

令和元年8月30日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02836

研究課題名(和文)シアノバクテリアの細胞内電子供給系路の解明と新規芳香族化合物分解株の創成

研究課題名(英文) Elucidation of electron transfer pathway in cyanobacterial cells and production of novel cyanobacterial cells which degrade aromatic compounds

研究代表者

木村 成伸 (Kimura, Shigenobu)

茨城大学・理工学研究科(工学野)・教授

研究者番号：90291608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアは光エネルギーを利用した物質生産や変換に有用な光合成微生物である。本研究では、異種微生物由来のビフェニル分解系電子伝達系タンパク質であるBphA4に電子を供給できるシアノバクテリア *Synechosystis* PCC6803株細胞内タンパク質として、光合成系のフェレドキシン還元酵素およびslr0600遺伝子産物を同定した。また、シアノバクテリアに薬物代謝酵素遺伝子を光依存的に発現させることにより貧栄養環境下でダイオキシン類を水酸化できるシアノバクテリア株を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、シアノバクテリアは太陽光エネルギーを利用した持続可能なエネルギー生産や物質変換を担う生物資源として注目され、バイオ燃料(水素、エタノール、ディーゼル燃料など)生産を目的とした代謝工学的研究が進められている。このような研究では、シアノバクテリアの光合成(光化学)系からの電子をいかに効率的に利用できるかがキーポイントである。本研究の成果は、シアノバクテリアを用いたエネルギー生産や物質変換に必要な電子供給経路の確保などの点から意義深い。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacteria are useful photosynthetic microorganisms for substance production and conversion using light energy. In this study, ferredoxin oxidoreductases and a gene product of slr0600 gene in a cyanobacterium *Synechosystis* sp. PCC6803 were identified as electron donor proteins for BphA3, which is an electron transfer protein in biphenyl degradation system of heterogenous bacterium. In addition, a cyanobacterium, which can hydroxylate a dioxin compound under oligotrophic environment, by photo-inducible expression of heterogenous drug-metabolic enzyme gene.

研究分野：生化学, タンパク質工学, 微生物工学, 代謝工学

キーワード：シアノバクテリア 電子伝達 光合成 フラビン酵素 フェレドキシン 発現制御 バイオレメディエーション

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PCB やダイオキシン類、ベンゼンなどの芳香族環境汚染物質は残留性・毒性が高く、効率的な分解・浄化が求められている。環境中に低濃度で残留している場合には微生物を用いたバイオレメディエーション (生物的環境浄化) が有効と考えられ、多くの芳香族化合物分解微生物が単離されている (Ramos J.-L. et al. (2011) *Trends. in Biotech.* **29**, 641-647)。

報告者らは、これまでに PCB 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株のビフェニル分解系酵素群遺伝子をシアノバクテリアに導入し、環境浄化への応用を目指した研究を進めてきた。*Acidovorax* sp. KKS102 株のビフェニル化合物分解酵素系では、PCB はジオキシゲナーゼ複合体 (BphA1A2) による酸素添加 (水酸化) に始まる一連の反応によって分解される (図 1)。この水酸化反応には NADH からの電子供給が不可欠であり、電子は NADH 特異的電子伝達フラビン酵素である BphA4, Rieske 型低電位フェレドキシン (Fdx) である BphA3 を経て BphA1A2 に供給される。

