

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660063

研究課題名(和文)シアノバクテリアにおけるアルカン生合成系のスカベンジング経路の研究

研究課題名(英文)Possible scavenging pathway for alkane synthesis in cyanobacteria

## 研究代表者

白石 英秋(Shiraishi, Hideaki)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90202118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアはアルカンの生合成経路を持っており、その経路が駆動すると脂肪酸を原料として最終的にアルカンとギ酸が生成される。その過程で、NADPHが消費されてNADP+となる。この経路の最終産物であるギ酸を基質としてNADP+からNADPHを生成する経路の存在が示唆されたため、その酵素遺伝子の解析を行った。当初単離した遺伝子はその活性にギ酸に対する依存性がみられなかったため、改めてスクリーニングを行い、新たに3種類の候補遺伝子を単離した。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacteria has an alkane biosynthesis pathway that generate alkane and formic acid using intermediates of fatty acid metabolism. In this process, NADPH is converted to NADP+. Because presence of an enzymatic pathway that generate NADPH using the by-product of this reaction, formic acid, was suggested by our genetic experiments, a candidate gene for that reaction was examined. Biochemical analysis of the gene product revealed that the enzymatic reaction performed by this protein was not dependent on formic acid. By further screening genomic library of a cyanobacteria, three novel candidate genes that genetically complement the formate dehydrogenase-deficient phenotype of an E. coli moaD mutant were identified.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：シアノバクテリア 酸化還元酵素

## 1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアは、アルカンの生合成経路を持っている (*Science* 329, 559 (2010))。アルカンはガソリンやディーゼルなど一般に利用されている燃料の主成分であり、しかも、シアノバクテリアは酸素発生型の光合成で増殖することから、この系は、太陽光のエネルギーを利用して燃料物質を生成し得る系として注目されている。このアルカン生合成経路が駆動すると、脂肪酸を原料として最終的にアルカンとギ酸が生成する (*JACS* 133, 3316 (2011))。その過程で、NADPH が消費されて NADP<sup>+</sup>となる。

一方、我々は、線状シアノバクテリアの一種である *Arthrospira platensis* を用いて、モリブデン補因子の生合成に関わる遺伝子の研究を行っていた。*A. platensis* (通称、スピルリナ) はアフリカや中米のアルカリ塩湖を原産地とするシアノバクテリアで、古くから原産地周辺で食用にされてきた食品微生物である。培養や収穫が簡単に行えるため、現在は食品や食品添加物の原料として世界各地で産業的な生産が行われている。この *A. platensis* は有用な微生物であるが、基礎的な研究にはこれまであまり使われてこなかった。我々は、この生物での分子遺伝学的手法の整備の一環として、モリブデン補因子の生合成遺伝子の同定を試みていた。モリブデン補因子は、ギ酸脱水素酵素や硝酸還元酵素など細胞内のさまざまな酵素の活性中心を構成している補因子であり、この補因子の合成経路に遺伝的な欠損が起こると、細胞内のそれらの酵素の活性が失われる。*A. platensis* ではモリブデン補因子の生合成経路の遺伝子のひとつ *moaD* が未同定であった。この遺伝子は種間の相同性が極端に低く、相同性による同定が困難である。そこで、その産物の活性を遺伝学的手法で検出することで *moaD* 遺伝子を単離することを目的として、大腸菌の *moaD* 欠失突然変異体に *A. platensis* のゲノム・ライブラリーを導入し、ギ酸脱水素酵素活性の回復をプレート・アッセイで検出することによって、大腸菌 *moaD* 欠失変異を相補する *A. platensis* の遺伝子の単離を試みた。ギ酸脱水素酵素の活性を検出できるとされているプレート・アッセイ法で大腸菌 *moaD* 突然変異体のギ酸脱水素酵素欠損表現型が相補されたクローンを分離し、塩基配列を決定したところ、その遺伝子によってコードされるタンパク質は他の多数の生物種で明らかにされている *moaD* タンパク質の特徴的な構造は有しておらず、NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> 依存的な脱水素酵素としての特徴を持っていた。このクローンはギ酸脱水素酵素の欠損表現型を相補する遺伝子として単離されたものであることから、この遺伝子が導入された株ではモリブデン補因子が無いにも関わらずギ酸脱水素酵素の活性が回復しているものと考えられた。しかし、単離された遺伝子にコードされるタンパク質は

