

研究報告書

「巨大光捕集器官クロロソームを利活用した生理活性物質・脂質の大量蓄積系の構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 塚谷 祐介

1. 研究のねらい

光合成の初期過程は、太陽光を捕獲してそのエネルギーを伝達するアンテナ部と、伝達された光エネルギーから化学エネルギーへの変換を行う反応中心部に分かれる。微弱な光環境で生育する光合成微生物は、『クロロソーム』と呼ばれる特殊な集光アンテナ器官を持つ。クロロソームは、糖脂質と蛋白質から成る一重膜に覆われた小胞状オルガネラであり、その内腔の疎水的環境には蛋白質が存在せず、多量の色素分子のみが含まれており、物質生産/蓄積の場に資する(図1左)。緑色硫黄細菌のモデル生物である *Chlorobaculum tepidum* では、1つのクロロソームあたり約 200,000 分子以上のバクテリオクロロフィル-c (BChl-c) 色素のロッド状自己会合体と約 20,000 分子のカロテノイドが含まれており、微弱光環境における光捕集と高効率な光エネルギー伝達に適応している。BChl-c 色素は、蛋白質の関与が無くても *in vitro* の有機溶媒中で自己会合体を形成することが知られており、光ナノデバイスとして人工光合成等への応用が検討されている。一方で、BChl と同様に多量に含まれるカロテノイドの応用研究は行われておらず、またクロロソームが生体内でどのようにして形成されるのかについては不明のままである。本研究では、BChl とカロテノイドの生合成経路を解明・改変することで、有用色素をクロロソーム内に蓄積する細菌株を作出することを目指している。また、将来的なクロロソームの応用範囲拡大のために、クロロソームの特性および形成過程(色素や糖脂質がどのように生合成され、どのように相互作用してクロロソームに選択的にアSEMBルしてオルガネラを形成するのか)を解明することを目指している。

2. 研究成果

(1) 概要

クロロソームを構成する要素を大別すると、小胞膜を構成する糖脂質と Csm 蛋白質、および、内腔を埋める BChl とカロテノイドに分けられる。研究テーマ A では、Csm 蛋白質の多重欠損変異株から糖脂質を抽出し、蒸発光散乱検出器を連結した HPLC を用いて糖脂質組成を調べた。その結果、特定の Csm 蛋白質の欠損株では特定の糖脂質が増減するという関係性が見られ、それらの Csm 蛋白質-糖脂質間の相互作用がクロロソームのサイズ・形状を決定するのに重要であると示唆された。研究テーマ B では、クロロソームを構成する BChl の生合成経路を解明することができた。また、近赤外吸収素材として産業的応用が期待される BChl-b の生合成経路を明らかにすることができ、クロロソームにこの色素を蓄積する株の作製を試みている。細胞膜で生合成された色素をクロロソーム内へトランスポートすると推定される蛋白質を見出した。研究テーマ C では、緑色硫黄細菌 *C. tepidum* のカロテノイド合成経路を改変して、 β -カロテンをクロロソーム内に蓄積する株を構築することができた。各テーマ

の詳細は以下に述べる。

(2) 詳細

研究テーマ A 「糖脂質の凝集に関わる Csm 蛋白質」

クロロソーム小胞膜には、光合成細菌の種にもよるが、約 10 種類の蛋白質が介在する(図 1 参照; CsmA/B/C/D/E/F/H/I/J/X)。このうち、CsmA はクロロソームの基底部(ベースプレート)を構成し、内部 BChl-*c* 会合体から反応中心側へのエネルギー移動を担っていることが知られているが、その他の Csm 蛋白質の機能は不明である。10 の Csm 蛋白質は、アミノ酸配列の情報からさらに4つのモチーフ・ファミリーに分けられる。また、細胞膜を構成するリン脂質とは異なり、クロロソーム小胞膜を構成する脂質組成の過半数は糖脂質である。緑色硫黄細菌 *C. tepidum* のクロロソームには大別して 2 種類の糖脂質があり、それらは単糖類のモノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)と二糖類のラムノシルガラクトシルジアシルグリセロール(RGDG)である。本研究テーマでは Csm 蛋白質を一重、二重、あるいは三重に欠損した変異株の糖脂質組成を解析した。CsmA 以外の蛋白質の一重欠損株は(CsmA は欠損致死)、野生株とほとんど同じ糖脂質成分組成を示した。しかし、CsmCDH および CsmIJ 蛋白質モチーフ・ファミリー内の二重・三重欠損株では、それぞれ MGDG および RGDG の相対的な減少が測定された(Tsukatani et al., 2016)。このことは、阻害剤添加によって特定の糖脂質が合成阻害されたときの Csm 蛋白質組成解析からもサポートされた(Mizoguchi et al., 2013)。つまり、CsmCDH はモノガラクト脂質である MGDG と、CsmIJ はジガラクト脂質である RGDG と相互作用することが示唆され、その結果としてこれらの Csm 蛋白質群がクロロソーム形態形成に関わることが示唆された。

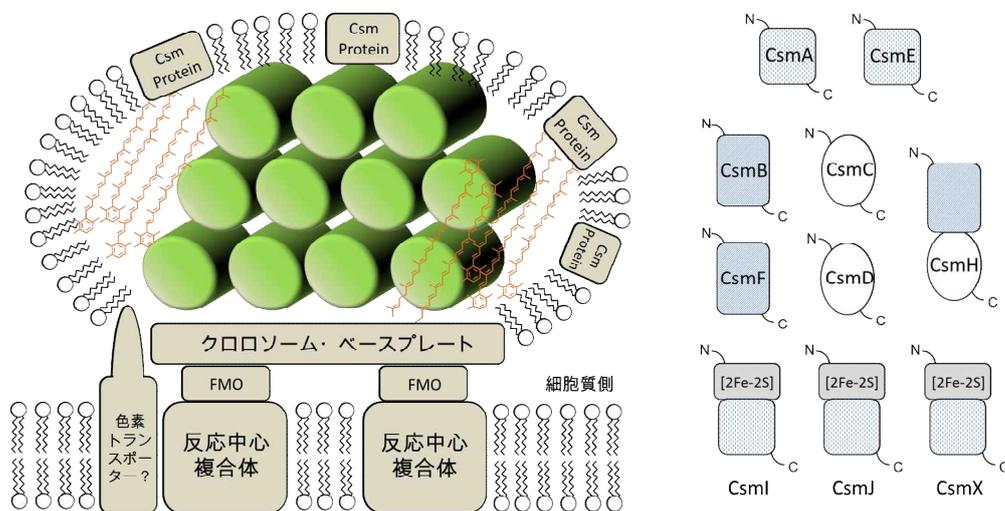


図1(左)クロロソームとその周辺蛋白質複合体の模式図。(右)Csm 蛋白質モチーフ・ファミリーの概略図。

研究テーマ B 「クロロソーム BChl 色素の生合成経路解明と色素輸送蛋白質の探索」

クロロソーム内腔には、細菌の種によるが、BChl-*c*、*d*、あるいは *e* の会合体が詰まっている。さらにベースプレート部には BChl-*a* が結合していると考えられている。これらの色素群は、生合成経路内でどれもクロロフィリドという中間体から分岐して合成される(図 2)。本研究テーマでは、BChl-*c/d/e* に共通して作用する C3 位水和酵素として BchFV を同定・機能解析

した(Harada et al., 2015)。酵素欠損変異株のクロロソーム解析から、C3 位のヒドロキシエチル基が、色素の自己会合体を形成する上で重要な側鎖であることが示された。BChl-e の生合成経路で働く C7 位ホルミル化酵素 BciD および C20 位メチル化酵素 BchU を同定した。また色素生合成系を改変して BChl-b を蓄積する株の作製を試みた。BChl-b は天然色素の中で最も長波長側(近赤外光領域)に吸収極大を持つため、タンデム型色素増感太陽電池や光線力学療法などへの産業利用が期待できる。ベースプレート部の BChl-a を BChl-b に変えることで、測定が難しいベースプレートの分光特性を明らかにすることも狙った。しかし、研究開始時点では BChl-b の合成経路が不明であったため、まずはこれを明らかにし、その後紅色細菌モデル生物を用いて、酵素の欠損置換によって BChl-a 生産性が BChl-b 生産性に变化することを確かめた(Tsukatani et al., 2015)。現在、緑色硫黄細菌での欠損置換変異株の作製を行っているところである。

