

令和元年6月10日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00593

研究課題名(和文) 光合成細菌を利用した二酸化炭素と窒素固定反応によるPHA生産

研究課題名(英文) PHA production by utilizing nitrogen fixation and CO₂ fixation abilities of purple photosynthetic bacteria

研究代表者

樋口 美栄子 (Higuchi, Mieko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40443014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性の紅色光合成細菌の持つ光合成と窒素固定能を利用したバイオプラスチックの生産について検証した。複数の紅色光合成細菌株が、ニトロゲナーゼによる窒素固定能を持つことを明らかにした。さらにPHA生産に有効な培養光条件を確立した。また好気培養におけるバイオプラスチック生産には酢酸が必要であることを明らかにし、代謝の変化に関与する遺伝子を同定した。また、カルシウム処理による新たな海洋性紅色光合成細菌の形質転換系を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋性の紅色光合成細菌は地球上に大量に存在する海水・太陽光・二酸化炭素・窒素ガスを生育に利用できる物質生産に理想的な微生物である。また近年需要が高まっているバイオプラスチックの生産能も高く、応用展開が期待されている。本研究により、紅色光合成細菌の窒素固定能やPHA生産条件、バイオプラスチックの生産制御、形質転換についての知見が得られたことは、今後の産業生産に大きな貢献ができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Marine purple photosynthetic bacteria are ideal organisms for production of useful materials to reduce production costs and to contribute sustainable society because they can utilize sun energy, seawater and carbon dioxide and nitrogen gas in the air for their growth. Purple photosynthetic bacteria are known to have Polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastic production ability. PHA production was investigated using marine purple photosynthetic bacteria. Some marine purple photosynthetic bacteria strains could grow in nitrogen gas as a sole nitrogen source. PHA was not produced under aerobic conditions and the addition of acetate induced PHA production. Gene expression analysis revealed that one transcription factor was involved in the acetate-induced PHA production under aerobic conditions. I also developed the transformation method of marine purple photosynthetic bacteria using chemically competent cells prepared by calcium chloride treatment.

研究分野：光合成微生物

キーワード：ポリヒドロキシアルカン酸 海洋性紅色光合成細菌 窒素固定 形質転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年石油由来のプラスチックの代替材料として、生物由来のバイオプラスチックが注目されてきている。バイオプラスチックの一種であるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、熱可塑性・生分解性・生体適合性などの性質を示し、化石原料の使用・枯渇による地球環境悪化を軽減するうえで有用な材料となることが期待されている。PHAは微生物が栄養飢餓に備えて細胞内に合成する炭素源やエネルギーの貯蔵物質であり、多くの微生物が合成することが知られている。近年、光合成産物としてのバイオマスの活用という観点で、二酸化炭素の資源化の向上を目指した研究が多く行われている。光合成は高等植物・藻類・シアノバクテリア・酸素非発生型光合成細菌(光合成細菌)によって行われ、このうち最も原始的なものが光合成細菌である。また、光合成細菌はニトロゲナーゼによる窒素固定を行うことが知られており、生物に重要な二大栄養素である炭素源と窒素源を作り出す有用な生物である。PHA生産に光合成細菌を用いた報告例はあるが、そのほとんどは実験系が確立している種類のものでしか行われていない。しかしながらそれ以外の光合成細菌がPHAを合成することが報告されており、さらにゲノムが解読されている光合成細菌のほとんどがPHA合成酵素と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子を有していることを確認している。これらのことから申請者は光合成細菌がPHA生産のよい宿主生物となると考えた。

2. 研究の目的

PHAを生産することが知られている多くの微生物は、窒素などの栄養源が枯渇したときにPHA生産が誘導されることが知られている。一方、これまでの研究において、栄養が豊富な生育培地でPHAを蓄積し、窒素制限条件でPHA量が増加しない光合成細菌が複数得られている。これらの株は高い窒素固定能により、窒素制限条件でも栄養飢餓に陥らず、PHAを蓄積しないと考えられる。そこで候補株のなかから、より少ない窒素源でよい生育・高いPHA生産量を示す光合成細菌を同定し、さらに二酸化炭素を炭素源としたPHA合成について検討する。次に、窒素制限以外のPHA合成の誘導条件及び生育条件を確立する。またより高いPHA生産を目的とした外来遺伝子の導入や光合成細菌の遺伝子改変のため、PHA生産の宿主株とした光合成細菌に適用できる形質転換法を確立する。

