

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650092

研究課題名(和文) 光合成で駆動する細菌型「リピッドボディー」の創出

研究課題名(英文) Creation of bacterial "lipid body" for biofuel production

## 研究代表者

増田 真二 (Masuda, Shinji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：30373369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クロロソームと呼ばれる緑色光合成細菌の光捕集色素タンパク質複合体の機能を改変することで、クロロソーム内部に脂質やカロテノイドといった有用物質を蓄積することのできる、細菌型「リピッドボディー」を創出し、今まで困難であった細菌によるバイオ燃料産生への道筋をつけることを目指した。近年開発された緑色光合成細菌用過剰発現ベクターを用い、プラスミド上で植物(シロイヌナズナ)由来のDGAT遺伝子をクローニングした。このプラスミドを緑色光合成細菌*Chlorobaculum tepidum*に導入することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to create artificial bacterial "lipid body" for biofuel and useful materials production. Specifically, we achieved genetic modification of the light-harvesting protein-pigment complex called chlorosome of green-sulfur bacteria. Chlorosomes are composed of single monolayer membrane system, and inside the membrane, a large amount of chlorophylls are accumulated. In this study, we aimed to accumulate biofuels such as triacylglycerol inside the chlorosomes. We cloned the genes for triacylglycerol synthases of higher plants. Then, these genes are cloned into the highly expression vector for green-sulfur bacteria. After several trials, we succeeded to introduce these expression vectors into the model green-sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. These recombinant photosynthetic bacteria grew slower than wild type, suggesting that some triacylglycerol may be accumulated in the bacterium.

研究分野：光生物学

キーワード：光合成細菌 バイオエネルギー トリアシルグリセロール クロロソーム 緑色細菌

## 1. 研究開始当初の背景

バイオエネルギーの需要が近年急速に高まり、様々な技術開発が進められている。それらは、脂質を溜める微細藻類の大量培養に根ざしたものが多く、増殖速度が遅い、遺伝子組換えが困難、解放系での純粋培養が困難等の問題が指摘されている。しかし、これら諸問題を克服する技術の確立は遅れている。

本研究では、この点を克服すべく、緑色光合成細菌によるまったく新規なバイオエネルギー作出技術の開発を進めた。

## 2. 研究の目的

緑色光合成細菌の中でも、比較的遺伝子導入が容易で増殖速度の速い *Chlorobaculum tepidum* を材料に、光捕集系クロロソーム内にトリアシルグリセロールを蓄積する株の作出を目指し、研究を進めた。

## 3. 研究の方法

通常の細胞膜は二重膜で構成されており、膜の内外は共に親水的な環境である。一方、緑色細菌の光合成光捕集色素タンパク質複合体であるクロロソームは、一重膜で構成されており、膜の内側は疎水的な環境となっている。この性質は、光捕集を行うクロロフィル分子を多量に、自己会合体としてクロロソーム内部に蓄積することを可能としている。このクロロソーム内部の疎水的環境を利用し、細菌細胞内に多量のトリアシルグリセロールを蓄積させることを目指した。より具体的には、通常はクロロフィルを蓄積するクロロソーム内部に、トリアシルグリセロールを蓄積させることを目指した。

## 4. 研究成果

クロロソームの膜は、多量の (~60%) ガラクトリピッドで構成されているが、その合成は、ジアシルグリセロールを基質とし、ワンステップの酵素反応で行われることが知

られている。そこで同じ基質 (ジアシルグリセロール) からワンステップでトリアシルグリセロールを生成する酵素 DGAT1 遺伝子および DGAT2 遺伝子を、高等植物シロイヌナズナより単離した。それぞれの酵素遺伝子を、*Chlorobaculum tepidum* 用の過剰発現ベクター (Azai et al. 2013) にクローニングした。

次に得られた組換えプラスミド DNA を、大腸菌 S17-1 株のプラスミド伝達能を利用して緑色細菌 *Chlorobaculum tepidum* の野生型に導入する実験を行った。その結果、2つの目的プラスミドを保持した株をそれぞれ複数株単離することに成功した。

次に得られた株の表現型を調べた。まず得られた株の増殖曲線を調べたところ、シロイヌナズナの DGAT1 遺伝子を過剰に発現していると思われる株のみ、顕著な増殖遅延が見られた。得られた株全てにおいて、光合成色素の合成量に違いは見られなかったことから、この増殖遅延は、光合成活性ではなく、通常行わないトリアシルグリセロールの合成等、他の理由に起因するものと思われた。今後得られた株の詳細な解析を行うことで、バクテリアを用いた全く新規のバイオエネルギー作出技術を確立できると期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

1) J. Harada, T. Mizoguchi, K. Nomura, and H. Tamiaki. Isolation and structural determination of C8-vinyl bacteriochlorophyll d from the bciA and bchU double mutant of the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. Photosyn. Res. 査読有, 121 (2014) 13-23. doi: 10.1007/s11120-014-0007-7

2) J. Harada, Y. Mizoguchi, Y. Tsukatani, Y.

