

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19825

研究課題名（和文）微細藻類の変動光に対する光化学系と代謝のシステム解析

研究課題名（英文）Systems analysis of photosynthesis and metabolism of cyanobacteria under fluctuation light condition

研究代表者

清水 浩（Shimizu, Hiroshi）

大阪大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：00226250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：シアノバクテリアは光エネルギーを利用してCO₂から直接有用物質を生産できるため理想的な細胞工場として、その工学利用が期待されている。本研究では、光合成生物が変動光下においても光化学系や代謝系が安定に動作するメカニズムの解明を目指した。安定同位体標識を用いた¹³C代謝フラックス解析法を開発し、定常光、変動光条件下で代謝と光合成の状態を明らかにすることを目的とした。また、光化学系の活性を評価する実験も行った。さらにゲノムスケール代謝モデルや動的な代謝変動シミュレーションモデルを用いて代謝を解析し、代謝と光化学系の活性状態をフラックスとして議論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物は様々な応答速度で変化するサブシステムが連結するネットワークと考えることができる。シアノバクテリアは光化学系と代謝を連結している生物であり、速い速度で応答する光化学系と遅い速度で応答する代謝系がいかに安定に動作しているかを理解することは異なる時間スケールのシステムを連結する際に重要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cyanobacteria is a promising microorganism which is able to directly use CO₂ and produce valuable compounds with the aid of light energy as a green microbial cell factory. Aim of this study is to clarify the mechanism of stable behavior of cyanobacteria under fluctuation light condition which involves different time scale systems such as photochemical and metabolic systems. ¹³C isotope labeling and metabolic flux analysis system were performed under different light conditions. By integrating the multiple analytical methods, Mechanism of dynamics of biosystem with different time scale sub systems was discussed.

研究分野：バイオ機能応用およびバイオプロセス工学関連

キーワード：シミュレーション 代謝フラックス解析 変動光 光合成

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリア *Synechocystis* PCC 6803 は、光エネルギーを利用して CO₂ から直接有用物質を生産できるため理想的な細胞工場として、その工学利用が期待されている。しかし、変動光下では、連続光下と異なり成育の大きさが変化することが知られている。光合成生物では変動光下において高速に変化する光エネルギー供給と低速に変化するエネルギー利用のシステムが連結して安定に動作するシステムとしての仕組みが備わっていると考えられる。光合成に関わるの光化学系と代謝系が連結した細胞においてどのような動作原理が備わっているのかについて明らかにすることは、様々な時間オーダーで動作するサブシステムを包含するシステムの動作原理説明として重要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究においては、光の ON/OFF と点灯時の光強度を変更可能なコンピューター制御型培養装置を自作し、時間的に変動する光環境実験系を立ち上げることを目的とした。次に、我々自身が先行研究で構築した ¹³C-標識実験による炭素中枢代謝解析を統合し、光合成生命システムの安定性や適応性の仕組みを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Synechocystis PCC 6803 を用いて変動光下で時間オーダーの異なる光化学系と代謝の解析を行った。LED 光源の光強度を様々な時間間隔で変動させるコンピューター制御光培養装置を開発を行って、変動光や一定強度の定常光で培養し、基本的な増殖特性を得た。安定同位体標識データから細胞内の中枢代謝フラックスを決定する ¹³C 代謝フラックス解析や光化学系の解析を行って、光化学系と代謝系の特性を解析した。また、定常状態や非定常状態を表現する数理モデルを開発し、代謝状態がどのように変化するのかについてシミュレーションを行う基盤を作成した。実験データから短い時間で応答する光化学系は速度の速い環境変動を緩衝する機構が備わっており、応答の遅い代謝システムが安定に動作することが示唆された。

4. 研究成果

本研究では、図 1 に示す研究を実施した。

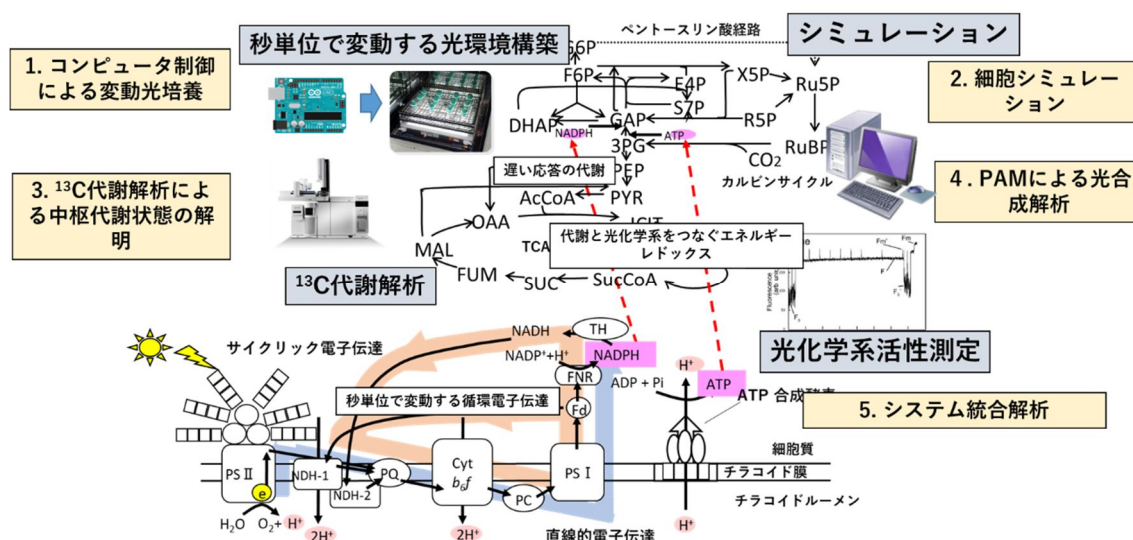


図 1 . 研究成果の概要

(1) コンピューター制御による変動光条件培養システムの開発

コンピューター制御による LED 変動光培養システムの開発を行った。プログラムによって定

常光および変動の時間幅を自由に变化させること変動光を照射可能なシステムとして開発した。開発した変動光制御システムと培養装置を統合し、コンピューター制御による変動光条件培養システムとして完成させた。このシステムを用いて、定常光、変動光条件下でシアノバクテリアを培養し、基本的な増殖特性を得ることが可能となった。

(2) ^{13}C -代謝解析による変動光条件における中枢代謝の解析

コンピューター制御による変動光条件培養システムを用いて、安定同位体 ^{13}C を含むグルコースを細胞に取り込ませ、変動光条件、定常光条件下で中枢代謝がどのように変化するかについて詳細に実験をおこなった。取り込まれたグルコース中の ^{13}C が代謝物質にどの程度蓄積されているかをガスクロマトグラフ質量分析計を用いて解析した。グルコースの取り込み速度、増殖速度についても計測した。これらのデータを用いて ^{13}C -代謝フラックス解析を行い、中枢代謝のフラックスを決定した。得られた中枢代謝フラックスから代謝経路で生成、消費する ATP、および NADPH の速度を評価するとともに、細胞が増殖のために要求する ATP、NADPH の速度の値を用いて、光化学系で生成する ATP、NADPH を見積もる方法を開発した。このデータを用いて定常光条件、変動光条件下での光化学系の変化についても議論した。変動光条件下における短時間での光化学系の変動は代謝に大きな影響をもたらしておらず、安定に代謝は維持されることが明らかとなった (Imada, *Biotechnol Prog* 2023)。

(3) Pulse amplitude modulated fluorometry (PAM) 蛍光法による光合成活性の解析

PAM は光化学系IIのクロロフィル蛍光を測定する手法であり、光化学系のタンパク質の劣化などの評価、エネルギー散逸などを見積もる手法として用いることができる。定常光と変動光を照射した際に、光化学系の状態がどのように変化するかを PAM を用いて計測し、光化学系のタンパク質の状態を評価した。変動光を用いた場合においては、光化学系のタンパク質は機能を落とすことなく健全な状態に保たれていることが明らかとなった。

(4) システム統合解析による変動光照射下の光化学系のシステム解析

シアノバクテリアのゲノムスケールの代謝モデルを従来より、開発し公開している。この方法は定常状態の代謝や光化学系の状態をフラックスとしてシミュレーションすることのできる方法である。また、これに加えて、シアノバクテリアの主要な炭素代謝経路であるカルビンベンソンサイクルを含む動的な変動をシミュレーションできるモデルを構築した。光化学系の代謝制御機構についても既知の制御機構については盛り込んでモデルを開発した。明条件や暗条件下で動作可能なモデルとしてシミュレーションを行うことが可能となった。

本研究では、光条件が変動する環境下において光化学系、代謝系をフラックスという指標を用いて評価可能な ^{13}C 代謝フラックス解析システムを開発し、光変動光条件下での代謝フラックスを解析した。また、PAM を用いて光化学系のタンパク質の状態を評価した。さらに、ゲノムスケールモデルや代謝動的モデルを開発することで、定常状態における代謝や光化学系の状態の解析、摂動を与えた際にシステムがどのように変化するかを統合的に議論できるシステムが構築された。これらの解析から光変動条件下においては過剰な光エネルギーは光化学系で緩衝され、遅い応答の代謝系には影響が伝播しない機能を備えていると考えられた。このような仕組みは時間スケールの異なるサブシステムを連結した際に変動の影響を緩衝する方法として機能することが示唆された。

<引用文献>

Imada, T., Yamamoto, C., Toyoshima, M., Toya, Y., Shimizu, H.*, Effect of light fluctuations on photosynthesis and metabolic flux in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biotechnology Progress*, **39**(3), e3326 (2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada Keisuke, Uebayashi Kiyoka, Toya Yoshihiro, Putri Sastia Prama, Matsuda Fumio, Fukusaki Eiichiro, C. Liao James, Shimizu Hiroshi	4. 巻 69
2. 論文標題 Effects of n-butanol production on metabolism and the photosystem in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 based on metabolic flux and target proteome analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2023.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Imada Tatsumi, Yamamoto Chiaki, Toyoshima Masakazu, Toya Yoshihiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of light fluctuations on photosynthesis and metabolic flux in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biotechnology Progress	6. 最初と最後の頁 e3326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/btpr.3326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 今田 辰海, 戸谷 吉博, 清水 浩
2. 発表標題 グリコールアルデヒドがシアノバクテリアの代謝に与える影響の解析
3. 学会等名 化学工学会第89年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 戸谷吉博
2. 発表標題 様々な光環境におけるシアノバクテリアの中核代謝ロジスティクスの解析
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshihiro Toya
2. 発表標題 Systems biology of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 and its applications in metabolic engineering
3. 学会等名 Workshop: Metalloenzymes cofactor assembly, catalytic mechanism and redox partners (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsumi Imada, Chiaki Yamamoto, Yoshihiro Toya, and Hiroshi Shimizu
2. 発表標題 Effect of fluctuating light condition on photosynthesis and central carbon metabolism in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Shimizu
2. 発表標題 In silico and Experimental Metabolic Flux Analyses and their Applications to Fermentation Processes
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今田辰海、戸谷吉博、清水浩
2. 発表標題 シアノバクテリアにおけるEntner-Doudoroff経路の生理学的役割
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今田辰海, 戸谷吉博, 清水浩
2. 発表標題 シアノバクテリアにおけるエントナードウドロフ経路の生理学的影響の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田島 遼太郎, 池原 万由, 戸谷 吉博, 清水 浩
2. 発表標題 動的代謝モデルを用いたシアノバクテリアのカルビン回路における制御機構の解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 浩, 戸谷 吉博, 豊島 正和, 山本 千晶
2. 発表標題 シアノバクテリアの代謝工学
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水浩、豊島正和	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 224
3. 書名 光合成 第 部、3. 光合成のカギとなる段階を探せ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

清水浩研究室
https://metabolic-engineering.jp/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸谷 吉博 (Toya Yoshihiro) (70582162)	大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	二井手 哲平 (Niide Teppei) (20802705)	大阪大学・大学院情報科学研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------