

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「ハイパーシアノバクテリアの光合成を利用した含窒素化合物生産技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成23年10月～平成29年3月

研究代表者：久堀 徹
(東京工業大学科学技術創成研究院、
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

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

(1) シアノバクテリアによる含窒素化合物の生産性の向上 (久堀グループ)

糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 (以下、*Anabaena*) における窒素代謝系酵素の遺伝子発現制御技術を新規に確立し、窒素同化に重要なグルタミン合成酵素 (GS) の発現制御を行った。そして、アンモニア自立生産株として本プロジェクトで作成したメチオニンスルフォキシミン耐性株 (MSX 耐性株) において GS の発現制御を行い、アンモニアを培地に放出させる技術を確立し (Higo A. *et al.* 2016, *Plant Cell. Physiol.*)、さらに遺伝子発現制御の精密化を行う制御システムの開発を行った (Higo A. *et al.* 2017, *ACS Synthetic Biology*)。

代謝系制御として重要なレドックス制御については、シロイヌナズナとシアノバクテリアを光合成モデル生物とした制御システムの解明 (Yoshida K. *et al.* 2015, *J. Biol. Chem.*; 2016 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)、および、代謝系酵素の解析 (Tsukamoto Y. *et al.* 2014 *Plant Cell Physiol*; Yoshida K., Hisabori T. 2016, *Biochim. Biophys. Acta*) などの成果を上げた。また、*Anabaena* のレドックスシステムの網羅的な解析を行った (Nomata J. *et al.* 2015, *J. Biochem.*; Mihara S. *et al.* 2016, *Plant Cell Physiol*)。このような細胞内のレドックス環境の変化が代謝過程に重要な影響を及ぼすことに鑑み、細胞内およびタンパク質のレドックス状態を可視化する技術開発を行い (Hara S. *et al.* 2013, *Biochim. Biophys. Acta*; Hara S. *et al.* 2015, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; Sugiura K. *et al.* 2015, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*)、特許出願 (特願 2013-205598、特願 2013-16648、特願 2014-199401、特願 2016-156963、特願 2017-040778)、企業への技術移転による製品化などの成果を上げた。一方、エネルギー供給系である ATP 合成酵素については、制御系の理解、および、その改変による酵素活性の人為的な制御につながる成果を上げた (Sunamura E. *et al.* 2012, *J. Biol. Chem.*)。

(2) 含窒素化合物生産及び回収技術の確立 (原グループ)

本研究では、シアノバクテリアが放出した窒素化合物を高効率で回収・分離する新プロセスとして、固体触媒を用いる方法を開発した。さらに、これに用いる固体触媒を大量製造する方法を確立した。この触媒を用いることによって、溶液中の含窒素化合物を連続的に吸着・分離するシステムのモデル装置を完成させ、作動することを確認した (特願 2016-010622)。

(3) 糖代謝改変による含窒素化合物高生産 (得平グループ)

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

(4) ヘテロシスト高頻度化と含窒素化合物増産 (増川グループ)

ニトロゲナーゼによる窒素固定 (含窒素化合物生産) に特化した異型細胞ヘテロシストは、通常 10–20 細胞に 1 個の割合で形成されるが、そのヘテロシスト形成頻度を増加させることで、含窒素化合物生産効率の向上が期待できる。すでに、ヘテロシストの主要な活性化因子 HetR のランダム変異改変により、ヘテロシスト頻度が増加するアミノ酸残基置換変異を複数同定している。そこで、それらの変異を利用して、含窒素化合物を自立的に放出する株から、へ

テロシスト頻度が増大する変異株を作出し、ニトロゲナーゼ活性の評価を行った。また、ヘテロシスト高頻度株によるアンモニア生産条件の最適化を行った。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. ATP 合成酵素の活性制御の改変

概要:

ATP 合成酵素の回転軸部分となる γ サブユニットが 2 本の α -ヘリックスからなる特徴的な構造であることに着目し、この部分にアミノ酸変異による構造変化を導入して、人為的な活性制御を実現した。酵素分子内における 2 本の α -ヘリックスの互いの相対的な配置をさまざまな位置で化学的に固定する、あるいは、ペプチド鎖上に切れ目を挿入することで自由度を与えるなどの方法によって、酵素の加水分解活性を 10 倍以上上昇させることに成功した。そして、これらの変異を持つ酵素の生化学的な解析と 1 分子観察により活性上昇の原因を解明した (Sunamura E. et al. 2012, *J. Biol. Chem.*; Kondo-Osanai K. et al. 論文準備中)。

2. 光合成生物の酸化還元制御システムの解析

概要:

Anabaena は、NADPH-チオレドキシン還元酵素ドメインとチオレドキシンドメインを併せ持つ NTRC というハイブリッド酵素を持っている。この NTRC の生理生化学的な特長を、緑色植物由来の同タンパク質について詳細に調べ、従来知られているフェレドキシン-チオレドキシン還元酵素の経路とは別の還元力伝達経路として重要であることや、この経路によって特異的に還元力を供給されるタンパク質が存在することなどを明らかにした (Yoshida and Hisabori, 2016 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)。さらに、*Anabaena* においては NTRC が抗酸化ストレスシステムとして重要な機能を担っていることを明らかにした (Mihara S. et al. 2016, *Plant & Cell Physiol.*)。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 糸状性シアノバクテリアのタンパク質発現制御を可能にする合成生物学的手法の開発

概要:

窒素固定型の糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 株の遺伝子発現制御システムを構築し、窒素飢餓条件において特異的にグルタミン合成酵素のアンチセンス RNA を発現させ、これによりグルタミン合成酵素の発現を抑制した。このシステムを用いて、ヘテロシストにおいてニトロゲナーゼが生成するアンモニアの窒素同化系への供給を部分的にブロックし、アンモニアを細胞外に放出させることに成功した (Higo A. et al. 2016, *Plant Cell Physiol.*)。さらに、*Anabaena* 細胞内で機能するポジティブフィードバックループによる遺伝子発現制御を確立した (Higo A. et al. 2016, *ACS Synthetic Biology*)。

2. 細胞内酸化還元状態を可視化する新規ツール蛍光タンパク質の開発

概要:

まず、緑色蛍光タンパク質に導入したシステインの形成するジスルフィド結合の有無によって、酸化状態、還元状態でそれぞれ蛍光の消光を示す二種類の酸化還元状態モニタータンパク質 Oba-Q と Re-Q の開発に成功した。

3. 溶液中のアンモニアを回収する高性能チタニアの開発

概要:

チタニア(酸化チタン)を用いて溶液中のアンモニアをエネルギー消費をすることなく簡便に回収するシステムを開発した(特願 2016-010622)。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「バイオアンモニア生産に資するシアノバクテリアの機能向上」グループ 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
久堀 徹	東京工業大学 科学技術創成研究院化学生命 科学研究所	教授	H23.10～
野亦 次郎	同上	助教	H23.10～
吉田 啓亮	同上	助教	H23.10～
杉浦 一徳	同上	D1-D3, 研究員	H23.10～
吉見(井須)敦子	同上	研究補助員	H24.1～H26.10 H27.10～H28.10
養父 知子	同上	研究補助員	H23.10～
肥後 明佳	同上	研究員	H24.4～
近藤(小山内)久 益子	同上	研究員	H26.4～
見原 翔子	同上	M1-D1	H26.4～
横地 佑一	同上	B4-M2	H26.4～
深谷 佑紀	同上	研究補助員	H26.10～H27.9
稲辺 宏輔	同上	M1-M2	H27.4～
円 由香	同上	研究補助員	H27.4～
今村 葵	同上	M1	H28.4～
岩田 惇	同上	M1	H28.4～
和泉 諒之	同上	B4	H28.4～
西山 真穂	同上	B4	H28.4～
原 怜	東京工業大学資源化学研究所	特任助教	H23.10～H27.4
砂村 栄一郎	同上	D2-D3, 研究員	H23.10～H26.3
武山 祐	同上	M1-M2	H23.10～H25.3
塚本 悠	同上	M1-M2	H23.10～H25.3
土屋 昭洋	同上	M1-M2	H23.10～H25.3
小板橋 亮矩	同上	M1-M2, D1	H23.10～H25.4
打越 えり子	同上	M1-M2	H24.4～H26.3
堀内 伶美	同上	M1-M2	H24.4～H26.3
竹場 佑太郎	同上	B4, M1-M2	H24.4～H27.3
米嶋 孝臣	同上	B4, M1-M2	H24.4～H27.3
吉中 大和	同上	M1-M2	H25.4～H27.3
片山 慎也	同上	M1-M2	H25.4～H27.3
西牧 優太	同上	B4	H25.4～H26.3
若尾 瞳	同上	B4, M1-M2	H25.4～H28.3
中舛 絵理奈	同上	M1-M2	H26.4～H28.3
原 文香	同上	M1-M2	H26.4～H28.3
中島 昌子	同上	B4	H26.4～H27.3
村上 聡	東京工業大学生命理工学院	教授	H27.7～
吉田 賢右	京都産業大学総合生命科学部	フェロー	H23.10～
成川 礼	静岡大学大学院理学研究科	講師	H23.10～

紺野 宏記	金沢大学大学院理学研究科	特任准教授	H23.10～
-------	--------------	-------	---------

研究項目

- ・ATP 生産効率の向上
- ・光エネルギー利用効率の向上
- ・ヘテロシスト形成能力の向上(原グループとの共同)
- ・遺伝子改変によるアンモニア生産(原グループとの共同)

②「バイオアンモニア生産及び回収技術の確立」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
原 亨和	東京工業大学 科学技術創成研究院 原研究ユニット	教授	H23.10～
鎌田 慶吾	東京工業大学 科学技術創成研究院 フロンティア材料研究所	准教授	H27.4～
喜多 祐介	同上	助教	H28.4～
川口 貴子	同上	研究補助員	H24.4～
伊澤 ゆき	同上	研究補助員	H28.4～
鎌田 慶吾	東京工業大学 応用セラミックス研究所	助教	H23.10～H27.3
近藤(小山内)久 益子	同上	研究員	H25.12～H26.3
渡邊 尚美	東京工業大学 ソリューション研究機構	研究補助員	H24.4～H26.3
小糸 祐介	東京工業大学大学院総合理工 学研究科物質科学創造専攻	D1-D3	H23.10～H26.3
新宅 泰	同上	D1-D3	H24.4～H26.9
杉山 敦人	同上	M2	H24.4～H24.9
野間 遼平	同上	M2-D3	H24.4～H28.3
福原 紀一	同上	D3	H23.10～H24.3
森田 一輝	同上	M2	H25.4～H26.3
竹田 大樹	同上	M1-M2	H25.4～H27.3

研究項目

- ・シアノバクテリアによる含窒素化合物回収技術の確立

③「得平」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
得平 茂樹	首都大学東京理工学研究科	准教授	H27.4～
宮崎 翔伍	同上	リサーチアシスタ ント	H27.4～H28.3
福島 俊一	同上	特任研究員	H28.10～

研究項目

- ・遺伝子改変によるアンモニア高生産

④「増川」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
増川 一	大阪市立大学・複合先端研究機構	特任准教授	H27.4～

研究項目

・ヘテロシスト高頻度化とアンモニア生産

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

メタボロミクス解析 埼玉大学理工学研究科 准教授 川合真紀

DNA解析 豊橋技術科学大学 助教 広瀬侑

酸化還元応答蛍光タンパク質の開発

大阪大学産業科学研究所 教授 永井健治

東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授 一瀬宏

東北大学大学院薬学研究科 教授 中林孝和

シアノバクテリアの転写制御とレドックス

埼玉大学大学院理工学研究科 教授 西山佳孝

埼玉大学大学院理工学研究科 准教授 日原由香子

東京大学大学院総合文化研究科 教授 池内昌彦

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 バイオアンモニア生産に資するシアノバクテリアの機能向上(東京工業大学 久堀グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1) ATP 生産効率の向上

本課題では、ATP 合成酵素の制御機能の改変による ATP 合成活性の向上の研究により、ATP を高効率で生産するシステムの構築を目指して研究を実施した。光合成生物の ATP 合成酵素は、呼吸鎖と共役している ATP 合成酵素とは異なり、回転軸として知られている γ サブユニットに特有の挿入配列が存在し、これが酵素活性の制御、特に ATP 加水分解活性の制御に重要であることが知られている。さらに、我々は、この配列の存在がシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株では細胞内 ATP 量の維持に重要であり、この挿入配列を削除することによって ATP 加水分解活性が上昇し、細胞内 ATP 量の減少を招くことを 2010 年に明らかにしている。

光合成生物の ATP 合成酵素の制御については、上述した通り、その分子機構を解明するのに必要なさまざまな基本情報を蓄積することができた。平成 24 年度は、ATP 合成酵素の回転軸部分が 2 本の α -ヘリックスからなる特徴的な構造であることに着目し、この部分に人為的に構造変化を導入することによる活性制御に

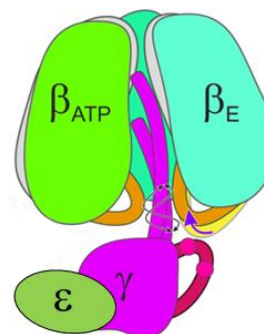


図 1. γ と DELSEED 領域の相互作用

について研究を実施した。その結果、酵素複合体分子内での 2 本の α -ヘリックスの互いの相対的な配置をさまざまな位置で化学的に固定することによって、多くの場合、酵素の加水分解活性を 10 倍以上上昇させることに成功した。この変異による活性の生化学的な解析から、この活性上昇がこの酵素の特徴的な阻害様式である ADP 阻害 (生産物阻害) を回避することで誘導されることを明らかにした (Sunamura et al. *J. Biol. Chem.* (2012) **287**, 38695-38704)。

さらに、これまでの本プロジェクト研究によって、 γ サブユニットを構成する 2 本の α -ヘリックス構造と、ロスマンフォールド部分がそれぞれ活性制御に重要であり、この部分への変異導入、および、分子間架橋によって ATP 加水分解活性が大きく変化することも明らかにした。この結果は、 γ サブユニットのロスマンフォールド部分の上部と β サブユニットの DELSEED 領域の相互作用が酵素活性の制御に重要であることを示している (図 1) (Buchert F. et al. *Biochim. Biophys. Acta* (2015) **1847**, 441- 450)。

次に、 γ サブユニットと酵素活性制御の関係を明らかにするための研究の一助として、 γ サブユニットのロスマンフォールドドメインの下部にニック (切れ目) を挿入した変異体タンパク質を作成し、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体として発現させた。得られた酵素活性は、野生型酵素に比べて著しく高く、界面活性剤 LDAO による活性化の程度も野生型に比べて顕著に低かったことから、ニックの挿入によって酵素が ADP 阻害に陥りにくい構造を取っているものと予想される。また、作成した変異体酵素を精製し電気泳動でサブユニット構成を詳細に解析し、 $\alpha_3\beta_3$ 六量体リング構造と γ サブユニットの N 末側のヘリックス部分だけで構成される部分複合体でも相応の ATP 加水分解活性を持っていることを明らかにした (日本植物学会第 80 回大会発表 (2016)、Kondo-Osanai, K. et al. 論文準備中)。

