

機関番号：22604

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2008～2010

課題番号：20200030

研究課題名（和文） 大腸菌をプラットフォームにした光合成機能の再構成

研究課題名（英文） Reconstitution of photosynthetic reactions of the phototrophic proteobacteria in *E. coli*

研究代表者

加藤 潤一 (KATO JUNNICHII)

首都大学東京 大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：10194820

研究成果の概要（和文）：光合成細菌の光合成機能を大腸菌で再構成するために、光合成関連遺伝子群を、新しく構築した外来遺伝子群を大腸菌の転写、翻訳に必要な配列と連結した形で、大腸菌の染色体、プラスミドに連続的にクローニングするシステムを用いて大腸菌に導入した。光合成に必須な色素である種々のカロテノイド合成の再構成に成功し、バクテリオクロロフィルの中間体であるクロロフィライド *a* 合成の再構成にも世界で初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：We developed a sequential cloning system for cloning and expression of the large gene cluster. Using this system we cloned and introduced the photosynthesis gene cluster of photosynthetic bacteria into the *E. coli* chromosome and plasmid. We succeeded in reconstitution of the biosynthesis of some carotenoids and of an intermediate of the bacteriochlorophyll, chlorophyllide *a*.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,200,000 | 2,460,000 | 10,660,000 |
| 2009年度 | 7,700,000 | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 2010年度 | 7,700,000 | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 23,600,000 | 7,080,000 | 30,680,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：微生物ゲノム、色素体機能・光合成、光合成細菌

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムサイエンスの進歩によりバクテリアゲノムの大規模改変が可能になり、染色体大規模欠失株の作製、さらには異種生物の全ゲノムのクローニングなどが行われるようになった。応用面でもこれらの技術が新たな産業用宿主の開発などに利用されるようになってきた。しかしこれらのゲノムの大規模な改変、導入は、ただちに機能と結びつくものにはなっていない。バクテリアの "Synthetic Biology" の次の鍵となる重要なステップは、このゲノム改変技術の進歩を土台

にした生物機能の再構成である。

(2) プロテオバクテリアの紅色細菌は多系統群であり、非光合成性の細菌を含めた全細菌系統の中に散在することから、これらの光合成能は独立に生じたのではなく、全ての細菌の祖先が光合成性であったとも考えられている。また紅色光合成細菌の光合成関連遺伝子群はクラスターを形成しており、進化的に遺伝子群の水平移動による伝播の可能性が強く示唆されている。これらのことから紅色細菌の光合成機能の大腸菌における再構

成は充分可能であると考えられるが、単なる遺伝子群の導入だけでは機能の再構成は難しく、それぞれの遺伝子についてのファインチューニングが必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は紅色光合成細菌の光合成機能の再構成を、大腸菌をプラットフォームにして試みるもので、大腸菌のゲノムサイエンス技術と紅色光合成細菌のバイオエナジェティクスを融合させた新しい取り組みである。分子生物学的に最も理解が進み、また技術的にも多くの手法が開発されてきた大腸菌をプラットフォームにすることにより、これまでにない切り口の光合成システムの解析が可能になる。同時に応用面でも効率的な光エネルギーの利用に道を拓くものである。

3. 研究の方法

紅色光合成細菌の光合成関連遺伝子群を、カロテノイド合成、バクテリオクロフィル合成、光捕集アンテナ複合体形成、光化学反応中心複合体形成、水溶性のチトクロム c2 合成、チトクロム bc1 複合体形成の各素過程に分けて、順次大腸菌の染色体もしくはプラスミドにクローニングし、適宜 RT-PCR により転写レベルの遺伝子発現のチェックをするとともに個々の反応についてモニターしながら、それぞれの素過程を再構成し、最終的にはそれらを組み合わせることで光合成反応全体の再構成を試みる。

