

(様式第9 別紙2：公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 金尾 忠芳
2. 養成カリキュラム名： 超好熱菌の有用タンパク質の改変と他生物への導入
3. 養成カリキュラムの達成状況

超好熱菌にその存在が明らかとなった高効率炭酸固定酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (Rubisco) に変異を加えることにより改変し、常温域でも高活性を維持した変異型 Rubisco を獲得することを目標とした。最終的にはこの様な変異酵素を植物の葉緑体に導入することで、高効率炭酸固定能を有する植物の創世を目標とする。研究を始めるにあたり、まず常温活性型変異 Rubisco の獲得するためのスクリーニング系の構築を試みた。常温にて従属栄養・独立栄養の両方で生育可能な紅色非硫黄細菌の一種 *Rhodospseudomonas palustris* を宿主として利用し、本来これが所有している3種類の Rubisco を破壊して超好熱菌の Rubisco を導入することで相補させ、Rubisco の活性依存的な生育によるスクリーニングの系を考案した。*R. palustris* 内に外来遺伝子となる *Tk-rbc* を導入するには安定に外来遺伝子を保持するための選択圧や、外来遺伝子を保有していることを認識するためのマーカーが必要となる。抗生物質に対する薬剤耐性がこの様な選択圧やマーカーとしては適しているのだが、本研究の場合、宿主本来が持つ Rubisco 遺伝子を破壊する際にこの薬剤耐性マーカーを既に使用しているため、新たな薬剤を探索する必要があった。様々な薬剤耐性を検討した結果、ゼオシンが有効であることを解明した。これの耐性遺伝子を利用したベクターによって *Tk-rbc* は宿主菌体内で安定して保有でき、マーカーとして *Tk-rbc* を保有している菌株を認識することが出来た。プラスミドとして *Tk-rbc* を全ての Rubisco 遺伝子が破壊された *R. palustris* 破壊株に導入した場合、非常に遅いが独立栄養生育することが可能となり、*Tk-Rbc* もカルビンサイクルの酵素として機能し得る事が明らかとなった。この非常に遅い *Tk-Rbc* 活性依存的な生育は、目的とする常温活性型変異酵素を獲得する場合、むしろ好都合であり生育速度を指標に目的酵素を獲得できる基盤を完成させたことになる。特に導入したベクターに組み込んだ *Tk-rbc* は、その ORF のみを制限酵素によって入れ替えることが出来る様に設計しており、error prone PCR の様な方法を用いて *in vitro* での能動的な変異導入も可能である。この様な *Tk-Rubisco* 活性依存的な増殖速度によるスクリーニング方法の確立は、本研究の目標達成のために最初

の律速段階であり、研究開始から1年以内に、これをクリアできたことは1年目の目標を十分に達成できたと考えられる。

4. 成果（A4版3枚程度）

【研究の背景と目標】

超好熱菌の有用タンパク質の題材として、従来に見ない非常に高活性な炭酸固定酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) に研究の焦点を絞った。Rubisco は植物などにおけるカルビン回路で、二酸化炭素を固定化して有機物を生成するための重要な酵素である。しかしながら植物の Rubisco は通常の酵素と比較して非常に回転率が悪く（1秒間に3回程度）またCO₂の代わりに酸素が基質となるオキシゲナーゼ反応が拮抗するため、炭酸固定反応効率が非常に悪い。植物の炭酸固定において、この効率の悪い Rubisco が炭酸固定代謝そのものを鈍らせている事が明らかとなっている。もしこの Rubisco の機能を高める、あるいは高機能の Rubisco を導入することが出来るなら、その組み換え型植物はカルビン回路による炭酸固定能力を大幅に向上することができると期待される。このような植物の創製は大気中の二酸化炭素の効率的回収に加え、食料やエネルギーの問題への解決にも利用できる可能性が高い。このような試みは、既に世界中で提案され実施されてきたが、植物内における複雑なタンパク質の成熟化、外来タンパク質の不溶化などの理由から未だ成功していない。原始生命体に近いと考えられる超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株には植物の50倍程の高活性の Rubisco (Tk-Rubisco) が存在することが明らかとなった。この Rubisco は構造的に従来報告のある植物 (type I) や細菌 (type II) のものとは異なる新型 (type III) であり、高活性・高カルボキシラーゼ (炭酸固定) 反応特異的という特徴を有していた。更に大腸菌などでの異種発現を行っても機能性タンパク質として高度に発現した。また、変異導入を行っても不溶化することなく極めて安定なタンパク質であった。この Super Rubisco とも言える Tk-Rubisco を植物へ導入する試みはこれまでに例が無く、他のどんな生物由来の Rubisco を用いるよりも最も効率良く植物内で機能できる可能性が高い。唯一の問題点は、植物の50倍もの高活性を持つ Tk-Rubisco ではあるが、超好熱菌に由来するために常温 (室温) 域ではあまり機能しない。従って本研究では Tk-Rubisco に変異を導入して、常温域においても植物 Rubisco の活性を上回る「常温域高活性変異型 Tk-Rubisco」を獲得し、最終的に高効率炭酸固定植物の創製を目標とした。

