

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22760608

研究課題名(和文) 光駆動型高エネルギー小胞および宿主細胞の創生による光からの有用物質生産技術の開発

研究課題名(英文) Development of value-added chemicals from light using light-driven vesicles and cell factory.

研究代表者

原 清敬 (Hara, Kiyotaka)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・准教授

研究者番号：40434378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、新型の光駆動プロトンポンプであるデルタロドプシンと熱安定ATP合成酵素を大腸菌に発現させ、その反転膜を調製することで、光駆動ATP合成小胞の創製に成功した。この光駆動ATP合成小胞をヘキソキナーゼと共役させ、光依存型グルコース消費を確認した。本結果は、光駆動ATP合成小胞が様々なATP消費型バイオプロセスにおいて、光のエネルギーを用いてATPを再生するポテンシャルを示すものである。

研究成果の概要(英文)：We prepared ATP photosynthetic vesicles from inside-out membranes of Escherichia coli cells that express delta-rhodopsin (a novel light-driven H⁺ transporter) and T_{fo}F₁-ATP synthase (a the most stable ATP synthase). These vesicles showed light-dependent ATP synthesis. Furthermore, coupling the ATP photosynthetic vesicles with an ATP-hydrolyzing hexokinase enabled light-dependent glucose consumption. The ATP photosynthetic vesicles indicate their potential to applied to light-driven ATP regenerating bioprocess for various ATP-hydrolyzing bioproductions.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ATP ATP synthase Membrane vesicle Photoenergetics Rhodopsin Vesicles

1. 研究開始当初の背景

我々は研究開始以前に大腸菌の解糖系 ATP 再生活性のハイスループット測定系を構築し、本活性に大きな影響を与える遺伝子を多数同定した。また、本活性が向上した株を用いて有用物質生産プロセスを構築した。これらの研究ではグルコースをエネルギー供給源としているが、本研究では光をエネルギー供給源とすることを目的とした。光から ATP を再生する研究としては、ATP 合成酵素の ATP 再生活性の測定を主な目的としてバクテリオロドプシンと ATP 合成酵素を再構成した膜小胞が調製されている。この膜小胞では、光の照射によりバクテリオロドプシンが小胞外のプロトンを小胞内に輸送し、形成された小胞内外のプロトン濃度勾配を駆動力として ATP 合成酵素が ADP から ATP を合成する。研究開始以前この膜小胞を ATP 駆動プロセスの ATP 再生源として利用する試みがなされていた。しかし、このタンパク再構成膜小胞を調製するためには、膜小胞の調製のほか、高度好塩菌の培養とバクテリオロドプシンの精製および好熱菌の培養と ATP 合成酵素の精製、さらにはこれら 3 つのコンポーネントからのタンパク再構成膜小胞の調製という多段階の煩雑なステップを経る必要があり、この膜小胞を物質生産に利用することは現実的でなかった。一方研究開始当初、新規なバクテリオロドプシンであるデルタロドプシンが大腸菌の細胞膜上で機能的に発現するという報告がなされていた。

2. 研究の目的

これまでにバイオプロセスを用いた様々な有用物質の生産方法が開発されている。中でも ATP をエネルギー源とした反応は多様であり、生産物も医療や食品分野などで有用な物質が多い。しかしながら、酵素反応プロセスでは高価な ATP を著量供給する必要があり、発酵生産プロセスでは細胞内の ATP が不足す

るなど、これらのプロセスの実用化は難しいのが現状である。そこで本申請研究では、大腸菌で機能的に発現する新規なバクテリオロドプシン(デルタロドプシン)を利用することで、無尽蔵に存在する光のエネルギーを用いて生体エネルギー(ATP)をリサイクルし、有用物質を持続的に生産するエネルギー循環的な物質生産サイクルの開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) デルタロドプシンと好熱菌 ATP 合成酵素を発現させた大腸菌の反転膜を調製し、簡便に光駆動 ATP 再生小胞を調製した。大腸菌反転膜の調製は、大腸菌細胞はソニケーターで破碎することで膜面積が小さくなり、自然に物理的に安定な本来と反対向きの反転膜が形成された。次に、大腸菌の反転膜小胞の光依存的なプロトン輸送および ATP 再生の至適条件を明らかにした。そして、ATP 駆動酵素の 1 つであるヘキソキナーゼを共役させることで、光駆動物質生産プロセスを確立した。

(2) 光駆動のプロトンポンプであるデルタロドプシンを哺乳動物細胞のミトコンドリアにおいて特異的に発現させたのち(図 2)、この細胞に光照射を行うと、哺乳動物細胞ミトコンドリア内で呼吸鎖のプロトン濃度勾配が増加するとともに、ミトコンドリア機能を阻害し、パーキンソン病モデルを誘導する薬剤として用いられる 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (略称: MPTP) による神経細胞死が抑制されるかを確かめた。

4. 研究成果

(1) デルタロドプシンと好熱菌 ATP 合成酵素を共発現させた大腸菌の反転膜を調製することで光駆動 ATP 再生小胞を得るため、以下の研究を行った。

まず、好塩菌が有する膜タンパク質で、光エネルギーから細胞のエネルギーの一形態であるプロトン濃度勾配 (PMF) をつくることのできるバクテリオロドプシンに着目した。また、古細菌やバクテリアの細胞膜および真核生物のミトコンドリア膜に存在する ATP 合成酵素は、この PMF のエネルギーからエネルギー物質である ATP を合成することができる。光駆動 ATP 再生小胞の創製を構想していた当時、ATP 合成酵素の酵素学的な ATP 合成活性の測定を主な目的として、バクテリオロドプシンと ATP 合成酵素を再構成した膜小胞の調製が行われていた。

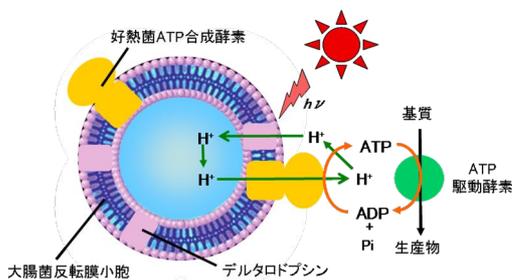


図 1. 光駆動 ATP 再生小胞の概略図

この膜小胞では、光の照射によりバクテリオロドプシンが小胞外のプロトンを小胞内に輸送し、形成された小胞内外の PMF を駆動力として ATP 合成酵素が ADP から ATP を合成する。しかし、このタンパク再構成膜小胞を調製するためには、膜小胞の調製のほか、高度好塩菌の培養とバクテリオロドプシンの精製および好熱菌の培養と ATP 合成酵素の精製、さらにはこれら 3 つのコンポーネントからのタンパク再構成膜小胞の調製という多段階の煩雑なステップを経る必要があり、この膜小胞を物質生産に利用することは現実的でなかった。そこで、研究代表者は、「大腸菌の細胞膜を破碎し膜面積が小さくなると、物理的に安定な本来と反対向きの反転膜が形成される」という性質を利用し、バクテリオロドプシンの一種であるデルタロドプシンを用いた。また、大腸菌が本来有する ATP 合成酵素は反転膜から解離しやすいため、解

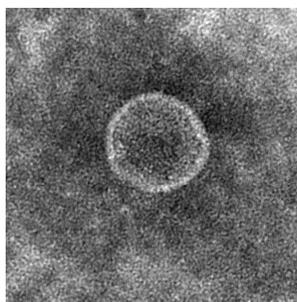


図 2. 光駆動 ATP 再生小胞の TEM 画像

離しにくい好熱菌の ATP 合成酵素を用いることを考えた。吉田賢右教授 (京都産業大) および鈴木俊治先生 (東京工業大学、ICORP ATP 合成制御プロジェクト) の協力を得て、*Thermophilic Bacillus* PS3 の ATP 合成酵素を用いた。これらデルタロドプシンと好熱菌 ATP 合成酵素を発現させた大腸菌の反転膜が

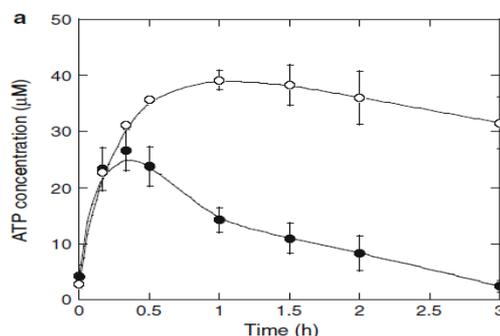
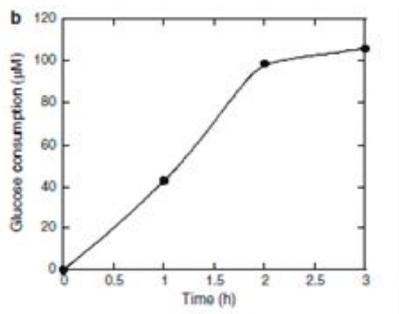


図 3. 光駆動 ATP 再生小胞による光駆動 ATP 再生

ら成る光駆動 ATP 再生小胞を簡便に調製することに成功した (図 2)。実際に、この光駆動 ATP 再生小胞に光照射すると (図 3 の) 照射しない場合 (図 3 の) よりも ATP が増加した。さらに、この光駆動 ATP 再生小胞 (図 1) と ATP 駆動反応を共役させることに成功した (図 3、文献)。また、プロトン濃度勾配に依存しないアデニレートキナーゼ ($2\text{ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$) 活性の阻害剤である P_1 , P_5 -di (adenosine-5') pentaphosphate によって阻害することで、この光駆動による ATP の合成が、発現させた ATP 合成酵素によるものであることを実証した。実際に、この光駆動 ATP 再生小胞と、ATP をエネルギー源としてグルコースからグルコース 6 リン酸を合成するヘキソキナーゼを共役させることで、光



を用い

図4. 光駆動 ATP 再生小胞と共役させた時のヘキソキナーゼの光駆動グルコース消費

てグルコース 6 リン酸を合成させることに成功した(文献)。

本研究で目指す光駆動バイオプロセスは、光のエネルギーを直接的に ATP に変換することで、クリーンでかつ高効率という特色を持ち、社会的に見ても波及効果の大きい技術革新になり得ると考えている。本手法を用いれば、光照射により光駆動 ATP 再生小胞が持続的に ATP を再生することで、光駆動の有用物質生産が可能である。

(2) デルタロドプシンを細胞内で働かせることにより人工光合成細胞を創製することができれば、反転膜の調製が不要な究極の光駆動物質生産プロセスの開発につながる考えた。そして、ミトコンドリアはバクテリア由来であるとする細胞内共生説に基づけば、「大腸菌の細胞膜で機能するデルタロドプシンは、ミトコンドリア膜でも機能するのではないか」と考えた。そこで、ミトコンドリア局在化シグナルを結合した外来タン

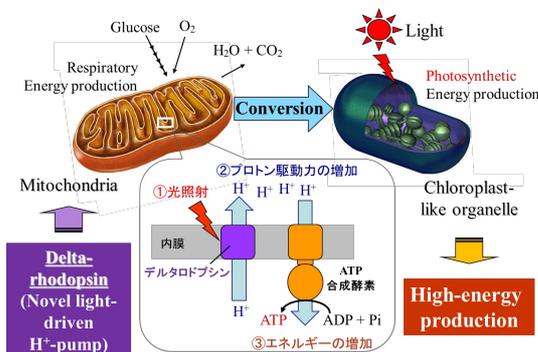


図5. 光駆動ミトコンドリアの概略

パク質のミトコンドリアでの発現が確立されている哺乳類培養細胞での検証を試みた。実際に研究代表者は、細胞生物学のバックグラウンドを持つ早稲田大学の澤村直哉准教授、朝日透教授および博士課程学生の和田丈慶氏の強力を得て、デルタロドプシンを哺乳類培養細胞のミトコンドリアで特異的に発現させることにより、光に応答して PMF が増加する細胞を作製することに成功した(文献)。具体的には、デルタロドプシンを哺乳動物細胞のミトコンドリアにおいて特異的に発現させたのち、この細胞に光照射を行うと、哺乳動物細胞ミトコンドリア内で呼吸鎖の PMF が増加するとともに、ミトコンドリア機能を阻害し、パーキンソン病モデルを誘導する薬剤として用いられる 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) による神経細胞死が抑制されることを明らかにした(文献 2)。本技術は今後、再生医療技術との融合によりパーキンソン病などの治療にも役立つ可能性も秘めている。

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 2 件)

Kiyotaka Y. Hara, Takeyoshi Wada, Kuniki Kino, Toru Asahi, Naoya Sawamura (2013) Construction of photoenergetic mitochondria in cultured mammalian cells. Scientific Report, 査読有, s 3, 1635.

Kiyotaka Y. Hara, Rie Suzuki, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida, Kuniki Kino (2011) ATP photosynthetic vesicles for light-driven bioprocesses. Biotechnology Letters, 査読有, **33(6)**, 1133-1138.

〔学会発表〕(計 5 件)

原清敬、桐山健太郎、近藤昭彦、合成生

物工学を用いた高効率有用物質生産細胞の創製、細胞を創る研究会、慶応大学鶴岡キャンパス、2013年11月14日
原清敬、出芽酵母を用いたグルタチオンの生産、平成25年度開発型企業連携研究会、神戸大学、2013年7月4日
原清敬、桐山健太郎、福田秀樹、近藤昭彦、新規グルタチオン排出トランスポーター発現酵母を用いた細胞外グルタチオン生産、第7回トランスポーター研究会、京都大学、2012年6月9日
原清敬、光駆動ATP再生小胞の創製、第45回原生動物学会、兵庫県立大学書写キャンパス2012年11月23日
原清敬、吉田秀世、桐山健太郎、金松希、荻野千秋、近藤昭彦、酵母によるバイオマスからのグルタチオンの直接発酵、第63回日本生物工学会、東京農工大学、2011年9月27日

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

〔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 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
<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/>
<http://www.org.kobe-u.ac.jp/bioproduction/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 清敬 (HARA, Kiyotaka)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環・特命准教授
研究者番号：40434378

(2)研究分担者

()

研究者番号：