

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850224

研究課題名(和文) 酵素複合体を導入した光合成細菌によるエチレン生産の相乗機構の解明と大量生産の研究

研究課題名(英文) Construction and analysis of recombinant cyanobacterium expressing a chimeric enzyme complex for ethylene production

研究代表者

神藤 定生 (Jindou, Sadanari)

名城大学・理工学部・助教

研究者番号：90583865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：2014年度は、ACSの酵素モル比を1から2へ(strain SOC3A)、ACOの酵素モル比を1から2へ(strain SOC3B)それぞれ変更し、それぞれ1.3倍、1.7倍のバイオエチレン生産効率向上を観察した。また、2015年度は、MTA1(strain SOC3D1)および2(strain SOC3D2)を酵素反応系へ組み込み、それぞれ1.6倍、1.9倍のバイオエチレン生産効率向上を観察した。2016年度は、二酸化炭素からバイオエチレンへの物質変換効率を検討する事を目的に、バイオエチレン生産株のCO2吸収量とエチレン生産量を観察し、その比較を野生株(WT)との間で行った。

研究成果の概要(英文)：To reduce the rate of global warming, we have developed a novel bio-ethylene synthetic process using the both cellulosomal system and cyanobacteria. In vivo synergistic effect of chimeric enzyme complex on ethylene production was demonstrated. In order to produce more bio-ethylene from cyanobacteria, the investigation was performed as follows. First, to produce ethylene from SAM via ACC in a concerted fashion with less inhibition of ACS, we have constructed two chimeric enzyme complexes, SOC3D1 and SOC3D2, based on cellulosomal system. Second, two chimeric enzyme complexes were introduced into *Synechococcus elongatus* PCC7942. Then, we have examined the in vivo ethylene accumulation of engineered *S. elongatus* PCC7942 cells to determine whether the expressed chimeric enzymes produce more ethylene.

研究分野：合成生物学

 キーワード：エチレン シアノバクテリア 酵素複合体 *Synechococcus* コヘシン ドックリン ACC合成酵素 ACC酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

現在の社会は、石油資源の大量消費、特にプラスチック製品の大量生産によって支えられている。しかし、石油は有限資源であり、さらにその燃焼によって地球温暖化ガス(二酸化炭素)が過剰に排出される。よって、二酸化炭素の削減による低炭素社会の基盤構築が喫緊の課題である。

エチレンは、植物ホルモンとして知られ、その生合成は植物細胞内のメチル基供与体である S-アデノシルメチオニン(SAM)から 2 段階の酵素反応で行われる。具体的には、基質 SAM から産物 ACC が 1-アミノシクロプロパン-L-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)の触媒作用で得られ、つぎに、基質 ACC から最終産物のエチレンが ACC 酸化酵素(ACO)の触媒作用で得られる。いっぽう、光合成細菌の *Synechococcus elongatus* PCC7942 は、そのゲノム情報から、SAM 合成酵素の存在が明らかである。そこで、当該細菌へ上記 ACS および ACO を導入することで、細胞内で供給される SAM から副次的にバイオエチレンを生産させる事が可能であると考えられた。

申請者はこれまで、セルロース分解嫌気性細菌が固有に保有し、セルロソームと呼ばれるセルラーゼ複合体の酵素分子配向に関する機構を解明した。その研究過程でセルロソーム形成に必須の過程であるコヘシン・ドックリン結合が高い結合特異性と結合親和性を持つことを明らかにした(Jindou *et al.*, *PLoS One*, 2009)。近年、イスラエルのグループはセルロソームを真似ることで効率的な酵素反応が可能ではないかと着想し、コヘシン・ドックリン結合を応用した酵素の複合体化を試みた。その結果、一連の異なる触媒作用を持つ酵素を複合体化させる事が酵素反応の効率化に寄与する報告をした(Capsi *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2008)。

以上の背景のもと、申請者は、太陽エネルギーによって二酸化炭素を固定化する独立栄養光合成細菌を利用したバイオエチレン生産系開発を試みた。すなわち、二酸化炭素から光合成的にエチレンを生産する低炭素社会の構築である。

具体的には、エチレン合成に関わる ACS と ACO から構成される酵素複合体を構築した。結果として、2 種の酵素の複合体化は、これら酵素の連続反応活性を最大 2.5 倍の値で高効率化させた。申請者は上記実験データをまとめ特許を出願した(特願 2011-215487,平成 23 年 10 月 1 日出願)。つぎに、光合成細菌を培養し当該酵素複合体を発現させることに成功し、細胞内 SAM からバイオエチレンを得た。この結果として、酵素複合体化により 3.7 倍高いバイオ

エチレン合成活性を得た(図参照)。また、得られたバイオエチレンの生産効率率は 56 pl(エチレン)/ml(培養液)/O.D.₇₃₀/培養時間であった。

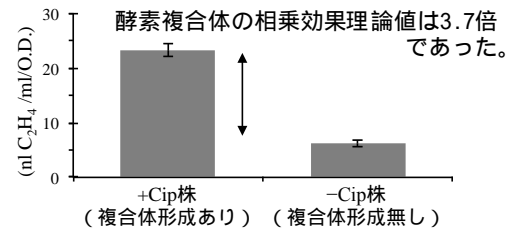


図. 酵素複合体を導入した組換え *S. elongatus* PCC7942 のバイオエチレン生産効率

2種類の株、酵素が複合体化せず、ネガティブコントロールとした株(-Cip株)、酵素が複合体として細胞内に発現・形成する株(+Cip株)を用いバイオエチレン生産効率を比較した。各サンプル中のバイオエチレンはガスクロマトグラフィーによって定量的に測定した。その結果、酵素の複合体化は3.7倍の活性上昇を示した。

2. 研究の目的

現時点において、組換え光合成細菌のバイオエチレン生産量は微量である。この問題点として、以下の点が上げられた。1) CO₂削減効果の定量化に係る、二酸化炭素からエチレンへの物質変換効率が明らかでない。2) エチレン合成に関わる ACO の V_{max} 値は ACS の約 1000 分の 1 であり、律速段階である。3) バイオエチレンの基質となる細胞内の SAM 供給量が少ない。4) 光合成ストレスによる ACO の顕著な活性阻害がある。そこで、本申請では解決策を試みる。1) 藻類培養装置を導入し、二酸化炭素からバイオエチレンへの物質変換効率を算出する。2) 酵素組成中の律速酵素のモル比を増やすため、ACO を酵素反応系へさらに 1 つ追加する。3) 細胞内の SAM 供給量を増やすため、SAM 合成酵素を酵素複合体へ追加する。4) ACO の活性阻害を回避させるため、抗酸化剤を培養液に添加する。

3. 研究の方法

本研究では、以下の取り組みを行う。

1. コヘシン Ac を 2 ヶ、コヘシン Ct を 1 ヶ連結したキメラ軸タンパク質 2B(Cip2B)の新規構築と発現。ACS の基質 SAM に対する酵素の最大反応速度(V_{max})と ACO の基質 ACC に対する V_{max} を比較した結果、ACO の V_{max} 値が ACS のそれと比較し 1000 倍低いことがわかった。そこで、律速段階となる ACO をさらに一つ追加した酵素複合体を構築する。具体的には、すでに構築済みの Cip2A へ更に 1 つの *Acetivbrio cellulolyticus* 由来コヘシンを遺伝子工学的に連結し、Cip2B を構築する。

2. Rf, Ac, Ct の 3 種類のコヘシンを連結した Cip3 および SAM-Doc の新規構築と発現。バイオエチレン合成反応によって、宿主細菌から供給される基質 SAM が不足すると考えられる。そこで、SAM 供給量を増やすため、*S. elongatus* PCC7942 株由来の SAM 合成酵素遺

伝子を *Ruminococcus flavefaciens* 由来のドックリンと遺伝子工学的に連結し SAM-Doc を新規に構築する。また、既存の Cip2A および上記計画 1. で構築した Cip2B へ更に 1 つの *R. flavefaciens* 由来のコヘシを遺伝子工学的に連結し、Cip3 を構築する。

3. 異なるプロモーターを組み込んだベクターの新規構築。現在、IPTG を用いた発現誘導は trc プロモーター制御下で行っている。バイオエチレン生産のコストダウンを目的とした場合、高価な IPTG の使用は不利である。そこで、計画初年度では、エチレンにより誘導される植物由来のエチレン応答プロモーターを trc プロモーター上流に追加し、ダブルプロモーターによる酵素複合体遺伝子の発現制御を行う。そのほか、*Synechocystis* PCC6803 由来のニッケルイオン応答プロモーターを trc プロモーターの代替に用いる。結果として、IPTG を用いることなく目的遺伝子の発現を制御できる。

4. 構築した酵素複合体を光合成細菌で発現させ、バイオエチレンの生産効率を測定する。これまでの研究によって、酵素複合体を構成する 3 種の遺伝子、ACS, ACO および Cip2、を trc プロモーター下流に配置したベクターは構築済みである。新規に構築した Cip2B あるいは Cip3 を組み込んだベクターを用いて *S. elongatus* PCC7942(R2-PC) 株を形質転換し、生産されるバイオエチレンをガスクロマトグラフィーで測定する。