【研究経過と研究成果】

目的とする常温域高活性変異型 *Tk-Rubisco* を獲得するため、常温菌である紅色非硫黄細菌 *Rhodospseudomonas palustris* を宿主として利用しスクリーニングを行う系を考案した。*R. palustris* は好気条件下では従属栄養生育、嫌気条件下ではカルビン回路で独立栄養生育を行うことのできる光合成細菌の 1 種である。まず研究を始めるにあたり *R. palustris* 内で *Tk-Rubisco* が発現することの確認を行うためプロモーターの選択を行った。この結果、炭素源や生育状況に影響されず構成的に発現する phosphoenolpyruvate carboxylase kinase (PEPCK) promoter を用いることに決定し、その支配下に *Tk-Rubisco* 遺伝子を組み込んだ発現ベクターの構築を行った。具体的には、本菌と大腸菌のシャトルベクタープラスミドである pMG103 に PEPCK promoter と *Tk-rbc* の融合遺伝子を組み込み発現ベクターを構築した。これを pM3Rbcwt と名付けた。これを先ず *R. palustris* 野生株にカナマイシン耐性を指標として組み換え体の選抜を行った。得られた組み換え体については PCR によって *Tk-Rubisco* 遺伝子を保有していることを確認した。そして抗 *Tk-Rubisco* 抗体を利用した Western blot 解析によって、この組み換え型 *R. palustris* が *Tk-Rubisco* を発現していることを確認した。また、発現した *Tk-Rubisco* は可溶性かつ熱安定なタンパク質であり、正常な活性化タンパク質であることが期待できた。次に *R. palustris* 本来が持つ 3 種類の *Rubisco* 遺伝子を破壊した変異株 (Triple mutant) を宿主として用い、野生株の場合と同様に導入しカナマイシン耐性を選択圧として用いた。しかしながら、宿主本来が保有している *Rubisco* 遺伝子を破壊する際、既にカナマイシン耐性遺伝子を用いたため、このプラスミドを安定に保持するための選択圧としては機能せず、増殖した菌株にはこのプラスミドは保持されていなかった。このため、導入した発現ベクターを菌体内に安定して保持させることのできる新たな薬剤と薬剤耐性遺伝子の探索が必要となった。数種類の薬剤について検討を重ねた結果、従来用いられてきたカナマイシン、テトラサイクリン、ゲンタマイシンに加えて、ブレオマイシン系抗生物質であるゼオシンが本菌に対して有効であることが分かった。ゼオシンの本菌に対する最少生育阻止濃度は 150 μ g/ml であることを明らかにした。

ゼオシン耐性遺伝子細菌で機能する EM promoter と共に、先に構築した pM3Rbcwt へ挿入してゼオシン耐性をマーカーおよび選択圧として利用できる発現ベクター pM3EZRbcwt を新たに構築した。これを *Rubisco* 遺伝子が全て破壊されている Triple mutant に導入したところ、ゼオシン耐性能を獲得していた。炭素源を有機酸に制限した培地において生育した組み換え型菌体 (Triple mutant/ pM3EZRbcwt) を SDS-PAGE に供した後、抗 *Tk-Rbc* 抗体を用いて Western blot 解析を行った結果、*Tk-Rbc* の発現を確

