

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830130

研究課題名(和文)次世代DNAシーケンサーを駆使したシアノバクテリアの補色順化の多様性の解明

研究課題名(英文) Analysis of cyanobacterial chromatic acclimation by next-generation sequencing technology

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：一部のシアノバクテリアは、緑色光と赤色光に応答して光合成のアンテナ色素タンパク質(フィコシアニンとフィコエリスリン)の組成を調節する「補色順化」と呼ばれる能力を持つ。本研究では、(1)次世代シーケンサーを用いて多検体のシアノバクテリアのゲノムを効率よく解析するパイプラインの構築、(2)そのパイプラインを用いた20種の補色順化種のゲノム解析、(3)特徴的な補色順化能を持つ種のRNA-Seq解析とアンテナ色素タンパク質の単離と分光解析、を行った。これらの成果は、補色順化の分子機構の多様性の実態の解明を大きく推進すると共に、今後のシアノバクテリアのゲノム研究の礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：Certain cyanobacteria species modulate their photosynthetic antenna proteins, phycocyanin and phycoerythrin, which is a phenomenon called complementary chromatic acclimation (CCA). Recent studies of typical CCA-capable cyanobacteria species suggest the diversity of green and red light-regulated gene set during CCA. In this project, I performed (1) establishment of efficient analysis pipeline of cyanobacterial genomes, (2) de novo genome sequencing of CCA-capable cyanobacteria species, and (3) RNA-Seq and spectral analysis of several cyanobacteria performing unique CCA. These results will facilitate the understanding of the molecular basis of CCA and also many other researches of the cyanobacterial genomes.

研究分野：光生物学

キーワード：ゲノム 光合成 シアノバクテリア フィトクロム シアノバクテリオクロム フィコビリソーム

1. 研究開始当初の背景

光をエネルギー源として利用する光合成生物では、他の生物よりも効率よく光を吸収する仕組みが、生存に重要である。シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行う原核生物であり、光の捕集のためのアンテナとして、フィコビリソームと呼ばれるタンパク質複合体を用いている。一部のシアノバクテリアのフィコビリソームは、赤色光を吸収するフィコシアニンと緑色光を吸収するフィコエリスリンを主な構成成分とする。これらの種が緑色光の下でフィコエリスリンを増やし、逆に赤色光の下でフィコシアニンを増やす現象は 100 年以上前から知られ、「補色順化 (Complementary chromatic acclimation)」と呼ばれている。これまでの、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Nostoc punctiforme* ATCC 29133、*Fremyella diplosiphon* などの代表的なシアノバクテリア種における解析により、補色順化の分子機構の実態が明らかとなった。補色順化では、緑色光と赤色光を吸収するフィトクロム様光受容体 (シアノバクテリオクロム) により、フィコエリスリンやフィコシアニンを構成するタンパク質が光波長依存的に発現調節される。しかし、シアノバクテリオクロムによって発現調節される遺伝子の種類と数はそれぞれの種において異なり、シアノバクテリアが環境に合わせてアンテナ調節機構を進化させている事を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、補色順化能を持つシアノバクテリアを収集してゲノム解析を行い、波長依存的な発現調節を受けるフィコビリソームの遺伝子セットのバリエーションを明らかにすることで、補色順化の分子機構のモデルの多様性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

野外環境よりシアノバクテリアを収集して緑色光および赤色光照射下で培養した。培養後の細胞の吸収スペクトルを測定し、補色順化能を持つシアノバクテリアを選別した。フィコエリスリンとフィコシアニンの吸収ピークの比率に変化が見られた種からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー Roche 454 GS FLX+および illumina MiSeq を用いてゲノムシーケンスを行った。得られたリードデータをトリミングし、アセンブルを実施した。ペアエンドライブラリとメイトペアライブラリのリードデータによって scaffold を形成し、contig 間の Gap の配列をソフトウェア GenoFinisher およびサンガー法を用いて決定した。代表的な補色順化応答を示す種については、次世代シーケンサーをもちいた RNA-Seq 解析と低温蛍光スペクトルスペク

トル解析を行い、フィコビリソームの構造モデルを構築した。

4. 研究成果

本研究の具体的な成果は以下の 3 点である。

(1) 多数のシアノバクテリアのゲノム解析を効率よく行うためのパイプラインの確立

細胞外多糖多く含む種から抽出したゲノム DNA にはアダプター結合を阻害する物質が混入し、ライブラリ調製を阻害した。そのため、この阻害物質を除去する手法を確立した。糸状シアノバクテリア種では、凝集体の形状や粘性によってビーズによる細胞破碎効率が大きく変動した。ビーズの種類、破碎バッファー、破碎時間などの処理を検討する事で、細胞の形状・性状に関わらず細胞を均一に破碎する手法を確立した。次世代シーケンサーのライブラリ調整試薬、ラン試薬の検討を行ったところ、MiSeq 1 ランで 12 種のシアノバクテリアのペアエンドライブラリとメイトペアライブラリを解析するのが最も効率的であった。得られたリードデータのトリミング手法、アセンブルのパラメータの最適化を行った。ショートリード型シーケンサーを用いて *de novo* アセンブルを行うにはリード長よりもリード精度が重要であることが示された。

(2) 補色順化種のゲノム解析

(1) で確立したパイプラインを用いて、20 種の補色順化種のゲノム解析を実施した。そのうちの 10 種については、ほぼ完全ゲノムが構築できた。*Geminocystis* sp. NIES-3708 および NIES-3709 については完全ゲノム配列を決定し、国立環境研究所 (NIES) へ株を寄託し、論文発表を行い、配列データを公開した (発表論文 1 および 2)。残りの株については、サンガー法による Gap の配列決定を行っている。*Calothrix* 属のように 12Mbp を超えるようなシアノバクテリアの完全ゲノム配列を決めることができた。シアノバクテリアの完全ゲノム配列は、シーケンスが容易なゲノムサイズが小さな種が優先しているが、大きなゲノムサイズの種もより積極的に取り組むことができることを示唆している。一方、ゲノムサイズ 4Mbp ほどの *Synechocystis* 属でも、特定のリピート配列が数十カ所ゲノムに組み込まれている場合には、完全ゲノム配列決定は極めて困難であった。

(3) 特徴的な補色順化能を持つ種の詳細な生化学・分光解析

Geminocystis sp. NIES-3708 および NIES-3709 は、どちらも千葉県の実籾公園から採取されたシアノバクテリアである。これ

ら2種の吸収スペクトルは III 型の補色順化に近く、ゲノム解析の結果、制御遺伝子の組成は II 型の補色順化であることが判明した。そこで、これらの2種について緑色および赤色光下での RNA-seq 解析を行った。複数コピー存在するフィコエリスリンのロッドリンカー遺伝子のうちの1つが光によって転写制御を受けることで、細胞のフィコエリスリン量が大きく変動する事が明らかとなった。補色順化させた細胞からフィコビリソームを単離してスペクトル解析を行ったところ、赤色光照射光では、NIES-3708 よりも NIES-3709 のほうが、フィコビリソームに含まれるフィコエリスリン量が多いことが分かった。フィコエリスリンのロッドリンカー (CpeC, CpeE) のコピー数は NIES-3708 が3コピー、NIES-3709 が4コピーであることを考えると、ロッドの長さが2種のシアノバクテリアのフィコエリスリン量を決定している事が強く示唆された (図1)。

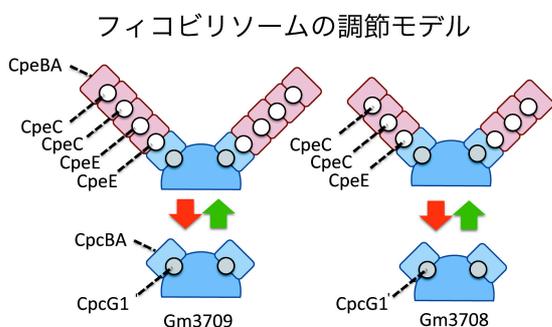


図1、*Geminocystis* NIES-3708 株 (左) および NIES-3709 株 (右) における補色順化におけるフィコビリソームの構造変化のモデル。

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8件)

1, Hirose Y., Katayama M., Ohtsubo Y., Misawa N., Iioka E., Suda W., Oshima K., Hanaoka M., Tanaka K., Eki T., Ikeuchi M., Kikuchi Y., Ishida M. and Hattori M. Complete Genome Sequence of Cyanobacterium *Geminocystis* sp. Strain NIES-3708, Which Performs Type II Complementary Chromatic Acclimation. *Genome Announcements*, 3(3), e00357-15, 2015, 査読有, DOI:10.1128/genomeA.00357-15.

2, Hirose Y., Katayama M., Ohtsubo Y., Misawa N., Iioka E., Suda W., Oshima K., Hanaoka M., Tanaka K., Eki T., Ikeuchi M., Kikuchi Y., Ishida M. and Hattori M. Complete Genome Sequence of

Cyanobacterium *Geminocystis* sp. Strain NIES-3709, Which Harbors a Phycoerythrin-Rich Phycobilisome. *Genome Announcements*, 3(2), e00385-15, 2015, 査読有, DOI:10.1128/genomeA.00385-15.

3, Nagao N., Hirose Y., Misawa N., Ohtsubo Y., Umekage S. and Kikuchi Y. Complete Genome Sequence of *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 2351, an Extracellular Nucleic Acid-Producing Bacterium. *Genome Announcements*, 3(2), e00388-15, 2015, 査読有, DOI:10.1128/genomeA.00388-15.

