

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14486

研究課題名(和文)虹色で作動する光スイッチの創出

研究課題名(英文)Development of the photoswitch systems sensing rainbow colors

研究代表者

広瀬 侑(Hirose, Yuu)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30616230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が発見した緑・赤色光受容型のシアノバクテリアの光スイッチの吸収波長の可塑性を最大限に引き出すため、吸収波長特性を大腸菌の増殖速度でモニターする新規スクリーニング系の開発を行なった。光スイッチ遺伝子群と光スイッチプロモーターを融合した薬剤耐性遺伝子を大腸菌に導入し、その効果を評価したところ、大腸菌由来の転写システムによる光スイッチプロモーターの恒常的な活性化、光スイッチタンパク質の色素結合効率と転写活性の不足、の2点が課題として示された。現在、別宿主から単離した有望な光スイッチ遺伝子を用いて、システムティックなアプローチによる大腸菌内光スイッチ回路の構築を進めている。

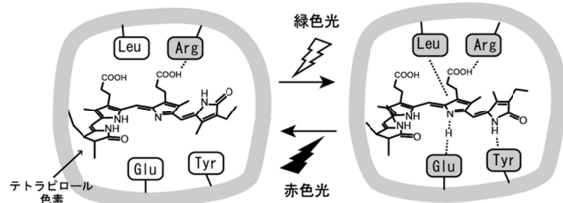
研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop the photoswitch systems sensing rainbow colors by introducing random mutagenesis in the cyanobacteriochrome-class photosensor and by its screening in *E. coli* using next generation sequencers. We introduced the photoswitch system and light regulated promoter fused to antibiotics genes in *E. coli*, but did not observe clear control of its growth rate by light irradiation. Further analyses suggested that 1) activation of light-regulated promoter by *E. coli* transcriptional system and 2) inefficient transcriptional activation probably due to low efficiency in chromophore attachment of photosensor protein and/or its low phosphorylation activity. Therefore, we are now trying a superior photoswitch identified in different host cyanobacteria and establishing more systematic approach.

研究分野：光生物学、ゲノム生物学

キーワード：次世代シーケンサー フィトクロム オプトジェネティクス シアノバクテリア 光受容体 二成分制御系 シアノバクテリオクロム

### 1. 研究開始当初の背景

酸素発生型の光合成を行う原核生物であるシアノバクテリアは、シアノバクテリオクロムと呼ばれる独自のフィトクロム型の光受容体を持つ。シアノバクテリオクロムは、テトラピロールを色素として結合するが、植物型のフィトクロムとは異なり、紫・青・緑・黄・橙・赤など様々な色の光を吸収するバリエーションが存在する。近年の解析により、シアノバクテリオクロムの吸収波長が、色素近傍のアミノ酸の側鎖によって調節されることが明らかとなった。例えば、緑色光と青色光を受容するタイプのシアノバクテリオクロムでは、色素がシステイン残基と共有結合を形成する (Rockwell et al 2008 *Biochemistry*)。申請者らは、緑色光と赤色光を受容するタイプのシアノバクテリオクロムである CcaS を発見し、CcaS がテトラピロール色素のプロトン脱着反応を周囲の複数のアミノ酸残基と協調的に行うことを見出している (図 1、Hirose et al 2013 *Proc.*



*Natl. Acad. Sci.* )

図 1、申請者らが見出したシアノバクテリアの光スイッチタンパク質 CcaS の光反応機構

オプトジェネティクスとは、生体活動を光で制御することを目指す研究分野であり、急速に発展を遂げている。オプトジェネティクスは、光の生体へ影響の低さ、光照射領域の範囲の制御のしやすさ、光照射する時間の制御のしやすさといった多くの利点を持ち、近年では *Nature Methods* 誌の選ぶ「Method of the year 2010」にも選出されている。近年、海外のグループによって、CcaS を導入した大腸菌の遺伝子発現を、外部からの緑色光と赤色光の照射によって制御できたことが報告された (Tabor et al 2011 *J. Mol. Biol.*)。この報告をきっかけとして、オプトジェネティクスにおける優れた遺伝子発現の光スイッチとして CcaS は着目を集めている。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が発見した緑・赤色光受容型のシアノバクテリオクロム CcaS をプラットフォームとして、色素近傍のアミノ酸をランダムに置換する。その中から、紫～赤色までのそれぞれの光によって遺伝子発現の ON/OFF を行う変異体を、次世代シーケンサーを用いたアプローチによってスクリーニ

ングすることを目的とした。最終的には、これらの虹色を受容する変異体シリーズを組み合わせることで、多波長光入力による複雑な遺伝子発現制御を実現できる。このアプローチは、他の光受容体の吸収波長の改変にも応用できる可能性を秘めており、近年発展の著しいオプトジェネティクスに大きなインパクトを与える可能性がある。

### 3. 研究の方法

網羅的に変異を導入した CcaS 変異体シリーズの中から、波長特性の異なる変異体を大腸菌内で効率的にスクリーニングするためのシステムの構築を行なった。具体的には、緑・赤色光受容システム (CcaS 及び CcaR) に薬剤耐性遺伝子を導入したプラスミドを作製して大腸菌に導入し、大腸菌の増殖を外部からの緑もしくは赤色光照射によって制御するシステムの開発を行なった (図 2)。CcaS に結合するテトラピロール色素はシアノバクテリアのみが持つ色素であり、この色素を大腸菌に合成させるための遺伝子 (*holI* 及び *pcyA*) として、大腸菌で実績のある pKT271 プラスミドを利用した。 (Mukougawa et al 2006 *FEBS letters*)。)

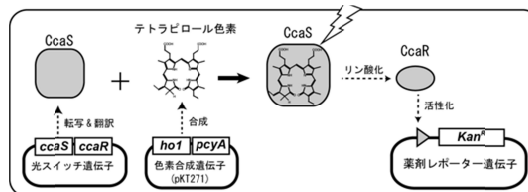


図 2、本研究で構築を行なった大腸菌細胞の光制御システム。

### 4. 研究成果

平成 28 年度は、*Synechocystis* 属シアノバクテリア由来の緑・赤色光スイッチ遺伝子群 (シアノバクテリオクロム CcaS 及びレスポンスレギュレーター CcaR)、光スイッチプロモーターを融合させた薬剤耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを構築し、色素合成プラスミドと共に大腸菌へと導入した。プラスミドを導入した大腸菌の増殖速度は、緑色光と赤色光の照射下で大きな違いは見られなかった。RT-PCR 解析を行なったところ、導入した CcaS 及び CcaR の遺伝子は発現しているが、光スイッチプロモーターを融合した薬剤耐性遺伝子も恒常的に発現し、明確な照射光の波長依存性が見られなかった。続いて、光シグナルの途切れている要因が、CcaS の光受容能にあるのか、CcaR のリン酸化レベルにあるのか、もしくは薬剤耐性遺伝子の発現レベルにあるのかを検証するため、CcaS/CcaR 両遺伝子を欠失したプラスミドを構築し、大腸菌に導入して生育速度を評価した。その結果、

この欠失プラスミド導入株においても恒常的な薬剤耐性遺伝子の発現が見られた。このことは、光スイッチプロモーターに大腸菌由来の転写因子が結合して薬剤耐性遺伝子を発現させ、その結果、光波長に依存しない薬剤耐性を大腸菌獲得したことを示している。また、CcaS/CcaR 欠失プラスミド導入株は、欠失前のプラスミド導入株と比べて増殖速度が低下していた。このことは、CcaS 及び CcaR 導入により薬剤耐性遺伝子の恒常的転写が活性化されたことを示しており、CcaS-CcaR システムの光感受性にも問題があることが示唆している。

平成29年度は、前年度に見つかった問題点の解決のための研究を行なった。研究開始と同時期に、大腸菌由来の転写因子が光スイッチプロモーターに結合する可能性が海外のグループから報告された (Sebastian et al 2014 *ACS Synth. Biol.*)。大腸菌由来のシグナル伝達のクロストークを解消するため、これらの結合部位を除去した光スイッチプロモーターを薬剤耐性遺伝子と融合して大腸菌に導入したが、増殖速度に影響は見られなかった。これは大腸菌由来の転写因子の結合部位が CcaR 結合部位と非常に近い可能性を示唆している。続いて、薬剤耐性遺伝子を GFP 遺伝子に置換したプラスミドを構築し、細胞の増殖ではなく、GFP の蛍光強度として光シグナルをモニターする系を構築した。その結果、光スイッチプロモーターの活性は GFP 蛍光の検出下限レベルであることがわかった。これらの点は、微量の薬剤耐性遺伝子の発現の「漏れ」が、細胞の増殖速度という表現系に大きく影響することを示していた。薬剤濃度を上げたところ、ある程度の改善が見られたが、将来的には栄養要求性に関わる遺伝子等の利用も検討する必要がある。CcaS 及び CcaR から光スイッチプロモーターへのシグナル増強を目的として、*Synechocystis* 属以外のシアノバクテリア宿主由来の CcaS 及び CcaR を検討した。その結果、糸状シアノバクテリアの持つ CcaS 及び CcaR の光スイッチ能が極めて高いことを見出し、その遺伝子に関する特許を出願した。さらに、CcaS 及び CcaR の発現量の厳密な制御を目的として、プロモーター・リボソーム結合部位・ターミネーター配列の最適な組み合わせをスクリーニングできるシステムを構築している。

総括として、本研究では光受容体の波長特性改変のための優れたスクリーニングシステムが開発を行い、そのボトルネックとなる課題点を絞り込むことに成功した。今後は、これらの点を1つ1つ解決し、最終的な光受容体の吸収波長の改変へとつなげることが重要である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

広瀬侑、浅見春佳「シアノバクテリアの光スイッチの改良」第9回長野セミナー、平成28年1月24日、ラフォーレ倶楽部白馬八方(長野県白馬村)

広瀬侑、長尾信義、米川千夏、渡辺麻衣、池内昌彦、浴俊彦「*Leptolyngbya* 属シアノバクテリアの光合成装置の光色応答の解析」第11回日本ゲノム微生物学会年会、平成29年3月2日、慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス(神奈川県藤沢市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 核酸分子およびこれを用いたタンパク質の製造方法  
発明者: 広瀬侑  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2017-038832  
出願年月日: 平成29年3月1日  
国内外の別: 国内

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  
<https://www.tut.ac.jp/university/faculty/ens/703.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 侑 (HIROSE, YUU)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・環境・生命工学系・助教  
研究者番号: 30616230

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

浴 俊彦 (Eki, Toshihiko)  
豊橋技術科学大学・環境・生命工学系・大  
学院工学研究科・教授  
研究者番号：40192512