認した。続いてこの菌体を CO₂ を炭素源、電子供与体にエタノールを用いた無機塩エタノール培地において独立栄養生育を試みた結果、ゼオシン存在下の選択圧を有する状態で、非常に緩やかではあるが本菌の独立生育を確認することが出来た。この事は、構造や生理的な役割も異なると考えられる従属栄養生物である超好熱始原菌由来の Rubisco がカルビン回路の Rubisco として機能出来ることを証明している。また *Tk*-Rubisco 活性に生育が依存しているため、この「非常に遅い生育」は野生型（変異のない）の *Tk*-Rubisco の常温域での活性が非常に低いことに由来しており、何らかの変異によって常温域での活性が上昇すれば、それが生育速度の早さに反映する。pM3EZRbcwt は pUC ベクターに由来する ori を保有しており、大腸菌での複製も可能である。したがって、error prone PCR などの手法で *Tk*-Rubisco ORF に人為的に変異を導入したプラスミドを用いて大腸菌を形質転換することでこれを増幅させ、回収することが可能である。増幅した変異導入済みの *Tk*-Rubisco ORF をもつ pM3EZRbcMt はエレクトロポレーションによって Triple mutant に導入し、独立栄養生育を試みる。この方法によって、野生型の *Tk*-Rubisco ORF をもつ pM3EZRbcwt の組み換え体よりも増殖速度の速い株を選抜すれば、常温域で、より活性の高い変異型 *Tk*-Rubisco を獲得できる可能性が期待される。この様なスクリーニングによって、目的とする常温域で高活性を保持した変異型 *Tk*-Rubisco を獲得した際には、その遺伝子の解析、および変異タンパク質の構造の解析を行い、より活性の高い変異酵素を人為的に作成することも可能となる。この様な *in vitro* での積極的な変異導入にプラスミドを利用した *R. palustris* への導入発現させる実験系は有効な手段であり、本研究によって確立することが出来た。

更に *R. palustris* 染色体 DNA に *Tk*-Rubisco ORF を組み込む方法も検討した。本方法は、菌体が増殖する際に生じた変異が、生育環境に対し優位に働くことを期待して行うものである。すなわち、*Tk*-Rubisco 依存的な独立栄養生育が優位に働く変異（常温域で高い Rubisco 活性を持つ変異）を生じた菌株が優先的に生育し、それを選抜することで目的を達成するという方法である。いわば、*in vivo* での変異 *Tk*-Rubisco のスクリーニングである。プラスミドによって導入された場合にはプラスミドの複数コピーにより *Tk*-Rubisco 発現量が増え、見かけ上高活性の菌株が得られることも考えられるが、コピー数が 1 であるゲノムに組み込まれた場合はその様な影響を受けず、生育速度が正確に *Tk*-Rubisco 活性に反映されると考えられる。この目的を達成するためには、先ず *R. palustris* が本来持つ 3 つの Rubisco 遺伝子を破壊する必要がある。3 つの内 2 つまでを事前に別種類の薬剤耐性遺伝子で破壊しておき、残された 1 つを更に別の薬剤耐性マーカー

一遺伝子と *Tk-Rubisco* 遺伝子で破壊と同時に組み込む手法である。予め formI-1, formII と 2 つの Rubisco 遺伝子を破壊した *R. palustris* Rubisco Double mutant を宿主として用い、残された 1 つの Rubisco 遺伝子 (formI-2) をターゲットとした特異的破壊ベクターの構築を行った。薬剤耐性遺伝子と *Tk-Rubisco* ORF を formI-2 遺伝子断片約 1.2kbp のほぼ真ん中部分に挿入した (挿入断片の両端にそれぞれ数百 bp の formI-2 相同領域を持つことになる)。この様な破壊ベクターの構築により、ダブルクロスオーバーの相同組み換えにより formI-2 Rubisco 遺伝子に薬剤耐性遺伝子および *Tk-Rubisco* ORF を挿入することにより破壊した。

本研究業務において、*Tk-Rubisco* 常温活性型変異酵素を獲得するためのスクリーニング系を、プラスミドによる変異導入法 (*in vitro*: 能動の変異導入) と染色体 DNA に組み込む変異導入 (*in vivo*: 生体内変異導入) の両方でその基盤を確立した。また、始原菌由来の生理的に異なる TypeIII Rubisco が紅色非硫黄細菌のカルビン回路においても機能し得ることを明らかにした。また、その生育が非常に遅いことから本スクリーニング方法が非常に有効であることを証明した。

5. 成果の対外的発表等

- (1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。)
- (2) 口頭発表 (発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)
- (3) 特許等 (出願番号を記載)

(1) ~ (3) 特になし。