3. 研究の方法

窒素固定活性については、窒素源を窒素ガスのみにした培養条件で培養し、生育を観察する。また、窒素固定反応を行うニトロゲナーゼの活性をアセチレン還元アッセイにより評価する。また炭酸固定活性については、炭酸水素ナトリウムを炭素源とした生育や代謝解析を行う。PHA生産条件の検討としては、様々な環境(光質・光強度・酸素濃度)条件での紅色光合成細菌の生育及びPHA生産を評価する。形質転換については、自然形質転換、細胞透過性ペプチド(Cell penetrating peptide, CPP)、ケミカルコンピテントセルなどの方法を検証する。

4. 研究成果

海洋性紅色光合成細菌の窒素固定能について検証するため、窒素ガスを唯一の窒素源とした条件における生育を観察した。その結果、数株の紅色光合成細菌については生育が認められた。光合成細菌においては、窒素のアンモニアへの変換はニトロゲナーゼという酵素によって行われる。ニトロゲナーゼの活性を評価するために、アセチレンとアセチレンの還元により生じるエチレンをガスクロマトグラフィーにより検出するアセチレン還元アッセイを行った。窒素制限条件下でよい生育を示した株は、高いニトロゲナーゼ活性を示していたことから(Figure 1)、これらの紅色光合成細菌はニトロゲナーゼによる窒素固定により生育していることが示唆された。またニトロゲナーゼ欠損株を作成した。欠損株の解析により窒素固定の寄与について解析する予定である。

次に二酸化炭素を炭素源とした生育について検証するため、複数の還元剤と炭酸水素ナトリウムの濃度を検証したところ、8 mM チオ硫酸ナトリウムと20 mM 炭酸水素ナトリウムの存在下において、最も良い生育を示すことがわかった。さらに、安定同位体で標識した炭酸水素ナトリウムのアミノ酸への取り込みを観察した結果、どのアミノ酸へも同様に炭酸水素ナトリウムが取り込まれていることが明らかになった。

また、PHA生産に適した光条件を検討するために、3種類の近赤外光(730, 800, 850 nm)のLEDを生育光とした紅色光合成細菌の生育とPHA生産について検証した。さらに光強度についてもそれぞれの波長について、弱光と強光の影響を解析した。その結果、初期の生育には730 nmの照射が有効であり、生育後期は850 nmの照射光により、よい生育を示すことがわかった。またPHA生産については、いずれの波長においても弱光照射下でより高いPHA生産量を示し、800 nmの照射が最も有効であることがわかった。次に培養時の酸素濃度の影響について検討した。その結果、海洋性の紅色光合成細菌はピルビン酸とリンゴ酸を炭素源として培養すると、好気培養ではほとんどPHAを生産しないことがわかった。しかし、酢酸ナトリウムを

添加すると PHA 生産量が大きく増加することを発見した (Figure 2)。好気培養した紅色光合成細菌の遺伝子発現解析を行った結果、好気培養では TCA サイクルの主要な酵素の発現レベルが低下しており、好気培養時は TCA サイクルが低下しているため、PHA が生産されないことが示唆された。この TCA サイクルの低下は酢酸を添加することにより回復することがわかった。また炭素代謝や生育の制御に関与することが報告されている転写因子のホモログの転写量が、酢酸の添加により強く誘導されており、この転写因子が好気培養時における酢酸誘導性の PHA 生産の制御に関与していることが示唆された。