既知のギ酸脱水素酵素との間にアミノ酸配列の相同性がほとんど無く、シアノバクテリアのみに存在する脱水素酵素ファミリーのタンパク質であった。また、大腸菌にこのタンパク質の遺伝子を導入してタンパク質を過剰発現させて予備的に調べると、他の生物のギ酸脱水素酵素が NAD<sup>+</sup> 依存性なのに対して、この酵素は NADP<sup>+</sup> 依存性であり、反応すると NADPH を生成することが示唆された。このことから、この酵素が、アルカン生合成の最終副産物であるギ酸を使って、アルカン合成で消費される NADPH を再生する働きをしていること、すなわち、アルカン生合成系の副産物を回収して再資源化する働きをしていることが示唆された。

## 2. 研究の目的

単離された遺伝子は、アルカン生合成経路の副産物を回収して再資源化する働きをしている可能性がある。モリブデン補因子が存在しない状態で活性発現がみられる (*moaD* 欠損株のギ酸脱水素酵素の欠損表現型をプレートアッセイで相補できる) ことは、これまで知られているギ酸脱水素酵素の性質とは大きく異なっている。これまで知られているギ酸脱水素酵素は、モリブデン補因子を必須の構成要素としているからである。そこで、本研究では、この遺伝子の産物の活性、基質依存性、補因子依存性をより詳細に調べて酵素的性状を明らかにする。さらに、ギ酸の代謝を通じたアルカン生合成経路との関係を調べる。

## 3. 研究の方法

単離された遺伝子の産物を、T7 プロモーターによる大腸菌内過剰発現系を利用して大腸菌で過剰発現させた。過剰発現されたタンパク質を His タグを利用したアフィニティー・カラムで精製し、NAD<sup>+</sup>、および、NADP<sup>+</sup> に対する依存性と基質依存性を調べた。当初単離された遺伝子は、後述するようにギ酸脱水素酵素でない可能性があることがわかったため、この遺伝子以外に大腸菌の *moaD* 突然変異体のギ酸脱水素酵素欠損表現型を相補できる遺伝子があるか調べるために、*A. platensis* ゲノム DNA の *Sau3AI* 部分分解産物をプラスミドに繋いだゲノム・ライブラリーを作成し、大腸菌の *moaD* 欠失突然変異体に導入してプレート・アッセイを行うことにより、ギ酸脱水素酵素の欠損表現型を相補する遺伝子をさらに単離した。ギ酸脱水素酵素活性のプレート・アッセイ法としては Begg と Hemschemeier の方法 (*FEMS Microbiol. Lett.* 2, 47 (1977), *J. Bacteriol.* 173, 6499, (1991)) に従い、ギ酸カリウムとフェノールレッドを含むプレートによるアッセイをおこなった。

#### 4. 研究成果

当初の実験により、大腸菌 *moaD* 突然変異体のギ酸脱水素酵素欠損表現型を相補するクローンが *A. platensis* のゲノム・ライブラリーから複数単離された。相補活性の強いものを選んで塩基配列を決定したところ、いずれもゲノムの NIES39\_Q00200 遺伝子から NIES39\_Q00230 遺伝子の間の領域に由来するものだった。最も短いクローン(クローン3)では、完全なタンパク質コード領域としては NIES39\_Q00220 のみしか含まれていなかった。そこで、この遺伝子のコード領域だけを発現ベクター pTV118 に繋いで *moaD* 変異体に導入し、プレート・アッセイを行ったところ、この遺伝子が *moaD* の表現型の相補に関わっていることが判明した(図1)。

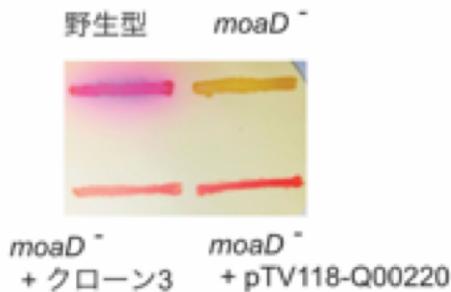


図1. 大腸菌 *moaD* 欠失突然変異体のギ酸脱水素酵素欠損表現型を相補する *A. platensis* のゲノム・クローン。

この遺伝子が大腸菌の *moaD* 突然変異体の表現型を相補するメカニズムとしては、(1) *moaD* 遺伝子の活性を供給してモリブデン補因子を産生できるようにしている可能性と、(2)ギ酸脱水素酵素の活性を供給して、プレート・アッセイをポジティブにしている可能性が考えられる。前者の場合は、ギ酸脱水素酵素の活性意外に、モリブデン補因子を必要とする他の酵素(例えば、硝酸還元酵素)の活性も回復しているはずである。そこで、図1のクローン3を導入した *moaD* 変異体について、塩素酸に対する抵抗性の有無を指標にして硝酸還元酵素の活性が回復しているかどうか調べた。そうしたところ、硝酸還元酵素の活性は回復していなかった。したがって、クローン3はギ酸脱水素酵素の活性を供給していることが示唆された。*A. platensis* のゲノムには、既知のギ酸脱水素酵素と同一性を持つ遺伝子は1つも検出されないため、このクローンにコードされるタンパク質は、これまでに未知だった新しいギ酸脱水素酵素である可能性がある。

クローン3にコードされるタンパク質について、既知のタンパク質との同一性検索を行うと、このタンパク質は NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> 依存

性の short chain dehydrogenase/reductase ファミリーのタンパク質だった。このタンパク質の活性を調べるために、タンパク質のコード領域を T7 プロモーターによる大腸菌での発現ベクターに繋ぎ、大腸菌内でタンパク質を過剰発現させて、発現されたタンパク質を精製した(図2)。

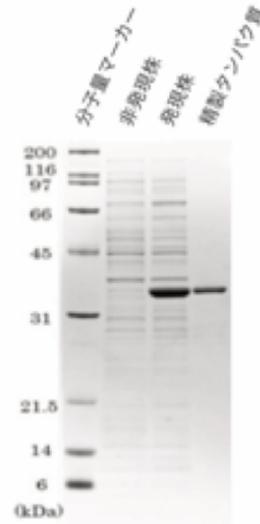


図2. NIES39\_Q00220 タンパク質の大腸菌での発現と精製。

精製されたタンパク質について、ギ酸、NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>を入れた場合と入れない場合で種々の組み合わせで反応を行うと、このタンパク質を入れない場合は何も反応が起こらないが、このタンパク質にギ酸と NADP<sup>+</sup> を加えると 340 nm の吸光度が上昇した(図3紫のグラフ、ギ酸+NADP+Q00220)。しかし、NADP<sup>+</sup>ではなく NAD<sup>+</sup>を加えた場合は何も

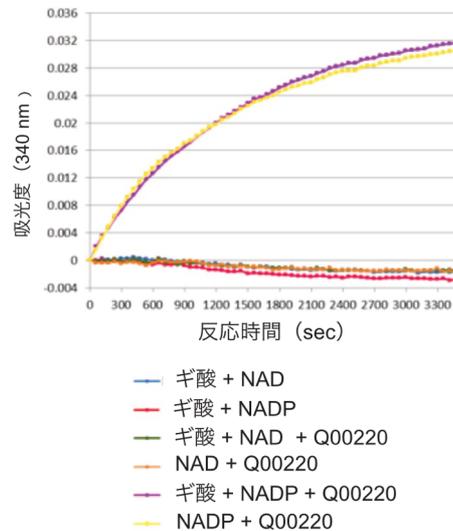


図3. NIES39\_Q00220 の産物の持つ酵素活性

反応が起こらなかった。したがって、この酵素が NADP<sup>+</sup>を使って NADPH を生成する NADP<sup>+</sup>依存性酵素であることが確認された。しかし、一方、ギ酸が無い状態でも NADP<sup>+</sup>の存在下では反応産物が検出された (図 3、黄色のグラフ、NADP+Q00220)。いずれも 340 nm の吸光度の上昇が少ないため、本来の基質が無い状態での副次的な反応が検出されている可能性がある。そこで、ギ酸の代わりに酢酸やリン酸を加えて反応を行ったところ、いずれの場合も同程度の 340 nm の吸光度の上昇がみられた。したがって、この酵素が NAD<sup>+</sup>依存性ではなく NADP<sup>+</sup>依存性であることは明らかだが、ギ酸には非依存性であった。

精製したタンパク質を使った以上の解析から、このクローンがギ酸脱水素酵素ではないことが判明した。そのため、ギ酸脱水素酵素遺伝子を新たに取得するため、大腸菌の *moaD* 突然変異体のギ酸脱水素酵素欠損表現型を相補する *A. platensis* のゲノム・クローンを改めてスクリーニングし直した。

最初のスクリーニングと同様にして指示薬を加えたプレートによるスクリーニングを行い、発色の弱いものも含めて多数のゲノム・クローンを単離した。それらを分類したところ、最初に単離したクローンの領域以外に 3 種類の別の領域から単離されたクローンがそれぞれ複数含まれていた。これら 3 種類のグループについて短いクローンを調べたところ、既知の ORF では、それぞれ、NIES39\_D01090、NIES39\_F00630、および、NIES39\_M02460 のみを含む DNA 領域が相補に関わっていた (図 4)。これらの ORF は前述の NIES39\_Q00220 と同様に、いずれも他の生物の *moaD* 遺伝子との類似性はみられず、アミノ酸配列からはそれぞれ異なる酸化還元酵素をコードしていることが示唆された。これらのタンパク質とギ酸代謝との関係は今後解明していく必要があるが、アルカン合成においてギ酸の代謝を通じて何らかの役割を果たしている遺伝子である可能性がある。

