

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656526

研究課題名（和文） 微細藻類の光阻害とストレス適応メカニズムの解析

研究課題名（英文） Study on inhibitory effect of high light on the cell growth and adaptation mechanism of cyanobacteria

研究代表者

清水 浩 (SHIMIZU HIROSHI)

大阪大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：00226250

研究成果の概要（和文）：

本研究では、微細藻類 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて光強度と増殖の関係を調査し、強度の大きい光に対して耐性を示し増殖能、物質生産能の高い株を育種するための戦略を探ることを目的とした。光強度に対して増殖速度が変化することを定量的に捉えることに成功した。また遺伝子発現量をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。これらの解析から今後、強い光に対して耐性を有する細胞を創製する戦略を立てることが可能となると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Effect of light irradiation strength on growth of cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 was investigated to establish a new strategy for creation of high light stress tolerant strain keeping high growth and production ability under high light condition. It was succeeded that the cell growth activity was quantitatively evaluated and DNA microarray analysis was performed under several light intensity conditions. It is expected that the results of analysis could provide a fundamental basis for design of high light tolerant strains of cyanobacteria for industrial purpose.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：微細藻類、DNA マイクロアレイ、光合成、代謝反応モデル、強光条件

1. 研究開始当初の背景

化石資源からの脱却を目的として、微細藻類を利用したバイオ燃料、バイオ化製品の生産は、循環型社会の創成にとって極めて重要な技術となると考えられている (Rittmann, *Biotechnol. Bioeng.*, 2008)。植物など他の光合成生物と比較すると、生長速度の速さ、食糧との競合の回避、未利用水域を利用した培養法の可能性など、微細藻類は細胞工場としての大きな可能性を有している。大気中の二酸化炭素を炭素源としたバイオ燃料

(Chisti, *Biotechnol. Adv.*, 2007)、化成品生産 (Atsumi et al., *Nature Biotechnol.*, 2009) などの生産開発に向けた研究が盛んに行われている。

大腸菌や酵母などの糖源などの栄養資源を利用する工業有用微生物に比較して、光合成による微細藻類の増殖速度は、1/10 程度小さいことが解決すべき課題となっている。バイオリアクタによる効率的な光供給法や律速となる栄養源の添加法などが検討されているが (Kim et al., *Biotechnol. Bioeng.*,

2010)、最も重要な点は、「受光エネルギーが大きすぎると細胞の活性自体が減少する「光阻害」効果のメカニズムが明らかでない」ことであり、実際の培養では、光供給量に制限を設けざるを得ないことである。実際、日本では日中の太陽光は $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 光程度まで上昇するが、このような強度の光では、光阻害が起きることが知られている。

本研究では、光の強度が大きすぎるとどのように光阻害が引き起こされ、細胞増殖が低下するのかをバイオリアクタを用いて定量的に解析し、遺伝子発現を網羅的に解析することで、そのメカニズムに迫ることによって、強い光に耐性を示す細胞の創製の戦術を探ることに焦点をあてた。

2. 研究の目的

本研究では、光合成微細藻類 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用い、強い光によって二酸化炭素吸収能力が飽和、減少する「光阻害」のメカニズムを DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現情報の取得を行うことを目的とした。光強度を人為的に制御することのできる光バイオリアクタを用い、光強度と増殖速度を測定できる実験系を構築することをまず、第一の目的とした。各光強度に対して、遺伝子発現量を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析することにより、光阻害を引き起こすメカニズムと細胞の適応に関与する遺伝子を抽出し、将来、二酸化炭素吸収能力、増殖能力を飛躍的に上昇させる細胞工場の創製への可能性を探ることを更なる目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌株

本研究では、シアノバクテリアの 1 種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 株のグルコース耐性株を使用した（以後 *Synechocystis* と記載）。

(2) 培地

Synechocystis の培養に用いられる標準的な BG11 培地から、HEPES と EDTA 2Na 以外の炭素化合物を含まないように改変した改変 BG11 培地を用いた。

(3) 培養方法

培養は図 1 に概要を示すバイオリアクタを用いて行った。図 1 に示すように本バイオリアクタでは、pH、温度、攪拌速度の観測と制御が可能なシステムとなっている。LED を光源として光強度を一定に保って培養を行った。培養は、400 mL の改変 BG11 培地、34 \square 、攪拌回転数 200 rpm、2.5%の CO₂ を混合した空

気を 400 ml/min で通気し、1 N KOH と 1 N HCl で pH7.5 に調整して行なった。

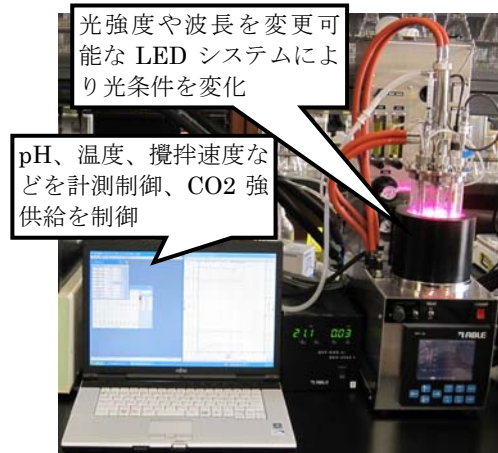


図 1. バイオリアクタ

(4) 菌体濃度測定

培養液の菌体濃度は、分光光度計 (SHIMADZU, Vmini-1240) を用いて、培養液の 730 nm における吸光度 (OD) を測定することにより決定した。波長は 730 nm を用い、必要に応じて希釈して測定した。

(5) 光強度測定

光強度 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) は、光量子計 (LI-COR, LI-190SA 光量子センサー LI-250A ライトメーター) を用いて測定した。

(6) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

①菌体の回収

遺伝子発現解析を行うため、対数増殖中期 (OD \approx 0.4) の培養液を、終濃度 10% (w/v) のフェノール/エタノール溶液に等量加えた。その後、4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 rpm で 5 min 遠心分離し、上清を除き、RNA 抽出操作まで -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

②RNA 抽出

回収した菌体から、RiboPure™-Yeast Kit (Ambion) を用いて RNA を抽出した。

③逆転写と蛍光標識

逆転写および蛍光色素の標識は、抽出した RNA 100 ng を用い、Low Input Quick Amp Labeling WT Kit (Agilent)、Cyanine 3-CTP (Perkin Elmer)、RNeasy mini kit (Qiagen) を使用して行った。

④DNA マイクロアレイの設計

DNA マイクロアレイの作成は web tool の eArray (Agilent Technologies, <https://earray.chem.agilent.com/earray/>) を用いて行った。eArray に FASTA 形式のターゲット生物の全配列と、アレイの設定条件を決定することで、プローブの設計を行った。

⑤DNA マイクロアレイによるハイブリダイゼーションとウォッシュ

Agilent Technologies 社指定のプロトコル (http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4813-90000_OneColor_Prokaryote_Protocol_1.3.pdf) に従って実験を行った。スキャナーは C version (G2505C) (Agilent) を、スキャンコントロールソフト v8.4.1 (Agilent)、Feature Extraction v10.7 (Agilent) をそれぞれ用いた。

⑥DNA マイクロアレイのデータ解析

データ解析は主に MATLAB 2010b (The Mathworks Inc.) を用いて行った。Feature Extraction ソフトウェア (Agilent) により、シグナルに問題があると判定されたプローブのデータは、遺伝子発現量の算出から除いた。遺伝子発現量は、同一遺伝子についてデザインされた複数プローブの、シグナル強度の中央値から算出した。マイクロアレイデータ間の比較を行うために、遺伝子発現量について Quantile Normalization (Bolstad et al. Bioinformatics, 2003) により正規化を行った。

(6) 研究成果

①光強度に対する増殖速度の影響

図 1 に示すバイオリアクタを用いて、 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ から $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ まで、8 段階に分けて光強度を一定にした培養を行い、*Synechocystis* の菌体増殖速度を比較した。菌体濃度の時間変化を図 2 に示す。

この図から、*Synechocystis* は光強度が低い環境から光強度の増加に伴い徐々に増殖曲線の傾きが上昇し、最大の増殖を示す状態を超えて光強度が強くなると、逆に増殖活性が低下することがわかる。比増殖速度 μ (単位菌体当たりの増殖活性) を指標にすることにより定量的に増殖活性が評価できると考えた。比増殖速度は時間ゼロから 24 h までの間の菌体濃度の値から決定した。

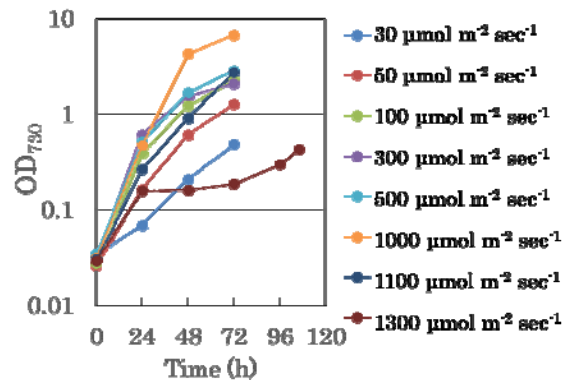


図 2. *Synechocystis* の菌体増殖曲線

②光強度に対する比増殖速度の影響

図 3 に光強度に対する比増殖速度の影響を示す。図 3 に示すように、光強度に対して比増殖速度が、比例的に上昇する培養フェーズ、飽和するフェーズ、減少するフェーズが存在することが明らかとなり、光強度に対する細胞活性の影響を、比増殖速度というパラメータにより初めて定量的に示すことに成功した。

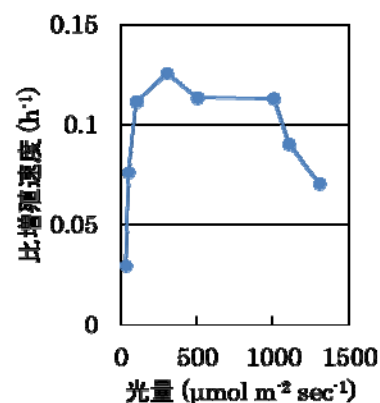


図 3. 光強度が比増殖速度に与える影響
比増殖速度はゼロ時間から 24 h の間の増殖曲線より評価した。

図 3 からわかるように光強度が $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ から $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の条件では菌体の比増殖速度が比例的に上昇しており、この間では光強度が増殖の律速になっていると考えられる (フェーズ 1)。光強度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ から $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の条件では菌体の比増殖速度は 0.11-0.13 h^{-1} の間で、ほぼ一定となっている (フェーズ 2)。(フェーズ 2) では、光強度を上昇させても比増殖速度は上昇せず、菌体は光エネルギーを菌体増殖に効率的に利用することはできていないことがわかる。さらに、光強度 $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ より大きい領域では、光強度が強くなるにつれ、比増殖速度は低下している (フェーズ 3)。

フェーズ3)。(フェーズ3)において光阻害現象により光エネルギーの有効利用ができていないばかりでなく、細胞増殖にとって阻害効果が現れていることがわかる。このように、本研究では、光の強度に対して比増殖速度の変化を捉えることに成功し、増殖阻害を起こす光の強さの範囲をつかむことに成功した。

③DNA マイクロアレイによる遺伝子発現量の網羅的解析

図4-1から図4-5に光強度が $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の際の遺伝子発現量を横軸に、 50 – $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の遺伝子発現量を縦軸に描いた遺伝子発現量のスカッタープロットを示す。

図4-1からわかるように、 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ と $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の(フェーズ1)条件では、そのスカッタープロットから遺伝子発現量の両者間の差異は他と比べて大きくないといえる。光強度に比例的に比増殖速度が上昇する条件では、遺伝子発現量のプロファイル大きく変化していないことが伺える。

一方、図4-2と図4-3の(フェーズ2)の条件においては、 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ や $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ と、 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の比較においては、スカッタープロットから各遺伝子の発現量が大きく変化しているものが多いことが明らかである。この条件では菌体の比増殖速度は 0.11 – 0.13 h^{-1} の間で、ほぼ一定でありながら、遺伝子の発現プロファイルは(フェーズ1)のそれとは大きく異なることが明らかとなった。

さらに図4-4、4-5(フェーズ3)の条件においては、 $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ や $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ と $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の比較においても遺伝子発現量プロファイルは大きく変化しており、光阻害効果が遺伝子発現の変化として捕らえることができていると考えられる。

注目すべきことに、光阻害効果は増殖能力を低下させるというレベルでは(フェーズ3)の $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の条件が注目されるが、遺伝子発現量のプロファイルでは $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の条件以上の光強度条件で、すでに発現量に影響が強く示されていることである。

(フェーズ2)と(フェーズ3)で同じような遺伝子に変化があるかどうかを理解するために、(フェーズ2)、(フェーズ3)内同士でのスカッタープロット、(フェーズ2)と(フェーズ3)間でのスカッタープロットを取った結果を図5、図6に示す。図6に示す異なるフェーズ間の遺伝子発現量の比較において、(フェーズ3)の $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ と(フェーズ2)の遺伝子発現量の違いが比較的小さい(図6-2、6-3)ことを除き、同じ

フェーズ内と比較し、異なるフェーズ間では、遺伝子発現の変化が大きいことが示唆された。

図4-1(フェーズ1) 図4-2(フェーズ2)

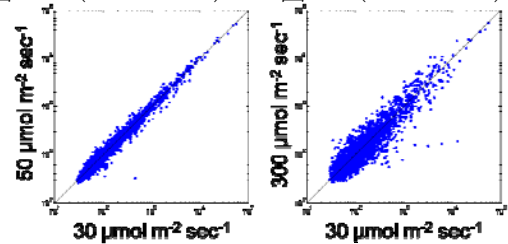


図4-3(フェーズ2) 図4-4(フェーズ3)

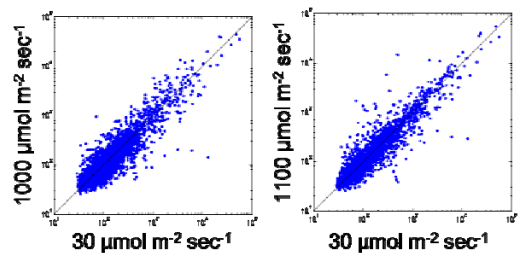


図4-5(フェーズ3)

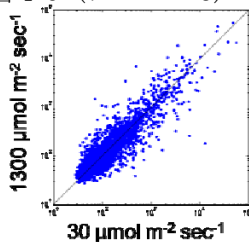


図4各光強度に対する遺伝子発現量のスカッタープロット。図4-1(フェーズ1)、図4-2、4-3(フェーズ2)、図4-4、4-5(フェーズ3)を(フェーズ1)の遺伝子発現量と比較した。

図5-1(フェーズ2) 図5-2(フェーズ3)

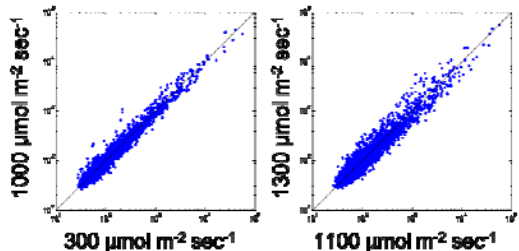


図5同じフェーズ内の遺伝子発現量のスカッタープロット。図5-1(フェーズ2)、図5-2(フェーズ3)。

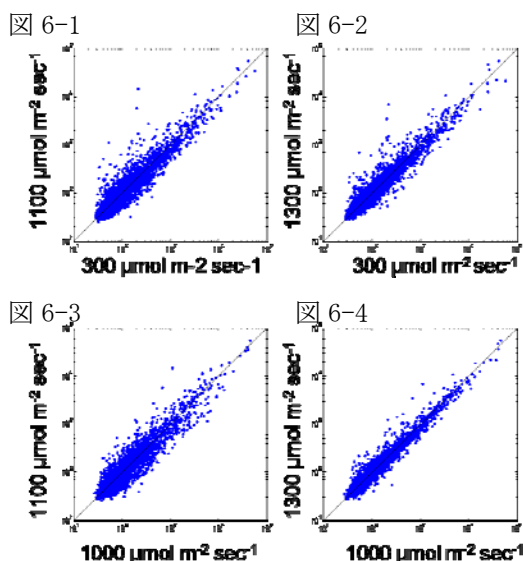


図6 (フェーズ 2) と (フェーズ 3) の遺伝子発現量のキャッタープロット。

まとめると本研究では、光の強度に対して比増殖速度の変化を捉えることに成功し、増殖阻害を起こす光の強さの範囲をつかむことに成功した。光の強度を上昇させると比増殖速度が上昇する(フェーズ1)、光強度を上昇させても比増殖速度が一定である(フェーズ2)、光強度が上昇すると比増殖速度が減少する(フェーズ3)に分類分けすることができることがわかった。次に、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現量の網羅的解析各フェーズの解析を行った。光量の増加に伴い(フェーズ1)では遺伝子発現量のプロファイルは大きく変化しないが、(フェーズ2)および(フェーズ3)では遺伝子発現量が(フェーズ1)に比較して大きく変化した。また同じフェーズ内の遺伝子発現量の変化に対し、異なるフェーズ間の遺伝子発現量の変化が大きい傾向が見られ、各フェーズ特異的に遺伝子発現が変化することが示唆された。

今後、これらの遺伝子発現量変化を詳細に解析することで、強光ストレス環境下における重要な遺伝子の抽出やストレス耐性を賦与するための戦略が創出されることが期待される。

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2件)

① Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Kenichi Ogawa, Yuki Hidaka, Tsubasa Nakajima, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, Integrated transcriptomic and metabolomic analysis of the central metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under different trophic conditions, *Biotechnology Journal*, 査読有、8:5 (2013), pp. 571-580, DOI: 10.1002/biot.201200235

② Katsunori Yoshikawa, Yuta Kojima, Tsubasa Nakajima, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa and Hiroshi Shimizu, Reconstruction and verification of a genome-scale metabolic model for *Synechocystis* sp. PCC6803, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有、92:2 (2011), pp. 347-358, DOI: 10.1007/s00253-011-3559-x

〔学会発表〕(計7件)

① 小川健一、*Synechocystis* sp. PCC 6803 における進化実験による強光ストレス耐性株の獲得、第54回日本植物生理学会、2013年3月23日、岡山大学津島キャンパス

② 吉川勝徳、微細藻類の細胞工場の実現に向けたシステムバイオロジー解析、化学工学会第78年会、2013年3月17日、大阪大学豊中キャンパス

③ Katsunori Yoshikawa, Systems biology in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Metabolic Engineering IX*, June 4, 2012, Le Bellevue Congress and Exhibition centre, Biarritz, France

④ Hiroshi Shimizu, Genome Scale Metabolic Flux Design and Experimental Evaluation of Cellular Performance, The 2nd iBioP Asian Symposium (iBioP2011), Dec. 15, 2011, POSTECH (Pohang University of Science and Technology), Pohang, South Korea

⑤ 小川健一、異なる栄養条件下でのシアノバクテリアの網羅的遺伝子発現解析、第63回日本生物工学会大会、2011年9月28日、東京農工大学

⑥ Tsubasa Nakajima, Effect of a Photosynthesis Inhibitor on Metabolic Flux Profile of Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *International Union of Microbiological Societies 2011*

Congress(IUMS2011), Sep. 7, 2011, Sapporo Convention Center

⑦ Hiroshi Shimizu, Systems Metabolic Engineering for Bioproduction Development, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress(IUMS2011), Sep. 6, 2011, Sapporo Convention Center

[図書] (計2件)

① Katsunori Yoshikawa, Springer, Systems Metabolic Engineering, Chapter3, 2012, 57-82

② 吉川勝徳、公益社団法人日本生物工学会、生物工学会誌、2012年、627-628

[その他]

① 清水浩、バイオ素材から樹脂原料、日本経済新聞第14面、2012年

② ホームページ等

<http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 浩 (SHIMIZU HIROSHI)
大阪大学・情報科学研究科・教授
研究者番号：00226250

(2) 研究分担者

古澤 力 (FURUSAWA CHIKARA)
大阪大学・情報科学研究科・招へい教授
研究者番号：00372631

平沢 敬 (HIRASAWA TAKASHI)
大阪大学・情報科学研究科・助教
研究者番号：20407125