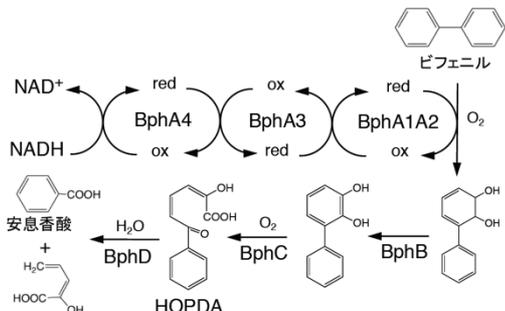


図 1. *Acidovorax* sp. KKS102 株によるビフェニルの分解経路と NADH からの特異的電子供給系

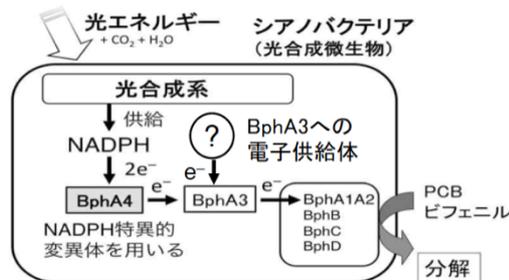


図 2. 貧栄養環境下で PCB を分解できる新規光合成細菌 (研究開始当初の概念図)

NADH は細胞内では主に TCA 回路等で生産される。したがって、糖などの炭素源が少ない貧栄養環境下では、ビフェニル分解のために炭素源 (糖) を供給して分解を進めなければならないという問題があった。報告者は、この問題解決のためにビフェニル分解代謝系酵素群遺伝子を酸素発生型 (植物型) 光合成を行う独立栄養生物であるシアノバクテリアに組み込み、光エネルギーを利用して貧栄養環境下でも効率的に PCB を分解できる新規光合成細菌株の創出に向けた基礎研究を進め (図 2)、分解系遺伝子を導入したシアノバクテリアを用いて、貧栄養環境下でビフェニルを安息香酸にまで分解できることを実証した (特開 2011-10651, 出願人: 茨城大学)。

報告者らは、この研究の過程で意外にもシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株では、BphA4 変異体遺伝子が無くても、ビフェニルが水酸化されることを見だし (西澤ら (2009) *ケミカルエンジニアリング*, **54**, 785-791), シアノバクテリア細胞内に、BphA4 に代わる BphA3 への電子供給系が存在することを明らかにした。本研究開始時までに、報告者らはシアノバクテリアの光合成系フェレドキシン還元酵素 (FNR) が BphA3 への電子供給タンパク候補の 1 つであることを示唆する結果を得ていたが、FNR 以外にも BphA3 への電供給タンパクが存在する可能性があり、その全体像は不明であった。

また、本報告者らは、PCC6803 株へのラット肝臓シトクロム P450 (rCYP) 1A1 の導入も試みており、CYP 還元酵素 (CPR) 無しでダイキシン類化合物である 2-クロロジベンゾ-p-ジオキシン (2-CDD) が水酸化されることを確認していた。CYP ファミリーは多様性に富み、様々な有機化合物を酸化できる酵素群であることから、シアノバクテリアに様々な CYP 遺伝子を導入すれば、貧栄養環境下で多様な環境汚染物質を効率的に分解できるシアノバクテリア株を創出できると期待される。なお、本研究開始時点で、報告者以外にはシアノバクテリアに異種 CYP 遺伝子を導入して利用しようとする試みは為されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を発展させ、応用の可能性を広げるために、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株が持つ異種タンパクへの電子伝達経路と電子伝達の分子機構を解明するとともに、CYP 遺伝子の導入により貧栄養環境下で多様な有機化合物を分解できる新規シアノバクテリア株の創成を目指して、(1) シアノバクテリア細胞内に存在する BphA3 への電子供給経路の解明、及び、(2) CYP 遺伝子導入による環境汚染物質分解性新規シアノバクテリア株の創成と改良を目的とした。

3. 研究の方法

(1) シアノバクテリア細胞内に存在する BphA3 への電子供給タンパク質遺伝子の探索

BphA3 に電子を供給できる *Synechocystis* sp. PCC6803 株細胞内タンパク質遺伝子の探索は、ビフェニル分解細菌 *Acidovorax* KKS102 株のビフェニル分解系酵素群中の BphA1, A2, A3, B, および C の構造遺伝子 (それぞれ、*bphA1*, *A2*, *A3*, *B*, および *C* 遺伝子) を共発現する大腸菌 *E. coli* JM109/pABphA123BC 株を作製し、これを用いた遺伝子スクリーニングによって行った。この方法は、スクリーニング対象のタンパク質の構造遺伝子を大腸菌 JM109/pABphA123BC 株で発現させ、培養液に添加したビフェニルから 434 nm に吸収極大を持つ黄色化合物である 2-

