

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08150

研究課題名(和文)代謝の光制御による藍藻でのPHA生産

研究課題名(英文)Light control metabolic pathways for production of PHA in cyanobacteria

研究代表者

松井 南 (Matsui, Minami)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：80190396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：地球温暖化の原因である炭酸ガスを資源としてラン藻によるバイオプラスチックPHAの合成の研究を進めた。ラン藻は、紫、青、緑、橙、赤、遠赤色の光を感受するため、これらの光条件でのラン藻のPHA合成に関わる解糖系、TCA回路、PHA合成経路についてそれらの酵素遺伝子発現を調べた。解糖系酵素は、暗所でほとんど発現されず、赤、緑、青色光で発現がみられた。TCA回路は逆に暗所でその酵素の多くが発現していることがわかった。PHA合成経路は、暗所で殆どの酵素特に、PHAのポリマー酵素が発現していた。これらのことは、光波長によりラン藻の代謝を制御し、PHAの高生産を行い得ることを示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化石資源の消費によって起こされる地球温暖化による環境の変動は、世界的な問題である。プラスチックのような製品も環境負荷の少ない生物を利用した生産が求められる。ラン藻は、温暖化ガスのCO₂を資源として用いた光合成によりバイオプラスチックの1つであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を作ることができる。またPHAは生分解性を有する環境負荷の少ない材料である。ラン藻は、6種類の波長の光を受容することができる。このような光波長による遺伝子発現制御を利用して効率よくPHAを生産するために、PHA合成に関わる酵素遺伝子の光制御機構を解明することで、効率的なバイオプラスチック生産と温暖化軽減を実現する。

研究成果の概要(英文)：We performed research on production of Bioplastic PHA by cyanobacteria through fixation of CO₂ that is causative molecule of global warming. Cyanobacteria perceive purple, blue, green, orange, red and far-red lights. We analyzed expression of enzyme genes involved in PHA biosynthesis such as glycolysis, TCA-cycle and PHA-biosynthesis. Enzyme genes in glycolysis are not expressed under dark condition and induced by red, green and blue-light. On the other hand most of TCA-cycle enzyme genes are expressed in darkness. Enzymes in PHA-biosynthesis are induced in darkness including PHA polymerization enzymes. These observations indicate that optimal production of PHA by Cyanobacteria is possible through control by monochromatic light irradiation.

研究分野：植物バイオマス

キーワード：ラン藻 代謝制御 光受容体 ポリヒドロキシアルカン酸 遺伝子発現制御 単色光

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私達は今までに環境の炭酸ガスの資源化によるバイオマス生産のための研究を行ってきた。バイオプラスチックの1つであるポリヒドロキシアルカン酸 PHA は、特定条件で微生物が炭素源貯蔵のために蓄積するものであり、PhaA, PhaB, PhaC の3つの酵素でアセチル CoA から合成される。私達はラン藻 *Synechocystis*PCC6803 を用いてそれに放線菌 *NphT7*、*C.Nector* の PhaB、*クロモバクテリア*の PhaC を用いることで、今まで PhaA により PHA の合成経路の初期反応が可逆的であったため非効率であった反応を *NphT7* の司るマロニル CoA とアセチル CoA からポリヒドロキシアルカン酸 PHA の合成中間体であるアセトアセチル CoA を不可逆的に一方に作り出すことで、PHA の高生産を達成できることを報告した (Lau, N. S., et al., *PLoS One*. 9, e86368 (2014))。

この高生産ラン藻の細胞内遺伝子発現を RNA-Seq により調べたところ光合成関連の遺伝子発現が上昇しており、これによって PHA 合成に使われるアセチル CoA の減少が補われていることが示唆された。ラン藻を用いた物質生産のためには、単に合成系を導入するのみならず、細胞内の代謝系を理解することが必要である。ラン藻の多くの遺伝子発現は、光制御されていることが知られており、光合成関連遺伝子もその中に含まれると考えられる。ラン藻には、幾つかの光受容体が単離されている (Hitomi et al., 2000, *Nucl. Acid. Res.*, 28, 2353-62, Brudker et. Al., 2003, *Mol. Cell*, 11, 59-67, Lampertter et al., *Eur.J. Biochem.*, 2001, 268, 4720-30)。ラン藻は、高等植物と同じく赤、青、遠色光を受容する以外に緑色光を受容する。ラン藻 PCC6803 には、Cph1, Cph2 の光受容体があり、N 末半分で、赤色光、遠赤色光を受容し、C 末半分で青色光を受容する。また青色光、UV-B 受容の Syn-CRY Cryptochrome も光合成装置のメンテナンスに関わっていることが報告されている (Vass, et al. *Photochem. PhotoBio*, 130, 318-326 2014)。

さらに概日リズムが物質生産に影響することが報告されている (Muller, et al., 2014, *J. Exp. Bot.*, 65, 2915-23)。ラン藻の1種の *Synechococcus* PCC7942 は、概日リズムの研究が中心に行われ、kaiA, kaiB, kaiC, SasA, CikA, SasR 等の概日リズムに関与する遺伝子が解析されている。そこで、ラン藻の遺伝子の光制御を調べ、それらを単色光で調節することを行うことで炭酸同化能力を向上させ更なる PHA 生産を起こさせる。このような遺伝子発現の光制御はオプトジェネティクスとして近年主に動物細胞での遺伝子の光制御を中心に用いられているが (Deisseroth, K. *Nat. Method* 2011, 8, 26. doi:10.1038/), ラン藻の代謝が種々の単色光で制御されていることからこのような代謝系の光制御が可能であると考えられる。光制御によるラン藻での物質生産の基礎を作る。

2. 研究の目的

ラン藻を用いた物質生産は、直接光合成により環境中の炭酸ガスを資源として物質生産することができることから広い応用の可能性を有している。このための科学的な基礎を作るために、我々はバイオプラスチック PHA 生合成のためにラン藻 PCC6803 に人工のオペロンを導入し生産性の向上を行ってきた。ラン藻細胞内代謝系の遺伝子発現の単色光による制御と PCC7942 による概日リズムの PHA 生産に関わる影響を調べることで、ラン藻の遺伝子発現の光制御地図を作成する。PHA 生産量を向上させるためにこの代謝光制御地図を用いて PHA 合成と拮抗する代謝経路光抑制による生産性の向上をおこなう。また代謝系遺伝子のプロモーターを単色光で特異的に発現制御されるプロモーターに相同組換えで置換することで、人工的な代謝スイッチによる制御を行い、オプトジェネティクスによる PHA 生産を目指す。

3. 研究の方法

PHA を生産するために *NphT7PhaBPhaC* 人工オペロンの導入してある PCC6803 を単色光条件下で生育して、PHA の生産量と細胞内代謝系遺伝子の単色光制御を調べる。また同じ PHA 合成のための人工オペロンを *Synechococcus*PCC7942 と概日リズム遺伝子の変異株に導入することで PHA 生産の概日リズムの影響と細胞内代謝系遺伝子の変化を調べる。このようにしてラン藻の代謝系遺伝子の光制御地図を作成する。PHA 生産を最適化するために PHA 生産に拮抗する代謝系遺伝子の単色光の組み合わせによる制御を行う。またこれら代謝系遺伝子を PHA 合成とは別の波長の単色光制御プロモーターに置換することで PHA 合成のための細胞内代謝の光制御を行う。

4. 研究成果

(1) 単色光照射実験系の評価各サンプル間における遺伝子発現のクラスター分析

ラン藻 PCC6803 をラン藻用の培地である BG-11 で 30 度で液体培養を行った。その後 6 時間暗所で暗順化を行い、紫色光 (405 nm, 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、青色光 (447 nm, 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、緑色光 (530 nm, 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、橙色光 (590 nm, 10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、赤色光 (660 nm, 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、遠赤色光 (700 nm, 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の LED による単色光照射を 1 時間行なった。各波長の照射は、3 回繰り返し行うことで平均的な遺伝子発現変化を観察した。

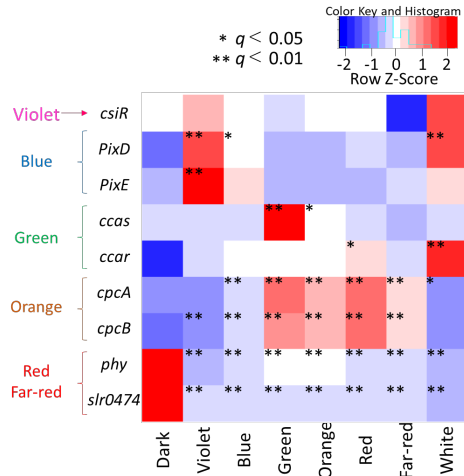
(2) 単色光照射に対する光受容体遺伝子の発現

ラン藻は、紫、青、緑、橙、赤色、遠赤色光を吸収する光受容体を持っている。これらの光受容体がどのような波長によって遺伝子発現制御されているかについて調べた。

解析した光受容体遺伝子は、紫色光に反応する *csiR*、青色光 *PixD*、*PixE*、緑色光 *ccas*、*ccar*、橙色光 *cpcA*、*cpcB*、赤色光と遠赤色光 *phy*、*slr0474* である。

全体的な傾向として各光受容体は、各々が受容する光波長で発現が増加する傾向がみられた。*csiR* は、紫色光、*PixD*、*PixE* は、紫色光と青色光で、*ccas* は、緑色光、*cpcA*、*cpcB* は、橙色を中心、緑、赤色光で他の単色光条件と比較して発現が観察された（右図）。

phy、*slr0474* は、赤色光条件や遠赤色光条件ではなく、暗条件で発現が増大していた。シロイヌナズナでは、暗条件において赤色光、遠赤色光吸収に関わる phytochrome A が細胞内に蓄積することが知られている（Furuya, 1993）。*phy*、*slr0474* の暗条件における発現の増大は phytochrome A と共通の発現様式を持つことが示唆された。



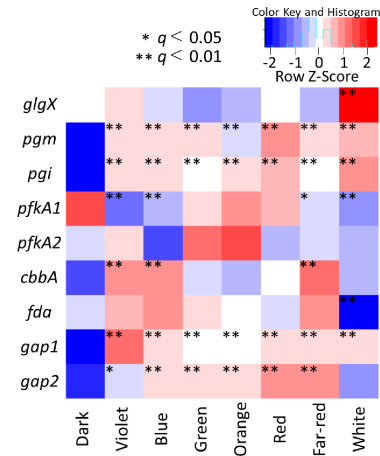
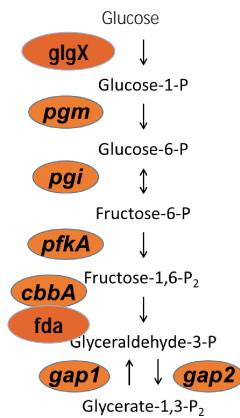
(3) 解糖系関連酵素遺伝子の光発現制御

解糖系は、グルコースを基質として *glgX* (isoamylase), *pgm* (phosphoglucomutase), *pgi* (glucose-6-phosphate isomerase), *pfkA1/pfkA2* (phosphofructokinase), *cbbA/fda* (fructose-bisphosphate aldolase),

gap1 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 1 (NAD+)), *gap2* (NAD(P)-dependent

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) で構成されている。ほぼ全ての酵素遺伝子は暗所での発現が他の単色光条件よりも低かった。しかし、Fructose-6-P から

Fructose-1,6-P₂ を司る *pfkA* は、暗所での発現が高く紫色や青色光では、他の酵素遺伝子発現が高いのに対してこの酵素遺伝子は発現が低い。このことからこの酵素を介して紫、青色光による解糖系制御ができると考えられた。



(4) TCA 回路の光制御

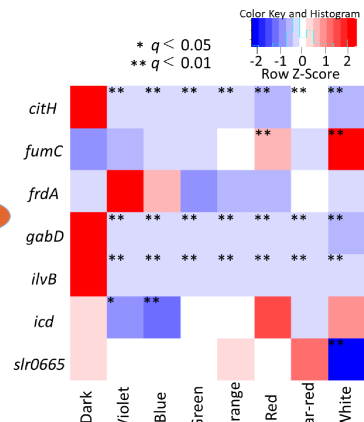
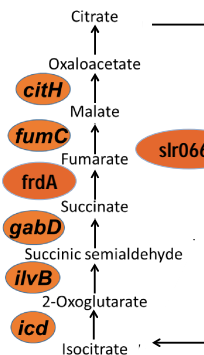
TCA 回路を構成しているラン藻の酵素遺伝子は *citH* (malate dehydrogenase), *fumC* (fumarase),

frdA (succinate dehydrogenase flavoprotein subunit), *gabD* (succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+)), *ilvB*

(acetolactate synthase), *icd* (isocitrate dehydrogenase (NADP+)), *slr0665* (aconitate hydratase) である。

右図から分かるように暗条件でこれらの多くの遺伝子発現が高かった。暗条件で盛んに TCA 回路が働くことで

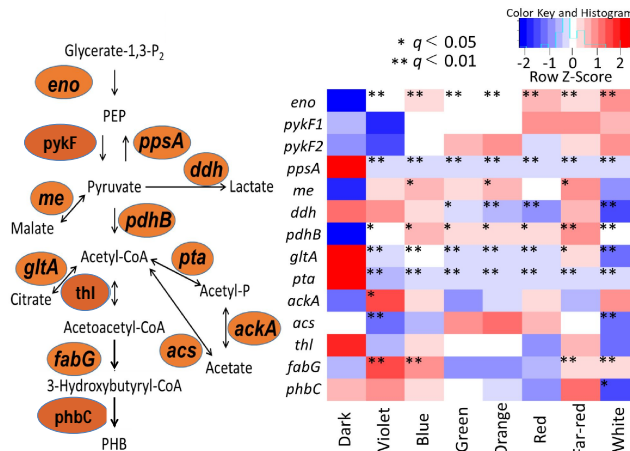
ATP 生産が行われると考えられる。このなかで *frdA* と *fumC* が他の酵素遺伝子と相反する発現をしていることがわかった。特に *frdA* 遺伝子は紫、青で発現が高く、他の TCA 回路の遺伝子発現はこの光条件で低い。このことから *frdA* は TCA 回路の制御をしている酵素と考えられ、紫色により調節を行うことができると考えられた。



(5) PHA 生産経路に関わる酵素遺伝子の光発現制御

ラン藻は、光合成による炭素源が豊富にあるものの窒素源が少ない状態の時、過剰の炭素源をアルカンポリマーとして蓄積する。

このアルカンポリマーは、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)と呼ばれる。その中でも PHB ポリヒドロキシブタン酸は、ラン藻、微生物が作り出す生分解性のポリマーであり、バイオプラスチックの1つである。代謝経路は、*eno* (enolase), *pykF1/pykF2* (pyruvate kinase), *ppsA* (phosphoenolpyruvate synthase), *me* (malic enzyme), *ddh* (2-hydroxyaciddehydrogenase), *pdhB* (pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit), *gltA* (citrate synthase), *pta* (phosphotransacetylase), *ackA* (acetate kinase), *acs* (acetyl-coenzyme A synthetase), *thl* (PHA-specific beta-ketothiolase), *fabG* (PHA-specific acetoacetyl-CoA reductase), *phbC* (poly(3-hydroxyalkanoate synthase) で構成される(右図)。なかでも acetyl-CoA から PHB への合成に関わる *thl*, *fabG*, *phbC* の3つの酵素が PHB 合成に重要である。



TCA 回路と同じく暗所での各酵素遺伝子の発現量は高かった。PHB は、ラン藻が光合成を行わない時に蓄積する貯蔵物質であることから、暗所で PHB 合成に関わる酵素遺伝子の発現が高くなると考えられた。

me は、pyruvate と malate (コハク酸) の変換に関わる反応を司る酵素であり、*ddh* は、pyruvate から lactate に変換する酵素である。また *pta*, *acs*, *ackA* は、acetyl-coA から acetate (酢酸) への変換に関わる酵素である。これらの酵素は、PHB 合成への流れから分流する経路であるため、光制御によって遮断することができるならば効率的な PHB 合成に貢献することができる。実際暗条件では、*me*, *ackA* の発現が抑制されていることからこれらの分流する反応は抑制されていると考えられる。一方 *ddh* は、暗条件でも発現が起こることから Lactate への変換は暗条件でも誘導されていると考えられる。この反応を抑制するためには、*ddh* の発現を抑制できる赤色光のパルス照射による抑制や、プロモータ改変が考えられる。また PHB 合成経路では、*pdhB* のように PHB 合成経路の律速になる可能性のある酵素が見られる。*pdhB* 遺伝子は、青や遠赤色光で発現誘導されることからこれらの単色光パルスでのこの律速段階を回避することができる可能性が考えられた。

この研究では、光を単色光に分解して解析を行い、特に解糖系、TCA 回路、PHA 合成経路についての光波長特異性について解析を行うことで基礎的な代謝の光マップの知見を得ることができた。単波長を駆使して細胞に掛る負荷をできるだけ少なくして物質生産のための基礎的な情報を得ることができた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

日本プラスチック工業連盟誌
 タイトル：ラン藻によるバイオプラスチックの高効率生産
 執筆者：松井南 2017-10 p29-p32 2017年
 (査読無し)

[学会発表](計 1件)

第59回日本植物生理学会年会 2018年
 講演タイトル：ラン藻の光代謝マップの作成
 発表者：荒木優也、嶋田勢津子、蒔田由布子、川島美香、栗山朋子、島田裕章、松井南

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://synthetic-genomics.riken.jp/>
6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。