Yokono, A. Tanaka, and H. Tamiaki. Chlorophyllide *a* oxidoreductase works as one of the divinyl reductases specifically involved in bacteriochlorophyll *a* biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 査読有, 289, (2014), 12716-12726. doi: 10.1074/jbc.M113.546739

3) C. Azai, J. Harada, and H. Oh-oka. Gene expression system in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* by conjugative plasmid transfer. *Plos one.* 査読有, 8, (2013) e82345. DOI: 10.1371/journal.pone.0082345

4) Y. Tsukatani, J. Harada, T. Mizoguchi, and H. Tamiaki. Bacteriochlorophyll homolog compositions in the *bchU* mutants of green sulfur bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 査読有, 12, (2013), 2195-2201. doi: 10.1039/c3pp50253h

5) T. Mizoguchi, Y. Tsukatani, J. Harada, S. Tasaka, T. Yoshitomi, and H. Tamiaki. Cyclopropane-ring formation in the acyl groups of chlorosomal glycolipids is crucial for acid resistance of green bacterial antenna systems. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 査読有, 21, (2013), 3689-3694. doi: 10.1016/j.bmc.2013.04.030

6) J. Harada, T. Mizoguchi, S. Satoh, Y. Tsukatani, M. Yokono, A. Noguchi, A. Tanaka, and H. Tamiaki. Specific gene *bciB* for C7-methyl oxidation in bacteriochlorophyll *e* biosynthesis of brown-colored green sulfur bacteria. *Plos one*, 査読有, 8, (2013), e60026. DOI: 10.1371/journal.pone.0060026

〔学会発表〕(計 9件)

1) 清水隆之、増田真二 (2015) 初期型光合成電子伝達を硫化水素依存的に誘導する因子の探索。日本植物生理学会 3/16~3/18 東京農業大学

2) J. Harada, Y. Shibata, M. Ryono, K. Yamamoto, T. Mizoguchi, and H. Tamiaki (2014) Characterization of chlorosomes containing bacteriochlorophyll *c*, *d*, or *f* in the mutants derived from the identical strain of brown-colored green sulfur bacterium. 2014 International Congress on Artificial Photosynthesis. 11/24~11/28. Awaji Yumebutai International Conference Center.

3) 原田二郎、溝口正、塚谷祐介、横野牧生、田中歩、民秋均 (2014) 3 番目 C8 位ピニル還元酵素 (DVR) として同定されたクロロフィリド *a* 酸化還元酵素 (COR) の研究から考察されるクロロフィル合成の進化。第 5 回光合成学会年会 5/20~5/21 近畿大学

4) Y. Tsukatani, H. Yamamoto, J. Harada, J. Nomata, T. Mizoguchi, Y. Fujita, and H. Tamiaki (2013) Plasticity of chlorophyllide *a* oxidoreductase, a versatile nitrogenase-like enzyme. 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation. 10/14~10/18. 宮崎

5) J. Harada, T. Mizoguchi, S. Satoh, Y. Tsukatani, M. Yokono, A. Tanaka, and H. Tamiaki. (2013) Bacteriochlorophyll *e* biosynthetic pathway of the brown-colored green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum*. The 16<sup>th</sup> International Congress of Photosynthesis. 8/11~8/16. セントルイス (米国)

6) J. Harada, T. Mizoguchi, Y. Tsukatani, M. Noguchi, and H. Tamiaki (2013) Chlorosomes containing bacteriochlorophyll *c*, *e*, or *f* in the brown-colored green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum*. Light-harvesting Sattellite Meeting 2013. 8/8~8/11, セントルイス (米国)

7) Y. Tsukatani, H. Yamamoto, J. Harada, J. Nomata, T. Mizoguchi, Y. Fujita, and H. Tamiaki (2013) Chlorophyllide a oxidoreductase branches biosynthetic pathways for bacteriochlorophylls *a* and *b*. Light-harvesting Sattellite Meeting 2013. 8/8~8/11, セントルイス (米国)

8) Y. Tsukatani, J. Harada, T. Mizoguchi, and H. Tamiaki (2013) Bacteriochlorophyll homolog compositions in mutants of green sulfur bacteria. 9<sup>th</sup> International Workshop in Supermolecular Nanoscience of Chemistry Programmed Pigments. 6/28~6/30. 立命館大学

9) T. Noguchi, M. Isaji, J. Harada, Y. Tsukatani, and H. Tamiaki (2013) A variety of of composite bacteriochlorophyll pigments in purple photosynthetic bacteria. 9<sup>th</sup> International Workshop in Supermolecular Nanoscience of Chemistry Programmed Pigments. 6/28~6/30. 立命館大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

増田 真二 (MASUDA Shinji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号 : 30373369

(2)研究分担者

原田 二郎 (HARADA Jiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号 : 10373094