

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05578

研究課題名（和文）生体の光シグナル伝達経路を俯瞰するための新たなオミクス手法の開発

研究課題名（英文）Establishment of new omics approach for the comprehensive analysis of the light sensing pathways

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） 18,100,000円

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンサーの普及により全ての生物のゲノム情報が明らかとなりつつある現在でも、生物の有する光受容体ファミリーの多様性と進化の全体像を把握する手法は確立されていない。本研究は、次世代シーケンサーによる生体分子の超並列定量技術を活かし、遺伝子発現の波長依存パターン（作用スペクトル）を包括的に取得することで、光色による転写制御ネットワークの全容を明らかにするフォトーム解析（Photome）の手法の確立に成功した。この手法は全生物種に適用が可能で、光受容機構の解明などの基礎研究に加え、光を用いた生体制御などの応用研究にも貢献できる。

研究成果の概要（英文）：To understand the light-sensing network of living organisms, I developed new omics method named "Photome". This method utilizes the advantage of wide range of quantification of the next generation sequencer and the irradiation of multichromatic light with high resolution wavelength. I succeeded to establish highly efficient sample preparation method of photome and also automated pipeline for computing. This method can be applied to all living organism and will promote the progress of the wide research filed such as analysis of intrinsic light-sensing pathway or regulation of cellular response by light irradiation.

研究分野：ゲノム生物学、光生物学

キーワード：次世代シーケンサー フォトーム 光受容体 シアノバクテリア 藻類 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

「光」とは、生物の生存に重要な外部シグナルの1つであり、生物は光の色を感知するために多様な光受容体を進化させてきた。植物のフィトクロムやフォトトロピン、動物や微生物のロドプシンなど、いくつかの光受容体ファミリーは作用機序の詳細の解明が進んでいる。一方、光受容体は生体内の存在量が少ないため生化学的な単離が難しく、また、光照射によって引き起こされる生理応答の強度が小さければ、その存在の認知も困難である。そのため、多くの生物のゲノム情報が明らかとなりつつある現在でも、生物がどれほど多様な光受容体を持ち、それをどのように進化させてきたのか？、すなわち、光受容体の多様性と進化の全体像を把握する研究は行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、次世代シーケンサーによる生体分子の超並列定量技術を活かし、遺伝子発現の波長依存パターン（作用スペクトル）を包括的に取得することで、光色による転写制御ネットワークの全容を明らかにすることを目的とした。フォトーム (Photome) と命名する本手法は、全生物種に適用が可能で、光受容機構の解明などの基礎研究に加え、光を用いた生体制御などの応用研究にも大きく貢献できる。

3. 研究の方法

本研究では、フォトーム解析のための (A) 次世代シーケンサー解析パイプラインの構築、(B) 多波長光照射装置の作製、(C) 解析対象種のゲノム解析、に取り組んだ。(A) と (B) の項目に多くの予算と時間を投入したため、当初計画していた遺伝子破壊によるシグナル伝達経路の解析は別予算で行うこととした。

4. 研究成果

(A) 次世代シーケンサー解析パイプラインの構築

基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを利用し、*Synechocystis* 属シアノバクテリアに多波長光照射を行い、次世代シーケンサー Ion Proton を用いた RNA-Seq 解析によって遺伝子の発現パターンを取得した。得られた発現パターンのクラスター解析により、特異的な波長の光で誘導される遺伝子の包括的な同定に成功した。また、多様な光受容体遺伝子を持つことが期待される *Nostoc* 属シアノバクテリアについても、LED 光源を用いて光照射を行い、次世代シーケンサー MiSeq を用いた RNA-Seq 解析によって、光色依存的な遺伝子の発現パターンを取得に成功した。さらに、(B) で開発した多波長光照射装置を用いてシアノバクテリアと大腸菌

を対象に光照射を行い、同様の解析を行った。大腸菌では紫外光に応答する遺伝子が中心であったが、シアノバクテリアでは紫外～遠赤色光までの幅広い光に応答する多様な遺伝子群が発見された。この結果は、多様な光環境で生育する光合成生物が独自の光受容機構を進化させてきたことを強く示唆していた。さらに、多検体の RNA-Seq 解析による全遺伝子発現の定量と、それらの波長依存パターンのクラスター解析を全自動で行うパイプラインを構築し、フォトーム解析の効率的な利用が可能となった。また、ゲノムサイズが小さな原核生物を解析の対象とする場合でも、低発現遺伝子の高精度な波長依存パターンを取得するためには、リボソーム RNA を除去してメッセンジャー RNA を濃縮する工程が必要であった。

(B) 多波長光照射装置の作製

フォトーム解析における細胞への多波長光照射を効率よく行うための装置の制作に取り組んだ。島津製の中古の蛍光光度計を分解し、白色光源を分光した各波長の光路に細胞培養セルを設置する方式を検討した。しかし、この方法では細胞量の小スケール化はできるものの、高い波長分解能や細胞の迅速な回収が困難であり、実用的ではなかった。そこで、白色光源を分光し、その光を光ファイバーで波長ごとに取り出し、ウェルプレートに照射する装置を設計した。装置の作製を光学機器メーカーに委託したため、当初計画していた以上の予算を投入することとなった。作製した装置が、紫外から遠赤色光までの光を、均一な光量子密度で、極めて高い波長分解能で、多数の試料に照射する性能を有することを確認した。本装置が必要とする試料量はわずか数百マイクロリットルであり、大量調整が困難な試料にも光照射できる。光照射部に温度およびガス濃度調節チャンバーを設置し、多様な細胞の培養も可能である。本装置に関する国内特許を出願し、JST の PCT 出願支援プログラムによる国際特許の取得手続きを進めている。また、光学機器メーカーとの装置のライセンス販売の検討も進めている。

(C) 解析対象種のゲノム解析

ユニークな光応答システムを持つことが期待されるシアノバクテリアと真核藻類のゲノムシーケンスを行った。Nanopore シーケンサー MinION を用いてゲノム DNA をシーケンスし、MiSeq を用いた RNA-Seq 解析データを組み合わせて遺伝子予測を行い、高精度な参照ゲノム配列を構築した。解析対象とするシアノバクテリア種を絞り込むため、16S リボソーム配列に基づく系統と光合成アンテナ調節機構の分布を比較したところ、光感知機構遺伝子群の水平伝播が頻繁に起きていることが示唆された。その中から、*Leptolyngbya* 属シアノバクテリアから優れ

た光スイッチ機構を発見し、特許を出願した。

(B)の多波長装置の特許出願のため、これらのフォトーム解析の研究成果は発表を控える必要があった。今後は、得られた研究成果を学会や論文として積極的に発表していく予定である。

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 6 件)

1. Hirose Y., Misawa N., Yonekawa C., Nagao N., Watanabe M., Ikeuchi M. and Eki T. Characterization of the Genuine Type 2 Chromatic Acclimation in the Two Geminocystis Cyanobacteria. DNA Res. 24(4):387-396, (2017)
2. Hirose Y., Fujisawa T., Ohtsubo Y., Katayama M., Misawa N., Wakazuki S., Shimura Y., Nakamura Y., Kawachi M., Yoshikawa H., Eki T. and Kanesaki Y. Complete genome sequence of cyanobacterium Fischerella sp. NIES-3754, providing thermoresistant optogenetic tools. J. Biotechnol. (220) 45-6, (2016)
3. Hirose Y., Fujisawa T., Ohtsubo Y., Katayama M., Misawa N., Wakazuki S., Shimura Y., Nakamura Y., Kawachi M., Yoshikawa H., Eki T. and Kanesaki Y. Complete genome sequence of cyanobacterium Nostoc sp. NIES-3756, a potentially useful strain for phytochrome-based bioengineering. J. Biotechnol., 228:51-52, (2016)
4. Hirose Y., Fujisawa T., Ohtsubo Y., Katayama M., Misawa N., Wakazuki S., Shimura Y., Nakamura Y., Kawachi M., Yoshikawa H., Eki T. and Kanesaki Y. Complete genome sequence of cyanobacterium Leptolyngbya sp. NIES-3755. Genome Announc., 4(2): e00090-16, (2016)
5. 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 Announc., 3(3): e00357-15, (2015)
6. 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 Announc., 3(2): e00385-15, (2015)

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 広瀬 侑、米川千夏、渡辺麻衣、池内昌彦、浴俊彦、フィコエリスロシアニン調節型の補色順化における光色および鉄イオンの影響、第 59 回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2018 年 3 月
2. 広瀬 侑、米川千夏、藤澤貴智、志村遥平、兼崎友、渡辺麻衣、中村保一、河地正伸、池内昌彦、浴俊彦、網羅ゲノムシーケンスによるシアノバクテリアの補色応答の多様性の解析、第 12 回日本ゲノム微生物学会年会、京都大学桂キャンパス(京都府京都市) 2018 年 3 月
3. 広瀬 侑、大腸菌の光応答機構の解析、第 11 回長野ミーティング(長野県安曇野市) 2018 年 1 月
4. 広瀬 侑、ゲノム情報に基づくシアノバクテリアの補色順化の多様性の解析、シアノバクテリアの生態学的多様性と系統分類研究集会、京都大学吉田キャンパス(京都府京都市) 2017 年 11 月
5. 広瀬 侑、生物の光応答現象解明に向けた新しいアプローチ、日本ゲノム微生物学会若手の会第 10 回研究会、伊豆山研修センター(静岡県熱海市) 2017 年 9 月
6. 広瀬 侑、米川千夏、藤澤貴智、志村遥平、兼崎友、渡辺麻衣、中村保一、河地正伸、池内昌彦、浴俊彦、 \square 状シアノバクテリアの網羅ゲノム解析と光応答システムの系統解析、第 8 回光合成学会年会、龍谷大学瀬田キャンパス(滋賀県大津市) 2017 年 5 月
7. 広瀬 侑、長尾信義、米川千夏、渡辺麻衣、池内昌彦、浴俊彦、Leptolyngbya 属シアノバクテリアにおけるフィコエリスロシアニン調節型の補色順化の解析、第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島大学群元キャンパス(鹿児島県鹿児島市) 2017 年 3 月
8. 広瀬 侑、長尾信義、米川千夏、渡辺麻衣、池内昌彦、浴俊彦、Leptolyngbya 属シアノバクテリアの光合成装置の光色応答の解析、第 11 回日本ゲノム微生物学会年会、慶応義塾大学湘南藤沢キャンパス(神奈川県藤沢市) 2017 年 3 月
9. 広瀬 侑、シアノバクテリアのゲノムのアノテーションをどう進めるか? 第 10 回長野ミーティング(長野県安曇野市) 2017 年 1 月
10. 広瀬 侑、池内昌彦、浴俊彦、シアノバクテリアのゲノム解析とそれを活用した

- 補色応答現象の理解、第 80 回日本植物学会年会、沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）2016 年 9 月
11. 広瀬侑、大坪嘉之、兼崎友、藤澤貴智、志村遥平、三澤直美、若月幸子、中村保一、河地正伸、池内昌彦、浴俊彦、シアノバクテリア *Geminocystis* sp. NIES-3708 および 3709 株のゲノム比較、第 7 回光合成学会年会、東京理科大学葛飾キャンパス（東京都葛飾区）2016 年 5 月
 12. 広瀬侑、藤澤貴智、大坪嘉行、三澤直美、若月幸子、志村遥平、中村保一、河地正伸、吉川博文、浴俊彦、兼崎友、NIES シアノバクテリアの完全ゲノム解析、第 10 回ゲノム微生物学会年会、東京工業大学大岡山キャンパス（東京都目黒区）2016 年 3 月
 13. 広瀬侑、シアノバクテリアの光スイッチの改良、第 9 回長野ミーティング（長野県安曇野市）2016 年 1 月
 14. 広瀬侑、大坪嘉之、兼崎友、藤澤貴智、志村遥平、三澤直美、若月幸子、中村保一、河地正伸、浴俊彦、多検体のシアノバクテリアの完全ゲノムを効率よく決定する方法、細菌学若手コロッセウム、KKR ホテル敬天閣（鹿児島県鹿児島市）2015 年 11 月
 15. 広瀬侑、大坪嘉之、兼崎友、藤澤貴智、志村遥平、三澤直美、若月幸子、中村保一、河地正伸、浴俊彦、illumina シークエンサーを用いたシアノバクテリアの完全ゲノム配列決定、藍藻の分子生物学 2015、かずさアカデミアホール（千葉県木更津市）2015 年 11 月
 16. 広瀬侑、ここにつまずいた！NGS！～wet から dry まで～、日本ゲノム微生物学会若手の会第 9 回研究会、八王子セミナーハウス（東京都八王子市）2015 年 9 月
 17. Hirose Y., Misawa N., Wakazuki S. and Eki T. Establishment of the Pipeline for High-throughput Determination of Complete Bacterial Genomes. Irago Conference 2015. 伊良湖シーパーク&スパ（愛知県田原市）2015 年 9 月
 18. 広瀬侑、NIES シアノバクテリアのゲノム解析、東京大学教養学部（東京都目黒区）2015 年 7 月
 19. 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の補色順化の解析、第 6 回光合成学会年会、岡山国際交流センター（岡山県岡山市）2015 年 5 月
 20. Hirose Y., Rockwell N. C., Lagarias J. C., and Ikeuchi M. Protochromic photocycle of the green/red cyanobacteriochrome family for complementary chromatic acclimation,

15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Tubingen, Germany, Aug 2015.

〔図書〕(計 2 件)

1. 広瀬侑「シアノバクテリアのゲノム解析とそれを活用した補色応答現象の理解」生物の科学遺伝(NTS 出版),71 巻 2 号,98 - 99 頁,2017 年
2. 広瀬侑、池内昌彦「シアノバクテリアの補色順化における光色感知機構」化学と生物,54 巻 6 号,403 - 407 頁,2016 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：核酸分子およびこれを用いたタンパク質の製造方法
 発明者：広瀬侑
 権利者：国立大学法人豊橋技術科学大学
 種類：特許
 番号：特許第 2017-038832
 出願年月日：2017 年 3 月 1 日
 国内外の別：国内

名称：多波長光照射装置
 発明者：広瀬侑
 権利者：国立大学法人豊橋技術科学大学
 種類：特許
 番号：特許第 2017-074637
 出願年月日：2017 年 4 月 3 日
 国内外の別：国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
<https://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・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：30616230