hydroxy-6-oxo-6-phenyl-hexa-2,4-dienoic acid (HOPDA) が生じるかどうかをしらべる方法である。遺伝子スクリーニングの対象となる遺伝子は、シアノバクテリアのゲノム塩基配列データベース CyanoBase 中に登録されている *Synechocystis* PCC6803 株タンパク質遺伝子から選定した。まず、可能性のある電子伝達系タンパク質遺伝子を、「reductase」,「ferredoxin」,「flavodoxin」をキーワードとして検索して 76 遺伝子を選び出した。次に、補酵素の有無と種類、予想される電子伝達機能に基づいて、スクリーニング候補遺伝子を 10 種類に絞り込んだ (表 1)。選定した遺伝子をプラスミド pCW_{ori}⁺ に組み込んで大腸菌用遺伝子発現用プラスミドを作製した。

表 1. スクリーニングに用いた *Synechocystis* PCC6803 株遺伝子

Gene ID	Symbol	Definition
<i>slr0600</i>	NTR	NADP-thioredoxin reductase
<i>slr0898</i>	nirA	ferredoxin-nitrite reductase
<i>slr0963</i>	sir	ferredoxin-sulfite reductase
<i>slr1643</i>	pethH	ferredoxin-NADP oxidoreductase
<i>ssr0330</i>	ftv	ferredoxin-thioredoxin reductase, variable chain
<i>sl10554</i>	ftc	ferredoxin-thioredoxin reductase, catalytic chain
<i>sl10248</i>	isiB	flavodoxin
<i>sl10741</i>	nifJ	pyruvate flavodoxin oxidoreductase
<i>sl11221</i>	hoxF	diaphorase subunit of the bidirectional hydrogenase
<i>sl11454</i>	narB	ferredoxin-nitrate reductase

Synechocystis PCC6803 株では、*slr0643* 遺伝子から長鎖型および短鎖型の NADP⁺-フェレドキシン酸化還元酵素 (それぞれ、FNR_L および FNR_S) の 2 つのアイソザイムが生じることから、*slr0643* 遺伝子については、FNR_L および FNR_S を産生するための発現プラスミドをそれぞれ作製した。また、*ssr0330* 遺伝子と *sl10554* 遺伝子については、それぞれフェレドキシン-チオレドキシン還元酵素の可変鎖と定常鎖を暗号化していることから、両者を共発現する発現プラスミドも作製した。

これら 12 種類の発現プラスミドを JM109/pABphA123BC 株に組み込み、得られた大腸菌株を 50 µg/mL のアンピシリンおよび 20 µg/mL のクロラムフェニコールを含む LB 培地中、遺伝子発現誘導剤である 0.2 mM の IPTG を添加して 37°C で 8 時間培養した。菌体を、濁度 (D_{600}) が 2.0 になるように培養上清に分散し、1 mM のビフェニルを添加した。37°C で 1 時間浸透した後、培養上清の 434 nm における吸光度 (A_{434}) を測定し、ビフェニルを添加しなかったときの A_{434} との差から HOPDA の生成量を見積もった。

(2) 遺伝子組換え型大腸菌株の作製と培養

大腸菌を用いたスクリーニングで得られた候補遺伝子産物の BphA3 還元活性の有無は、大腸菌 BL21 株を宿主に用いて作製した遺伝子組換え型タンパク質を精製してしらべた。候補遺伝子の大量発現用大腸菌株は、上記 3. (1) で作製した候補タンパク質遺伝子の発現用プラスミドで、を形質転換して作製した。作製した大腸菌株 (BL21/pCFNR_L, BL21/pCFNR_S, BL21/pCNTR 株) を 50 µg/mL のアンピシリンを含む 2×YT 培地中、37°C で終夜震盪培養して得た培養物を体積比で 1/200 になるように 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 培地 (LB-Amp 培地) に植菌し、37°C で 1.5 h 震盪培養した。IPTG を 0.2 mM になるように培養液に添加して遺伝子発現を誘導した後、BL21/pCFNR_L 株と BL21/pCFNR_S 株については 23 h、BL21/pCNTR 株については 16 h 培養した。

(3) 遺伝子組み換え型電子供給候補タンパク質の精製

① 遺伝子組換え型 FNR_L 及び FNR_S の精製

培養して得た BL21/pCFNR_L 株菌体を、2% (w/v) グリセロールおよび 2 mM のフッ化フェニルメチルスルファニルを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、0°C で音波処理して破砕した。遠心分離して得た上清画分を、1 mM EDTA と 2% (w/v) グリセロールを含む 10 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) (緩衝液 A) で希釈し、同緩衝液で平衡化した DE52 (Whatman) 陰イオン交換カラムにかけ、緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を 0 から 0.5 M まで直線的に上げることによって吸着物を溶出した。目的物を含む黄色画分を分画して硫酸アンモニウムで塩析した。硫酸アンモニウム濃度 2.0-3.0 M の沈澱画分を回収し、緩衝液 A を用いて透析した。透析後の溶液を、Blue-Sepharose 6 Fast Flow 群特異的アフィニティークロマトグラフィー用カラムにかけ、緩衝液 A でカラムを洗浄後、0.2 M の塩化ナトリウムを含む同緩衝液で目的物を溶出した。溶出物を緩衝液 A で希釈して再度短い DE52 カラムに吸着させ、0.2 M の塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出して濃縮した。得られた精製物は、SDS-PAGE で分子量約 46 kDa の位置にほぼ単一バンドを示した。FNR_L 精製物の濃度は、450 nm における分子吸光係数 $8.99 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ を用いて決定した。

遺伝子組換え型 FNR_S は、DE52 クロマトグラフィーからの溶出画分を緩衝液 A で透析し Amicon Ultra-15 を用いた限外濾過によって濃縮して Blue-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) カラムにかけたこと以外は、FNR_S と同じ方法で BL21/pCFNR_S 株菌体破砕物の上清から精製した。精製物は SDS-PAGE で分子量約 35 kDa の位置に、ほぼ単一バンドを示した。FNR_S 精製物の濃度も、450 nm における分子吸光係数 $8.99 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ を用いて決定した。

② 遺伝子組換え型 *slr0600* 遺伝子産物の精製

遺伝子組換え型 *slr0600* 遺伝子産物は、BL21/pCNTR 株菌体を、上述の FNR_L 及び FNR_S の精製の場合と同じ方法で、菌体の音波処理後の上清から精製した。上清画分を緩衝液 A で平衡化した DE52 カラムにかけ、0.1 M の塩化ナトリウムを含む緩衝液 A でカラムを洗浄した後、緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を 0.1 M から 0.3 M まで直線的に上げることによって吸着物を溶出した。SDS-PAGE で分子量約 36 kDa の位置にバンドを示した黄色の溶出画分を分画した。この溶出画分を緩衝液 A で希釈して再度短い DE52 カラムに吸着させ、0.5 M の塩化ナトリウムを含む緩衝液

で溶出して濃縮した。濃縮液を、緩衝液 A を溶出液に用いて Sephadex G-100 (GE Healthcare) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、高分子量側の共雑物を除去するとともに脱塩した。得られた画分を、緩衝液 A で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィー用 POROS GoPure D Pre-packed Column (Thermo Fischer Scientific) にかけ、AKTA prime plus クロマトグラフィーシステム (GE Healthcare) を用いて緩衝液 A 中の塩化ナトリウム濃度を 0.1 M から 0.2 M まで直線的に上げることによって、目的物のアポ体とホロ体を分離した。食塩濃度約 0.15 M で溶出したホロ体のみを含む画分を分画し、Sephadex G-25(fine) カラムで 1 mM EDTA を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液でゲル濾過して、SDS-PAGE でほぼ単一バンドを示す精製画分を得た。