葉緑体型 ATP 合成酵素は、 ϵ サブユニットという内在性の阻害サブユニットも持っている。このサブユニットは、 β サンドイッチ構造をした N 末端側ドメインと短いループ構造で連結している 2 本の α -ヘリックス構造を持つ C 末端側ドメインの 2 つのドメインで構成されている。他の生物種由来の ATP 合成酵素の生化学、および、構造解析によって、C 末端側ドメインは大きな構造変化をすることが可能で、伸び上がって $\alpha_3\beta_3$ リングと相互作用することで ATP 加水分解活性を強力に阻害すると予測されていた。今回、シアノバクテリアの ϵ サブユニットについて、N 末端側ドメインのみの変異体を作成して酵素活性に対する影響を調べたところ、この変異体タンパク質が十分な阻害活性を有することと、この阻害が ADP 阻害の解除に有効であることが知られている界面活性剤 LDAO によって解除されることを見出した。このことから、これまで γ サブユニットと相互作用するための領域と考えられてきた ϵ サブユニットの N 末端側ドメインは、ADP 阻害を誘導する機能も有するものと考えられる。さらに、C 末端側ドメインについて Cys を二カ所に導入して酸化によって折れ畳まれた構造を固定しても、阻害活性には影響がないことを見出した。上記の結晶構造解析の結果と考え合わせると、このことは、光合成生物の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの阻害機構がこれまで報告されていた細菌やミトコンドリアのものとは異なることを示唆している (日本光合成学会第 7 回大会発表 (2016) ; 第 89 回日本生化学会大会発表 (2016))。

2) 増殖速度の向上

光エネルギー利用効率の向上を実現するために、強光耐性の付与と還元力供給の効率化を当初目標とした。そして、光合成生物の強光耐性を強化するためには、レドックスシステムの理解と機能強化が重要であると考え、シアノバクテリアのレドックス制御システムの構成因子について生化学的な基礎研究を行った。その結果、シアノバクテリアの Calvin-Benson 回路の 2 番目の酵素であるホスホグリセレートキナーゼがチオレドキシン制御を受ける酵素であることを、新規に明らかにした (Tsukamoto et al. *Plant Cell Physiol.* (2014) **54**, 484-491)。また、窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena* 株の栄養細胞とヘテロシスト細胞の還元力供給経路を理解し、目的とするニトロゲナーゼへの還元力の供給を強化する研究を進めた。

本プロジェクトでは、これまで、*Anabaena* のもつチオレドキシンが還元力を受け渡す標的タンパク質について、網羅的な解析を行ってきた。栄養細胞とヘテロシスト細胞それぞれに特徴的なチオレドキシン標的タンパク質の網羅的な解析を行ったところ、ヘテロシスト細胞で窒素

固定に関連する複数のタンパク質を得た。中でも、ニトロゲナーゼの活性中心に存在する Fe-S クラスターの合成に重要なスカフォールドタンパク質である NifU が標的として捕捉され、チオレドキシンから NifU への還元力伝達が NifU の活性に重要であることを生化学的にも明らかにした(Nomata *et al. J. Biochem.* (2015) **158**, 253-261)。さらに、Fe-S クラスターの生合成に重要な他のスカフォールドタンパク質とチオレドキシンの還元力授受についても明らかにした(第 57 回日本植物生理学会年会 (2016)、4th Asian Conference Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (2016) にて発表)。

チオレドキシンが構成するレドックス制御系については、緑色植物の場合、複数のチオレドキシンのアイソフォームを持っており、これらがどのように標的を異にしているかはこれまで十分には理解されていなかった。そこで、チオレドキシンの標的タンパク質の多様性、および標的タンパク質との相互作用を様々な標的について解析し、アイソフォーム毎の特異性を明らかにした(図 2) (Yoshida *et al. Plant Cell Physiol.* (2013) **54**, 875-892; Yoshida *et al. Plant Cell Physiol.* (2014) **55**, 1415-1425; Yoshida *et al. J Biol Chem* (2015) **290**, 14278-14288)。また、チオレドキシンの標的とされているタンパク質の中には、チオレドキシンによる特異的な還元はされるにも関わらず、活性調節が行われない酵素もあることを見出し、これについてさらに解析を進めたところ、ミトコンドリアリンゴ酸脱水素酵素のアデニンヌクレオチドによる新規の制御機構を見出した(Yoshida and Hisabori, *Biochim Biophys Acta* (2016) **1857**(6):810-818)。

光合成生物でチオレドキシンに還元力を受け渡しているのは、フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素 (FTR) である。FTR からチオレドキシンへの還元力伝達の詳細を解析するため、大腸菌組み換え体蛋白質として活性のある FTR ヘテロダイマーを作成し、様々なチオレドキシンアイソフォームへの電子伝達の詳細を調べた。その結果、例えば、緑色植物葉緑体で知られている 10 種類のアイソフォームは、FTR からの電子伝達速度が速く親和性も高い一群、電子伝達速度が遅く親和性も低い一群、および、それらの中間の 3 つに類型化することができることがわかった(Yoshida and Hisabori, *Biochem. J.* (2017) **474**, 1347-1360)。

次に、*Anabaena* のチオレドキシン破壊株の表現型を調べ、窒素源非存在下で、チオレドキシン破壊株は野生株と比べ栄養細胞に対するヘテロシストの割合が約 1.5 倍多くなること、窒素固定活性が野生株の 10 分の 1 程度であること、ウェスタンブロー

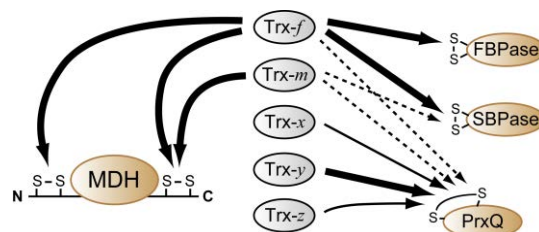


図 2. 葉緑体チオレドキシンアイソフォームの標的特異性 (Yoshida *et al. JBC*, 2015 より引用)

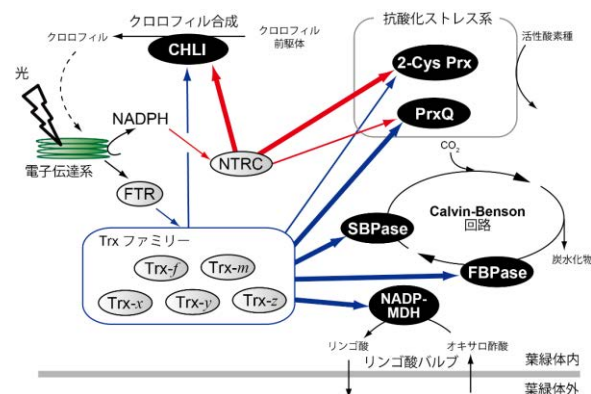


図 3. 緑色植物葉緑体の複数の還元力伝達経路

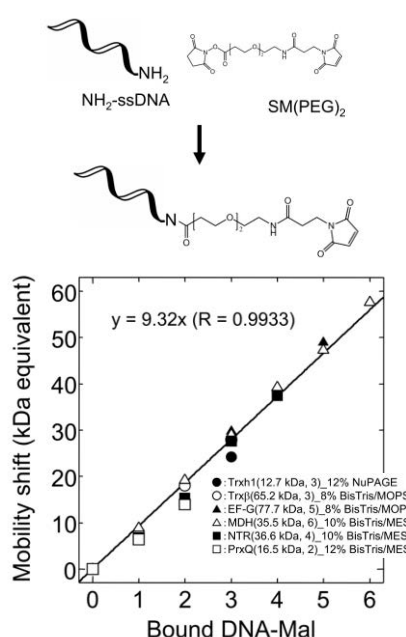


図 4. DNA マレイミドの基本分子設計と移動度シフト (Hara *et al. BBA*, 2013 より引用)

ット解析によりニトロゲナーゼの還元酵素である NifH の発現量が野生株の約 30%になることを明らかにした。窒素源存在下では、野生株に比べて増殖速度に差は見られなかったが、光化学系の集光色素複合体であるフィコビリソームの発現量の減少がみられた。そこで、埼玉大学・川合真紀教授の協力を得てメタボローム解析を行い、野生株と比べグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)の活性が低いことを示唆する結果を得た。そして、G6PDH との補因子である OpcA が酸化還元応答することを新たに見出した(第 57 回日本植物生理学会年会発表(2016))。さらに、制御に関与する OpcA 上の Cys 残基を決定した(第 58 回日本植物生理学会年会発表(2017)、論文準備中)。上記のチオレドキシン破壊株については、ショットガンプロテオミクス解析によって抗酸化ストレス系に特に顕著な欠陥があることを見出した。

光合成生物は、FTR-チオレドキシン系とは異なる還元力伝達システムを構成する NADPH-チオレドキシン還元酵素ドメインとチオレドキシンドメインを併せ持つ NTRC というハイブリッド酵素を持っている。この NTRC については、緑色植物の研究により、従来知られているフェレドキシン-チオレドキシン還元酵素の経路とは別の還元力伝達経路として重要であることや、この経路によって特異的に還元力を供給されるタンパク質が存在することなどを明らかにした(図 3)(Yoshida and Hisabori, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016, **113**(27):E3967-3976)。Anabaena の NTRC についても、同様に標的タンパク質の探索と破壊株を用いた生理学的解析を行い、抗酸化ストレスタンパク質として重要な 2-Cys 型ペルオキシレドキシンの還元力供給に重要なことや、NTRC が抗酸化ストレス系として生理的に重要な機能を持っていることなどを明らかにした(第 57 回日本植物生理学会年会発表(2016)、Mihara et al. *Plant Cell Physiol*. 2016)。

細胞内のレドックス状態を可視化することは、細胞内環境を制御して代謝改変するための重要な情報である。このために、本プロジェクトではタンパク質および細胞内環境そのものを可視化する 2 種類のツールの開発を行った。

まず、細胞内の酸化還元応答タンパク質のレドックス状態を可視化する手段として、新規マレイミド化合物の開発を行い、DNA を標識化合物として用いる新規化合物 DNA マレイミドを得た(図 4)。この化合物は、標識数に応じて SDS-PAGE 上でタンパク質の移動度を定量的に変化させることが出来るため、特定のタンパク質のチオール基の数を容易に定量することが可能である(Hara S. et al. *Biochim Biophys Acta*. 2013, **1830**, 3077-3081)。しかし、この化合物は、標識後のタンパク質のゲルからの転写効率を低下させ、ウェスタンブロッティング法への適用に不向きであったため、新たにマレイミドと DNA の間に光開裂基を導入した DNA-PC マレイミドを開発した(特願 2013-166448、株式会社同仁化学研究所との共同出願)(Hara S. et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015, **456**, 339-343)。DNA マレイミド、DNA-PC マレイミドは、同仁化学研究所より 2015 年 12 月に発売された。さらに、この技術を利用した細胞内のニトロ化検出試薬(2016 年 6 月発表)、PEG-PC マレイミド(2016 年 8 月発表)など関連商品が同社において開発され販売されている(上記特許は既に成立し、平成 29 年 6 月に特許証発行予定)。

細胞内のタンパク質の酸化還元状態を規定する要因は、グルタチオン、NADH、NADPH など低分子化合物の酸化還元量比、活性酸素量など、様々であり、実際、還

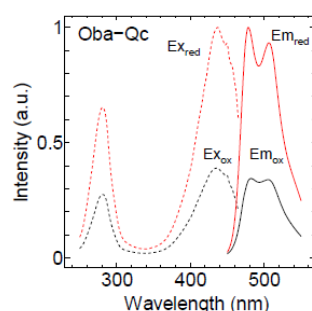


図 5. 酸化還元応答タンパク質 Oba-Qc のスペクトル
(赤・還元 黒・酸化)
コントロール株 アンチセンス RNA 発現株

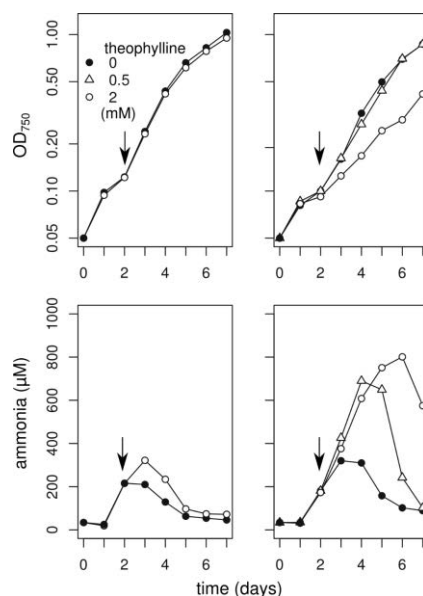


図 6. MSX 耐性株のアンモニア生産とテオフィリンによる誘導
(↓の時点でテオフィリンを添加)

元的と言われている細胞内、あるいは、各コンパートメント内がどの程度還元的あるいは酸化的であるかは、実は、よくわかっていない。例えば、窒素固定型シアノバクテリアのヘテロシスト内のレドックス状態が実際にどのようなになっているのかは調べられた例がない。非侵襲的に可視化する方法として酸化還元応答する蛍光タンパク質（レドックス応答 GFP）がすでに発表されているが、酸化還元電位が必ずしも細胞のそれに合致しないことや、変異体 GFP の蛍光変化が pH 変化によっても誘導されるため、実用的な「ものさし」とはなっていない。この問題を克服するために、大阪大学産業科学研究所の永井健治教授の協力を得て、蛍光タンパク質の開発を進め、酸化状態で特異的に蛍光が消光し、pH 変化にも比較的安定な蛍光強度を示す蛍光タンパク質 Oba-Q の開発に成功した（図7）（特願 2013-205598, Sugiura K. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015, **457**, 242-248）。

3) シアノバクテリアによる含窒素化合物の生産

窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 株に光合成条件下で自立的にアンモニアを生産させることを目指して、窒素化合物の代謝経路においてニトロゲナーゼ下流に位置するグルタミン合成酵素のアンチセンス RNA を利用した発現抑制、グルタミン合成酵素（GS）の活性中心への変異導入、および、ランダム変異によるアンモニア高生産株の取得を実施した。そして、テオフィリンアプタマーを用いて GS のアンチセンス RNA 発現を人為的に制御することで GS そのものの発現抑制を行い、GS の発現量をタンパク質レベルで 50%程度まで抑制することに成功した。この発現抑制単独では、自発的なアンモニア放出は観察されなかったが、MSX 添加によるアンモニア放出では MSX の必要量は野生株のその 1/10 程度まで減少した。

一方、GS の酵素活性を低下させるために当初実施した GS の活性中心近傍への変異導入が極めて困難であったことから、MSX 耐性を指標としてランダム変異によるアンモニア生産株の選抜を行った。その結果、得られた 4 つの耐性株のうちの 3 株はいずれもグルタミン合成酵素の活性中心のアンモニア結合ポケット近傍に変異（V217I）を持ち、窒素飢餓条件下でヘテロシスト形成するとアンモニアを自発的に培地中に放出した。これらの株のうち最も生産性の高いものについて、上記のテオフィリンアプタマーによりアンチセンス RNA を誘導して GS の発現抑制を行うと、アンモニア生産量が 4 倍まで増加した（図6）。また、得られた変異株は、培養液中のアンモニアを除去することで複数回、自立的にアンモニア生産を行うことが出来た。この変異株について、メタボローム解析を行ったところ、GS 下流の代謝系に依存したアミノ酸蓄積には若干の減少が見られたが、顕著な代謝産物の変化は確認できなかった。また、この変異株は通常光合成条件下で安定に維持できている。

次に、このアンモニア自立的生産株（MSX 耐性株）を基盤として、アンモニア高生産株

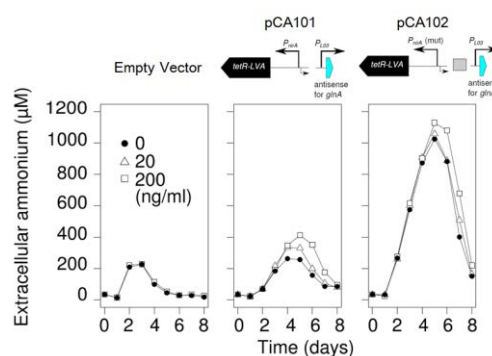


図 7 . GS の発現制御による *Anabaena* のアンモニア排出 (Higo et al. PCP, 2016 より引用)

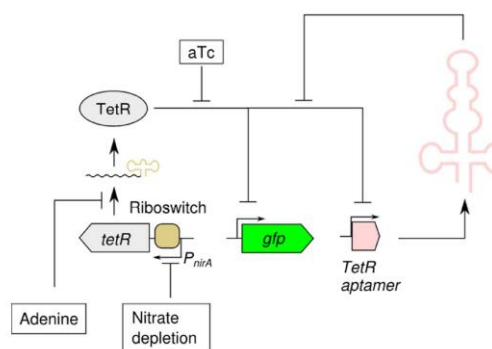


図 8 . *Anabaena* 細胞で機能するポジティブフィードバックループ (Higo et al. ACS Synth. Biol., 2016 より引用)

を確立することを目指して研究を実施した。これまで不十分だったシアノバクテリアにおける遺伝子発現を制御するためのツールとして、すでに様々な生物で遺伝子発現制御に用いられている転写抑制因子 TetR を利用した発現制御システムを完成させた。まず、GFP をレポーターとしてシアノバクテリアにおける遺伝子発現制御の可否を検証したところ、テトラサイクリン濃度依存的に GFP 蛍光が増大し、遺伝子発現の誘導が可能であることがわかった。さらに、*tetR* の発現を窒素固定条件下で減少させることにより、窒素充足時と比べて 1/10 のテトラサイクリン濃度で遺伝子発現誘導を起こすことに成功した。これを利用して、グルタミン合成酵素 (GS) のアンチセンス RNA を発現するシステムを構築した。このシステムを導入したアンモニア自立的生産株は、窒素飢餓条件に移行するだけで GS の発現が抑制され、誘導剤の添加なしでも代謝経路上で過剰となったアンモニアを細胞外に排出し、その最高濃度は 1 mM 以上に到達した (図 7) (Higo A. et al. Plant Cell Physiol., 2016)。

上記の GS の遺伝子発現制御システムをさらに改良するため、*Anabaena* 細胞で機能するポジティブフィードバックループを新規に構築した。特に、テトラサイクリンを誘導剤として利用する系では、テトラサイクリン自身が光不安定性で誘導効率が十分でなかったが、TetR アプタマーとリボスイッチを用いた発現制御システムを構築することによって、強光条件でも十分な遺伝子発現誘導が可能になった (図 8) (Higo A. et al. ACS Synthetic Biology, 2016)。

3.2 バイオアンモニア生産及び回収技術の確立(東京工業大学 原グループ)

(1)研究実施内容及び成果

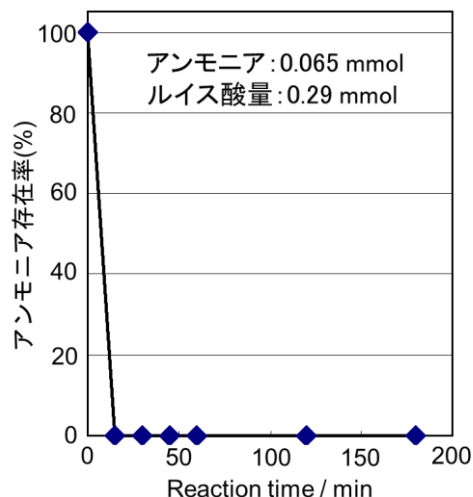
本サブテーマの目的は培養液中からアンモニアを低コストで回収するプロセスを開発することにある。

1) プロセス構築

上記プロセスの要として当グループは 4・5 族酸化物水中機能固体ルイス酸触媒 (TiO_2 、 ZrO_2 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5) を見出した。これらの粉末触媒は溶媒に不溶な固体材料であり、容易に合成できる。その表面には水中で塩基と結合できるルイス酸点が高密度に存在する。これらのルイス酸点は水中でもアンモニアを吸着するだけでなく、アンモニアを吸着した当該触媒を水中で炭酸ガスを吹き込むことにより簡単に遊離できる。即ち、シアノバクテリアが生成したアンモニアを当該触媒に吸着させ、これを培地から分離した後、炭酸ガスと接触させればアンモニアを培地から低エネルギー消費で濃縮分離することが可能となる。

本サブテーマでは、まず、規定量のアンモニアを溶解した蒸留水、培地に表面積 $100\sim 200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ の TiO_2 、 ZrO_2 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 粉末を分散させ、これらの触媒のアンモニア吸着能を検討した。また、これらの触媒に吸着したアンモニアは炭酸ガスを水中に吹き込むことによって室温における触媒からのアンモニアの遊離を検討した。

図 9 に蒸留水に溶解したアンモニアを水中機能固体ルイス酸 TiO_2 で吸着した結果を示す。なお、この実験では MSX 存在下でシアノバ



【実験条件】

アンモニア水溶液 : 50 mL (1.3 mM,)
酸化チタン触媒 : 1.2 g, 吸着温度 : 298 K

図 9. 蒸留水に溶解したアンモニアの回収

クテリアが生産する最大限のアンモニア量を上回るアンモニアを蒸留水に溶解している。図が示すように TiO_2 は 30 分以内に蒸留水中のアンモニア全てを吸着した。なお、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 も TiO_2 と同等のアンモニア吸着能を示したが、 ZrO_2 はアンモニア全てを吸着できなかった。表面を解析した結果、 ZrO_2 表面上には他の 4・5 族酸化物とは異なり、塩基性サイトが高密度に存在しており、これがアンモニア吸着を阻害していることが明らかになった。なお、 TiO_2 は Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 に比べ、豊富で安価な原料から生産できることから、今後の検討は TiO_2 で行うことにした。

図 10 には図 9 の実験でアンモニアを吸着した TiO_2 に炭酸ガスを吹き込んだときの蒸留水中のアンモニア存在率を示す。 TiO_2 触媒導入後 1 分で蒸留水中のアンモニアの 90%以上が TiO_2 に吸着される。この溶液に炭酸ガスを吹き込むと 1 分で水溶液中のアンモニア量は TiO_2 触媒導入前に戻る。なお、図 10 が示すように炭酸ガスを吹き込んでいる限り、アンモニアは TiO_2 に吸着しない。

さらに本サブテーマではアンモニアを溶解した培地で上記と同じ実験を行った。その結果、蒸留水での結果と同様に TiO_2 は培地中のアンモニアを吸着し、炭酸ガスの吹き込みによってアンモニアを遊離することが確認された。なお、培地には様々なイオンが存在するため、 TiO_2 へのアンモニア吸着が遅くなる。蒸留水の場合と同じアンモニア吸着速度を達成するには、1.5～2 倍以上の TiO_2 が必要となることが明らかになった。

以上のことから、 TiO_2 を用いることによってシアノバクテリアが生産したアンモニアを培地から吸着分離し、アンモニアを吸着した TiO_2 に炭酸ガスを吹き込むことによってアンモニアを遊離できることが確認された。これらの結果から図 11 に示すようなアンモニアの分離濃縮プロセスが予想される。このプロセスではまず、シアノバクテリア槽で生産された低濃度のアンモニアが TiO_2 分散相（水+ TiO_2 ）に移動して吸着される。アンモニアを吸着した TiO_2 は分散相ごと別の場所に移され、そこで炭酸ガスを添加することによってアンモニアを遊離させる。この操作によって高濃度のアンモニア水が得られる。アンモニアを遊離後、 TiO_2 は元の位置に戻される（実験室レベルの回収装置については、前項に記載した）。

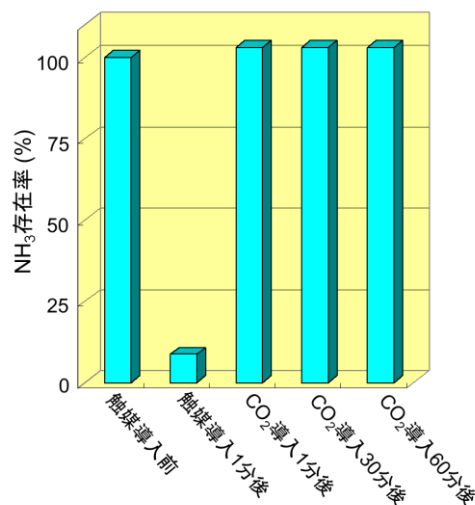


図 10 蒸留水に溶解したアンモニアの回収および吸着アンモニアの遊離
触媒導入後 1 分で炭酸ガス (50 ml min⁻¹)

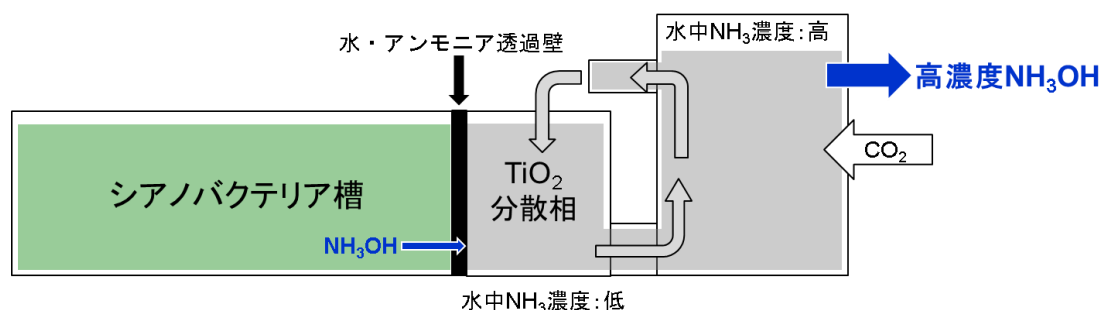


図 11 アンモニア分離濃縮プロセス

2) チタニア触媒の大量生産技術の確立

当チームはシアノバクテリアが生産したアンモニアを水中で吸着し、濃縮する手法とし

て水中機能ルイス酸を有するチタニア触媒を使用する方法が有効であることを実証してきた。この手法の要となるのはチタニア触媒であり、その表面に存在するルイス酸点の密度が高いほど、アンモニアの吸着・分離能が高くなる。この意味で当該チームの開発したチタニア (Tokyo Tech TiO₂: 3T) は他の市販チタニアと一線を画している。即ち、3T の水中機能ルイス酸密度は市販チタニアの 3 倍を越えている。この 3T は市販されていないため、その大量生産技術を確立する必要がある。

実験室レベル (5~10 g) の合成において、3T は室温でチタニウムテトライソプロポキシドを加水分解し、0.1 MHC 1 水溶液で洗浄することで得られる。しかし、1~5 kg の 3T をスケールアップした同様の方法で得ることはできない。この場合、ルイス酸密度が他の市販品チタニアと同等になってしまうことが明らかになった。そこで 3T 大量生産を念頭に合成条件を再検討した。

3. 3 糖代謝改変によるアンモニア高生産 (首都大学東京 得平グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

窒素固定反応を行うには、ニトロゲナーゼを酸素から保護するための嫌気的な環境と多量の ATP および還元力 (NADPH) が必要である。ヘテロシストにおいては、ATP は主に光エネルギーを利用した光化学系のサイクリック電子伝達により合成されるが、NADPH は栄養細胞から受け取ったスクロースを酸化了的ペントースリン酸 (OPP) 経路で代謝することで作られている。本グループでは、糖代謝系の改変により栄養細胞でのスクロースの合成量およびヘテロシストでのスクロースからの NADPH 合成量を増加させることで、窒素固定によるアンモニア生産の強化を目指した。また、ヘテロシストにおいて窒素固定に必要な嫌気的な環境が形成され、その中でニトロゲナーゼが発現する制御システムの解明に取り組んだ。

窒素固定に特殊化した細胞であるヘテロシストは、光合成を行うことができない。そのため、窒素固定に必要なエネルギーおよび炭素骨格は、隣接した栄養細胞の光合成に依存している。栄養細胞が光合成により作り出したスクロースがヘテロシストへと輸送され、ヘテロシストはそのスクロースを異化することで窒素固定に必要なエネルギーを得ている。そこで、ヘテロシストにおけるスクロース代謝をより活発にし、窒素固定に必要なエネルギーの供給量を増加させることで、窒素固定反応を活性化することを試みた。ヘテロシストにおいては、スクロースはインベルターゼ (InvA および InvB) によりグルコースとフルクトースに分解され、その後リン酸化を経て OPP 経路で代謝される。ヘテロシストにおけるスクロース分解を活性化し、OPP 経路による NADPH 合成量を増加させるため、*invA* および *invB* 遺伝子の過剰発現株を作製した。*invA*, *invB* 遺伝子をヘテロシスト特異的に発現させるため、ヘテロシスト特異的なプロモーターである *PnifB* からこれらの遺伝子を発現させた。しかし、インベルターゼ過剰発現株において、窒素固定活性の上昇やアンモニア生産量の増加は見られなかった。この結果は、ヘテロシストにおけるインベルターゼの活性はアンモニア生産の律速になっていないことを示唆している。そこで、栄養細胞からヘテロシストに供給されるスクロース量が制限されていると考え、栄養細胞でのスクロース生産量の増加に取り組んだ。栄養細胞でのスクロース生産は、グルコース-1-リン酸から作られる UDP-グルコースが出発物質となる。しかし、栄養細胞ではグルコース-1-リン酸は ADP-グルコースに変換され、主にグリコーゲンの合成に利用されてしまう。そこで、ADP-グルコース合成酵素をコードする *glgC* 遺伝子を破壊し、グリコーゲン合成に使われていたグルコース-1-リン酸を全てスクロース合成に利用できる株を作製した。*glgC* 破壊株における窒素固定活性およびアンモニア生産性の評価を進めることで、栄養細胞での糖代謝をグリコーゲン合成からスクロース合成へと改変したときの窒素固定活性への影響が明らかになると期待できる。また、炭酸同化能力の強化による窒素固定の活性化にも取り組んだ。藻類や高等植物を始めとする様々な光合成生物において、カルビン-ベンソン回路の酵素フルク

トース-1,6-/セドヘプツロース-1,7-ビスフォスファターゼ(FBP/SBPase)の過剰発現により、炭酸同化能力が向上し、バイオマス生産量が増加することが知られている。FBP/SBPase をコードする遺伝子をプラスミドにクローニングし、そのプラスミドを導入した株を作製した。この株では、FBP/SBPase をコードする遺伝子のコピー数がおおよそ 10 倍に増加しており、FBP/SBPase が過剰発現していると考えられる。これまでに、炭酸同化能の強化が窒素固定に及ぼす影響を評価したという報告はなく、今回作製した株を利用することで炭酸同化と

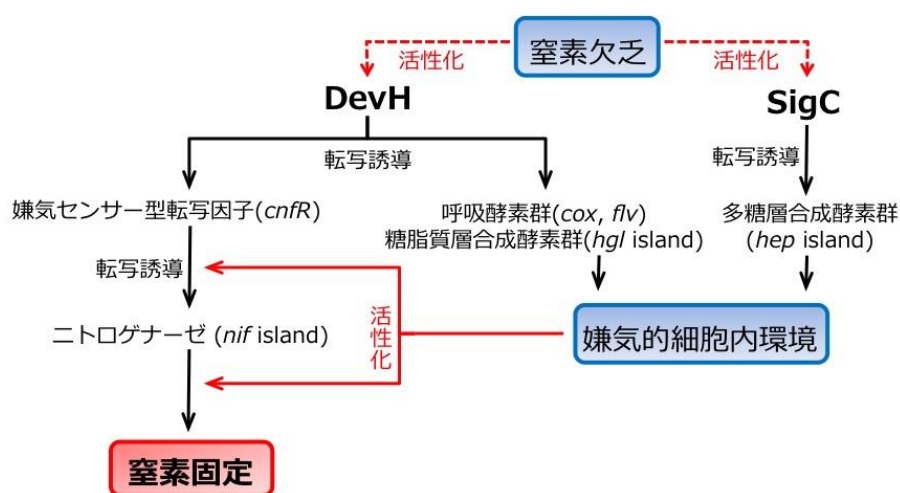


図 1 2. ヘテロシストにおける窒素固定関連遺伝子の発現制御

窒素固定の 2 つの活性のバランスを制御するシステムの解明が期待できる。

ヘテロシストにおいて窒素固定を行うためには、細胞内を嫌氣的な環境にし、その嫌氣的な環境内でニトロゲナーゼ複合体を発現させる必要がある。これまでに、細胞内を嫌氣的な環境に

するのに働く遺伝子群、ニトロゲナーゼ複合体の構築に働く遺伝子群は同定されていたが、それらの遺伝子の発現がヘテロシストにおいてどのように制御され、窒素固定を可能にしているのかは明らかとなっていなかった。我々は、ヘテロシスト分化の過程で発現が誘導される転写制御因子 DevH に注目し、その機能解析を行った。devH 遺伝子発現抑制株を用いて、DevH により発現が制御される遺伝子の同定を行った。その結果、DevH はヘテロシスト外膜の糖脂質層の形成に関わる遺伝子群(hgl 遺伝子群)および呼吸に関わる遺伝子(cox 遺伝子群、flv)の発現を制御していることが明らかとなった。これらの遺伝子は、ヘテロシスト内を嫌氣的な環境にするのに必須の遺伝子である。DevH はこれまでに我々が同定した転写因子 SigC と協調して働くことで、ヘテロシスト内の嫌氣的環境の構築を制御する転写因子であることが明らかとなった。また、DevH はニトロゲナーゼ(nif)遺伝子群の発現を制御する cnfR 遺伝子の発現も制御していた。CnfR は嫌氣的な環境に応答して活性化する転写因子であると考えられており、DevH の働きにより細胞内が嫌氣的環境となると CnfR が活性化され、ニトロゲナーゼの発現が誘導されると考えられる (図 1 2)。これまでの研究において、窒素欠乏によりヘテロシストの分化がどのように誘導されるのか、その分子機構は明らかとなっていた。今回、本研究によりヘテロシストが窒素固定細胞として機能するために必要な嫌氣的環境の構築およびニトロゲナーゼの発現誘導の分子機構を解明することに成功した。本研究の成果は窒素固定能の発現誘導をコントロールする技術の開発につながるものであり、アンモニア生産の効率化やさらには強化に貢献するものと期待している。

3. 4 ヘテロシスト高頻度化とアンモニア生産 (大阪市立大学 増川グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

糸状性窒素固定藍藻の一部 (*Anabaena*, *Nostoc* 等) は、窒素欠乏条件になると大気中の窒素からアンモニアを生産 (窒素固定) するため、窒素固定に特化した異型細胞ヘテロシストを形成する。窒素固定を行う酵素ニトロゲナーゼは、酸素により失活しやすいため、一般的に、光合成による酸素発生との両立は困難であるが、ヘテロシスト内部は酸素濃度が

低く維持されており、ニトロゲナーゼは酸素から保護される。このため、栄養細胞による酸素発生を伴う光合成と同時に、ヘテロシストによる窒素固定が可能である。ニトロゲナーゼはヘテロシストに局在しているため、ヘテロシストの形成頻度を増加させることで、アンモニア生産性の向上が期待された。

ヘテロシストは、通常 10–20 細胞に 1 個の割合（頻度 5-10%）で形成される。これまでに、ヘテロシスト活性化因子 *HetR* へのランダム変異導入・変異株選抜を行い、ヘテロシストの頻度増加につながる *HetR* のアミノ酸残基置換変異を複数同定している。本研究では、それらの *HetR* 変異をアンモニア自立放出株および *Anabaena* 野生株に導入し、ヘテロシストを高頻度で形成する変異株を 2 種類作出した。それら変異株のヘテロシストは、間隔を置いた規則的なパターンを比較的維持しながら、その形成頻度は約 2 倍まで増加した。その変異株をグルタミン合成酵素の阻害剤 *Methionine sulfoximine (MSX)* 存在下で培養し、アンモニアを培地中に排出させて、アンモニア生産性を評価した。変異株のアンモニア生産性は、特に水素を含む気相下（窒素ガス/10% CO₂/10% H₂）で、顕著な増加が見られ、更に高いアンモニア生産性が 3 日間以上持続した。水素を含む気相下では、水素をニトロゲナーゼ反応の補助的な還元力源として使うことができるためだと考えられる。

これまでのヘテロシスト関連遺伝子の変異研究により、ヘテロシスト頻度が増加する変異株は多数作成されているが、大部分のヘテロシストが 2 個以上連続して形成されるため、ニトロゲナーゼ活性の増加につながらない。また、藍藻を厳しい窒素欠乏下で培養することで、ヘテロシスト頻度を増加させ、アンモニア生産性が最大 1.8 倍まで増加した先行研究があるが、その増加は一時的なもので持続しない問題があった。一方、本研究で作成した変異株は、通常の窒素欠乏条件で、ヘテロシストの高頻度形成および間隔を置いた規則的なパターンを安定的に維持できる特徴があり、それに伴いアンモニア生産性が向上し、更に高い生産性を持続させることに成功した。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 30 件)

1. Sunamura EI, Konno H, Imashimizu M, Mochimaru M, Hisabori T, “A conformational change of the γ subunit indirectly regulates the activity of cyanobacterial F_1 -ATPase”, *J. Biol. Chem.* 2012 Nov. 9; 287(46): 38695-38704 (doi:10.1074/jbc.M112.395053)
2. Kitano M, Wada E, Nakajima K, Hayashi S, Miyazaki S, Kobayashi H, Hara M, “Protonated titanate nanotubes with Lewis and Brønsted acidity: Relationship between nanotube structure and catalytic activity”, *Chem. Mater.*, 2013 Jan; 25(3): 385–393 (doi: 10.1021/cm303324b)
3. Hara S, Nojima T, Seio K, Yoshida M, Hisabori T, “DNA-maleimide: an improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a specific protein”, *Biochim Biophys Acta.* 2013 Apr; 1830(4):3077-3081 (doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.012)
4. Koito Y, Nakajima K, Kitano M, Hara M, “Efficient Conversion of Pyruvic Aldehyde into Lactic Acid by Lewis Acid Catalyst in Water”, *Chemistry Letters*, 2013, 42, 873-875. (doi: 10.1246/cl.130319)
5. Yoshida K, Noguchi K, Motohashi K, Hisabori T, “Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria”, *Plant Cell Physiol.* 2013 Jun; 54(6):875-892 (doi: 10.1093/pcp/pct037)
6. Nakajima K, Noma R, Kitano M, Hara M, “Titania as an Early Transition Metal Oxide with a High Density of Lewis Acid Sites Workable in Water”, *Journal of Physical Chemistry C*, 2013, 117, 16028-16033. (doi: 10.1021/jp404523r)
7. Hara S, Hisabori T, “Kinetic analysis of the interactions between plant thioredoxin and target proteins”, *Front Plant Sci.* 2013 Dec 18; 4:508 (doi: 10.3389/fpls.2013.00508)
8. Tsukamoto Y, Fukushima Y, Hara S, Hisabori T, “Redox control of the activity of phosphoglycerate kinase in *Synechocystis* sp. PCC6803”, *Plant Cell Physiol.* 2014 Jan 7; 54(4): 484-491 (doi: 10.1093/pcp/pct002)
9. Sunamura EI, Kamei T, Konno H, Tamaoki N, Hisabori T, “Reversible control of F_1 -ATPase rotational motion using a photochromic ATP analog at the single molecule level”, *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Mar 4; 446(1):358-363 (doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.117)
10. Shintaku H, Nakajima K, Kitano M, Ichikuni N, Hara M, “Lewis Acid Catalysis of TiO_4 Tetrahedra on Mesoporous Silica in Water”, *ACS Catal.*, 2014, Mar. 11; 4(4), 1198-1204 (doi: 10.1021/cs401149n)
11. Yoshida K, Matsuoka Y, Hara S, Konno H, Hisabori T, “Distinct Redox Behaviors of Chloroplast Thiol Enzymes and their Relationships with Photosynthetic Electron Transport in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Cell Physiol.* 2014 May 20; 55(8): 1415–1425 (doi:10.1093/pcp/pcu066)
12. Nakajima K, Noma R, Kitano M, Hara M, “Selective glucose transformation by titania as a heterogeneous Lewis acid catalyst”, *J. Mol. Cat. A: Chemical*, 2014 July; 388-389; 100-105 (doi: 10.1016/j.molcata.2013.09.012)
13. Hara S, Tatenaka Y, Ohuchi Y, Hisabori T, “Direct determination of the redox status of cysteine residues in proteins in vivo”, *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2; 456(1):339-343. (doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.082)
14. Sugiura K, Nagai T, Nakano M, Ichinose H, Nakabayashi T, Ohta N, Hisabori T, “Redox sensor proteins for highly sensitive direct imaging of intracellular redox state”, *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Feb 13; 457(3):242-248. (doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.095)
15. Nagano T, Yutthanasirikul R, Hihara Y, Hisabori T, Kanamori T, Takeuchi N, Ueda T, Nishiyama Y, “Oxidation of translation factor EF-G transiently retards the translational elongation cycle in *Escherichia coli*”, *J Biochem.* 2015 Aug; 158(2):165-72. (doi: 10.1093/jb/mvv026)
16. Kadowaki T, Nishiyama Y, Hisabori T, Hihara Y, “Identification of OmpR-Family Response Regulators Interacting with Thioredoxin in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803”, *PLoS One.* 2015 Mar 16; 10(3):e0119107. (doi: 10.1371/journal.pone.0119107)
17. Buchert F, Konno H, Hisabori T, “Redox regulation of CF_1 -ATPase involves interplay between the γ -subunit neck region and the turn region of the $\beta_{DELS\text{EED}}$ -loop”, *Biochimica*

- Biophysica Acta, 2015, 1847(4-5):441-450. (doi: 10.1016/j.bbabbio.2015.01.013)
18. Yoshida K, Hara S, Hisabori T, “Thioredoxin Selectivity for Thiol-based Redox Regulation of Target Proteins in Chloroplasts”, *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(23):14278-14288. (doi: 10.1074/jbc.M115.647545)
 19. Fukuhara K, Nakajima K, Kitano M, Hayashi S, and Hara M, “Transesterification of Triolein over hydrophobic Microporous Carbon with SO₃H Groups”, *ChemCatChem*, 2015, 7, 3945–3950. (doi: 10.1002/cctc.201500525)
 20. Nomata J, Maeda M, Isu A, Inoue K, Hisabori T, “Involvement of thioredoxin on the scaffold activity of NifU in heterocyst cells of the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120”, *Journal of Biochemistry*, 2015, 158 (3):253-261. (doi: 10.1093/jb/mvv046)
 21. Higo A, Isu A, Fukaya Y, Hisabori T, “Efficient Gene Induction and Endogenous Gene Repression Systems for the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120”, *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(2):387-396. (doi: 10.1093/pcp/pcv202)
 22. Yoshida K, Hisabori T, “Adenine nucleotide-dependent and redox-independent control of mitochondrial malate dehydrogenase activity in *Arabidopsis thaliana*”, *Biochimica Biophysica Acta*, 2016 Jun;1857(6):810-818. (doi: 10.1016/j.bbabbio.2016.03.001)
 23. Ehira S, Miyazaki S, “Regulation of genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by a group 2 sigma factor SigC” *Life* 2015, 5:587-603. (doi: 10.3390/life5010587)
 24. Ohbayashi R, Watanabe S, Ehira S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H, “Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution” *ISME J.* 2016 May;10(5):1113-1121. (doi: 10.1038/ismej.2015.194)
 25. Yoshida K, Hisabori T, “Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability”, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 Jul 5;113(27):E3967-76. (doi: 10.1073/pnas.1604101113)
 26. Higo A., Isu A., Fukaya Y., Hisabori, T., “Designing synthetic flexible gene regulation networks using RNA devices in cyanobacteria”, *ACS Synth Biol.* 2017 Jan 20;6(1):55-61. doi: 10.1021/acssynbio.6b00201.
 27. Yoshida, K., Hisabori, T., “Comprehensive Kinetic Analysis of Electron Transfer from Ferredoxin-Thioredoxin Reductase to Ten Thioredoxin Isoforms in *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts”, *Biochem J.* 2017 Apr 4;474(8):1347-1360. doi: 10.1042/BCJ20161089
 28. Mihara S. Yoshida K., Higo A., Hisabori T., “Functional significance of NADPH-thioredoxin reductase C in the antioxidant defense system of cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120”, *Plant Cell Physiol.* 2017 Jan 1;58(1):86-94. doi: 10.1093/pcp/pcw182.
 29. Masukawa H, Sakurai H, Hausinger RP, Inoue K., “Increased heterocyst frequency by patN disruption in *Anabaena* leads to enhanced photobiological hydrogen production at high light intensity and high cell density”, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017 Mar;101(5):2177-2188. doi: 10.1007/s00253-016-8078-3.
 30. Fujisawa, T., Narikawa, R., Maeda, SI., Watanabe, S., Kanesaki, Y., Kobayashi, K., Nomata, J., Hanaoka, M., Watanabe, M., Ehira, S., Suzuki, E., Awai, K., Nakamura, Y. (2016) CyanoBase: A large-scale update on its 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* 45:D551-D554.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Hisabori T, Sunamura EI, Kim Y, Konno H, “The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery”, *Antioxid Redox Signal.* 2013 Nov 20; 19(15): 1846-1854 (doi: 10.1089/ars.2012.5044)
2. 久堀徹, “ATP 合成酵素の構造と機能”, 光合成のエネルギー変換と物質変換—人工光合成をめざして”, 2015, pp.189-198
3. Hara M, Nakajima K, Kamata K, “Recent Progress in the Development of Solid Catalysts for Biomass Conversion into High Value-added Chemicals”, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2015, 16: 034903. (First published online: 2015/05/20) DOI: 10.1088/1468-6996/16/3/034903
4. 増川一, 北島正治, 櫻井英博, 井上和仁, “ヘテロシスト形成型シアノバクテリアのニトロゲ

- ナーゼを利用した光生物学的水素生産”, 2016, BIOINDUSTRY, 33(1): 36-42
5. 日原由香子, 朝山宗彦, 蘆田弘樹, 天尾豊, 新井宗仁, 栗井光一郎, 得平茂樹, 小山内崇, 頼達也, 成川礼, 蓮沼誠久, 増川一, “多彩な戦略で挑むシアノバクテリア由来の持続可能燃料生産”, 化学と生物, vol. 55, No. 2, pp. 88-97, 2017
 6. 北島正治, 増川一, 櫻井英博, 井上和仁, 第4章第4節執筆 “シアノバクテリアからの高効率水素生産”, 再生可能エネルギーによる水素製造, S&T出版株式会社, pp. 143-151, (2016年9月28日発刊)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議19件、国際会議6件)

1. Toru Hisabori (東工大・資源研), “Regulation of rotation and activity of the molecular motor enzyme, ATP synthase governed by photosynthesis”, 13th RIES-Hokudai International Symposium, Sapporo, Dec. 13-14, 2012.
2. 原亨和 (東工大・フロンティア研究機構), “セルロースバイオマスからの有用化学資源生産”, エコプロダクツ2012日本バイオプラスチック協会セミナー「バイオプラスチックの新しい潮流」, 東京ビッグサイト, 2012年12月14日
3. 原亨和 (東工大・フロンティア研究機構), “固体酸触媒による低環境負荷プロセス”, 日本化学会第93春季年会, 立命館大学びわこ草津キャンパス, 2013年3月22日
4. 原亨和 (東工大・フロンティア研究機構), “この世界、どこまで残せるのかーサバイバルサイエンスの挑戦ー”, 東京工業大学ホームカミングディ, 東京, 2013年5月18日
5. Michikazu Hara (東工大・フロンティア研究機構), “New materials and New Catalysis”, The 14th Japan-Korea Symposium on Catalysis, Nagoya, July 1-3, 2013.
6. 原亨和 (東工大・フロンティア研究機構), “バイオマスからの必須化学資源の生産”, 大田区民大学 (東工大提携講座) 地球を化学しよう, 東京, 2013年6月19日
7. 久堀徹 (東工大・資源研), “分子モーター酵素制御の内的要因と外的要因ー葉緑体 ATP 合成酵素の場合ー”, 第3回分子モーター討論会, 東京大学, 2013年7月19日
8. 久堀徹 (東工大・資源研), “ATP 合成酵素の分子進化と活性制御”, 関西学院大学理学部セミナー, 三田・兵庫, 2013年9月6日
9. 久堀徹 (東工大・資源研), “ATP 合成酵素の活性制御機構”, 埼玉大学大学院理工学研究科セミナー, 埼玉, 2013年9月27日
10. 原亨和 (東工大・フロンティア研究機構), “不均一系酸触媒による化学資源の低環境負荷生産～革新的な触媒化学による環境に優しいバイオマス資源活用の展開～”, 廃棄物・資源循環研究会・平成25年公開シンポジウム, 鳥取県, 2013年9月27日
11. 原亨和 (東工大・フロンティア研究機構), “低環境負荷固体触媒の構築”, 触媒学会つくば地区講演会, 茨城県, 2013年12月9日
12. 原亨和 (東工大・フロンティア研究機構), “セルロースバイオマスからの有用化学資源生産”, エコプロダクツ2012日本バイオプラスチック協会セミナー「バイオプラスチックの新しい潮流」, 東京ビッグサイト, 2013年12月14日
13. 原亨和 (東工大・フロンティア研究機構), “環境適応性の高い不均一系酸触媒・アンモニア合成触媒の開拓 (学術賞受賞講演)”, 日本化学会第94回春季年会, 名古屋大学, 2014年3月28-30日
14. 久堀徹 (東工大・資源研), “植物体内のレドックス制御を可視化する”, 東京大学理学系研究科第976回生物科学セミナー, 東京大学, 2014年5月28日
15. 久堀徹 (東工大・資源研), “光合成生物細胞内のレドックス環境の可視化”, 日本遺伝学会第86回大会ワークショップ, 長浜バイオ大学, 2014年9月19日
16. 久堀徹 (東工大・資源研), “New devices to visualize redox regulation in plants”, 第87回日本生化学会大会シンポジウム, 京都国際会議場, 2014年10月19日

17. Toru Hisabori (東工大・資源研), “New techniques to visualize the redox status in cells and proteins”, 12th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants: from model systems to field, Palazzo della Gran Guardia, Verona, Italy, June 24, 2015
18. Michikazu Hara (東工大・フロンティア研究機構), “Glucose Conversion by a heterogeneous catalyst with water-tolerant Lewis Acid Sites”, マイケル・ノーベル博士招聘記念国際シンポジウム、Osaka, Japan, Oct. 28, 2015.
19. Toru Hisabori (東工大・資源研), “Significance of the redox regulation networks in photosynthetic organisms”, Yamada Conference: International Symposium on Dynamics and Regulation of Photosynthesis, 奈良春日野国際フォーラム, 奈良, Oct. 30, 2015
20. 得平茂樹(首都大東京), “窒素飢餓環境に対するシアノバクテリアの生存戦略”, ラン藻の分子生物学 2015, かずさアカデミアホール, 2015 年 11 月 17 日
21. 原亨和(東工大・フロンティア研究機構), “新規な水中機能触媒を用いた植物由来炭化水素から必須化学品原料の環境低負荷合成”, “未来へのバイオ技術”勉強会—バイオ素材百花繚乱8—革新的なバイオ化成品生産技術—, バイオインダストリー協会、東京, 2016 年 3 月 11 日
22. Michikazu Hara (東工大・フロンティア研究機構), “Titania as a water-tolerant Lewis acid catalyst for the selective conversion of glucose into 5-hydroxymethylfurfural”, INTERNATIONAL CONFERENCE ON FRONTIERS AT THE CHEMISTRY - ALLIED SCIENCES INTERFACE (FCASI) Jaipur, India, April 25, 2016.
23. 肥後明佳(東工大・化学生命科学研), “多細胞性ラン藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 の合成生物学”, ラン藻ゲノム交流会, 東京大学駒場キャンパス, 東京, 2016 年 6 月 25 日
24. 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “オルガネラ機能を操るレドックス制御ネットワーク”, 第 19 回植物オルガネラワークショップ「植物オルガネラの進化と機能, そして可能性」, 鹿児島大学, 鹿児島, 2017 年 3 月 15 日
25. 吉田啓亮(東工大・化学生命科学研), “葉緑体機能を統御するレドックス制御ネットワーク”, 日本光合成学会第 8 回年会およびシンポジウム、龍谷大学、滋賀、2017 年 5 月

② 口頭発表 (国内会議21件、国際会議3件)

1. 砂村栄一郎, 紺野宏記, 久堀徹 (東工大・資源研), “葉緑体型 ATP 合成酵素の活性制御には、 γ サブユニットの α -ヘリックスのずれが関与する”, 第 53 回日本植物生理学会年会, 京都産業大学, 2012 年 3 月 18 日
2. Michikazu Hara (東工大・フロンティア研究機構), “Selective Production of Lactic Acid from Triose over Phosphate/TiO₂ with Water-Tolerant Lewis Acid Sites”, 15th International Congress on Catalysis 2012, Munchen, Germany, July, 4, 2012
3. 塚本悠, 原怜, 久堀徹(東工大・資源研), “”, 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月 22 日
4. 吉田啓亮, 松岡裕太, 紺野宏記, 久堀徹(東工大・資源研), “葉緑体チオール酵素の *in vivo* レドックス応答とその制御”, 第 4 回日本光合成学会年会, 名古屋大学・名古屋, 2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日
5. 砂村栄一郎, 亀井敬, 紺野宏記, 玉置信之, 久堀徹(東工大・資源研, 北大・電子研), “光応答性 ATP アナログによる F₁-ATPase の活性と回転の制御”, 日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会, 静岡, 2013 年 12 月 18 日-20 日
6. 鯨井純一, 門脇太朗, 久堀徹, 日原由香子(埼玉大・院・理工, 東工大・資源研), “シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 における転写因子 Sll1961 とチオレドキシンとの相互作用解析”, 日本植物学会第 78 回大会, 明治大学(川崎), 2014 年 9 月 13 日
7. 吉田啓亮, 原怜, 久堀徹(東工大・資源研), “葉緑体リンゴ酸脱水素酵素のレドックス制御のチオレドキシン特異性: Trx-m より Trx-f が重要である”, 日本植物学会第 78 回大会, 明治大学(川崎), 2014 年 9 月 14 日
8. 肥後明佳, 井須敦子, 深谷佑紀, 久堀徹(東工大・資源研), “シアノバクテリア *Anabaena*

- sp. PCC7120 における遺伝子発現制御系の開発”, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京農業大学(東京), 2015 年 3 月 17 日
9. 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・資源研), “シロイヌナズナ変異株解析から見てきた葉緑体の機能調節におけるレドックス制御の重要性”, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京農業大学(東京), 2015 年 3 月 17 日
 10. 杉浦一徳, 久堀徹(東工大・資源研), “蛍光タンパク質を用いた細胞内酸化還元状態の直接観察法の開発”, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京農業大学(東京), 2015 年 3 月 18 日
 11. 増川一(大阪市立大), “ラン藻のヘテロシスト高頻度化と光合成的水素生産, 日本光合成学会・第 23 回「光合成セミナー2015:反応中心と色素系の多様性」, 龍谷大学大宮キャンパス(滋賀), 2015 年 7 月 11 日
 12. 得平茂樹(首都大学東京), “比較機能解析によるシアノバクテリアの環境適応機構の解明”, 第 30 回日本微生物生態学会大会, 土浦亀城プラザ(茨城), 2015 年 10 月 20 日
 13. 増川一(大阪市立大), “ラン藻を利用した水素生産の高効率化と持続性の向上”, 第 4 回ネイチャー・インダストリー・アワード, 大阪科学技術センター(大阪), 2015 年 12 月 4 日
 14. 得平茂樹(首都大学東京), “窒素飢餓環境に対するシアノバクテリアの生存戦略の比較解析”, 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会, 東京工業大学(東京), 2016 年 3 月 4 日
 15. Hisabori T, Yoshida K, Hara S, Sugiura K, Higo A (東工大・資源研), “New techniques developed for the biochemical and molecular biological researchers to utilize the potential of cyanobacteria”, 3rd International Workshop of Cyanofactory, 東京農工大学小金井キャンパス(東京), 2016 年 3 月 8 日
 16. 見原翔子, 吉田啓亮, 肥後明佳, 久堀徹(東工大・資源研), “*Anabaena* sp. PCC 7120 の NADPH-thioredoxin reductase C は抗酸化ストレス系に重要である”, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス(岩手), 2016 年 3 月 19 日
 17. 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・資源研), “葉緑体レドックスネットワークにおける還元力伝達の複雑さ:シロイヌナズナ FTR ヘテロ二量体は 10 種の Trx を異なる効率で還元する”, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス(岩手), 2016 年 3 月 20 日
 18. Yoshida Keisuke (東工大・化学生命科学研), “New emerging insights into redox regulation network in Arabidopsis chloroplasts”, Satellite Meeting on Photosynthesis, Kyoto University Seminar House, Kyoto, 2016 年 7 月 1-2 日
 19. Hisabori Toru (東工大・化学生命科学研), “New technologies developed for the biochemical and molecular biological researchers to utilize the potential of cyanobacteria”, Cyanobacteria Workshop at Mons University, Mons, Belgium, 2016 年 10 月 3 日
 20. 小池洋輔(首都大), 栗尾洋平(首都大), 兼崎友(東京農大), 吉川博文(東京農大), 得平茂樹(首都大)「シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 におけるヘテロシスト分化にともなう窒素固定能の発現制御機構」第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 神奈川, 慶応大学, 2017 年 3 月 2-4 日
 21. 増川一(大阪市立大学), 久堀徹(東京工業大学), 藍藻のヘテロシスト高頻度化による水素生産と窒素同化の向上, 第 8 回複合先端研究機構(OCARINA)国際シンポジウム, 大阪市立大学, 2017 年 3 月 8 日
 22. 増川一(大阪市大), 久堀徹, “ヘテロシスト高頻度化による窒素同化の向上”, 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学, 鹿児島, 2017 年 3 月 16-18 日
 23. 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “葉緑体酵素の光還元反応における律速段階”, 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学, 鹿児島, 2017 年 3 月 16-18 日
 24. 見原翔子, 若尾瞳, 杉浦一徳, 肥後明佳, 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 の G6PDH の OpcA を介したレドックス制御”, 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学, 鹿児島, 2017 年 3 月 16-18 日

③ ポスター発表 (国内会議43件、国際会議16件)

■ポスター発表(国内)

1. 土屋昭洋, 野亦次郎, 久堀徹(東工大・資源研), “窒素固定性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 のチオレドキシン破壊株を用いたレドックス制御機能の解析”, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山大(岡山), 2012年3月22日
2. 武山祐, 山内章裕, 砂村栄一郎, 紺野宏記, 久堀徹(東工大・資源研), “酵素複合体再構成による葉緑体型 ATPase に対するテントキシンの作用機序の解析”, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山大(岡山), 2012年3月22日
3. 吉田啓亮, 松岡裕太, 紺野宏記, 久堀徹(東工大・資源研), “葉緑体チオール酵素の *in vivo* レドックス応答とその制御”, 第4回日本光合成学会年会, 名古屋大学(愛知), 2013年5月31日-6月1日
4. 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・資源研), “ミトコンドリアのエネルギー状態に依存した mt-MDH の活性調節”, 第4回日本光合成学会年会, 名古屋大学(愛知), 2013年5月31日-6月1日
5. 野亦次郎, 前田真希, 井上和仁, 久堀徹(東工大・資源研、神奈川大・理・生物), “窒素固定性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 におけるチオレドキシン標的タンパク質の網羅的探索”, 第4回日本光合成学会年会, 名古屋大学(愛知), 2013年5月31日-6月1日
6. 原怜, 久堀徹(東工大・資源研), “光開裂型のチオール修飾試薬 DNA-PC マレイミドの開発”, 第86回日本生化学会大会, パシフィコ横浜(神奈川), 2013年9月13日
7. 吉田啓亮, 松岡裕太, 紺野宏記, 久堀徹(東工大・資源研、金沢大), “葉緑体チオール酵素の *in vivo* レドックス応答とその制御”, 日本植物学会第77回大会, 北海道大学(北海道), 2013年9月13日-15日
8. 杉浦一徳, 永井健治, 一瀬宏, 久堀徹(東工大・資源研, 阪大・産研, 東工大・院・生命理工), “酸化還元応答型新規蛍光タンパク質の開発”, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピア(兵庫), 2013年12月4日
9. 砂村栄一郎, 亀井敬, 紺野宏記, 玉置信之, 久堀徹(東工大・資源研, 北大・電子研), “光応答性 ATP アナログによる F₁-ATPase の活性と回転の制御”, 日本生体エネルギー研究会第39回討論会, 静岡, 2013年12月18日-20日
10. 野亦次郎, 前田真希, 井須敦子, 井上和仁, 久堀徹(東工大・資源研, 神奈川大・理・生物), “*Anabaena* sp. strain PCC 7120 における NifU タンパク質による FeS クラスター形成は Trx に依存する”, 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学(富山), 2014年3月18日-20日
11. 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・資源研), “ミトコンドリア TCA サイクル酵素のレドックスとアデニレート状態に応じた活性調節”, 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学(富山), 2014年3月18日-20日
12. 松岡裕太, 吉田啓亮, 紺野宏記, 久堀徹(東工大・資源研、金沢大), “葉緑体チオール酵素の *in vivo* レドックス状態に影響を与える因子の探索”, 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学(富山), 2014年3月18日-20日
13. 杉浦一徳, 永井健治, 中野雅裕, 一瀬宏, 久堀徹(東工大・資源研, 阪大・産研, 東工大・院・生命理工), “酸化還元応答型新規蛍光タンパク質 Oba-Q”, 公益社団法人日本植物学会第78回大会, 明治大学生田キャンパス(神奈川), 2014年9月12-14日
14. 近藤(小山内)久益子, 砂村栄一郎, 久堀徹(東工大・資源研), “ γ サブユニットへのニック挿入によるシアノバクテリア F₁-ATPase の改変”, 日本生体エネルギー研究会第40回討論会, 愛媛大学(愛媛), 2014年12月12日
15. 肥後明佳, 井須敦子, 深谷佑紀, 久堀徹(東工大・資源研), “シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC7120 における遺伝子発現制御系の開発”, 第9回日本ゲノム微生物学会年会, 神戸大学(兵庫), 2015年3月6日
16. 見原翔子, 吉田啓亮, 肥後明佳, 久堀徹(東工大・資源研), “*Anabaena* sp. PCC7120

- における NTRC の標的タンパク質の探索”, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京農業大学(東京), 2015 年 3 月 17 日
17. 野亦次郎, 前田真希, 井須敦子, 井上和仁, 久堀徹(東工大・資源研, 神奈川大), “*Anabaena* sp. PCC7120 の鉄硫黄クラスター生合成蛋白質は Trx と相互作用する”, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京農業大学(東京), 2015 年 3 月 17 日
 18. 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・資源研), “FTR/Trx 経路と NTRC 経路は協調的に葉緑体機能のレドックス制御および植物の生育を支えている”, 第 6 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 岡山国際交流センター(岡山), 2015 年 5 月 22 日(優秀ポスター賞)
 19. 見原翔子, 吉田啓亮, 肥後明佳, 久堀徹(東工大・資源研), “*Anabaena* sp. PCC7120 における NADPH-Thioredoxin Reductase C の機能解析”, 岡山国際交流センター(岡山), 2015 年 5 月 22 日
 20. 肥後明佳, 深谷佑紀, 井須敦子, 久堀徹(東工大・資源研), “機能性 RNA を利用したラン藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 の遺伝子発現制御”, 藍藻の分子生物学 2015, かずさアカデミアホール(千葉), 2015 年 11 月 16-17 日
 21. 見原翔子, 吉田啓亮, 肥後明佳, 久堀徹(東工大・資源研), “*Anabaena* sp. PCC 7120 のレドックス制御因子 NADPH-Thioredoxin Reductase C の機能解析”, 藍藻の分子生物学 2015, かずさアカデミアホール(千葉), 2015 年 11 月 16-17 日
 22. 片山瑳紀, 得平茂樹(首都大東京), “ヘテロシストパターン形成を制御するセリン・スレオニンキナーゼ PknH の機能解析”, 藍藻の分子生物学 2015, かずさアカデミアホール(千葉), 2015 年 11 月 16-17 日
 23. 小池洋輔, 栗尾洋平, 兼崎友, 吉川博文, 得平茂樹(首都大東京, 東京農大), “シアノバクテリアにおける分化細胞の機能発現を制御する転写因子 DevH”, 藍藻の分子生物学 2015, かずさアカデミアホール(千葉), 2015 年 11 月 16-17 日
 24. 増川一(大阪市立大), “ヘテロシスト形成の頻度増加による水素生産性の向上”, 藍藻の分子生物学 2015, かずさアカデミアホール(千葉), 2015 年 11 月 16-17 日
 25. 肥後明佳, 深谷佑紀, 井須敦子, 久堀徹(東工大・資源研), “多細胞性ラン藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 の時間・空間レベルでの遺伝子発現制御系の構築”, 第 10 回ゲノム微生物学会, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京), 2016 年 3 月 4 日
 26. 野亦次郎, 井須敦子, 久堀徹(東工大・資源研), “*Anabaena* sp. strain PCC 7120 の鉄硫黄クラスター運搬蛋白質 Nfu は Trx と相互作用する”, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス(岩手), 2016 年 3 月 20 日
 27. 若尾瞳, 杉浦一徳, 肥後明佳, 宮城敦子, 川合真紀, 久堀徹(東工大・資源研, 埼玉大・院・理工), “糸状生シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 における TrxA の生理学・生化学的解析”, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス(岩手), 2016 年 3 月 20 日
 28. 杉浦一徳, 肥後明佳, 久堀徹(東工大・資源研), “酸化還元応答蛍光タンパク質を利用した光合成生物の細胞内酸化還元状態変化の観察”, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス(岩手), 2016 年 3 月 20 日
 29. 肥後明佳, 井須敦子, 深谷佑紀, 久堀徹(東工大・資源研), “Photosynthetic production of ammonium by genetically engineered nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120”, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス(岩手), 2016 年 3 月 20 日
 30. 増川一(大阪市立大), “ヘテロシスト高頻度化による光生物的水素の増産”, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス(岩手), 2016 年 3 月 20 日
 31. 得平茂樹, 木村聡, 佐藤未歩, 大森正之(首都大東京, 埼玉大・院・理工), “シアノバクテリアにおける乾燥耐性獲得機構”, 第 7 回日本光合成学会年会, 東京理科大(東京), 2016 年 5 月 27-28 日
 32. 稲垣宏輔, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “シアノバクテリア由来 F₁-ATPase 阻害におけるεサブユニット N 末端側βサンドイッチ構造の役割”, 第 7 回日本光合成学会年会,

東京理科大 (東京), 2016 年 5 月 27-28 日

33. 得平茂樹, 新森友香(首都大東京), “シアノバクテリアにおける窒素飢餓環境への適応機構”, 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄), 2016 年 9 月 16 日
34. 吉田啓亮, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “葉緑体の機能調節および植物の生育を協調的に支える2つの還元力カスケード”, 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄), 2016 年 9 月 16 日
35. 近藤(小山内)久益子, 砂村栄一郎, 円由香, 井須敦子, 深谷佑紀, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の F₁-ATPase の γ サブユニットによる活性制御機構の解析”, 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄), 2016 年 9 月 16 日
36. 稲辺宏輔, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “シアノバクテリア由来 ATP 合成酵素の γ ・ ϵ サブユニットの相互作用と活性制御”, 第 89 回日本生化学会大会, 東北大学(宮城), 2016 年 9 月 25-27 日
37. 立中佑希, 大内雄也, 原怜, 久堀徹, 佐々木一美, 石山宗孝(同仁化学, 東工大・化学生命科学研), “新規タンパク質チオール解析用試薬 PEG-PCMal の開発”, 第 89 回日本生化学会大会, 東北大学(宮城), 2016 年 9 月 25-27 日
38. 杉浦一徳, 肥後明佳, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “新規酸化還元応答蛍光タンパク質の作成”, 第 54 回日本生物物理学会大会, つくば国際会議場(茨城), 2016 年 11 月 25-27 日
39. 小池玲示(首都大), 得平茂樹(首都大)「ヘテロシストを形成しないシアノバクテリア *Arthrospira platensis* NIES-39 における hetR 遺伝子の機能解析」第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 慶応大学, 神奈川, 2017 年 3 月 2-4 日
40. 野亦次郎, 井須敦子, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), シアノバクテリアの鉄硫黄クラスター運搬蛋白質 Nfu は Trx と相互作用する, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 慶応大学, 神奈川, 2017 年 3 月 2-4 日
41. 横地佑一, 野亦次郎, 久堀徹(東工大・化学生命科学研), “嫌気実験系を用いた緑葉内のチオレドキシン標的タンパク質の探索”, 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学, 鹿児島, 2017 年 3 月 16-18 日
42. 見原翔子, 若尾瞳, 杉浦一徳, 肥後明佳, 吉田啓亮, 若林憲一, 久堀徹(東工大・化学生命研), “窒素固定型シアノバクテリアの G6PDH 活性はアクチベータータンパク質である OpcA のレドックス状態によって制御される”, 日本光合成学会第 8 回年会およびシンポジウム, 龍谷大学, 滋賀, 2017 年 5 月 27-28 日
43. 野亦次郎, 久堀徹(東工大・化学生命研), “酸素濃度を可視化する蛍光タンパク質プロベールの開発”, 日本光合成学会第 8 回年会およびシンポジウム, 龍谷大学, 滋賀, 2017 年 5 月 27-28 日

■ポスター発表(国際)

1. Hisabori T(東工大・資源研), “The regulation machinery of the chloroplast ATP synthase”, Gordon Research Conference “Bioenergetics: Molecular Mechanisms and Fundamental Principles to Cellular Energetics in Health and Disease”, Andover, NH, USA, 2013 年 6 月 23 日-28 日
2. Nomata J, Isu A, Hisabori T(東工大・資源研), “Redox regulation of Iron-Sulfur clusters assembly on NifU scaffold protein from *Anabaena* sp.strain PCC 7120”, 18th International Congress on Nitrogen Fixation, フェニックス シーガイアリゾート(宮崎), 2013 年 10 月 14 日-10 月 18 日
3. Hara S, Nojima T, Yoshida M, Hisabori T(東工大・資源研), “Development of novel thiol modifier : DNA-maleimide”, 5th Gratama Workshop, Tokyo Tech Front, 2013 年 5 月 30 日
4. Hara S, Hisabori T(東工大・資源研), “Development of novel thiol modifier : DNA-maleimide”, Technologies for Medical Diagnostic and Therapy Symposium 2nd Committee Meeting for G3, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 2013 年 10 月 22 日

5. Hara S, Hisabori T(東工大・資源研), “DNA-based maleimide compounds for titration of reactive cysteinyl thiols in the redox-related protein”, RIES-Hokudai International Symposium, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo, 2013 年 12 月 11 日
6. Hara S, Hisabori T(東工大・資源研), “DNA-Based Maleimide Compounds for Titration of Reactive Cysteinyl Thiols in the Redox-Related Protein”, The 17th SANKEN International Symposium, Osaka University, 2014 年 1 月 21 日
7. Ehira S, Kimura S, Fan X Y, Miyazaki S, Ohmori M(首都大東京, 埼玉大), “Regulation of compatible solute synthesis in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120”, 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Eberhard-Karls-Universität, Germany, 2015 年 8 月 2-6 日
8. Ohbayashi R, Watanabe S, Ehira S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H(首都大東京, 東京農大), “Variety of dependency on DnaA protein for DNA replication among cyanobacterial lineages”, 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Eberhard-Karls-Universität, Germany, 2015 年 8 月 2-6 日
9. Sugiura K, Hisabori T(東工大・資源研), “Development of new redox sensitive fluorescence proteins”, CRL Forum International 2015, 東工大田町キャンパス(東京), 2015 年 3 月 4 日
10. Mihara S, Yoshida K, Higo A, Hisabori T(東工大・資源研), “Exploration of Target Proteins of NADPH-Thioredoxin Reductase C in *Anabaena* sp. PCC 7120”, CRL Forum International 2015, 東工大田町キャンパス(東京), 2015 年 3 月 4 日
11. Nomata J, Maeda M, Isu A, Inoue K, Hisabori T(東工大・資源研, 神奈川大), “Possible interaction of Trx with scaffold proteins in Iron-Sulfur cluster assembly from *Anabaena* sp. strain PCC 7120”, CRL Forum International 2015, 東工大田町キャンパス(東京), 2015 年 3 月 4 日
12. Kadowaki T, Nishiyama Y, Hisabori T, Hihara Y(埼玉大, 東工大・資源研), “Identification of OmpR-Family Response Regulators Interacting with Thioredoxin in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803”, CRL Forum International 2015, 東工大田町キャンパス(東京), 2015 年 3 月 4 日
13. Fujii G, Imamura S, Tarohra K, Yoshida K, Hisabori T, Hanaoka M, Tanaka K(東工大・資源研), “Redox status regulates chloroplast transcription in the red algae *Cyanidioschyzon merolae*”, CRL Forum International 2015, 東工大田町キャンパス(東京), 2015 年 3 月 4 日
14. Sugiura K(東工大・化学生命科学研), “Real-time monitoring of intracellular redox changes in the photosynthetic organisms using redox sensor proteins”, Satellite Meeting on Photosynthesis, Kyoto University Seminar House, Kyoto, 2016 年 7 月 1-2 日
15. Ehira S, Kimura S, Fan X Y, Miyazaki S, Ohmori M(首都大東京, 埼玉大), “Regulation of compatible solute synthesis in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120”, 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Tübingen, Germany, August 2015
16. Nomata J, Isu A, Hisabori T(東工大・化学生命科学研), “Possible involvement of Trx in the iron-sulfur cluster delivery process assisted by Nfu in *Anabaena* sp. strain PCC 7120”, 4th Asian Conference Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, PARKROYAL Penang Resort, Penang, Malaysia, 2016 年 10 月 16-19 日

(4)知財出願

①国内出願 (6件)

1. 発明の名称:細胞内の酸化還元状態をモニターするための蛍光タンパク質、DNA、ベクター、形質転換体、及び方法
 発明者:久堀徹、杉浦一徳、永井健治
 出願人:国立大学法人東京工業大学
 出願日:2013/9/30
 出願番号:特願 2013-205598

2. 発明の名称:タンパク質のチオール基の酸化還元状態を検出する方法、並びにそれに用いられる試薬及びキット
 発明者:久堀徹、原怜、野島達也
 出願人:国立大学法人東京工業大学、株式会社同仁化学研究所
 出願日:2013/8/9
 出願番号:2013-166448
3. 発明の名称:細胞内の酸化還元状態をモニターするための蛍光タンパク質、DNA、ベクター、形質転換体、及び方法
 発明者:久堀徹、杉浦一徳、永井健治
 出願人:国立大学法人東京工業大学
 出願日:2014/9/29
 出願番号:特願 2014-199401
4. 発明の名称:アンモニア含有液からアンモニアを分離回収するための装置
 発明者:久堀徹、原亨和
 出願人:国立大学法人東京工業大学
 出願日:2016/1/22
 出願番号:2016-010622
5. 発明の名称:細胞内の酸化還元状態をモニターするための蛍光タンパク質、DNA、ベクター、形質転換体、及び方法、並びに抗ガン剤スクリーニング方法
 発明者:久堀徹、杉浦一徳
 出願人:国立大学法人東京工業大学
 出願日:2016/8/9
 出願番号:2016-156963
6. 発明の名称:細胞内の酸素濃度の変化をモニターするための融合タンパク質
 発明者:久堀徹、野亦次郎
 出願人:国立大学法人東京工業大学
 出願日:2017/3/3
 出願番号:特願 2017-040778

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 文部科学大臣表彰科学技術賞開発部門, 原 亨和, 2012年4月17日
2. 日本生体エネルギー研究会第39回討論会優秀発表賞, 砂村栄一郎, 2013年12月20日
3. 平成25年度日本化学会学術賞, 原 亨和, 2014年3月28日
4. 日本光合成学会大会優秀ポスター賞, 吉田啓亮, 2015年5月23日
5. 第4回ネイチャー・インダストリー・アワード特別賞(主催 大阪科学技術センター、共催 日刊工業新聞社(モノづくり日本会議)), 増川一, 2015年12月4日
6. 第二回末松賞(東京工業大学), 吉田啓亮, 2017年2月14日

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 日刊工業新聞,「水中反応で再利用も～チタン酸化物のルイス酸触媒, 東工大が開発～」, 2014年4月1日
2. 東工大プレスリリース,「生体内のタンパク質の酸化還元状態を可視化 —DNAを着脱自在にした修飾化合物を利用して総合的分析を実現—」, 2014年12月4日
3. 日刊工業新聞,「ラン藻で窒素化合物・アンモニア生産技術構築」, 2015年12月28日
4. 東工大プレスリリース,「藻類を使ったアンモニア生産の可能性—ラン藻の遺伝子発現を制御して放出させることに成功」, 2016年1月5日
5. 化学工業日報,「藍藻から窒素化合物生産」, 2016/1/7
6. 日刊工業新聞, 第4回ネイチャー・インダストリー・アワード特別賞受賞内容のラン藻を利

- 用した水素生産の高効率化と持続性の向上に関する研究成果について報道、2016 年 1 月 22 日
7. Chemistry & Industry, Society of Chemical Industry's magazine, NY, USA、Ammonia from bacteria, Feb. 12, 2016
 8. 東工大プレスリリース、「葉緑体機能の制御に重要な新たな還元力伝達経路—二つの経路の協調が光合成や生育に必須—」、2016 年 6 月 23 日
 9. Biovoice news, Linking light to life: new pathways that help plants adapt to changing Environments, June 28, 2016
 10. 東工大プレスリリース、「ラン藻による有用物質の大規模生産に道を拓く—高価な誘導剤使わずに遺伝子発現を誘導するネットワークを構築—」、2016 年 9 月 26 日

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

本プロジェクトの研究の一部として開発したレドックス解析技術から生まれた新規修飾試薬 DNA マレイミド、および、改良型の光開裂型修飾試薬 DNA-PC マレイミドについては、株式会社同仁科学研究所を共同出願人として東京工業大学で特許出願 2013-166448 を行い、同社に実施権許諾を行い商品化した。さらに、関連商品を同社において開発・販売している。

②社会還元的な展開活動

本プロジェクトで得られた成果について論文発表したものについては、下記の各研究室のホームページに情報をアップロードし、一般に情報提供を行っている。

東京工業大学 久堀徹研究室：

http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori_HomePage/index.html

東京工業大学 原亨和研究室：

<http://www.msl.titech.ac.jp/~hara/>

首都大学東京 得平茂樹研究室：

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=molgen>

大阪市立大学 増川一研究室：

http://rdbsv02.osaka-cu.ac.jp/profile/ja.-UcQKbV.FkFWewU.n5.oMQ==.html#research_grant

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成24年 11月16日	蛍光寿命イメージングワークショップ	東京工業大学資源研会議室	30 人	学術交流目的で、奈良先端科学技術大学院大学・稲田のり子准教授を招聘し、招待講演を行った。
平成25年 2月1日	次世代シーケンスワークショップ	東京工業大学資源研会議室	30 人	学術交流目的で基礎生物学研究所・重信秀治氏を招聘し、招待講演を行った。
平成25年 3月21日	第54回日本植物生理学会年会シンポジウム「レドックス恒常性とレドックス制御」	岡山大学	200 人	学術交流目的でシンポジウムを主催し、多様な視点からレドックス制御に関する意見交換を行った。
平成 25 年 5月28日	光合成ワークショップ	東京工業大学資源	30 人	学術交流目的で、京都大学・西村芳樹博士を招聘し、招待講演を行

		研会議室		った
平成 25 年 10 月 30 日	光合成ワークショップ	東京工業 大学資源 研会議室	30 人	学術交流目的で、コネチカット大 学 S.M. King 博士を招聘し、招待 講演を行った
平成 26 年 6 月 13 日	光合成ワークショップ	東京工業 大学資源 研会議室	25 人	学術交流および情報収集目的 で、名古屋大学・藤田祐一准教授 を招聘し、招待講演を行った。
平成 26 年 6 月 30 日	光合成ワークショップ	東京工業 大学資源 研会議室	25 人	学術交流および情報収集目的 で、法政大学・昆隆英教授を招聘 し、招待講演を行った。
平成 26 年 7 月 15 日	光合成ワークショップ	東京工業 大学資源 研会議室	25 人	学術交流および情報収集目的 で、チェコ科学アカデミー Ondrej Prasil 教授を招聘し、招待講演 を行った。
平成 26 年 11 月 14 日	HOT セミナー	東京工業 大学資源 研会議室	60 人	東工大・太田啓之研究室、田中寛 研究室との研究交流会
平成 27 年 7 月 23 日	光合成ワークショップ	東京工業 大学資源 研会議室	23 人	学術交流および情報収集目的 で、大阪大学・岩崎憲治准教授を 招聘し、招待講演を行った。
平成 28 年 1 月 14 日	光合成ワークショップ	東京工業 大学資源 研会議室	25 人	学術交流および情報収集目的 で、大阪大学・石島秋彦教授を招 聘し、招待講演を行った。
平成 28 年 1 月 27 日	光合成ワークショップ	東京工業 大学資源 研会議室	20 人	学術交流および情報収集目的 で、京都府立大学・佐藤雅彦准教 授を招聘し、招待講演を行った。
平成 28 年 5 月 26 日	光合成ワークショップ	東工大化 学生命研 会議室	20 人	村上聡教授を講師として新規に解 明した結晶構造の議論を行った。
平成 28 年 11 月 11 日 (予定)	HOT セミナー	東工大化 学生命研 会議室	50 人	東工大・太田啓之研究室、増田真 二研究室、田中寛研究室との研 究交流会
平成 29 年 1 月 28 日	東工大光合成科学 シンポジウム	東工大 大学会館ホ ール	120 人	CREST 太田プロジェクト、宮城島プ ロジェクト(田中、今村)との合同で の光合成を利用した物質生産に 関する合同シンポジウムを開催。

§ 6 最後に

研究の目標等から見た達成度と得られた成果の意義等の自己評価

私は、大学院進学以来、35 年以上にわたりいわゆる基礎研究一筋に研究活動を行ってきた。現在在職する東京工業大学に異動後は、2001 年から 5 年間、資源化学研究所の吉田賢右教授が総括を務めた JST・ERATO・吉田 ATP システムプロジェクトにグループリーダー、技術参事として、後継事業の ICORP・ATP 合成制御プロジェクトには研究員として参画した。また、野地博行東大教授が代表を務めた特定領域研究の計画班研究代表、鹿内利治京都大教授の学術創成研究費の研究分担者としても研究を行った。これらの大型プロジェクトを通じて、光合成生物の ATP 合成酵素の制御の理解、および、葉緑体機能制御の中核で

あるレドックス制御システムの生化学的な解析を目的として研究を行った。

このような基礎研究のバックグラウンドを持つ私は、これまで培った基礎研究の知見をシアノバクテリアの代謝改変による物質生産の技術開発に直接・間接に役立てることを念頭に置いて、実用化をも見据えた CREST プロジェクトである「藻類バイオエネルギー」にプロジェクト提案を行った。今から 7 年前、地球温暖化に科学の力で歯止め策を提供することを目指して ALCA 事業が始まり、この頃から私は基礎研究を応用に展開できる道を探り始めた。そして、本 CREST プロジェクトがスタートしたことで、シアノバクテリアの代謝改変とエネルギー同化機能を新技術に生かす道を本格的に思考するに到ったのである。

(1) シアノバクテリアの代謝改変とアンモニア生産

本研究プロジェクトにおいて提案したシアノバクテリアの窒素固定能力を活用したアンモニア生産と最新の触媒技術を用いた培養液からのアンモニアの回収技術の開発では、現在、石油や天然ガスに依存して生産される水素と大気中の窒素を原料として、ハーバー・ボッシュ法によって生産されている工業用アンモニアの代替生産法を提供することを目指した。おりしも、自ら開発した酸化触媒を生物の物質生産と組み合わせることを構想していた原亨和教授を研究分担者に迎え、二人でシアノバクテリアを物質生産に活用することについて議論を重ねた。そして、光エネルギーで独立栄養的に生育できるシアノバクテリアの代謝を改変してアンモニアを生産させ、光エネルギーをアンモニアに変換する効率（エネルギー変換効率）5%を達成すれば、日本の休耕田の 1/1000 の面積を生産用のプールに利用することで、少なくとも国内の必要量 120 万トン/年を供給可能である、という試算を行った。

窒素固定型シアノバクテリアでは、まずニトロゲナーゼが大気中の窒素をアンモニアに変換し、このアンモニアをグルタミン合成酵素が基質とすることで、アミノ酸合成経路が働く。本プロジェクトの企画以前から、グルタミン合成酵素の阻害剤であるメチオニンスルフォキシミン（MSX）を窒素固定型のシアノバクテリア（*Anabaena*）の培養液に添加すると、培地にアンモニアが放出されることが知られており、本プロジェクト応募以前に私たちもこれを実験的に確認していた。このことから、本プロジェクトでは、グルタミン合成酵素の活性中心近傍に変異を導入して酵素活性を低下させることによって、アンモニア生産株を作出することを当初目標として研究を開始した。一方、原亨和教授のグループは、アンモニアを特異的に吸着することの出来る酸触媒を開発・選抜することに注力した。

ところが、私のグループが手がけたグルタミン合成酵素への変異導入の研究は開始当初から非常に困難なものであった。この酵素は、窒素固定型シアノバクテリアのニトロゲナーゼが窒素をアンモニアとして固定した後に働く、いわば窒素代謝の開始点である。グルタミン合成酵素に変異導入するためのプラスミドを作成し、シアノバクテリアに形質転換を行って目的とした変異をもった酵素を保持した株を得ることを試みたが、このように代謝的に不利な状態を甘受する株はまったく得られなかった。このため、アンモニア生産に関しては、本プロジェクトの研究開始の早い時期にグルタミン合成酵素の発現量の調節に研究の軸足を移した。この研究は、*Anabaena* の遺伝子操作に精通した肥後明佳研究員が主に担当した。そして、アンモニア生産株を得ることを目的として、まず遺伝子発現調節システムの構築を行った。その結果、テオフィリンアプタマーを用いた遺伝子発現制御に成功し、これによってグルタミン合成酵素遺伝子をアンチセンス RNA によって抑制することで、MSX 誘導によるアンモニア排出の効率を大きく高めることが出来た。

さらに、1980 年代に MSX 耐性の窒素固定型シアノバクテリア変異株でアンモニア漏出が報告されていたことを参考にして、この方法を模倣して MSX 耐性株の選抜を試み自発的にアンモニアを排出する株を取得した。得られた複数の耐性株を次世代シーケンサで解析したところ、いずれもグルタミン合成酵素のアンモニア結合ポケットと予想される部位の同一のアミノ酸に同じアミノ酸置換の変異が入っていた。MSX はアンモニアと拮抗するので、このアミノ酸はアンモニア結合にもっとも重要なアミノ酸残基のひとつであると考え

られる。結晶構造解析では、MSX はグルタミン結合部位に結合すると考えられているので、これがどのようにアンモニア結合に関与するアミノ酸残基の変異に結びつくのかは、この酵素の触媒分子機構を研究する生化学的なテーマとしても非常に興味深い。

一連の研究の進展に伴い、アンモニア生産の視点ではグルタミン合成酵素の発現制御がもっとも有効であると考えられたので、以降は窒素固定型シアノバクテリアである *Anabaena* sp. PCC7120 株についてこれまでほとんど報告がなかった遺伝子発現制御系の構築に注力した。得られた自発的アンモニア生産株は、単独ではエネルギー変換効率の観点からは、プロジェクトの当初目標を達成していなかった。そこで、*Anabaena* における遺伝子発現制御によってグルタミン合成酵素の発現量の抑制を組み合わせることにした。その結果、自発的アンモニア生産株のアンモニア生産能力を数倍に高めることができた。その最初の例は、テオフィリンアプタマーの適用であったが、アンモニア生産向上の観点からはまだまだ不十分であった。このため、細菌の遺伝子発現誘導で良く用いられるテトラサイクリンを用いた発現制御系を導入した。これによって誘導剤無添加に比べて 4 倍程度まで細胞からのアンモニアの排出量を増強できることがわかった。ここまでの研究成果は、昨年 12 月に *Plant and Cell Physiology* 誌に発表した。しかし、テトラサイクリンは高価であり、かつ光感受性であるため、*Anabaena* のような光合成微生物の遺伝子発現制御には必ずしも有効な手段とは言えない。本プロジェクト実施時点では、*Anabaena* の遺伝子発現制御は海外を含めてほとんど行われていなかったため、本プロジェクトでは *Anabaena* の遺伝子発現制御技術そのものを開発する必要がある。肥後研究員が中心となってこの研究に取り組み、ポジティブフィードバックループを構築することで、安価な誘導剤で高効率に遺伝子発現誘導、さらには、窒素飢餓条件で特異的に遺伝子発現を誘導できるシステムが完成した。具体的にはグルタミン合成酵素を発現抑制するためのアンチセンス RNA の発現の誘導を行うシステムが構築出来たわけである。

この成果は、本年 9 月に *ACS Synthetic Biology* 誌に掲載された。発表した論文では、システムによって誘導される遺伝子として GFP 遺伝子を用いているが、上述の通りこれをグルタミン合成酵素遺伝子を標的とするアンチセンス RNA に置き換えることによって、強力な代謝制御によるアンモニア生産が誘導出来るものと考えられる。この点については、本報告書記載時点では、研究を継続中である。今回実現した遺伝子発現誘導システムのもう一つの強みは、誘導剤の添加を行わなくても窒素飢餓条件に *Anabaena* を置いただけで目的遺伝子が発現誘導されるように調整した点である。これによって、本プロジェクトが目指した、目的とする藻類を通常の光合成条件で培養、増殖させ、物質生産工場とする（窒素固定とアンモニア生産の場合には、嫌気条件に移す）条件で必要な遺伝子を発現誘導するというシステムが完成出来た点は、特筆に値すると自己評価している。

このようにして構築したシアノバクテリアのアンモニア生産をさらに向上するためには、代謝、および、アンモニア生産工場となるヘテロシストの増産が必要である。このような視点からの研究を加速するため、「さきがけ」研究を終了した得平茂樹首都大学東京准教授と増川一大阪市立大学特任准教授を平成 27 年度から新たに研究チームに迎えた。途中参加した得平、増川の 2 チームの研究期間が短いため、本プロジェクトに直結する成果はまだ充分には得られていないが、両研究室において私たちの研究室で確立したアンモニア自立生産株の代謝改変、および、ヘテロシスト増産の研究を進めている。

本プロジェクトのもう一つの柱である酸化チタンを用いた培養液からのアンモニア回収については、原チームにおいて極めて順調に研究が進んだ。このシステムは、酸化チタン触媒に触れさせるだけで溶液中のアンモニアをほとんど吸着できること、二酸化炭素を吹き込むだけで容易に遊離させることが出来ることで、高圧や遠心などエネルギー消費をほとんど必要とせず、高純度のアンモニアを溶液から回収できる。また、原チームでは、安価に高性能の酸化チタン触媒を作成する技術の開発も行っている。

従って、私のチームのシアノバクテリアによるアンモニア生産と原チームの酸化チタン

触媒によるアンモニア回収技術を組み合わせれば、光合成によるアンモニア生産は実現するはずである。この 2 年間は、この最終的な目標に向けてシステム構築に挑戦している。しかし、予想外だったのは、糸状性のシアノバクテリアである *Anabaena* の培養液を機械的に動かすと、*Anabaena* が簡単に凝集してしまうという極めてプリミティブな問題であった。培養液中のアンモニアを酸化チタンに吸着するためには、何らかの方法で培養液を循環する必要がある。しかし、*Anabaena* の培養液そのものをチュービングポンプなどで動かした場合には、菌体がすぐに凝集してしまう。一方、酸化チタン触媒を含む溶液を *Anabaena* の培養槽に循環する方法では、アンモニアを酸化チタン層に移動させる適切な方法がまだ確定していない。この方法については、本報告書記載時点でも適切な手法を鋭意検討中である。

(2) ATP 合成酵素の改変

これらの研究と平行して、本プロジェクトでは、研究開始以来、高活性の変異型 ATP 合成酵素を確立することを目指して、ATP 合成酵素の制御機構を解析し、活性を高める研究を続けてきた。光合成生物の ATP 合成酵素は、8 種類 26 個のサブユニットで構成される非常に複雑な複合体タンパク質である。このような複雑な酵素の活性制御は、回転軸と呼ばれる γ サブユニットと、内在性の阻害サブユニットとして知られる ϵ サブユニットが主に担っている。また、ATP の合成と加水分解を行う触媒部位を保持している β サブユニットでも、触媒部位に ADP が強固に結合することによって起こる ADP 阻害と呼ばれる活性制御機構が知られている。光合成生物の場合には、 γ サブユニットが他の生物種では見られない余分な配列を分子内に持っており、緑色植物の場合にはさらにこの挿入部分にジスルフィド結合を形成することが可能な二つの Cys 残基を持っている。本プロジェクトでは、これら一連の制御に関わる酵素上の部位を遺伝子操作によって改変し、この酵素の活性を人為的に制御することを試みた。

その結果、酵素の回転軸にあたる中心軸部分の構造変化誘導による活性制御が可能な場所を複数新たに見出すことが出来た。しかし、どこをどのように変異させれば酵素活性がどのように変わるのか、構造情報なしには適切な分子デザインは出来ない。そこで、 γ と ϵ の部分複合体について構造解析を進め、これまで知られていなかった光合成生物の ATP 合成酵素の γ サブユニットの制御領域の構造解析に成功した。その後、生化学実験によってこの構造の妥当性を確定することも出来た。構造情報を入手できたことで、今後は新たな制御機構の導入に向けて分子デザインを行う予定である。

(3) レドックス制御システムの改変

光合成生物は水の分解によって得られる還元力を二酸化炭素の還元に用いるほかに、光合成機能を担うさまざまな酵素の活性調節にも利用している。この還元力を用いる制御システムをレドックス制御システムと呼ぶが、私たちが研究対象とする *Anabaena* の場合には、窒素同化酵素であるニトロゲナーゼがその反応に還元力を多量に使うため、還元力の供給とその制御が非常に重要である。そこで、窒素同化の向上のためにはまずレドックス制御システムの理解が不可欠と考え、シアノバクテリア、および、光合成のモデル生物であるシロイヌナズナを材料としてレドックス制御の生化学研究を進めた。一連の研究により、レドックス制御システムの中核として機能するチオールレドキシンの多様性を解明、新たな伝達経路の発見などを達成し、植物生理学のレドックス制御の研究分野では国際的にも十分な評価を得た。その結果、2015 年にはイタリア・ヴェローナで開催された POG conference に招待講演者として招聘された。日本人でこの会議で招待講演を務めたのは、「活性酸素」を命名された浅田浩二先生（故人）以来の名誉とのことであった。

生体内のレドックスを研究するためには、タンパク質や細胞内そのもののレドックス状態を調べるツールが必要である。しかし、この分野の開発研究は遅れていたため、本プロジェクトでは、まずタンパク質のレドックス状態、とくにチオールを解析を行える新規試薬である DNA マレイミドの開発を行った。この研究は、最初の学会発表の段階で株式会社

同仁化学の目にとまり、同社から商品として発売することが出来た。さらに、同社では関連商品の開発も継続して行い、タンパク質チオール研究の試薬シリーズとして販売されるに到っている。

また、本プロジェクトでは、細胞内のレドックス状態の可視化も手がけた。先行研究として、緑色蛍光タンパク質 GFP の発色団近傍に酸化還元応答可能なシステインを 2 個導入した roGFP が開発されていたが、蛍光変化の pH 依存性が大きいことや、異なる複数の部位の評価に使えないなど、改善すべき点があった。そこで、蛍光タンパク質を用いた細胞内可視化の研究で多くの知見を有する大阪大学産業科学研究所永井健治教授の協力を得て、新規蛍光タンパク質の開発に取り組み、蛍光変化、応答する中間酸化還元電位がさまざまな新たな蛍光タンパク質の開発に成功した。これらについては、いずれも特許申請し、新たな細胞内インジケータとしてすでに国内、ならびに、フランス、シンガポールなどと国際的に共同研究を開始している。

生体内のレドックスにもう一つの重要な因子となるのが酸素である。酸素は、電子を受け取ることで活性酸素種に変化し、タンパク質や脂質を攻撃する酸化ストレスの原因となる。水中の酸素飽和濃度は、通常条件では 250 μ M であるが、実際に細胞内の酸素濃度が測られた例はない。嫌気的な条件で機能するニトロゲナーゼの重要性に鑑み、本プロジェクトでは開始直後から細胞内酸素濃度の測定法の開発に取り組んできた。当研究室の野亦次郎助教の長年の努力により、最近になって有望な蛍光タンパク質複合体の開発にこぎ着けた。このタンパク質によりこれまで知られていなかった細胞内の酸素濃度を実測することができれば、他分野にも波及効果を持つ大きな成果となるものと期待している。

今後の研究の展開

本プロジェクトでは糸状性シアノバクテリアとしてさまざまな研究に用いられている *Anabaena* に変異導入を行い、ランダム改変によって細胞外に自発的にアンモニアを放出する株を得ることに成功した。また、これまで遺伝子発現制御技術の乏しかったこのシアノバクテリアにおいて、高効率に遺伝子発現制御を行うことのできるシステムを新規に組み上げることに成功した。しかし、*Anabaena* は、いわば実験室レベルで飼育慣らされたシアノバクテリアである。今後、シアノバクテリアによるアンモニア生産を実用レベルまで向上させるためには、合成生物学的な手法で代謝改変をさらに目的に適合するように進めていくと同時に、海洋性シアノバクテリアなど、多様な環境で生育し窒素固定を行っている種類にも研究を拡張する必要がある。

本年はこのような視点から新規プロジェクトを立案し、若手研究者のキャリアアップも目指して、私の研究グループの肥後明佳研究員（本学特任助教）を代表として平成 28 年度募集の ALCA 事業に応募し、ヒアリングを受けることが出来た。この事業の採択はされなかったが、今年度は、新たに得平首都大学東京准教授との共同研究を発展させ、窒素固定型シアノバクテリアの有用性を活用する新規プロジェクトとして取りまとめ、提案していく予定である。

一方、これまで理解があまり進んでいなかった光合成生物の ATP 合成酵素の制御系の研究については、本プロジェクトで数多くの新しい知見を蓄積することが出来た。また、レドックス制御系についても、基礎研究レベル、および、シアノバクテリアの還元力供給システムの視点から数多くの新規知見を蓄積することが出来た。ATP 合成酵素とレドックス制御系の基礎研究については、本年発足した新学術領域研究「新光合成：光エネルギー変換システムの再最適化」において、私が研究代表を務める研究課題「ATP 合成酵素によるプロトン駆動力制御」に研究テーマを部分的に引き継ぎ、プロジェクト終了後も研究を発展させていく予定である。

本プロジェクト実施期間中に申請した特許は、アンモニア回収という実用的なシステム以外は、いずれも新規の計測・評価技術として重要である。従って、これらについては、共同研究などを通じてさまざまな生物現象に対して研究者レベルで活用出来る体制を構築したい。

研究代表者としてのプロジェクト運営について

本プロジェクトでは、通算 60 名の研究者、支援者、学生が参画した。研究チームの規模としては、CREST「藻類バイオエネルギー」領域の他の研究チームに比べて、極めてコンパクトである。しかし、それでも久堀グループは、毎年学生を含めた 20 名程度の大きな組織で、複数の研究テーマを進行させてきた。

CREST 事業は明確な研究目標を設定しているため、本プロジェクトで雇用している研究員を中心として、

プロジェクトの研究計画に直結する研究を実施することが求められる。このため、本プロジェクトでは毎年度当初にグループリーダー（平成 26 年度までは久堀と原亨和教授、平成 27 年度以降は 4 名）と久堀グループの研究員が一堂に会して、研究テーマの確認と方向性のすり合わせを行ってきた。また、平均して 2 ヶ月に一度は各研究員の研究の進捗状況を研究室全体で情報共有する形で議論を重ねた。

しかし、研究は常に思わぬ方向に発展することがつきものであり、この思わぬ方向の発展が往々にして新たな展開を生み出すことになる。目的指向のプロジェクトにおいても、その枠内で新たな発見が生まれることは、基礎研究、応用研究を問わず新たな成果の種になると考え、私は常に研究員個々人の発想を尊重してきた。研究プロジェクト全体の基本路線が明確であれば、このような方法はむしろ問題解決に新たな切り口から取り組むことが出来る方法であると考えた。

そして、このような自由な発想の研究を支えることが出来たのが、プロジェクトの研究資金であったことは言うまでもない。私の研究室は、これまでの蓄積により生化学研究・分子生物学研究の研究機器は比較的潤沢に用意してあったが、シアノバクテリアの培養、顕微鏡観察、蛍光蛋白質の開発ツールなどが不足していた。プロジェクト資金によってこれらを十分にそろえることが出来た。また、プロジェクトを遂行するにあたって最も重要なのは人のリソースであったが、シアノバクテリアの分子生物学に精通した肥後研究員、ATP 合成酵素に精通した砂村研究員、シアノバクテリアの生理学・生化学に精通した近藤研究員、蛍光蛋白質に精通した杉浦研究員を雇用し、それぞれがその能力を十分に発揮して、特徴的な論文に結実した。彼らの研究を下支えする有能な研究補佐員、技術員を過不足なく安定して雇用できたことも大きな力になった。

プロジェクトの終了期を迎え、研究代表者として本プロジェクトを運営面から総括したい。本章冒頭に記したとおり、これまで基礎研究センターであった私の研究グループの研究に目的指向の研究

プロジェクトを設定したことで、当研究室を志望してくる学生に

はある変化が現れた。すなわち、当研究室を志望する大学院受験者が、一定の割合で CREST 研究に参加することを前提とするようになったことは、本プロジェクトを実施した大きな成果の一つである。その一方で、実際に当研究室で卒業研究の学部学生や修士の学生が実施した研究は、このプロジェクト期間中もほとんどが基礎研究であり、主として研究員や



2012 年プロジェクト開始頃の久堀研究室メンバー



2016 年プロジェクト終了年の久堀研究室メンバー

教員が担当した応用研究への拡張性が高い研究とは一線を画するようになっていた。これは、やはり学生の基礎研究の知識を重視した結果ではあるが、このようないわば役割分担によって、当研究室の学生は基礎研究の知識と実験時靴、研究室内での学習によって応用研究の知識をバランスよく吸収することが出来ていたと感じている。

一方で、最終年度にアンモニア生産のフイージビリティスタディーに到達すると設定した当初目標をいまだ達成できていないのは、研究代表者として非常に残念であるし、真摯に反省すべき点である。本報告書にも記載したとおり、最終的に生産と回収をつなぐ技術開発は、どちらかといえば化学プロセス工学の分野の研究であって、本プロジェクトで雇用していた研究員や研究支援員では対応できない範囲であったことが遅れの原因としては大きかったと感じている。しかし、生産と回収、それぞれの基本技術は確立できたので、今後は産業界の知識と経験を導入することを視野に入れて、本プロジェクトの発展をさらに望みたい。産学交流の手始めとして、平成 29 年 1 月 28 日に、本領域の太田啓之東工大教授のチーム、および、宮城島チームの分担者である田中寛教授、今村莊輔准教授らと交え、さらに藻類関連事業を実施しているデンソーやユーグレナなどの企業グループも巻き込んで、合同シンポジウムを開催し、今後の当該分野の発展について、企業研究者と交えて有意義な討論をすることが出来た。このようなシンポジウムを通して、本プロジェクトで培った研究の種をさらに育てることが出来ることを切に願っている。