

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：84307

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14375

研究課題名(和文) 遺伝子工学に有用な二酸化炭素固定遺伝子の探索

研究課題名(英文) Screening of genes useful for genetic engineering of carbon dioxide fixation

研究代表者

小林 淳平 (Kobayashi, Jyumpei)

公益財団法人地球環境産業技術研究機構・その他部局等・研究員

研究者番号：90759987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：光合成細菌の二酸化炭素固定への関与が推定される遺伝子の、実際の二酸化炭素固定への影響を明らかにするために、配列の情報から14の遺伝子を選定した。これらの遺伝子をそれぞれまたは複数高発現する株を計14株構築し、重炭酸ナトリウムを唯一の炭素源とした培地で光合成的に培養した結果、14株中6株で元の株よりも良好な生育を確認できた。またこの時の培養液中の重炭酸イオン濃度も、元の株と比較して減少していた。以上の結果から、二酸化炭素の固定に有用と考えられる遺伝子を6つ発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エネルギー源として化石燃料を中心に利用している現在の社会において、化石燃料の燃焼によって大気に放出される二酸化炭素を主原因とした地球温暖化は重大な懸念事項である。そのため、遺伝子組み換えによって微生物による二酸化炭素の利用能力を向上させることは、単純な二酸化炭素の削減にとどまらず、二酸化炭素から直接有用な物質を生産するために重要である。本研究によって6つの遺伝子が光合成細菌の二酸化炭素利用に応用できる可能性が明らかになった。この成果は持続可能な社会の実現の一助となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate effect of genes presumed to be involved in carbon dioxide fixation on photosynthetic bacteria, 14 genes were selected from sequence information. Fourteen strains that alone or multiply overexpress these genes were constructed and grown in medium containing sodium bicarbonate as a sole carbon source. As a result, the 6 strains showed improved growth rate and bicarbonate consumption compared to the parent strain among 14 recombinant strains. From these results, the 6 useful genes for carbon dioxide fixation were revealed.

研究分野：応用微生物学

キーワード：光合成細菌 二酸化炭素固定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、二酸化炭素(CO₂)の排出に伴う環境への影響が懸念されている。光合成細菌によるCO₂固定は、この問題への有効な解決策の一つである。光合成細菌は、多様な炭素源を多様な物質へ変換でき、光を利用できるため収率が高く、多様な条件下で生育できるなど、利用価値の高い細菌で、古くから利用されており、現在でも多くの物質生産に関する研究が報告され続けている¹⁾。また、単純に培養した菌体を飼料として与えることで、農業、畜産、水産分野で、明らかな収率および品質向上が膨大に報告されているため、単純に廃棄物を炭素源にして培養するだけでも十分な利用価値がある。さらには、世界的に広く研究されている植物や藻類とは異なり、嫌気的な条件や、光がない条件下でも固定が可能のため、様々な条件が想定される排ガスの処理に、より柔軟に対応できる。しかし、紅色非硫黄細菌のCO₂固定に関する応用研究は世界的に見ても一例しかない²⁾。

2. 研究の目的

上述のように、紅色非硫黄細菌のCO₂固定への応用研究はほとんど無い。そのため、CO₂固定への関与が推定される遺伝子を、紅色非硫黄細菌細胞内で過剰発現させることで、これらの遺伝子産物が紅色非硫黄細菌のCO₂固定に実際にどのような影響を与えるかを明らかにする。

3. 研究の方法

遺伝子改変の宿主として *Rhodobacter sphaeroides* HJ 株を³⁾、遺伝子を過剰発現させるためのプラスミドとして pLP-1.2 を採用した⁴⁾。遺伝子産物がCO₂の固定を促進すると考えられる14の遺伝子を選定し、これらの遺伝子をpLP-1.2にクローニングし、これにより得られた各プラスミドで宿主 *R. sphaeroides* HJ 株を形質転換した。その後、これらの株をコハク酸を炭素源とした平板培地 (ASY 培地) で嫌気的かつ光合成的に72時間培養し (30 °C、8500 lux)、得られた単一のコロニーをASY液体培地で嫌気的かつ光合成的に48時間培養した (30 °C、8500 lux)。この前培養により得られた培養液を、50 mMの重炭酸ナトリウムを唯一の炭素源とした培地で、気層を水素に置換した状態で、約8500 luxの光を照射し、嫌気的かつ光合成的に7日間培養した (30 ml バイアル瓶中に、培養液6 ml、初期OD₆₀₀ = 0.5)。培養液を1日おきに採取し、菌体のOD₆₀₀と培養液中の残存重炭酸イオン濃度を測定し、培養終了時の菌体を採取・乾燥させることで、バイオマス濃度を定量した。