(4) 遺伝子組換え型 FNR_L, FNR_S, および *s1r0600* 遺伝子産物の BphA3 還元活性

遺伝子組み換え型 FNR_L, FNR_S, および *s1r0600* 遺伝子産物の BphA3 還元活性の確認は、ウマ心筋シトクロム *c* (Cyt *c*) を遺伝子組換え型 BphA3 から的人為的電子受容体に用いて、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で行った。Cyt *c* の還元は、還元に伴う 550 nm における吸光度の増加 (ΔA_{550}) を測定してしらべた。約 30 μM の Cyt *c* を含む反応溶液に、電子供与体として NADPH, NADH, グルタチオンをそれぞれ、500 μM , 500 μM , 5 mM になるように、また、BphA4, FNR_L, FNR_S を 10 nM, *s1r0600* 遺伝子産物を 20 nM, BphA3 を 10 nM になるように順に加えながら ΔA_{550} を経時的に観測することによって BphA3 の還元活性と電子伝達経路を解析した。

シアノバクテリア細胞内と同程度の濃度の NADH, NADPH 存在下での定常状態における BphA4, FNR_L, FNR_S の BphA3 還元活性の見かけの酵素動力学的パラメーターである K_m^{A3} , k_{cat}^{A3} は、BphA3 からの電子受容体に Cyt *c* を用いて、その還元速度を測定することによって BphA3 の還元速度を見積もった。Cyt *c* の還元速度は、還元に伴う 550 nm における分子吸光係数の差 $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて算出し、BphA3 の還元速度は、BphA3 存在下での見かけの Cyt *c* の還元速度から、BphA3 非存在下での Cyt *c* の還元速度を差し引いて算出した。測定は 10 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、好氣的条件下 25°C で行った。電子供与体として NADH と NADPH を混合して用い、NADH 濃度を 100 μM , NADPH 濃度を 500 μM とした。シトクロム *c* 濃度は 30 μM , BphA4, FNR_L, FNR_S の濃度は 10 nM とし、BphA3 濃度を 0 から 40 μM の範囲で変化させて Cyt *c* の還元速度を測定した。算出した BphA3 の還元速度をミカエリス-メンテン式に直接フィッティングすることによって K_m^{A3} , k_{cat}^{A3} を見積もった。

(5) CYP 遺伝子発現シアノバクテリア株の作製とダイオキシン分解活性の測定

シアノバクテリア細胞内で、N 末端側膜結合領域を除去したラット肝臓シトクロム P450 (rCYP) 1A1 遺伝子を *tac* プロモーター制御下に発現するプラスミド pVLCYP, および rCYP1A1 遺伝子と rCYP1A1 への電子供給のためのヒト肝臓シトクロム P450 還元酵素 (hCPR) 遺伝子を *tac* プロモーター制御下に共発現するプラスミド pVLYPR は、大腸菌細胞内で *tac* プロモーター制御下に rCYP1A1 遺伝子と hCPR 遺伝子を共発現するプラスミド pCW_{ori}⁺-ratCYP1A1-hCPR (Shinkyo, R. *et al.* (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 584-590) のプロモーターと構造遺伝子領域を PCR で増幅して、シアノバクテリア用発現プラスミド pVZ321 に組み込むことによって作製した (表 2)。また、シアノバクテリア細胞内で、光誘導型の *psbE* プロモーター制御下に rCYP1A1 遺伝子を発現するプラスミド pVECYP, および rCYP1A1 遺伝子と hCPR 遺伝子を共発現するプラスミド pVEYPR は、pVLCYP および pVLYPR のプロモーター領域を、それぞれ PCC6803 株由来の *psbE* プロモーターに置換することによって作製した。作製したプラスミドを用いて Zinchenco の方法 (Zinchenco, V.V. *et al.* (1999) *Russian J. Genetics.* **35**, 228-296) で PCC6803 株を形質転換し、2-CDD 分解性シアノバクテリア株を作製した。

表 2. 作製したプラスミド

プラスミド	プロモーター	発現誘導	発現遺伝子	
pVLYPR	<i>tac</i>	IPTG	<i>rCYP1A1</i>	<i>hCPR</i>
pVLCYP	<i>tac</i>	IPTG	<i>rCYP1A1</i>	
pVEYPR	<i>psbE</i>	光	<i>rCYP1A1</i>	<i>hCPR</i>
pVECYP	<i>psbE</i>	光	<i>rCYP1A1</i>	

作製したシアノバクテリア株の 2-CDD の水酸化活性は、シアノバクテリア培養液に 2-CDD を添加し、HPLC を用いて 2-CDD の代謝物を定量することによってしらべた。BG11 培地中、照度 40 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の照射下、二酸化炭素濃度 0.3%, 湿度 30%, 30°C で震盪培養したシアノバクテリアを、BG11 培地に D_{660} が 1.0 になるように分散し、濃度が 0.1 mM になるように 2-CDD を加えて同じ条件下で 12 時間震盪培養した。なお、*tac* プロモーターを用いた発現株の場合には、0.2 mM の IPTG で遺伝子発現を誘導して 12 時間培養した。培養液をクロロホルム-メタノール (3:1) で抽出し、減圧乾固してアセトニトリルに溶解した後、Inertsil-ODS3 逆相セミアミクロ HPLC カラムを装備した日立 L-2000HPLC システムを用いて水酸化 2-CDD を定量した。

4. 研究成果

(1) シアノバクテリア細胞内に存在する BphA3 への電子供給タンパク質の同定

シアノバクテリア由来の BphA3 還元タンパク質を探索するために、表 1 に示した *Synechocystis* PCC6803 株遺伝子産物について大腸菌を用いた遺伝子スクリーニングを行った。このスクリーニングでは、大腸菌内で BphA3 に電子を供給できるタンパク質が合成されると、ビフェニル代謝物である HOPDA が生成するために大腸菌培養上清の 434 nm の吸光度が増加する。スクリーニングの結果、大腸菌株にプラスミド pCFNR_L, pCFNR_S および pCNTR を共存させた場合

に、BphA4 の発現プラスミドである pCA4 を共存させた場合と同程度の明らかな吸光度の増加が観測された。これに対して、その他のプラスミドを共存させた場合には吸光度はほとんど増加しなかった (図 3)。この結果から、PCC6803 株の *slr1643* 遺伝子産物である FNR_L と FNR_S、および *slr0600* 遺伝子産物である NTR が、BphA3 への電子供給体であることが示唆された。なお、*Synechocystis* PCC6803 株の NTR は、ゲノムデータベース中では NADPH-チオレドキシン還元酵素とされているが、NADPH とは結合せず、グルタチオンなどで還元されることが報告されているタンパク質である。

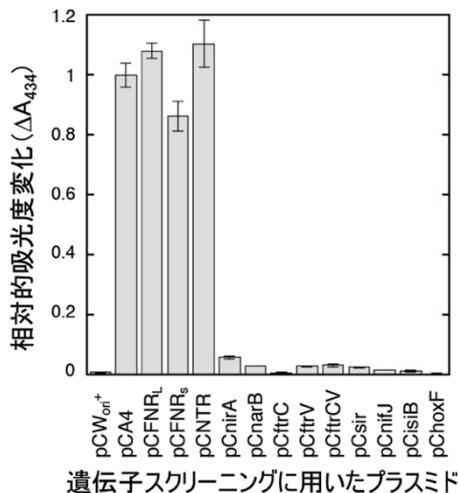


図 3. 大腸菌を用いた BphA3 還元タンパク質遺伝子のスクリーニング結果

これらの遺伝子産物が BphA3 を還元できることを確認するために、ほぼ単一にまで精製した遺伝子組換え型 FNR_L、FNR_S、および NTR を用いて BphA3 還元活性の有無を確認した (図 4)。その結果、FNR_L と FNR_S は NADPH からの電子を、NTR はグルタチオンからの電子を BphA3 に供給できることが明らかとなった。FNR_L と FNR_S については、シアノバクテリア細胞内と同程度の NADH、NADPH 濃度での BphA3 に対する定常状態における見かけの酵素動力学パラメーターを測定した (表 3)。FNR_L と FNR_S は同程度の BphA3 還元活性を示し、これらの BphA3 に対する見かけの触媒効率 k_{cat}^{A3}/K_m^{A3} は、BphA4 の 5% 以下であった。

以上の結果から、*Synechocystis* PCC6803 株細胞内で、光合成系のフェレドキシン還元酵素である FNR_L、FNR_S、およびシアノバクテリアに特徴的なグルタチオン依存性の NTR が BphA3 に電子を供給していることが明らかとなった。シアノバクテリアの NTR は NADPH ではなくグルタチオンから電子を受容し、結晶中では 1 分子あたり 2 分子の FAD が結合しているユニークなフラビンタンパク質であるが、生理的役割に不明な点が多い。NTR が Rieske 型フェレドキシンである BphA3 への電子供給体であるという今回の知見は、シアノバクテリア細胞内の還元型グルタチオンから異種タンパク質へ電子供給系路の存在を明らかにしただけでなく、NTR の生理的電子受容体とその役割を解明する上で有用な知見である。

(2) CYP 遺伝子導入による環境汚染物質分解性新規シアノバクテリア株の作製

作製したシアノバクテリア株の 2-CDD の水酸化活性を図 5 に示す。rCYP1A1 遺伝子を発現させたシアノバクテリア株は、rCYP1A1 への電子供給体である rCPR 遺伝子の有無にかかわらず、2-CDD のピークが観測された。このことから *Synechocystis* PCC6803 株内にシアノバクテリア由来の rCYP1A1 への電子供給経路があることが示唆された。*tac* プロモーターを用いた発現プラスミドでは、hCPR 遺伝子を共発現させた場合のほうが rCYP1A1 単独の場合の約 2 倍量の水酸化 2-CDD が観測された。これに対して、光誘導型の *psbE* プロモーターを用いた場合には、hCPR 遺伝子の有無による差はみられず、*tac* プロモーターを用いた場合の約 30% 以上の水酸化活性を保持していた。光誘導型プロモーターを用いたシアノバク

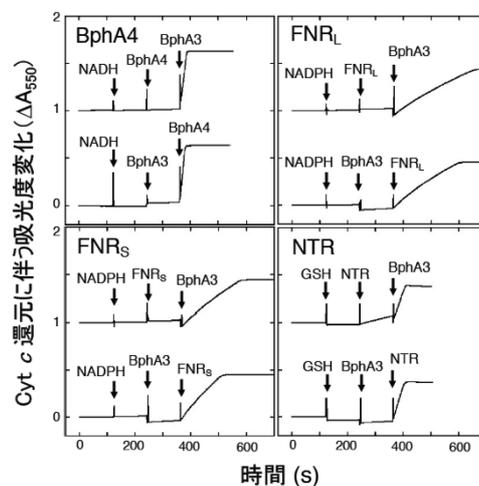


図 4. 遺伝子組換え型 FNR_S、FNR_L、NTR の BphA3 還元活性の確認

表 3. 定常状態における BphA3 還元活性の見かけの酵素動力学パラメーター

enzyme	K_m^{A3} (μM)	k_{cat}^{A3} (s^{-1})	k_{cat}^{A3}/K_m^{A3} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
BphA4	2.20 ± 0.195	156 ± 9.18	71.0 ± 3.58
FNR _L	17.6 ± 6.23	19.7 ± 2.50	1.18 ± 0.275
FNR _S	15.6 ± 7.22	35.4 ± 7.20	2.50 ± 0.770