5. CO₂ 削減効果の定量化を目的に、二酸化炭素からエチレンへの物質変換効率を求める。光合成細菌によるエチレン生産系の既存技術として、微生物由来の EFE を組み込んだ報告がある。この生産系は固定化した二酸化炭素を最大 5.5% の効率でエチレンへ変換させる事が報告されている (Ungerer et al., Energy Environ. Sci., 2012)。しかしながら、本研究による、酵素複合体を導入した光合成細菌の変換効率は明らかとなっていない。そこで、二酸化炭素濃度および酸素濃度を定量的に変化させ、当該細菌の培養を行う。そして、それぞれの条件に応じて生産されるバイオエチレンをガスクロマトグラフィーで定量する。

4. 研究成果

本研究課題は、光合成細菌の光合成産物をバイオエチレンとして回収する研究である。さらに、嫌気性微生物のバイオマス分解システムを模倣した酵素複合体化技術により、エチレン生合成酵素を光合成細菌で効率よく機能させ、高効率なバイオエチレン生産のための基盤の開発を行った。

2014 年度では酵素複合体反応系の最適化を試みた。具体的には、既存の酵素複合体(SOC2)を構成するところの 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)の酵素組成比

を変更した。すなわち、ACS の酵素モル比を 1 から 2 へ(SOC3A)、ACO の酵素モル比を 1 から 2 へ(SOC3B)それぞれ変更し、それぞれ 1.3 倍、1.4 倍のバイオエチレン生産効率向上を観察した。よって、酵素のモル比変更によるバイオエチレン生産効率の上昇理論値を得た。

2015 年度では、酵素複合体反応系の最適化を目的に、酵素の組成を改良し、生産効率を高めることを試みた。具体的には、メチルチオアデノシン(MTA)による ACS の活性阻害を回避させるため MTA ヌクレオシダーゼ(MTAN)を既存の複合体へ組み込み、これらを構築し新規の酵素複合体(SOC3D1 および SOC3D2)を得た。すなわち、*Arabidopsis thaliana* 由来 cDNA クローンから MTAN1/2 遺伝子を、*Clostridium josui* ゲノム DNA から Cel8A 由来ドックリン遺伝子を、それぞれ PCR 法で増幅させ、これらを融合させたキメラサブユニット AtMTAN1-Cjdoc および AtMTAN2-Cjdoc を構築した。これらは既存の酵素複合体へ、*A. thaliana* 由来 MTAN1 および 2 を新規に組み込んだ。つぎに、当該酵素複合体を発現するシアノバクテリアのバイオエチレン生産量を定量した結果、既存の strain SOC2 と比較して、strain SOC3D1 は 1.6 倍のバイオエチレン生産量増加を、strain SOC3D2 は 1.9 倍のバイオエチレン生産量増加をそれぞれ観察した。よって、酵素の組成変更によるバイオエチレン生産効率の上昇理論値を得た。

2016 年度は、CO₂ 削減効果の定量化に係る、二酸化炭素からバイオエチレンへの物質変換効率を検討する事を目的に、バイオエチレン生産株(strain SOC2 および strain SOC3B)の CO₂ 吸収量とエチレン生産量を観察し、その比較を野生株(WT)との間で行った。パブリックによる培養を 18 時間行ったとき、strain SOC2、strain SOC3B および WT の CO₂ 吸収量はそれぞれ 3.2 μl/O.D.₇₃₀、3.8 μl/O.D.₇₃₀ および 2.7 μl/O.D.₇₃₀ の値を得た。すなわち、バイオエチレン生産株はより多くの CO₂ を吸収することを明らかにした。また、18 時間で生産されたバイオエチレンは、SOC2 が 1.6 nL C₂H₄/ml/O.D.₇₃₀、SOC3B が 3.5 nL C₂H₄/ml/O.D.₇₃₀ であった。したがって、単位 CO₂ 体積(μl)当たりのバイオエチレン生産量は、SOC2 および SOC3B いずれも 3.2 nL C₂H₄/ml/O.D.₇₃₀/μl CO₂ の値となり、エチレン生産に利用される CO₂ の体積は一定であることを明らかにした。これより、 $2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4 + 3\text{O}_2$ の化学反応式から 1 モルのエチレン生成には 2 モルの CO₂ が利用されることから鑑みて、CO₂ の

物質変換効率は0.64%であると考えられる。最後に、以上得られた結果から、本研究のバイオエチレン製造法はバイオエチレン生産量とCO₂吸収量の間で正に比例する、より多くのバイオエチレン生産がより多くのCO₂削減効果を生じることを明らかにした。

以上より、光合成細菌で発現させたエチレン生合成酵素が複合体化によって効率よく機能し、二酸化炭素から光合成的にバイオエチレンを生産させるための基盤技術を確立した。

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 5 件)

Israeli-Ruimy V, Bule P, Jindou S, Dassa B, Morais S, Borovok I, Barak Y, Slutzki M, Hamberg Y, Cardoso V, Alves VD, Najmudin S, White BA, Flint HJ, Gilbert HJ, Lamed R, Fontes CM, Bayer EA.