この研究ではギ酸脱水素酵素の相補を検出するためにプレートアッセイ法を利用した。この方法は、以前、ギ酸脱水素酵素の突然変異体の単離のために大腸菌で用いられた方法だが、ギ酸に対する基質依存性のみられないクローンが本研究で単離されたことから、基



図4. *A. platensis* のゲノム・クローンによる大腸菌 *moaD* 突然変異体の表現型の相補。

質特異性の点で問題がある可能性がある。そのため、今後、ギ酸の代謝を調べていくためには、本研究で用いたアプローチ以外に別のアプローチも併せて考慮する必要があるだろう。

本研究では、食用のシアノバクテリアである *A. platensis* (スピルリナ) を研究に利用した。従来、この生物は無菌化が難しく、また、株の凍結保存も不可能であるとされてきたが、本研究の過程でこの生物の無菌化の方法や凍結保存の方法も確立することができた。これらも、本研究の派生的な成果である。

## 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 3 件)

- (1) Shotaro Tadama and Hideaki Shiraishi (2017). Growth of the edible microalga *Arthrospira platensis* in relation to boron supply. *Int. J. GEOMATE*, **12**, 90-95. (査読有)
- (2) Hideaki Shiraishi (2016). Cryopreservation of the edible alkalophilic cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 2051-2057. (査読有)
- (3) Hideaki Shiraishi (2015). Association of heterotrophic bacteria with aggregated *Arthrospira platensis* exopolysaccharides: implications in the induction of axenic cultures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 331-341. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 白石英秋、坂井田彩野. シアノバクテリア *Arthrospira platensis* の滑走運動における個体の螺旋形態の役割. 2017 年 生体運動研究合同班会議 (神戸国際会議場, 2017 年 1 月 6-8 日).
- (2) Shotaro Tadama and Hideaki Shiraishi, Growth of the edible alkalophilic alga *Arthrospira platensis* in relation to boron supply. The Second International Conference on Science, Engineering and Environment (Osaka, Japan; Nov. 21-23, 2016).
- (3) 白石英秋. 食用藍藻 *Arthrospira platensis* の実験手法の整備 — 無菌化と凍結保存法を中心に — ラン藻ゲノム交流会 (東京大学駒場キャンパス, 2016. 6. 25).
- (4) Hideaki Shiraishi. Cryopreservation of the edible filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. 12th Workshop on Cyanobacteria (Tempe, U.S.A: May 19-22, 2016)).

- (5) 白石英秋. 食用藍藻 *Arthrospira* (スピルリナ) の種々の株における, 凍結保存の至適条件の多様性. 日本藻類学会第 40 回大会 (日本歯科大学、東京、2016. 3. 19-20) (藻類, **64**(1), 84 (2016)).
- (6) 白石英秋、田玉翔太郎、廣田翔平、坂井田彩野. *Arthrospira* 属の食用シアノバクテリアの凍結保存方法. 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌コンベンションセンター, 2016. 3. 27~30).
- (7) 坂井田彩野、白石英秋. 繊維状シアノバクテリア *Arthrospira platensis* の滑走運動の解析 第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド, 2015. 12. 1~4).
- (8) Hideaki Shiraishi. Towards genetic manipulation of the edible cyanobacterium *Arthrospira platensis*: Axenic culture production, clonal manipulation, and cryopreservation. 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (Tübingen, Germany: Aug. 2-6, 2015).
- (9) 濱口朋江、廣田翔平、白石英秋. 藍藻に特有の新規 NADP 還元酵素の解析. 日本藻類学会第 39 回大会 (九州大学箱崎キャンパス, 2015. 3. 21~22) (藻類, **63**(1), 71 (2016)).
- (10) Hideaki Shiraishi. Exopolysaccharides produced by *Arthrospira (Spirulina) platensis* and their implications in the induction of axenic cultures. 5th Congress of the International Society for Applied Phycology (Sydney, June 22-26, 2014).

[図書] (計 1 件)

- (1) Shotaro Tadama and Hideaki Shiraishi (2017). Growth of the edible microalga *Arthrospira platensis* in relation to boron supply. In Hossain, Z. (ed), Science, Engineering and Environment (The GEOMATE International Society; Tsu, Japan; ISBN 978-4-9905958-7-6 C3051) pp. 65-70

[その他]

京都大学大学院生命科学研究科ホームページ <http://www.lif.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白石 英秋 (SHIRAISHI, Hideaki)

京都大学大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：90202118