4. 研究成果

本研究で構築した株を発現させた遺伝子およびその遺伝子のデータベース (KEGG) 上のIDとともに表1に示す。

表1 構築した組換え *R. sphaeroides* HJ 株

Strain	Overexpressed gene	KEGG ID
HJ (Vector)	none (intact plasmid)	
HJ (<i>accA</i>)	Acetyl-CoA carboxylase	RSP_1772
HJ (<i>accB</i>)	Acetyl-CoA carboxylase	RSP_0190
HJ (<i>accC</i>)	Acetyl-CoA carboxylase	RSP_0191
HJ (<i>accD</i>)	Acetyl-CoA carboxylase	RSP_0929
HJ (<i>accs</i>)	<i>accA</i> , <i>accB</i> , <i>accC</i> , and <i>accD</i>	RSP_1772, RSP_0190, RSP_0191, and RSP_0929
HJ (<i>pccA</i>)	Propionyl-CoA carboxylase	RSP_2191
HJ (<i>pccB</i>)	Propionyl-CoA carboxylase	RSP_2189
HJ (<i>pccs</i>)	<i>pccA</i> , and <i>pccB</i>	RSP_2191, RSP_2189
HJ (<i>pc</i>)	Pyruvate carboxylase	RSP_2090
HJ (<i>pec</i>)	Phosphoenolpyruvate carboxylase	RSP_1680
HJ (<i>bctp1</i>)	Bicarbonate transporter	RSP_3154, RSP_3153, RSP_3152, and RSP_3151
HJ (<i>bctp2</i>)	Bicarbonate transporter	RSP_0181, RSP_0180, and RSP_0179
HJ (<i>icdh1</i>)	Isocitrate dehydrogenase	RSP_0446
HJ (<i>icdh2</i>)	Isocitrate dehydrogenase	RSP_1559