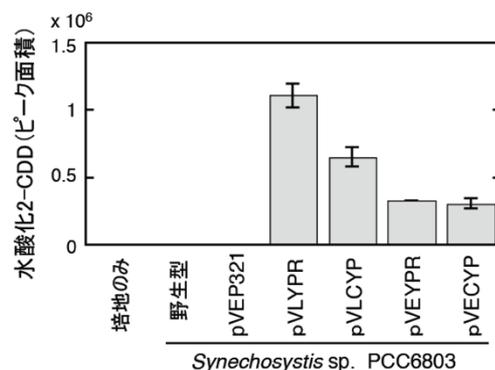


図 5. rCYP 遺伝子導入シアノバクテリア株により生成された水酸化 2-CDD 量

テリア株発現系では、IPTG のような発現誘導剤の添加が不要であり、水酸化活性も *tac* プロモーターを用いた場合とほぼ同等であり、その有用性を明らかにすることができた。

(3) 研究成果のまとめ

本研究では、光合成微生物であるシアノバクテリアを用いた炭素源の乏しい貧栄養環境下での芳香族性環境汚染物質のバイオレメディエーションを目指したこれまでの研究成果を進展させ、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株が持つ異種タンパクへの電子伝達経路のいくつかを明らかにすることができた。また、CYP 遺伝子の導入によりダイオキシン類の1つである 2-CCD を分解できる光誘導型発現系を利用した新規シアノバクテリア株を作製した。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計9件)

- ①深沢涼子 他3名, シトクロム P450 遺伝子導入シアノバクテリアによる 2-クロロ-ジベンゾ-p-ジオキシンの水酸化, 第29回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2018年
- ②鈴木崇章 他2名, *Synechocystis* sp. PCC6803 由来ジフラビン結合ジスルフィド酸化還元酵素のグルタチオン依存的 BphA3 還元活性, 第29回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2018年
- ③鈴木崇章 他2名, *Synechocystis* sp. PCC6803 由来ジフラビン結合ジスルフィド酸化還元酵素による BphA3 の還元, 第91回日本生化学会大会, 2018年
- ④Akito Nishizawa and 8 authors, Biphenyl degradation by recombinant cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in oligotrophic environment. *19th International Symposium on Flavins and Flavoproteins*, 2017
- ⑤深沢涼子 他6名, 光誘導型発現プロモーターを用いたシアノバクテリア細胞内での NADPH-P450 還元酵素の共発現, ConBio2017(2017年度生命科学系合同年次大会), 2017年
- ⑥鈴木崇章 他7名, NADPH 特異的 *bphA* 遺伝子群導入シアノバクテリア株のビフェニル水酸化活性, ConBio2017(2017年度生命科学系合同年次大会), 2017年
- ⑦菊池雅志 他4名, 大腸菌を用いた *Synechocystis* sp. PCC6803 由来 BphA3 還元タンパクの探索, 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016年
- ⑧伴野晴香 他2名, シアノバクテリアの SD 非依存的遺伝子発現に寄与する開始コドン上流塩基配列, BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 2015年
- ⑨川又寛子 他3名, フェレドキシン還元酵素 BphA4-フェレドキシン bphA3 間の特異的分子認識に関する BphA4 分子表面の正電荷領域, BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会), 2015年

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: 芳香族化合物分解能を有する光合成生物および芳香族化合物分解方法

発明者: 木村成伸、西澤明人、菓子野康浩、福田雅夫

権利者: 国立大学法人 茨城大学

種類: 特許

番号: 特許第 5751756 号

取得年: 2015 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/12/0001143/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 五十嵐 淑郎

ローマ字氏名: IGARASHI SHUKURO

研究協力者氏名: 小野 高明

ローマ字氏名: ONO TAKAAKI

研究協力者氏名: 生城 真一

ローマ字氏名: IKUSHIRO SHINICHI

研究協力者氏名: 千田 俊哉

ローマ字氏名: SENDA TOSHIYA