能を探る. 化学 66, No6 pp74–75
2. Nagashima S and Nagashima, KVP (2013) Comparison of photosynthesis gene clusters retrieved from total genome sequences of purple bacteria. In Beatty TJ (Ed.), *Genome Evolution of Photosynthetic Bacteria*, pp151–178, Academic Press, Elsevier Inc.
3. 永島賢治 (2012 予定) 13 章 細菌型光合成の電子伝達系. 編集 南後守、伊藤繁、杉浦美羽「光合成の物質変換 人工光合成を目指して(仮題)」化学同人
4. 永島賢治、櫻井英博、井上和仁 (2014 予定) 紅色光合成細菌による水素発生.(三宅淳、佐々木健 監修)光合成のエネルギー利用と環境応用 シーエムシー出版 印刷中