複数の紅色光合成細菌株を用いて感受性を示すカナマイシンの濃度を検討し、*Rhodovulum sulfidophilum* と *Roseospira marina* の 2 株を形質転換実験に供することとした。カナマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドを用い、紅色光合成細菌への導入を検証した。また、細胞膜透過ペプチド (CPP: Cell Penetrating Peptide) と DNA と相互作用するポリカチオン性ペプチドの融合ペプチド (BP1002K₈) を用い、プラスミド DNA とペプチドの複合体を作製し、形質転換への影響を評価した。また、ヒートショックによる形質転換効率の違いについても検証した。紅色光合成細菌の持つ自然形質転換能を検証するため、培養液に直接プラスミドとペプチド DNA 複合体を添加し、通常の生育培地で 1 日の前培養後、カナマイシンを含む寒天培地で嫌気・近赤外光照射下で培養した。その結果、いずれの条件でもカナマイシン耐性のコロニーは得られなかった。次に、対数増殖期の紅色光合成細菌を用い塩化カルシウム法によりコンピテントセルを作製し、形質転換を行った。その結果、*R. sulfidophilum* のコンピテントセルでは、1 μg のプラスミド DNA の導入により 3-44 個のカナマイシン耐性コロニーが約 6-12 日の培養で得られた。*R. marina* では、1 μg のプラスミド DNA の導入により 1-5 個のカナマイシン耐性コロニーが 6-10 日の培養で得られた。また、ヒートショック処理が形質転換効率の増加に寄与することがわかった。これらのカナマイシン耐性コロニーを液体培地で培養し、培養液からのプラスミド抽出を行った結果、プラスミドの存在が確認された。これらの結果から、塩化カルシウム法によるコンピテントセルを用いることにより、光合成細菌の形質転換が可能であることが示された (Figure 3)。さらに、マクロピノサイトーシスという多くの生物に普遍的に存在する細胞内への取り込み現象を利用することで、外来遺伝子を導入する新たな手法を開発した。培養液にマクロピノサイトーシスを誘起するペプチドを添加するだけという非常に簡便なものであり、紅色光合成細菌以外にも多くの生物種への応用展開が期待される。

光合成細菌は、太陽エネルギーを利用して大気中の二酸化炭素と窒素から光合成と窒素固定反応により、成長に必要な炭素源と窒素源を作り出すクリーンで持続可能な生産技術としての利用が期待できる有用な生物である。環境負荷の低減のみではなく、物質生産のコストダウンを目指す上でも、非常に有用なホスト生物になることが期待される。

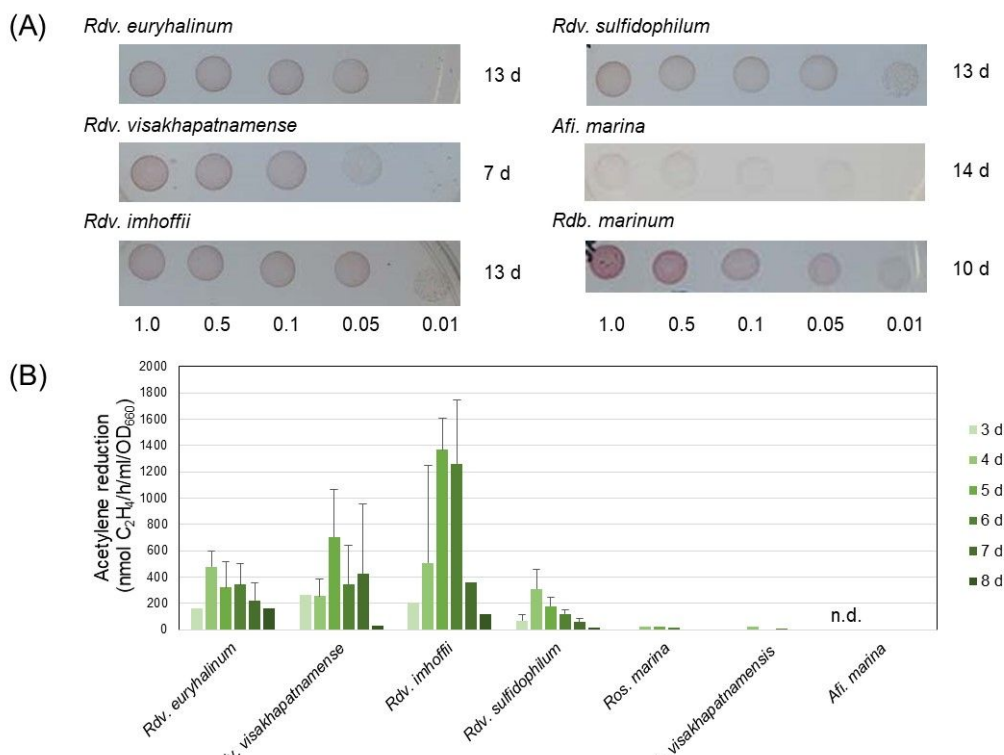


Figure 1. (A) Bacterial growth with sodium bicarbonate. The dilution series of the cell cultures were spotted in agar medium in the presence of 0.1% sodium bicarbonate and 2 mM thiosulfate. (B) Acetylene reduction activity. Acetylene reduction assays were carried out after 3 to 8 days of transfer to nitrogen-free medium with N₂ gas. n.d. = not detected.

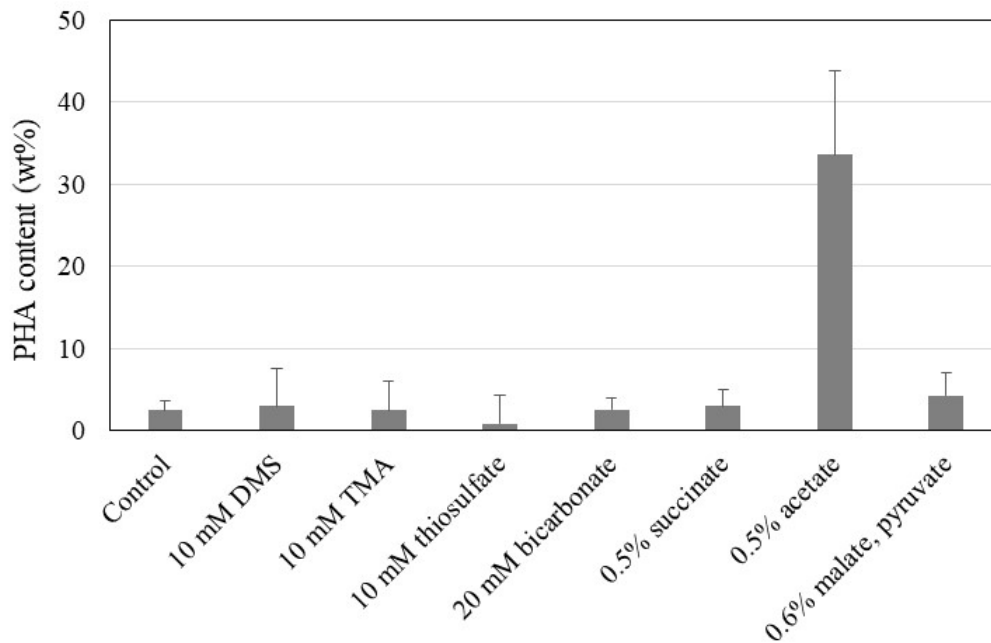


Figure 2. PHA production under aerobic conditions. *Rdv. sulfidophilum* cells were cultured under aerobic conditions in the presence of 10 mM DMS (dimethylsulfoxide), 10 mM TMA (trimethylamine), 10 mM thiosulfate, 20 mM sodium bicarbonate, 0.5% sodium succinate, 0.5% sodium acetate and 0.6% sodium pyruvate. PHA contents were determined by gas chromatograph/mass spectrometry.

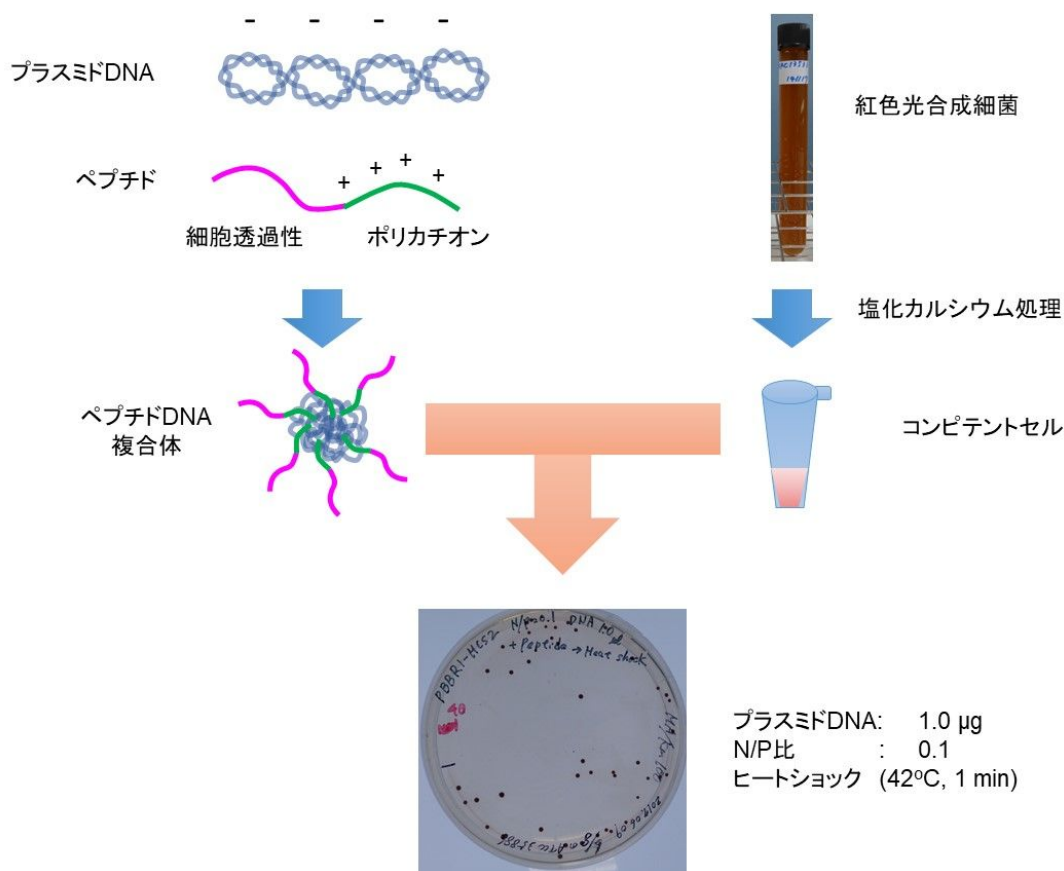


Figure 3. Calcium chloride-based transformation of marine purple photosynthetic bacteria

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Higuchi-Takeuchi M, Numata K. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (accepted) (査読有)
2. Foong CP, Higuchi-Takeuchi M, Numata K. *PLoS One*. 2019 Apr 29;14(4):e0212654. (査読有)

3. Higuchi-Takeuchi M, Motoda Y, Kigawa T, Numata K. ACS Omega. 2017 Aug 31;2(8):5071-5078.
(査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

招待・依頼講演

1. 樋口(竹内)美栄子 第3回光合成細菌ワークショップ(2018年)
2. 樋口(竹内)美栄子、森崎久美子、沼田圭司 第67回高分子学会討論会(2018年)
3. Higuchi-Takeuchi M, Morisaki K, Numata K. Kick-off Symposium“Japan-South-East Asia Collaboration Hub of Bioplastics Study” JSPS-Core-to-Core Program (2017年)

国際学会

4. Higuchi-Takeuchi M, Numata K. The 10th International Conference of Modification, Degradation and Stabilization of Polymers. (2018年)
5. Higuchi-Takeuchi M, Morisaki K, Motoda Y, Numata K. The 6th International Conference on Bio-based Polymers. (2017年)

国内学会

6. 樋口(竹内)美栄子、沼田圭司 植物生理学会 2019年
7. 樋口(竹内)美栄子、森崎久美子、沼田圭司 生物工学会 2018年
8. 樋口(竹内)美栄子、元田容子、沼田圭司 植物生理学会 2018年
9. 樋口(竹内)美栄子、森崎久美子、沼田圭司 バイオ・高分子シンポジウム 2017年
10. 樋口(竹内)美栄子、森崎久美子、沼田圭司 植物生理学会 2017年
11. 樋口(竹内)美栄子、元田容子、沼田圭司 高分子学会 2016年

〔図書〕(計 1 件)

樋口(竹内)美栄子、日刊工業新聞社発行「工業材料」2019年3月号(46-50ページ)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。