“Complexity of the Ruminococcus flavefaciens FD-1 cellulosome reflects an expansion of family-related protein-protein interactions.” Scientific Reports 7, Article number: 42355 (2017) (査読付き論文)

Voronov-Goldman M., Yaniv O., Gul O., Yoffe H., Salama-Alber O., Slutzki M., Levy-Assaraf M., Jindou S., Shimon L. J. W., Borovok I., Bayer E. A., Lamed R., Frolow F.

“Standalone cohesin as a molecular shuttle in cellulosome assembly.” FEBS Letters, Vol. 589, pp 1569-1576, (2015) (査読付き論文)

Petkun S., Grinberg I. R., Lamed R., Jindou S., Burstein T., Yaniv O., Shoham Y., Shimon L. J. W., Bayer E. A., Frolow F.

“Reassembly and co-crystallization of a family 9 processive endoglucanase from its component parts: structural and functional significance of the intermodular linker.” Peer J, Vol. 3, e1126, (2015) (査読付き論文)

Milana Voronov-Goldman, Maly Levy-Assaraf, Oren Yaniv, Gloria Wisserman, Sadanari Jindou, Ilya Borovok, Edward Bayer, Raphael Lamed, Linda Shimon and Felix Frolow

Structural characterization of a novel autonomous cohesin from Ruminococcus flavefaciens

Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications (The International Union of Crystallography). 2014. F70: 450-456 (査読付き論文)

Sadanari Jindou, Yuki Ito, Natsumi Mito, Keiji Uematsu, Akifumi Hosoda, Hiroto Tamura

Engineered Platform for Bioethylene Production by a Cyanobacterium Expressing a Chimeric Complex of Plant Enzymes ACS Synthetic Biology (ACS Publications). 2014. 18: 487-496 (査読付き論文)

[学会発表](計 8 件)

神藤 定生、中尾 領亜、坂本 拓郎、細田 晃文、田村 廣人「合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良」日本農芸化学会 2017 年度大会(京都)平成 29 年 3 月

神藤 定生、林 茉依、細田 晃文、田村 廣人「合成生物学的手法により構築したシアノバクテリアによる CO₂ からバイオエチレンへの変換効率に関する研究」日本生物工学会 2016 年大会(富山)平成 28 年 9 月

神藤 定生、林 茉依、細田 晃文、田村 廣人「合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良 Ethylenome 最適化によるエチレンの高生産」日本農芸化学会 2016 年度大会(札幌)平成 28 年 3 月

神藤 定生、石川 克也、増井 寛、武藤 和馬、細田 晃文、田村 廣人「合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良 Ethylenome の反応系最適化によるエチレンの高生産」日本生物工学会 2015 年大会(鹿児島)平成 27 年 10 月

石川 克也、神藤 定生、細田 晃文、田村 廣人「合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良—Ethylenome 過剰発現によるエチレンの高生産」日本農芸化学会 2014 年度大会(広島)平成 27 年 3 月

神藤 定生、増井 寛、細田 晃文、田村 廣人「合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良—Ethylenome の反応系最適化によるエチレンの高生産」日本農芸化学会 2014 年度大会(広島)平成 27 年 3 月

Sadanari Jindou, Yuki Ito, Natsumi Mito, Keiji Uematsu, Akifumi Hosoda, Hiroto Tamura「An engineered platform for bioethylene production by a cyanobacterium expressing a chimeric complex of plant enzymes」国際学会 三重バイオフォーラム 2014 (三重)平成 26 年 11 月

神藤 定生、早稲田 葵、増井 寛、細田 晃文、田村 廣人「合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良」日本生物工学会 2014 年大会(札幌)平成 26 年 9 月

〔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

<http://www-agr.meijo-u.ac.jp/labs/nn020/research05.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神藤 定生 (JINDOU, Sadanari)
名城大学・理工学部・助教
研究者番号：90583865

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

田村 廣人 (TAMURA, Hiroto)
名城大学・農学部・教授
研究者番号：90267972
細田 晃文 (HOSODA, Akifumi)
名城大学・農学部・准教授
研究者番号：50434618

(4) 研究協力者

Edward A. Bayer
Raphael Lamed