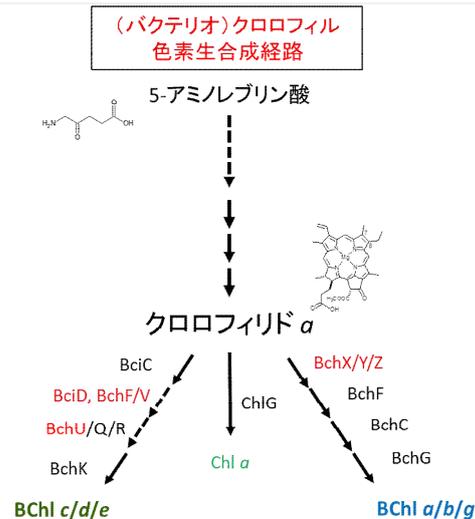


図2. 色素生合成系の概略図

クロロソーム内の色素同族体組成が、生育時間経過とともに変化すること、および生育が定常期到達後も変化することを初めて示した(Tsukatani et al., 2013)。組成変化に該当する色素合成酵素がクロロソームには局在しないことから、細胞膜で合成された色素をクロロソーム内部へトランスポートする蛋白質の存在が示唆された。クロロソーム保有光合成細菌のゲノム比較から、トランスporter様蛋白質の候補遺伝子群を見出し、これらの蛋白質がクロロソーム近傍に局在すること、欠損させると BChl-c 会合体の吸収極大がシフトすることが分かった。さらにこれら候補蛋白質のうち1つは BChl-c と相互作用することが示唆され、色素トランスporter蛋白質の最有力候補である。

研究テーマ C 「β-カロテン産生株の創出」

緑色硫黄細菌モデル生物の *C. tepidum* では、クロロソームに含まれるカロテノイドは、クロロバクテンという分子種である。*C. tepidum* のカロテノイド生合成経路は、研究開始時点で既にほとんどが同定されていたため、遺伝子工学的に生合成系を改変することで、クロロバクテンのかわりに生理活性物質として有用なβ-カロテンとアスタキサンチンをクロロソーム内に蓄積する変異株の作製を試みた。具体的には、不飽和化酵素 CrtU を欠損させ、近縁種の *cruB* 遺伝子を導入することでクロロバクテン生合成経路をバイパスさせてβ-カロテン合成株の作製には成功したが、アスタキサンチン合成株の作製には至らなかった。

3. 今後の展開

研究テーマ A では、特定の Csm 蛋白質ファミリーと糖脂質との相互作用を見出した。今後は Csm 蛋白質の欠損/大量発現を組み合わせることで、クロロソームのサイズをより大きくすることで内部へ物質蓄積量を上げる。クロロソームというオルガネラにだけ糖脂質が集まるという

現象は、植物細胞内における葉緑体が糖脂質で構成されるという状況と似ている。つまり基礎科学への波及としては、クロロソームが糖脂質で形成される生理的意義やメカニズムが分かれば、植物葉緑体形成の理解が進み、ひいては農業面への応用に繋がる可能性がある。

研究テーマ B では、得られた色素生合成経路の知見を元に、近赤外線吸収素材として応用が期待される BChl-*b* を蓄積する緑色硫黄細菌変異株の作製を継続する。生合成された BChl 色素のクロロソームへの輸送機構は、ようやくトランスポートに関わる蛋白質の足がかりを掴んだところである。今後は、輸送機構の詳細なメカニズムや包膜形成の仕組みを明らかにしていくことで、色素以外の有用物質、特に疎水性物質をクロロソーム内腔へ蓄積させる系の構築に繋げていきたい。

研究テーマ C では、 β -カロテンを蓄積する緑色硫黄細菌株を作製することができた。今後は、これまで不明であったクロロソーム内でのカロテノイドの生理的意義を、得られた変異株および他のカロテノイドを生産する株を用いて解明することが期待できる。さらに、生理活性物質として有用なアスタキサンチンの生合成系改変までを目指したが研究期間内では到達できなかった。緑色硫黄細菌が嫌気培養を要するために導入したケト化酵素がうまく機能しなかったことが考えられる。近縁の嫌気性細菌から見つかったケト化酵素を β -カロテン産生株へ導入して目標達成へ繋げたい。BChl-*c* を全く合成できなくした変異株クロロソームでは野生株の 2 倍量のカロテノイドが存在することが明らかとなったため、今後はこれら変異を組み合わせることで、有用物質の蓄積量を上げることが可能となるであろう。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究ではこれまで不明な点が多かったクロロソーム構成成分の特性を理解するだけでなく、クロロソーム形成過程のモデルを提唱することが出来た。クロロソーム小胞膜中の蛋白質と糖脂質の相互作用が明らかになったことは、今後クロロソームを物質生産へ利用するためには画期的な結果だった。クロロソームのサイズを自在に調整するという目標への道筋は付けられたであろう。また、色素生合成系に関わる未解明の酵素を次々に同定することができ、(既に合成経路が解明されていた BChl-*a*、*d* を除く) BChl-*b*、*c*、*e*、*g* の合成経路を完結することができた事は個人的に感慨深いものがあった。全ての BChl 合成系が明らかになったことで、得られた知見を元に変異導入によって光合成生物に本来持っているものとは異なる様々な色素を合成させ、生物の光利用の進化過程を実験室内で再現・検証するという新たなテーマに進展させたい。研究構想の段階では、クロロソームを構成する成分の特性や相互作用を解明するだけでなく、それらの成分が合成される時間的・空間的情報を得たいと考えていたが、研究期間のほとんどを特に未解明の色素合成経路の研究に費やしたことで実現には至らなかったことが悔やまれる点である。さきがけ研究の潤沢な資金のおかげで、これまで手を出したくも躊躇していたクロロソームの網羅的な研究によりやく着手することが出来た段階とも言える。困難ではあるが今後も正面からこの研究対象と向き合っていきたい。

(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。)

多くの系統群の光合成細菌で見られるクロロソームについて、これまであまり研究が進

んでこなかった特殊な光捕集蛋白質複合体を研究材料として、構成分子のキャラクタリゼーションなどの基礎研究を中心としながら、色素生合成系の改変等による応用を目指した研究を行った。クロロソーム蛋白質と糖脂質との相互作用や色素生合成経路について、全体像を明らかにするなどの成果を挙げた。また、特許申請など社会実装を見据えた取り組みも評価できる。今後は、これまで培った光合成細菌の研究経験を活かして植物等へ新たな研究の幅を広げるとともに、独自の技術基盤に立ったオリジナリティーある研究を展開することを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Harada, J., Takasaki, S., Yoshitomi, T., and Tamiaki, H. (2013) Cyclopropane-ring formation in the acyl groups of chlorosomal glycolipids is crucial for acid resistance of green bacterial antenna systems. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 3689-3694.
2. Tsukatani, Y., Harada, J., Mizoguchi, T., and Tamiaki, H. (2013) Bacteriochlorophyll homolog compositions in the *bchU* mutants of green sulfur bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 2195-2201.
3. Harada, J., Teramura, M., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Yamamoto, K., Tamiaki, H. (2015) Stereochemical conversion of C3-vinyl group to 1-hydroxyethyl group in bacteriochlorophyll *c* by the hydratases BchF and BchV: adaptation of green sulfur bacteria to limited-light environments. *Mol. Microbiol.* 98, 1184-1198.
4. Tsukatani, Y., Harada, J., Nomata, J., Yamamoto, H., Fujita, Y., Mizoguchi, T., and Tamiaki, H. (2015) *Rhodobacter sphaeroides* mutants overexpressing chlorophyllide *a* oxidoreductase of *Blastochloris viridis* elucidate functions of enzymes in late bacteriochlorophyll biosynthetic pathways. *Sci. Rep.* 5, 9741.
5. Tsukatani, Y., Mizoguchi, T., Thweatt, J., Tank, M., Bryant, D.A., and Tamiaki, H. (2016) Glycolipid analyses in envelope protein mutants of light-harvesting chlorosomes of *Chlorobaculum tepidum*. *Photosynth. Res.* In press.

(2) 特許出願

研究期間累積件数：国内 1 件、国際 1 件

1.

発 明 者：塚谷祐介、民秋均、原田二郎、藤田祐一、野亦次郎

発明の名称：バクテリオクロロフィル *b* の大量産生方法及び産生菌

出 願 人：学校法人立命館、学校法人久留米大学

出 願 日：2014/02/19

出 願 番 号：特願 2014-030085

国際特許 PCT-JP2015- 54552 (2015/02/19)

国際公開 WO2015/125849 (2015/8/27)



(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)

【国際学会(招待講演)】

1. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Harada, J., Mizoguchi, T., Fujita, Y., and Tamiaki, H. Chlorophyllide *a* oxidoreductases, important nitrogenase-like enzymes with versatile functions. Second International Symposium on Biosynthesis of Tetrapyrroles (November 30-December 2, 2012, Shiga, Japan)
2. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Harada, J., Nomata, J., Mizoguchi, T., Fujita, Y., and Tamiaki, H. Chlorophyllide *a* oxidoreductase catalyzes the formation of an ethylidene group of bacteriochlorophyll *b*. 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (June 22-28, 2014, Istanbul, Turkey)

【国内学会(招待講演)】

3. 塚谷祐介 「ニトロゲナーゼ類似酵素による光合成色素合成の多様性と応用」 蛋白研セミナー「嫌気蛋白質を対象とした構造・機能相関の現状」、大阪大学蛋白質研究所、2015年3月5日

【総説】

4. 塚谷祐介, 民秋均 (2015) 近赤外光を吸収するバクテリオクロロフィル色素の生合成経路解明と応用. 生化学 87, 234-238.
5. 塚谷祐介, 民秋均, 溝口正 (2015) 光合成細菌の脂質. 光合成研究 25, 151-159.
6. Tamiaki, H., Teramura, M., and Tsukatani, Y. (2016) Reduction processes in biosynthesis of chlorophyll molecules: chemical implication of enzymatically regio- and stereoselective hydrogenations in the late stages of their biosynthetic pathway. Bull. Chem. Soc. Jpn. 89, 161-173.