4. 研究成果

(1) 多数の外来遺伝子群を発現する形で連続的にクローニングするシステムの構築

① 連続的クローニングシステムの構築

最もよく光合成関連遺伝子群についての解析が進んでいる *Rhodobacter sphaeroides* の、光合成関連遺伝子クラスターは 60Kb 以上にわたる長い領域に存在する。また光化学反応中心複合体などは細胞膜に存在するので、過剰生産させると生育が悪くなる可能性が考えられる。従って多くのオペロンを含む長い領域を、大腸菌の染色体や低コピープラスミドにクローニングすることが可能なシステムを構築した (図1)。

このシステムでは、遺伝子クラスターの端の領域(A)と、FLP-FRT 部位特異的組換えの組換え部位である FRT を、クロラムフェニコール耐性遺伝子をマーカーにして染色体に組込んだ菌株を最初に作製する。次に通常の菌株では複製できないプラスミドに遺伝子クラスター領域(A-B-C)をクローニングして上記の菌株に導入し、領域(A)における相同的組換えによりプラスミドが染色体に組込まれた菌株を単離する。その後で FLP-FRT 部位特異的組換えの組換え酵素 FLP の遺伝子を

クローニングしたプラスミドを導入することにより、FRT-FRT 間を欠失させる。この操作を繰り返すことによって、長い領域についてもクローニングが可能である。

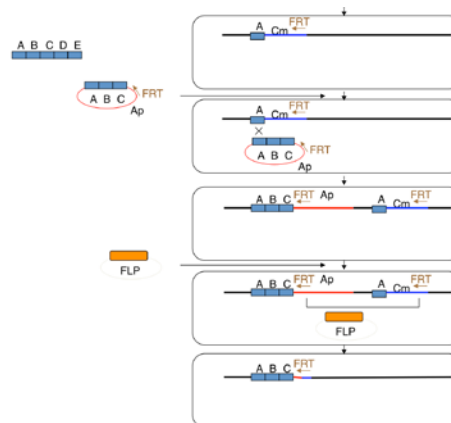


図1 連続的クローニングシステム

② 大腸菌で発現する形で染色体または低コピープラスミドへ連続的にクローニングするシステムの構築

系統的に大腸菌と離れた細菌の遺伝子は、大腸菌に導入しても発現しないことが多い。大腸菌で発現させるためには、大腸菌のプロモーター、SD 配列と連結させる必要がある。また連結させる場合、SD 配列と開始コドンの長さは重要であることが多いので、クローニングするオペロンの最初の遺伝子の開始コドンが大腸菌の開始コドンと一致するように連結させるのが最適である。

そこで発現をコントロールできる大腸菌のプロモーター、SD 配列、開始コドンの領域と、発現させるオペロンの最初の遺伝子の開始コドンが大腸菌の開始コドンと一致するように連結させた DNA 断片を、PCR を繰り返すことにより作製し、それを単位とした上記の連続的クローニングシステムによりクローニングするシステムを構築した。

③ 大腸菌で発現する形で高コピープラスミドへの連続的にクローニングするシステムの構築

染色体や低コピープラスミドでなくても多コピープラスミドにクローニングできる場合には、多コピープラスミドの方が高い活性を期待できる。そこで長い領域に存在する多くのオペロンを連続的に多コピープラスミドへクローニングするシステムを構築した。

まず上記と同様に PCR を繰り返すことにより、大腸菌のプロモーター、SD 配列、開始コドンの領域を、発現させるオペロンの最初の遺伝子の開始コドンが大腸菌の開始コドンと一致するように連結させた DNA 断片に、さらに薬剤耐性遺伝子をマーカーとして

る形でクローニングした多コピープラスミドを導入したところ、少量ながら Chlorophyllide *a* の合成が確認できた。

これまで大腸菌において種々のカロテノイドを合成させた報告はあるが、バクテリオクロロフィルについては少なく、特に DV-protochlorophyllide 以降の合成については報告がない。本研究における Chlorophyllide *a* の大腸菌における生合成は世界で初めての例である。これは単なるクローニングではなく、オペロンの最初の遺伝子の開始コドンが大腸菌の開始コドンと一致するように正確に連結させるなどの方法を駆使した、多数のオペロンの発現する形でのクローニングの結果であると考えられる。

② 大腸菌の関連遺伝子群の改変

大腸菌で再構成を試みるメリットの1つは豊富な知見、変異株などを利用できる点である。tolC 遺伝子の欠損株では porphyrin が蓄積することが報告されていたので、上記の菌株に tolC 遺伝子の欠損を導入したところ、バクテリオクロロフィルの中間体の量の増大が確認できた。また visA (*hemH*) 遺伝子の欠損株では Protoporphyrin の蓄積が報告されているので、visA 遺伝子破壊株を作製したが、生育が著しく悪いため、一時的に発現を低下させることを考えて、発現をコントロールできる菌株を作製した。

(4) 光合成関連遺伝子群の発現調節機構の解析

光合成細菌の遺伝子を導入する時に、本研究で構築したクローニングシステムを用いることによって、導入した遺伝子群を大腸菌で発現させることが多くの場合になされた。しかし上記のようにそれらの遺伝子から作られる酵素が機能しない場合もあった。市販されている、コドンの違いを補う大腸菌株やシャペロンを増強した菌株なども試してみたが、今までのところほとんど効果は認められなかった。これまでに有効だったのは、系統的により大腸菌に近い光合成細菌の遺伝子を利用することであり、β-プロテオバクテリアである光合成細菌 *R. gelatinosus* の遺伝子の利用が効果的であった。そこで今後さらに大腸菌に近い、γ-プロテオバクテリアである光合成細菌 *A. vinosum* の遺伝子の利用を考えて、その準備段階として *A. vinosum* の光合成関連遺伝子群の発現についての解析を行った。

光合成関連遺伝子の 11 個のオペロンのプロモーター領域を大腸菌の染色体上の lacZ 遺伝子と融合させた菌株を作製して発現量について調べたところ、発現の程度に差はあるものの 8 個のオペロンについては大腸菌内で発現することが分かった。

また再構成にあたって光合成関連遺伝子のプロモーターをそのまま使う場合には、それらの発現調節機構を明らかにする必要があるが、*A. vinosum* ではまだ解析が進んでおらず、また DNA の導入や染色体の改変がまだできないために *A. vinosum* を直接用いた解析が難しいので、大腸菌を用いて発現調節機構についての解析を試みた。まず種々の光合成細菌で共通の調節機構である PpsR リプレッサーによる抑制については、*A. vinosum* の *ppsR* 遺伝子と予想された遺伝子、*Alvin_2644*、をプラスミドにクローニングし、それを大腸菌に導入して調べたところ、大腸菌内で発現した 8 個の光合成関連遺伝子プロモーターのうち 7 個について発現の抑制が見られた。また多くの光合成細菌では、Crp-fnr family のタンパク質である FnrL により光合成関連遺伝子の発現が促進されることが知られているので、Crp-fnr family のタンパク質をコードする *Alvin_171*, *388*, *678*, *1148*, *1149*, *2001*, *2313*, *2496*, *3071* の 9 個の遺伝子をプラスミドにクローニングし導入して調べたところ、*Alvin_171*, *2313* の 2 つの遺伝子により発現の促進が見られた。大腸菌の遺伝子による調節についても、嫌気条件で転写を促進する *fnr* や、活性酸素に応答する *oxyR*, *soxR* 遺伝子の欠失株を作製して調べたが、発現に変化は見られなかった。光合成細菌では発現調節因子として 2 つの Crp-fnr family のタンパク質をコードする遺伝子が同定された例はないので、それらの機能、機能分担については興味深い。

(5) 大腸菌染色体大規模欠失株の作製

大腸菌で光合成機能を再構成するためには、カロテノイド、バクテリオクロロフィルの両方の色素を合成させなくてはならず、そのためにはかなりの還元力、エネルギーが必要であると予想される。そのためには所謂ミニマムゲノムファクトリー、すなわちゲノムを大規模に欠失させて、不要なエネルギーの消費、不要な遺伝子発現調節機構を欠損させた菌株の利用が有効であると考えられる。我々は大腸菌の生育に必須でない遺伝子群を欠失させることによって、染色体を大幅に欠失させて、ゲノムを大きく縮小させた菌株を作製してきており、これまでに野生株の約 30% の領域を欠失させた菌株の作製に成功している。本研究では染色体をさらに大きく欠失させた菌株の作製を行った。

① 染色体欠失システムの改良

これまでは相同的組換えを利用した欠失変異作製システムを用いて来たが、目的の欠失変異が作製できにくくなってきたため、相同的組換えに加えて、部位特異的組換えを加え、また少数の組換え体を選択できるように、

negative selection マーカーとして *rpsL* 遺伝子を利用したシステムを構築した (図 4)。

このシステムでは、まず欠失させる領域の両端の領域(A, B)と、FLP-FRT 部位特異的組換えの組換えサイトである FRT、クロラムフェニコール耐性遺伝子マーカーを連結させた DNA 断片を作製し、これを用いて欠失変異を作製する。次にこの菌株では複製できないプラスミドに、欠失させる領域の両端の領域(A, B)と *rpsL* 遺伝子をクローニングし、それを導入することにより、領域(A)における相対的組換えによりプラスミドが染色体に組込まれた菌株を単離する。その後で FLP-FRT 部位特異的組換えの組換え酵素 FLP の遺伝子をクローニングしたプラスミドを導入して FRT-FRT 間を欠失させ、さらに相対的組換えによりマーカー遺伝子などが欠失した菌株を、*rpsL* 遺伝子による negative selection を利用してストレプトマイシン耐性株として得る。

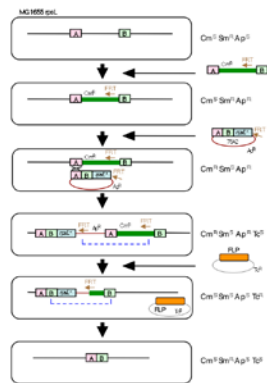


図 4 染色体大規模欠失変異作製システム

② 大腸菌染色体大規模欠失株の作製

上記の方法により残っていた外来遺伝子群であるプロファージ領域などを欠失させて、野生株の約 40% の染色体領域を欠失させた菌株の作製に成功した。



図 5 作製した染色体大規模欠失株

(6) 大腸菌の酸化ストレス耐性機構の解析

大腸菌で光合成機能を再構成する際には、電子伝達に伴う酸化ストレスに対する耐性機構が重要になり、また好氣的、嫌氣的などの培養条件が光合成に大きな影響を与える。

酸化ストレス耐性機構については、これまでに SOD (Superoxide dismutase) や Catalase など、活性型酸素を減少させるための酵素群や、細胞質を還元状態に保つための thioredoxin, glutathione などが知られているが、まだよくわかっていない部分も多い。特に定常期における酸化ストレス耐性機構については、明らかにされていない点が多い。

大腸菌の定常期における生存機構に欠損を持つ変異株はこれまであまり単離されていないが、その理由の一つとしては、定常期における生存を支えるシステムが複数存在するために、一つのシステムが欠損しても表現型が見られない可能性が考えられる。そのような複数のシステムが支える過程の解析には、多くの遺伝子を欠失しているために多くのシステムに欠損を持つ染色体大規模欠失株の利用が有効であると考えられる。

我々が作製した一連の染色体大規模欠失株を嫌氣的、好氣的に培養した時の定常期における酸化ストレス耐性について調べたところ、あるところまで欠失させた菌株では酸化ストレス耐性にほとんど変化が見られなかったが、一部の欠失変異株では非常に感受性になっていることがわかった (図 6, 7)。嫌氣的、好氣的に培養した時には、最も感受性になる欠失株が異なり、それぞれの条件での酸化ストレス耐性機構が違っていることが示唆された。またさらに欠失させると徐々に耐性にも戻ることがわかった。このうち感受性になる原因となっている 1 つの欠失変異の解析からは新規遺伝子が同定され、定常期における酸化ストレス耐性機構について新しい知見が得られた。今後さらに詳細に調べることによってさらに今まで野生株の解析からは明らかにされてこなかった機構が明らかになるものと思われ、光合成の再構成にはこれらの知見が重要になると考えられる。

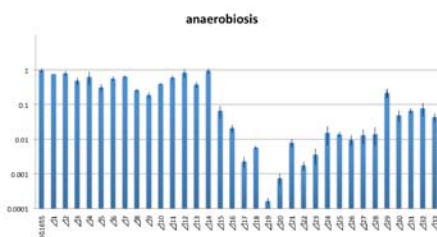


図 6 染色体大規模欠失株を嫌氣的に培養した時の酸化ストレス耐性

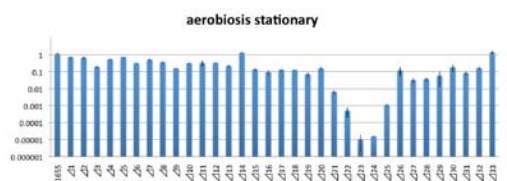


図 7 染色体大規模欠失株を好氣的に培養した時の酸化ストレス耐性

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 Nagashima S, Shimada K, Vermeglio A, Nagashima KVP (2011) The cytochrome c8 involved in the nitrite reduction pathway acts also as electron donor to the photosynthetic reaction center in *Rubrivivax gelatinosus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807(2). 189-196

② Ohmine M, Matsuura K, Shimada K, Alric J, Vermeglio A, Nagashima KVP (2009) Cytochrome c4 can be involved in the photosynthetic electron transfer system in the purple bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*. *Biochemistry* 48(38), 9132-9139

③ Tsukatani Y, Nakayama N, Shimada K, Mino H, Itoh S, Matsuura K, Hanada S, Nagashima KVP. (2009) Characterization of a blue copper protein, auracyanin, of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium, *Roseiflexus castenholzii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 490(1), 57-62

[学会発表] (計8件)

① 藤原弘平、城本史寛、岩本明、本多弘典、篠田卓弥、永島賢治、加藤潤一 大腸菌における光合成機能の再構成. 第5回日本ゲノム微生物学会年会 2011年3月 仙台

② 近藤政晴、原田香織、永島咲子、永島賢治、橋本秀樹、出羽毅久、南後守 光合成のアンテナ系-反応中心複合体のITO基板上への組織化と光電流応答. 第91回日本化学学会年会 2011年3月 横浜

③ 永島賢治 光合成で駆動する新しい生物代謝: 細菌への遺伝子操作による試み. 第91回日本化学学会年会 2011年3月 横浜

④ Akira Iwamoto, Hirofumi Honda, Kohei Fujiwara, Takumi Eguchi, Kenji V. P. Nagashima, and Jun-ichi Kato. An attempt to reconstitute photosynthetic reactions of the phototrophic proteobacterium, *R. sphaeroides*, in *E. coli*. 第32回日本分子生物学会年会 2010年12月11日 横浜

⑤ 城本史寛、岩本明、本多弘典、藤原弘平、篠田卓弥、島原佑基、永島賢治、加藤潤一 大腸菌をプラットフォームにした光合成機能の再構成. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同学会 2010年12月8日 神戸

⑥ 中山陽介、嶋田敬三、永島賢治 紅色光合成細菌の光化学反応中心結合型チトクロムcに含まれる低電位ヘムの機能解明のた

めの実験系の確立 第51回日本植物生理学会年会 2010年3月18日 熊本

⑦ 岩本明、本多弘典、藤原弘平、江口拓未、永島賢治、加藤潤一 大腸菌をプラットフォームにした光合成機能の再構成. 第4回日本ゲノム微生物学会年会 2010年3月7日 福岡

⑧ 加藤潤一 大腸菌ゲノムの縮小化と必須遺伝子群の機能解析及び他種ゲノムの導入と機能の再構成. 「細胞を創る」研究会 2.0 2009年10月3日 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 潤一 (KATO JUNICHI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 10194820

(2) 研究分担者

永島 賢治 (NAGASHIMA KENNJI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 80264589

(3) 連携研究者

()

研究者番号: