

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658080

研究課題名(和文)クロロフィルdを利用して遠赤色光で光合成を行うシアノバクテリアの分子遺伝学的解析

研究課題名(英文)Molecular genetic analysis of the cyanobacterium that can utilize far-red light for photosynthesis using chlorophyll d

研究代表者

土屋 徹 (TSUCHIYA, Tohru)

京都大学・地球環境学堂・准教授

研究者番号：20362569

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)：シアノバクテリアに属するAcaryochloris(アカリオクロリス)は、他の酸素発生型光合成生物が利用できない遠赤色光を光合成反応に利用することができる。しかし、分子遺伝学的手法が確立されていないことが本生物の研究の進展について大きな障害となっていた。本研究は、Acaryochlorisが遠赤色光を利用するために適応した機構を解明するために、分子遺伝学的手法を開発することを目的とした。その結果、発現ベクターにより外来遺伝子をAcaryochlorisに導入すること、トランスポゾンタギングによりAcaryochlorisの突然変異体を作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Acaryochloris marina is the cyanobacterium that can utilize far-red light for photosynthesis, whereas most other oxygenic photosynthetic organisms cannot use the light. However, the lack of molecular genetic techniques for A. marina prevented us from studying this organism deeply. In this project, we aimed to develop the molecular genetic techniques for A. marina in order to elucidate the adaptation mechanism of A. marina to far-red light utilization. In the result of this study, we succeeded in introducing a foreign gene into A. marina using an expression vector. We also succeeded in producing transposon-tagged mutants of A. marina by transposon tagging.

研究分野：光合成

キーワード：応用微生物 シアノバクテリア クロロフィルd 光合成

1. 研究開始当初の背景

光合成は、光のエネルギーを生物が利用可能な形の化学エネルギーに変換する反応である。それゆえ、現代の人類が抱える諸問題の解決に向けて、光合成反応および光合成生物の有効利用が期待されていることから、植物や藻類の光合成能を上げる試みが、これまでに様々な側面から進められてきた。

光合成には、光のエネルギーを吸収するための「光合成色素」が必要である。光合成色素は、概ね生物種に依存して多様な分子種が存在し利用されている。それら個々の光合成色素の特性の違いが、それぞれの光合成生物が利用可能な光の波長域を限定している。

植物など多くの酸素発生型光合成生物では、700 nm より長波長側の光のみを照射しても光合成反応が進行しないことが古くから知られている。しかし、その長波長側の光に属する遠赤色光のみを照射しても、白色光を照射した場合と同様に生育することができる光合成生物が、近年になり発見されてきた。

シアノバクテリア(らん藻)である *Acaryochloris marina* は、クロロフィル *d* という特殊なクロロフィルをもち、遠赤色光で駆動する光合成系を有している。クロロフィル *d* は、他の酸素発生型光合成生物が利用するクロロフィル *a* と比較すると、約 30 nm 長波長側の光を吸収する性質をもっているため、クロロフィル *d* の存在が遠赤色光で駆動する光合成系の主たる要因であることが推定された。したがって、クロロフィル *d* の生合成を含めて本生物の光合成系を研究することで、光合成系の遠赤色光に適応する分子基盤が解明されることが期待された。そこで、*A. marina* を対象として生化学的解析、分光学的解析、生理学的解析などが進められてきたが、分子遺伝学的手法が確立していないことが、さらなる研究の進展について大きな障害になっていた。

2. 研究の目的

本研究では *A. marina* を対象とした分子遺伝学的手法を確立するために、(1)*A. marina* の形質転換系を開発し、さらに(2)順遺伝学的解析のために高転移頻度のトランスポゾンタギング系を開発することで、(3)その系を *A. marina* に適用してトランスポゾンが挿入された突然変異体を作製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 広宿主域プラスミドから作製した発現ベクターを接合法により *A. marina* へ導入した。さらに、この発現ベクターを利用して、外来遺伝子としてクロロフィル *b* 合成酵素遺伝子を *A. marina* に導入した。得られた形質転換体の色素組成、単離した光化学系の分光学的性質などを解析した。

(2) 既存の mini-Tn5 トランスポゾンベクターを改変した。はじめに、ベクター上のトランスポゼースに点変異を導入してハイパーアクティブ化した。次に、トランスポゼースの認識配列を至適化した。さらに、トランスポゼースの発現を制御するためのプロモーターおよびターミネーターを導入し、ベクターを保持する大腸菌内での転移を抑える工夫を施した。改変した mini-Tn5 トランスポゾンベクター (pKUT-Tn5-Sm/Sp) は、接合法でモデルシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入し、スペクチノマイシン耐性を示す形質転換体を得た。得られた形質転換体でのトランスポゾンの挿入位置を解析した。

(3) pKUT-Tn5-Sm/Sp のスペクチノマイシン耐性遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子に置換した pKUT-Tn5-Em を作製した。接合法により、pKUT-Tn5-Em を *A. marina* に導入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を得た。得られた形質転換体でのトランスポゾンの挿入位置を解析した。

4. 研究成果

(1) *A. marina* の形質転換系の開発

A. marina の抗生物質に対する感受性を調べた結果、スペクチノマイシンに感受性を示したことから、スペクチノマイシンを形質転換体の選抜に利用することにした。そこで、スペクチノマイシン耐性遺伝子をもつ発現ベクターを作製し利用することで、接合法による形質転換の条件検討を行った。その結果、発現ベクターの導入による *A. marina* の形質転換系の開発に成功した。

この確立した系を利用して、*A. marina* の光合成色素組成の改変を試みた。*A. marina* がもっていないクロロフィル *b* 合成酵素遺伝子を導入したところ、得られた形質転換体では、クロロフィル *b* ではなく、自然界には存在が確認されていない新奇な[7-ホルミル]-クロロフィル *d* が蓄積していた。これは、クロロフィル *d* が合成される過程で、7位のメチル基をホルミル基に変換するクロロフィル *b* 合成酵素が作用して生じたクロロフィル *d* であると考えられた。形質転換体の細胞および単離した光化学系の分光学的解析から、[7-ホルミル]-クロロフィル *d* は光のエネルギーを捕集するアンテナ色素として機能していることが判明した。

(2) モデルシアノバクテリアをもちいた高転移頻度のトランスポゾンタギング系の開発

順遺伝学的解析を行うためには、突然変異体を作製する必要がある。突然変異体の作製にはいくつかの方法があるが、シアノバクテリアでは「動く遺伝子」であるトランスポソンをゲノム中にランダムに挿入することにより遺伝子破壊を行うトランスポゾンタギングが有効である。そこで、既存の mini-Tn5 トランスポゾンベクターを利用して、トランスポゾンが挿入された *A. marina* の突然変異体の作製を試みたが、目的とする形質転換体

は得られなかった。

そこで、mini-Tn5 トランスポゾンベクターに改変を施した。改変によるトランスポソンの転移頻度の変化の評価には、成長が早く条件検討に適したモデルシアノバクテリアである *Synechocystis* を利用した。その結果、改変した mini-Tn5 トランスポゾンベクター、pKUT-Tn5-Sm/Sp をもちいることで、*Synechocystis* での高転移頻度のトランスポゾンタギング系の開発に成功した。この系のトランスポソンの転移頻度は、他のベクターによる既報のトランスポゾンタギング系の転移頻度より約 100 倍高かった。

トランスポゾンが挿入された *Synechocystis* の突然変異体のなかから、生育が遅い突然変異体を単離した。トランスポソンの挿入位置から原因遺伝子の候補を特定した。当該遺伝子を発現ベクターで突然変異体に導入したところ、生育が野生型と同程度まで回復した。これより、トランスポゾンタギングによる突然変異体の作製から、発現ベクターをもちいた原因遺伝子の導入による機能相補までの実験系が調った。

(3) *A. marina* でのトランスポゾンタギング系の開発

(2) で開発したトランスポゾンタギング系を *A. marina* に適用した。突然変異体の機能相補実験に発現ベクターを利用することを想定して、スペクチノマイシン以外の抗生物質による形質転換体の選抜を検討した。その結果、エリスロマイシンが有効であることが判明したため、pKUT-Tn5-Sm/Sp のスペクチノマイシン耐性遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子に置換した pKUT-Tn5-Em を作製し、(1) で開発した、接合法による形質転換系を利用して *A. marina* に導入したところ、トランスポゾンが挿入された突然変異体を作製することに成功した。

これらの結果は、*A. marina* を対象とした

分子遺伝学的手法を世界に先駆けて開発したことを意味する。本研究をさらに発展させることで、遠赤色光で駆動する光合成系の機構の解明が期待される。

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 7件)

Watabe, K., Mimuro, M. and Tsuchiya, T. (2014) Development of a high-frequency *in vivo* transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 55 (11): 2017-2026. 査読有、doi:10.1093/pcp/pcu128

Tsuchiya, T., Akimoto, S., Mizoguchi, T., Watabe, K., Kindo, H., Tomo, T., Tamiaki, H. and Mimuro, M. (2012) Artificially produced [7-formyl]-chlorophyll *d* functions as an antenna pigment in the photosystem II isolated from the chlorophyllide *a* oxygenase-expressing *Acaryochloris marina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (8): 1285-1291. 査読有、doi:10.1016/j.bbabi.2012.02.021

Tsuchiya, T., Mizoguchi, T., Akimoto, S., Tomo, T., Tamiaki, H. and Mimuro, M. (2012) Metabolic engineering of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*: production of a novel chlorophyll species by the introduction of the chlorophyllide *a* oxygenase gene. *Plant Cell Physiol.* 53 (3): 518-527. 査読有、doi:10.1093/pcp/pcs007

[学会発表](計 13件)

Tsuchiya, T. and Watabe, K. Molecular genetic analysis of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*. International meeting "Photosynthesis Research for Sustainability - 2014" in honor of Vladimir A. Shuvalov, Russia, 2014年6月4日

渡部 和幸、三室 守、土屋 徹、クロロフィル *d* を有するシアノバクテリア *Acaryochloris marina* での順遺伝学的解析のためのトランスポゾンタギング系の開発、第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月19日

Watabe, K., Mimuro, M. and Tsuchiya, T.

Development of a highly-frequent *in vivo* transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803. International meeting "Photosynthesis Research for Sustainability - 2013" in honor of Jalal A. Aliyev, Azerbaijan, 2013年6月7日

土屋 徹、代謝工学的アプローチから探る光化学系 II の色素組成の柔軟性、第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月22日

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

土屋 徹 (TSUCHIYA, Tohru)
京都大学・地球環境学堂・准教授
研究者番号：20362569

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：