4, Hiraide Y., Oshima K., Fujisawa T., Uesaka K., Hirose Y., Tsujimoto R., Yamamoto H., Okamoto S., Nakamura Y., Terauchi K., Omata T., Ihara K., Hattori M. and Fujita Y. Loss of cytochrome cM stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant and Cell Physiology*, 56(2), 334-45, 2015, 査読有, DOI:10.1093/pcp/pcu165.

5, Kurata A., Hirose Y., Misawa N., Hurunaka K. and Kishimoto N. Draft Genome Sequence of the Ionic Liquid-Tolerant Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1. *Genome Announcements*, 2(5), e01051-14, 2014, 査読有, DOI:10.1128/genomeA.01051-14.

6, Shiwa Y., Yanase H., Hirose Y., Satomi S., Araya-Kojima T., Watanabe S., Zendo T., Chibazakura T., Shimizu-Kadota M., Yoshikawa H. and Sonomoto K. Complete Genome Sequence of *Enterococcus mundtii* QU 25, an Efficient L-(+)-Lactic Acid-Producing Bacterium. *DNA Research*, 21(4), 369-77, 2014, 査読有, DOI:10.1093/dnares/dsu003.

7, Hirose Y., Rockwell N. C., Nishiyama K., Narikawa R., Ukaji Y., Inomata K., Lagarias J. C. and Ikeuchi M. Green/red cyanobacteriochromes regulate complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13), 4974-9, 2013, 査読有, DOI:10.1073/pnas.1302909110.

8, Gottlieb S. M., Kim P. W., Rockwell N. C., Hirose Y., Ikeuchi M., Lagarias J. C. and Larsen D. S. Primary Photodynamics of the Green/Red-Absorbing Photoswitching Regulator of the Chromatic Adaptation E Domain from *Fremyella diplosiphon*. *Biochemistry*, 53(6), 1029-40, 2013, 査読

有, DOI:10.1021/bi400946q.

〔学会発表〕(計8件)

1, 広瀬 侑、片山 光徳、大坪 嘉行、三澤 直美、飯岡 恵里香、須田 互、大島 健志朗、華岡 光正、田中 寛、浴 俊彦、池内 昌彦、服部 正平、*Geminocystis* 属シアノバクテリアに見られる補色応答能の違い、第9回日本ゲノム微生物学会年会、2015年3月6-8日、神戸大学(兵庫県神戸市)、ポスター発表

2, Hirose Y. and Misawa N. Light color response of *Nostoc punctiforme*, a model cyanobacterium for the study of chromatic acclimation processes. The Irago Conference, 2014年11月6-7日、産業技術総合研究所(茨城県つくば市)、ポスター発表

3, 広瀬 侑、三澤 直美、モデルシアノバクテリア *Nostoc punctiforme* を用いた光色応答の解析、第55回植物生理学会年会、2014年3月18-20日、富山大学(富山県富山市)、ポスター発表

4, 広瀬 侑、三澤 直美、Miseq を用いたシアノバクテリアの光色応答の解析、第8回日本ゲノム微生物学会年会、2014年3月7-9日、東京農業大学(東京都世田谷区)、ポスター発表

5, 広瀬 侑、大坪 嘉行、岡本 忍、兼崎 友、吉川 博文、河地 正伸、志村 遥平、藤澤 貴智、中村 保一、NGS時代におけるラン藻ゲノムの協調的解析、藍藻の分子生物学2013、2013年11月22-23日、かずさアカデミアパーク(茨城県木更津市)、口頭発表

6, Hirose Y., Misawa N., Katayama M. and Ikeuchi M. Genome analysis of cyanobacteria for understanding of their light color responses. The Irago Conference, 2013年10月24-25日、伊良湖シーパーク&スパホテル(愛知県田原市)、口頭発表

7, 広瀬 侑、三澤 直美、片山 光徳、池内 昌彦、服部 正平、榎 佳之、NGS を使ったシアノバクテリアの光色応答の解析、NGS現場の会第3回研究会、2013年9月4-5日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、ポスター発表

8, 広瀬 侑、次世代シーケンサーを藻類の解析に使ってみよう!、第3回微細藻類研究会、2013年6月、基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)、口頭発表

〔図書〕(計2件)

広瀬 侑、池内 昌彦、藻類の光合成メカニズムに関するタンパク質機構の解明、(NTS 出版、藻類オイル生産技術研究の最前線、2013年、165-172)

広瀬 侑、シアノバクテリアの補色応答の制御メカニズムの解明 (NTS 出版、光合成研究と産業応用最前線、2014年、109-117)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://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、環境・生命工学系
研究者番号: 30616230

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし