

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870472

研究課題名(和文) 微細藻類スピルリナの代謝工学のための基盤技術開発

研究課題名(英文) Development of basic technology for metabolic engineering of *Arthrospira platensis* (Spirulina)

研究代表者

得平 茂樹 (Ehira, Shigeki)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：90548132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオマス資源としての実用化に最も近い微細藻類の一つであるシアノバクテリア *Arthrospira platensis* (通称、スピルリナ) の代謝工学に不可欠な遺伝子操作技術の開発を行った。スピルリナの形質転換において最大の障壁となるのは、外部から導入されたDNAが11個のII型制限酵素と複数のI型制限酵素により分解されてしまうことにある。本研究では、これらの制限酵素からDNAを保護する技術を開発し、スピルリナの形質転換のための基盤技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed genetic engineering technology indispensable for metabolic engineering of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* (common name: Spirulina) which is one of the microalgae closest to practical use as biomass resources. The biggest barrier in the transformation of Spirulina is that the DNA introduced from the outside of cells is degraded by 11 Type II restriction enzymes and multiple Type I restriction enzymes. In this study, we developed methods for protection of DNA from these restriction enzymes and established the basic technology for the transformation of Spirulina.

研究分野：微生物分子生理学

キーワード：微細藻類 スピルリナ 形質転換 制限修飾系

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の枯渇や地球温暖化への対策として、カーボンニュートラルな再生可能資源である植物バイオマスを利用したバイオ燃料生産が世界的に進められている。しかし、食料との競合や耕作地の限界などの課題に直面しており、新たなバイオマス資源の開発が求められている。海や池などの水域に生息する微細藻類は、植物よりもはるかに優れた光合成能力をもち、さらに耕作地も必要としないため、植物に替わるバイオマス資源として注目されている。その中でもシアノバクテリア *Arthrospira (Spirulina) platensis* (以下スピルリナ) は、最も実用化に近い微細藻類の一つである。スピルリナは他の微細藻類と比べても増殖が早く、多量のデンプンを蓄積することが知られている。また、アルカリや塩に対する耐性が非常に高いため (pH 11 以上、海水の 1.5 倍の塩濃度で増殖可能)、開放系でも独占種として大量培養が可能である。実際、スピルリナは商業的に大規模生産されており、その細胞破砕物や抽出物がサプリメントなどとして売られている。

スピルリナのデンプンを原料にしたバイオ燃料 (エタノール) 生産においては、日本は世界をリードしている。乾燥重量当たりのエタノール生産量は、すでにバイオ燃料として利用されているトウモロコシに匹敵している。しかし、スピルリナを原料として利用するためには、さらにデンプン生産性を向上させ、生産コストを削減する必要がある。申請者はこれまでの研究において、シアノバクテリアの糖代謝制御系を明らかにしてきた。そしてその制御系を改変することで、細胞内のデンプンやショ糖の含量を増加させることに成功している。この技術をスピルリナにも適用することができれば、スピルリナの生産性向上を図ることができる。そのために必要となるのが、スピルリナの遺伝子操作技術である。しかしながら、スピルリナの遺伝子操作は難しく、形質転換に成功したという報告はごく限られている。国内外の複数のグループが数十年前からその技術開発に取り組んでいるが、安定した形質転換系はいまだ確立していない。

多くのバクテリアの形質転換において問題になるのは、外部から進入した DNA を切断する制限修飾系の存在である。シアノバクテリアにおいても、制限酵素による DNA の切断が形質転換効率を低下させることが報告されている。申請者を含む研究グループは、世界に先駆けてスピルリナ NIES-39 株のゲノム DNA 配列を解読した。その結果、スピルリナは 11 個の制限酵素遺伝子を持っており、非常に発達した制限修飾系が存在していることが明らかとなった。このようにスピルリナのゲノム情報を明らかにしたことで、形質転換系の開発につながる重要な情報が得られている。

2. 研究の目的

本研究では、シアノバクテリア *Arthrospira platensis* (スピルリナ) の遺伝子操作技術を確立するために、形質転換法を開発する。スピルリナが持つ DNA メチル化酵素を大腸菌に導入し、スピルリナの制限系を回避できる DNA を作らせる。そして、そのメチル化 DNA を形質転換に利用し、スピルリナへの外部からの遺伝子導入や相同組換えによる遺伝子破壊を実現することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、シアノバクテリア *Arthrospira platensis* NIES-39 株を実験材料として用いた。*A. platensis* NIES-39 株の培養は、30°C、30 μ mol photon/ m²/ sec の白色光の連続照射の下、SOT 培地または BG-11 培地を用いて行った。*A. platensis* NIES-39 株の 11 個のメチル化酵素遺伝子の大腸菌用発現ベクターへのクローニングは、以下のように行った。各メチル化酵素遺伝子は、*A. platensis* NIES-39 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により増幅した。PCR には、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio) を用いた。クローニングには、アラビノース誘導型プロモーターを持たせた pACYC184 とコールドショック発現系プラスミド pCold II (Takara Bio) の 2 種類のプラスミドを用いた。クローニングの宿主には、全ての制限修飾系とメチル化酵素 Dam および Dcm を欠損させた大腸菌 HST04 株 (Takara Bio) を用いた。プラスミドの精製は、NucleoSpin Plasmid EasyPure (Takara Bio) を用いて行い、制限酵素は Takara Bio、New England Biolabs および Thermo Scientific から購入したものをを用いた。

4. 研究成果

(1) スピルリナの制限修飾系

スピルリナは応用利用への期待から、数十年前からその遺伝子導入技術の開発が国内外の複数のグループにより進められてきた。しかし、形質転換に成功したという報告は限られ、いまだに安定した遺伝子導入技術は確立していない。多くのバクテリアの形質転換において問題になるのは、外部から進入した DNA を分解する制限修飾系の存在である。藍藻においても、制限酵素による DNA の分解が形質転換効率を低下させることが報告されている。本研究では *Arthrospira platensis* NIES-39 株のゲノム解析の結果から、スピルリナに 11 個の II 型の制限酵素遺伝子が存在し、非常に発達した制限修飾系を持つことを明らかにした (表 1)。また、全ての制限酵素遺伝子に対して、それぞれがコードする制限酵素が認識する配列をメチル化すると考えられるメチル化酵素遺伝子が隣接して存在していた。

表1 *Arthrosira platensis* NIES-39 株のもつ II 型制限酵素

| 遺伝子番号 | 類似した制限酵素とその認識配列 | メチル化酵素遺伝子番号 |
|-------|-----------------------|-------------|
| A0353 | BsaHI (HinII) GRCGYC | A0354 |
| A0582 | SacII CCGCGG | A0583 |
| A0893 | BsiWI CGTACG | A0892 |
| B0021 | SnaBI TACGTA | B0020 |
| J0297 | BspT107I GGYRCC | J0296 |
| K0404 | Bpu10I CCTNAGC | K0403 |
| K0464 | PstI CTGCAG | K0465 |
| L0170 | NspI RCATGY | L0171 |
| O0259 | AgeI ACCGGT | O0260 |
| Q0119 | NsiI (EcoT22I) ATGCAT | Q0118 |
| Q0245 | Bsp119I (NspV) TTCGAA | Q0244 |

(2) 大腸菌を用いたスピルリナ型メチル化 DNA の作製

ゲノム解析の結果から、スピルリナは多くの制限酵素を持っており、それらが外部からの DNA の侵入を妨げていると考えられた。しかし、例え外部から導入された DNA であっても、スピルリナと同様のパターンでメチル化された DNA は、スピルリナ内で自己の DNA と認識されるため制限酵素による分解を受けない。そこで、11 個のメチル化酵素遺伝子を全て大腸菌に導入し、スピルリナ型に DNA をメチル化する大腸菌の作製を目指した(図 2)。この大腸菌から調整したプラスミド

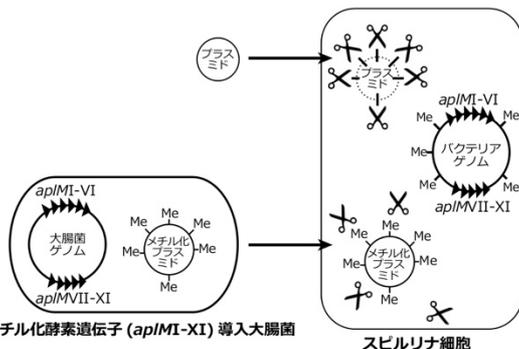


図 2 スピルリナ型メチル化 DNA を用いた形質転換法の開発

を用いてスピルリナの形質転換を行うことで、スピルリナ細胞内での DNA の分解を防ぐことができると期待できる。まず、11 個のメチル化酵素遺伝子が大腸菌内で発現・機能するのを確かめるため、それぞれの遺伝子を導入した大腸菌を作製した。アラビノース誘導型のプロモーターから各メチル化酵素を発現する大腸菌からプラスミドを精製し、制限酵素による切断から保護されるかを評価した。その結果、A0892、J0296、Q0118 および Q0244 を発現させた大腸菌から調整したプラスミドでは、アラビノース存在下でそれぞれ対応する制限酵素による切断からプ

ラスミドが保護された。アラビノース非存在下では切断されたことから、メチル化酵素が発現することでプラスミドがメチル化され、制限酵素による切断を受けなくなったことが分かる。しかし、その他の 7 個のメチル化酵素を発現させた大腸菌から精製したプラスミドでは、制限酵素による切断からの保護は見られなかった。アラビノース誘導型のプロモーターからのメチル化酵素の発現に問題があった可能性を考え、次にこれら 7 個のメチル化酵素をコールドショック発現系で発現する大腸菌を作製した。その結果、さらに 2 個のメチル化酵素(A0354、K0465)を発現させた大腸菌から調整したプラスミドにおいて、制限酵素による切断からの保護が見られた。

以上のように、大腸菌においてスピルリナのメチル化酵素を発現させることで、制限酵素による切断から DNA を保護することができると示された。しかし、スピルリナにある 11 個のメチル化酵素のうち 5 個に関しては、制限酵素による切断からの保護が見られなかった。実際にメチル化酵素が認識する配列と切断に用いた制限酵素が異なっている可能性はあるが、メチル化酵素を大腸菌内で充分量発現させることができなかったことが原因と考えている。メチル化酵素を誘導した大腸菌の総タンパク質を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色により可視化した。メチル化酵素の大きさに相当する位置に誘導タンパク質を確認することができなかった。何らかの理由により大腸菌内でメチル化酵素が発現しにくいのか、あるいは速やかに分解されてしまっていると考えられる。

(3) 電気穿孔法によるスピルリナへの遺伝子導入条件の検討

電気穿孔法とは、細胞懸濁液に電気パルスをかけることで細胞膜に微小な穴を開け、その穴から DNA を細胞内部に送りこむことにより DNA を導入する方法である。電気穿孔法は、バクテリアから動物細胞まで非常に幅広い細胞に適用可能であることから、スピルリナにおいてもまず本方法による遺伝子導入を試みた。電気穿孔法においては、用いる細胞懸濁液に塩が含まれると電流が流れ過ぎ、細胞が死んでしまう。スピルリナの培養に用いる SOT 培地は高濃度の Na⁺イオンを含むため、まず塩の除去のための洗浄方法を検討した。SOT 培地で培養したスピルリナを遠心により集め、水および 10%グリセロールで 1 回あるいは 3 回洗浄した後、SOT 寒天培地に塗布した。その結果、全ての条件でスピルリナ細胞が死んでしまっていた。洗浄過程での急激な塩濃度の変化が原因ではないかと考えられた。そこで、培養時の塩濃度を下げるために、淡水性のシアノバクテリアの培養に用いられる BG-11 培地での培養を試みた。スピルリナは BG-11 培地でも増殖が可能であったため、BG-11 培地で培養したスピルリナ

を実験に持ちいることにした。BG-11 培地で培養したスピルリナを 10%グリセロールで 1 回洗浄した後、SOT および BG-11 寒天培地に塗布した。その結果、BG-11 寒天培地上では細胞の増殖が観察された。したがって、スピルリナを塩濃度の低い BG-11 培地を用いて培養することで、電気穿孔法による遺伝子導入に必要な塩を除去した細胞懸濁液を調整することが可能であることが示された。

(4) まとめと今後の展望

本研究により、大腸菌内でスピルリナのメチル化酵素を発現させ、DNA をメチル化することが可能であることが示された。メチル化された DNA は予想通り、制限酵素による切断から保護されることも示された。大腸菌内でスピルリナ型にメチル化した DNA を用いることで、スピルリナ細胞内において制限酵素による切断を受けなくなると期待できる。今後は、スピルリナの持つ全てのメチル化酵素遺伝子を導入した大腸菌を作製し、スピルリナ型にメチル化された DNA を取得する。また、電気穿孔法による遺伝子導入の条件検討を行い、電気穿孔法に用いる細胞懸濁液の調整方法を確立した。本研究で確立した方法で調整した細胞懸濁液に上記のスピルリナ型にメチル化された DNA を混ぜ、電気パルスを加えることで、スピルリナに DNA を導入することができると期待している。また、DNA を導入する方法としては、電気穿孔法だけでなく大腸菌による接合法を試す。*Anabaena* sp. PCC 7120 などの一部のシアノバクテリアでは、大腸菌の接合能を利用した遺伝子導入法が確立されている。大腸菌内でメチル化した DNA を直接大腸菌による接合伝達により、シアノバクテリアに導入する。接合による遺伝子導入法は、制限酵素を多くもつシアノバクテリアで特に有効であることが示されている。スピルリナにおける接合法の有効性も検証していきたい。

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 9 件)

1. Shimmori, Y., Kanesaki, Y., Nozawa, M., Yoshikawa, H., Ehira, S. (2018) Transcriptional activation of glycogen catabolism and the oxidative pentose phosphate pathway by NrrA facilitates cell survival under nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Plant Cell Physiol.* in press. doi:10.1093/pcp/pcy059
2. Ehira, S., Takeuchi, T, Higo, A. (2018) Spatial separation of photosynthesis and ethanol production by cell type-specific metabolic engineering of filamentous cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

102:1523-1531.

doi:10.1007/s00253-017-8620-y

3. Higo, A., Isu, A., Fukaya, Y., Ehira, S., Hisabori, T. (2018) Application of CRISPR interference for metabolic engineering of the heterocyst-forming multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol.* **59**:119-127. doi:10.1093/pcp/pcx166
4. Ehira, S., Shimmori, Y., Watanabe, S., Kato, H., Yoshikawa, H., Ohmori, M. (2017) The nitrogen-regulated response regulator NrrA is a conserved regulator of glycogen catabolism in β -cyanobacteria. *Microbiology* **163**:1711-1719. doi:10.1099/mic.0.000549
5. Fujisawa, T., Narikawa, R., Maeda, SI., Watanabe, S., Kanesaki, Y., Kobayashi, K., Nomata, J., Hanaoka, M., Watanabe, M., Ehira, S., Suzuki, E., Awai, K., Nakamura, Y. (2017) CyanoBase: A large-scale update on its 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* **45**:D551-D554.
6. Ohbayashi, R., Watanabe, S., Ehira, S., Kanesaki, Y., Chibazakura, T., Yoshikawa, H. (2016) Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution. *ISME J.* **10**:1113-1121.
7. Ehira, S., Miyazaki, S. (2015) Regulation of genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by a group 2 sigma factor SigC. *Life* **5**:587-603. doi:10.3390/life5010587
8. Ehira, S., Kimura, S., Miyazaki, S., Ohmori, M. (2014) Sucrose synthesis in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 is controlled by the two-component response regulator OrrA. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:5672-5679. doi:10.1128/AEM.01501-14
9. Halimatul, H.S.M., Ehira, S., Awai, K. (2014) Fatty alcohols can complement functions of heterocyst specific glycolipids in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**:178-183. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.093

[学会発表] (計 22 件)

1. Ehira, S. 'Redox regulation of cellular differentiation in cyanobacteria' CLS, Tokyo Tech. International Forum 2018, Tokyo, Japan, March 2018
2. Kizawa, A., Uetake, J., Kosugi, M., Ehira, S., and Takeuchi, N. 'Pigment composition of a cultivated strain of the cyanobacterium *Phormidesmis priestleyi* isolated from cryoconite on Qaanaaq Glacier, northwest Greenland' International Symposium on Cryosphere and Biosphere, Kyoto, Japan

March 2018

3. 得平茂樹, 肥後明佳, 竹内卓人「糸状性シアノバクテリアの細胞種特異的代謝工学による嫌氣的バイオ燃料生産」第59回日本植物生理学会年会, 札幌, 2018年3月
4. 肥田真太郎, 得平茂樹「シアノバクテリアにおける多様な分化細胞を生み出す分子機構の解明」第12回日本ゲノム微生物学会年会, 京都, 2018年3月
5. 得平茂樹「酸素発生型光合成で駆動する嫌気発酵プロセス」第8回日本光合成学会年会, 滋賀, 2017年5月
6. 新森友香, 兼崎友, 吉川博文, 得平茂樹「シアノバクテリアにおいてグリコーゲン分解が窒素飢餓での生存に必須である」第8回日本光合成学会年会, 滋賀, 2017年5月
7. 小池玲示, 得平茂樹「ヘテロシストを形成しないシアノバクテリア *Arthrospira platensis* NIES-39 における *hetR* 遺伝子の機能解析」第11回日本ゲノム微生物学会年会, 神奈川, 2017年3月
8. 小池洋輔, 栗尾洋平, 兼崎友, 吉川博文, 得平茂樹「シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 におけるヘテロシスト分化にともなう窒素固定能の発現制御機構」第11回日本ゲノム微生物学会年会, 神奈川, 2017年3月
9. 得平茂樹, 新森友香「シアノバクテリアにおける窒素飢餓環境への適応機構」日本植物学会第80回大会, 沖縄, 2016年9月
10. 得平茂樹, 木村聡, 佐藤未歩, 大森正之「シアノバクテリアにおける乾燥耐性獲得機構」第7回日本光合成学会年会, 東京, 2016年5月
11. 得平茂樹「窒素飢餓環境に対するシアノバクテリアの生存戦略の比較解析」第10回日本ゲノム微生物学会年会, 東京, 2016年3月
12. 得平茂樹「比較機能解析によるシアノバクテリアの環境適応機構の解明」第30回日本微生物生態学会大会, 茨城, 2015年10月
13. Ehira, S., Kimura, S., Fan, X.Y., Miyazaki, S. and Ohmori, M. 'Regulation of compatible solute synthesis in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120' 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Tübingen, Germany, August 2015
14. Ohbayashi, R., Watanabe, S., Ehira, S., Kanasaki, Y., Chibazakura, T. and Yoshikawa, H. 'Variety of dependency on DnaA protein for DNA replication among cyanobacterial lineages' 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Tübingen, Germany, August 2015
15. Ehira, S. 'Metabolic engineering of differentiated cells of filamentous cyanobacteria for biofuel production' The 7th German-Japanese Binational Seminar, Shizuoka, Japan, March 2015
16. Ehira, S. 'Cell-specific metabolic engineering of filamentous cyanobacteria for biofuel production' Tokyo Tech-HHU Düsseldorf Joint Symposium on Photosynthesis as a New Chemical Resource, Tokyo, Japan, March 2015
17. 西山英里, 中村康太, 日原由香子, 得平茂樹「*Anabaena* sp. PCC 7120 における *cyAbrB* による *gnd* 遺伝子の発現制御」第9回日本ゲノム微生物学会年会, 神戸, 2015年3月
18. 栗尾洋平, 得平茂樹「シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 のヘテロシスト分化における転写制御因子 *DevH* の機能解析」第9回日本ゲノム微生物学会年会, 神戸, 2015年3月
19. 得平茂樹, Fan Xing-Yan, 木村聡, 大森正之「シアノバクテリアにおける乾燥適応の分子機構」環境微生物系学会合同大会 2014, 浜松, 2014年10月
20. 得平茂樹「シアノバクテリアにおける細胞特異的な代謝改変によるバイオ燃料生産」第66回日本生物工学会大会, 札幌, 2014年9月
21. 得平茂樹, 藤木耕平, 西山英里「シアノバクテリアにおけるグリコーゲン代謝制御の比較解析」第5回日本光合成学会年会, 奈良, 2014年5月
22. 野末秀穂, 佐藤直樹, 豊島正和, 得平茂樹, 寺嶋正秀, 熊崎茂一「ヘテロシスト形成に伴う遺伝子発現とチラコイド膜光化学系変化の同時タイムラプス顕微分光」第5回日本光合成学会年会, 奈良, 2014年5月

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=molgen>

6. 研究組織

(1)研究代表者

得平 茂樹 (EHIRA, Shigeki)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号 : 90548132