これらの株を上述の条件で培養したときのOD₆₀₀を図1に示す。

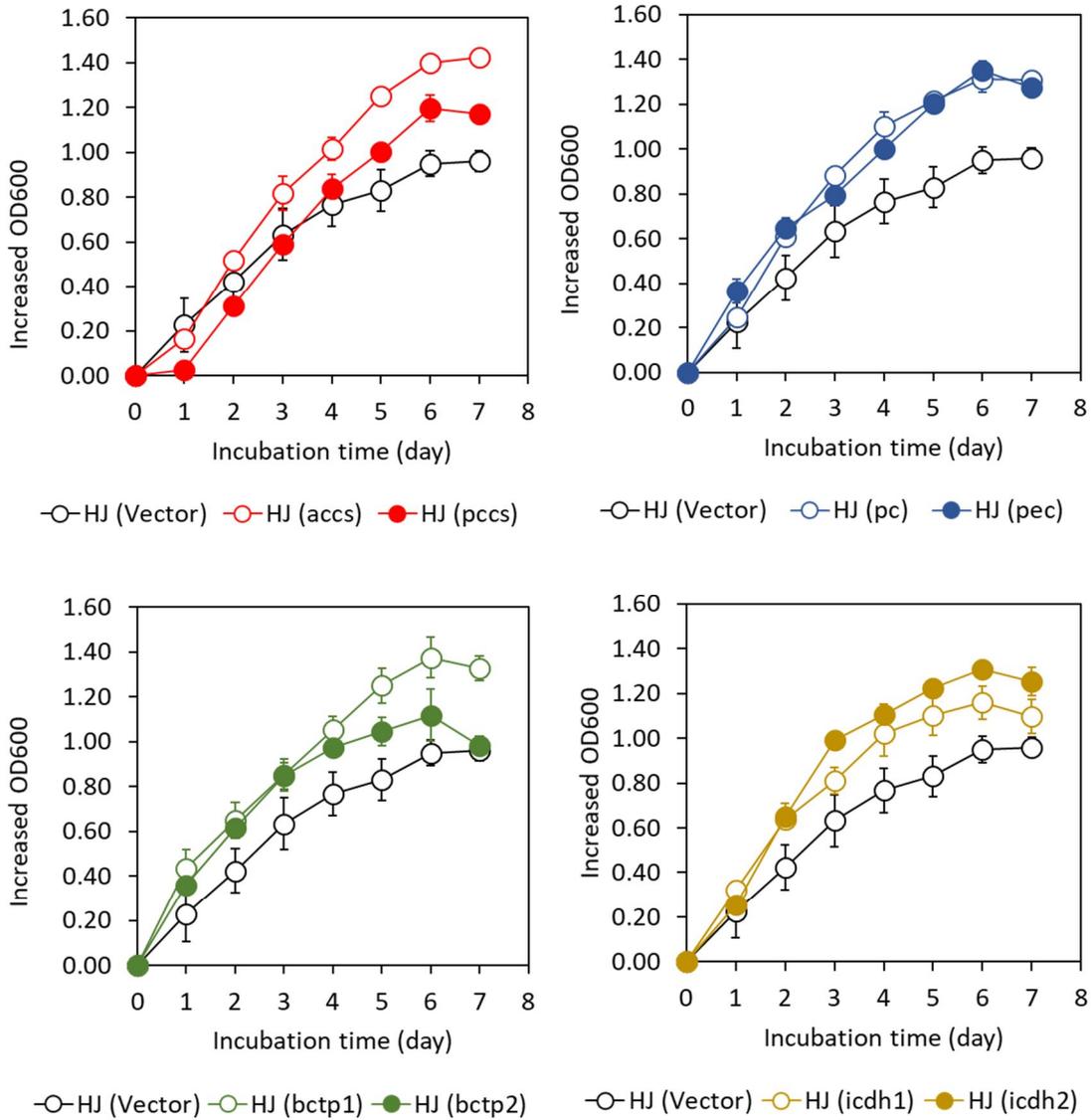


図1 組換え*R. sphaeroides* HJ株の重炭酸イオンを単一の炭素源としたときの増殖

図1から、構築した多くの株で、コントロールであるHJ (Vector)株よりも菌体の濃度が増加した(CO₂の利用能力が向上した)。最も菌体の増殖が促進されたのはHJ (accs)株で、HJ (Vector)株の約1.5倍であった。またHJ (bctp2)株およびHJ (icdh1)株は培養5日、または6日まではHJ (Vector)株よりも高い増殖を示したが、7日目ではほとんど変化がないか、わずかに高い程度になった。一般に、菌体の濃度を測定するためにはODが用いられるが、ODは単純な細胞の数のみではなく、細胞の状態によっても変化をする。そのため菌体の増殖をより正確に把握するために、培養終了時の菌体を集菌・乾燥させ、その質量を測定することで、バイオマス濃度を定量した(図2)。その結果、HJ (bctp2)株およびHJ (icdh1)株はHJ (Vector)株とほとんど同じバイオマス質量だった。このことから、bctp2およびicdh1遺伝子の発現は、宿主HJ株のCO₂固定に影響を与えなかったと考えられる。また、最もOD₆₀₀が増加したHJ (accs)株はバイオマス質量においても同様に最も高い値を示したことから、本研究ではaccA, accB, accC, およびaccD遺伝子の同時発現が最も宿主のCO₂固定を促進した。まとめとして、本研究では紅色非硫黄細菌のCO₂固定において、現在明らかになっているリブローズ-1,5-ビス

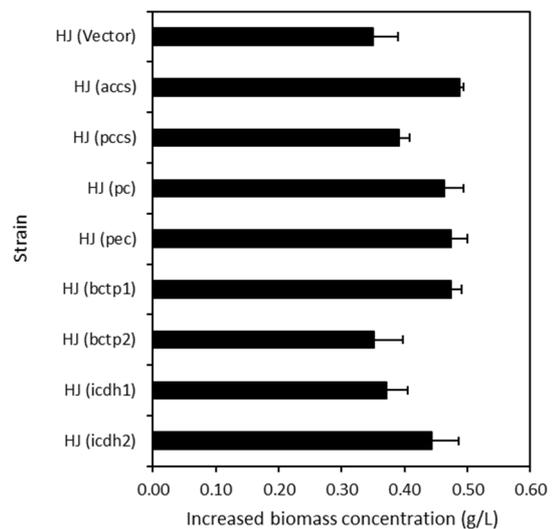


図2 組換え*R. sphaeroides* HJ株のバイオマス濃度

リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ遺伝子²⁾以外に新たに6種類の有用な遺伝子が示された。本研究成果は論文として投稿予定である。

<参考文献>

- 1) K. Sasaki et al., J. Biosci. Bioeng. (2005) 100:481-488.
- 2) C. Du et al. FEMS Microbiol. Lett. (2003) 225:69-73.
- 3) J. Kobayashi and A. Kondo, Microbiol. Resour. Announc. (2019) 8:e00652-19.
- 4) J. Kobayashi et al., Int. J. Hydrog. Energy. (2012) 37:9602-9609.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kobayashi J, Kondo A	4. 巻 18
2. 論文標題 Disruption of poly (3-hydroxyalkanoate) depolymerase gene and overexpression of three poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic genes improve poly (3-hydroxybutyrate) production from nitrogen rich medium by Rhodobacter sphaeroides.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12934-019-1088-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi J, Kondo A	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete genome sequence of Rhodobacter sphaeroides strain HJ, a purple nonsulfur bacterium with the ability to produce high levels of hydrogen from acetate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology resource announcements	6. 最初と最後の頁 e00652-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00652-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi J	4. 巻 7
2. 論文標題 d-Amino Acids and Lactic Acid Bacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms7120690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 小林淳平	4. 巻 96
2. 論文標題 酸素を出さない光合成細菌の遺伝子工学的な物質生産	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 534-537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	無し (none)		