

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：84307

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15445

研究課題名（和文）紅色光合成細菌におけるポリヒドロキシ酪酸をシグナル分子とした代謝調節機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of metabolic regulation by polyhydroxybutyrate as a signal molecule in purple photosynthetic bacteria

研究代表者

清水 哲（Shimizu, Tetsu）

公益財団法人地球環境産業技術研究機構・その他部局等・研究員

研究者番号：30839014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）： 紅色細菌 *Rhodobacter sphaeroides* においてポリヒドロキシ酪酸（PHB）応答性の転写制御因子をコードする *phaR* の破壊によって発現量が上昇する遺伝子を RNA-seq により網羅的に解析した。その結果、*phaR* の破壊によって同株の酢酸資化に必須なエチルマロニル CoA 経路を担う複数の遺伝子の発現量が上昇していることが明らかとなり、PhaR が酢酸代謝関連遺伝子の制御に関わることが示された。また水素高生産株をベースに *phaR* と PHB 合成酵素遺伝子を同時に破壊することで、酢酸からの水素生産量および収率が向上することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまで微生物において細胞内炭素貯蔵物質あるいはレドックスバランス調節物質として機能することが示されていた PHB が、代謝調節を媒介するシグナル分子としての役割を担うことを新たに示した。本研究成果は PHB をはじめとするポリヒドロキシアルカン酸生産菌の代謝生理を理解するうえで重要な知見であるとともに、ポリヒドロキシアルカン酸生産菌を対象とした代謝工学による物質生産菌の育種に資するものである。

研究成果の概要（英文）： By using an RNA-seq analysis, we searched genes upregulated by deletion of *phaR* encoding a polyhydroxybutyrate (PHB)-responsive transcription regulator. As a result, we found that genes involved in the ethylmalonyl-CoA pathway were upregulated by deletion of *phaR*, indicating that PhaR is involved in the regulation of acetate metabolism in *R. sphaeroides*. We also found that deletion of *phaR* and PHB synthase gene in the hydrogen-overproducing strain resulted in enhancement of hydrogen production and hydrogen yield from acetate.

研究分野：応用微生物学

キーワード：PHB PHA PhaR *Rhodobacter* Ethylmalonyl-CoA hydrogen

1. 研究開始当初の背景

ポリヒドロキシ酪酸(PHB)は微生物が生合成するバイオポリマーであり、細胞内炭素貯蔵物質や、レドックスバランス調節物質として機能することが知られている。研究代表者は紅色細菌 *Rhodobacter sphaeroides* による酢酸からの水素生産を研究する過程で、PHB 合成酵素遺伝子(*phaC1*)を破壊すると *R. sphaeroides* の酢酸資化能が著しく低下すること、*phaC1* に加えて PHB 応答性の転写制御因子をコードする *phaR* を破壊すると酢酸代謝不良が野生株並みに回復することを見出していた(図1)。このような表現型は PHB の細胞内炭素貯蔵物質あるいはレドックス調節物質としての機能が酢酸資化に必須なのではなく、PHB の蓄積により PhaR 制御下遺伝子が脱抑制されることが酢酸資化に必須であることを示唆する。すなわち、PhaR は酢酸資化に必要な遺伝子の発現制御にかかわり、PHB はその発現制御を媒介するシグナル分子として機能することが予想された。

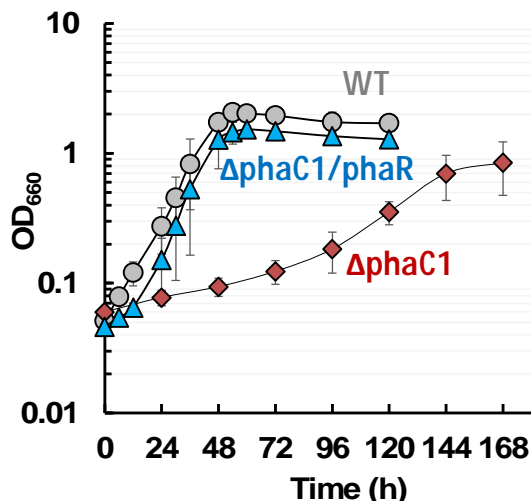


図1. 各株の酢酸を炭素源とした生育

2. 研究の目的

本研究では *R. sphaeroides* において PhaR により発現制御を受ける酢酸資化に必要な遺伝子を同定し、同株における PHB をシグナル分子とした代謝調節機構の解明を目的とした。本研究は細胞内炭素貯蔵物質として認識されている PHB が代謝関連遺伝子の発現制御を媒介するシグナル分子として機能する可能性について検証するもので、先行研究とは異なる独自の視点に基づく。これまでの結果から酢酸資化関連遺伝子が PhaR により制御されていることが予想されるが、*R. sphaeroides* はエチルマルコニル-CoA (EMC) 経路により酢酸を資化することが知られている。EMC 経路を担う遺伝子の多くはその発現制御機構が不明であり、PhaR がその制御に関わる可能性が考えられる。また PhaR が酢酸の取り込み、アセチル-CoA 生合成の制御にかかわる可能性も考えられるが、いずれにしても新奇な代謝調節機構の発見が期待された。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq 解析による PhaR 制御下遺伝子の網羅的な解析

野生株、*phaC1* 破壊株、*phaR* 破壊株、*phaC1/phaR* 二重破壊株をそれぞれ酢酸を単一炭素源とした培地で嫌気、光照射条件で培養し、対数増殖期の菌体から RNA を抽出した。抽出 RNA の純度を電気泳動及び分光光度計により確認後、RNA-seq 解析を外注にて実施した。

(2) *phaR* の破壊により発現量が上昇する遺伝子のプロモーター配列解析

RNA-seq 解析の結果同定された *phaR* の破壊によって発現量が上昇する遺伝子について、5' - RACE 法によって転写開始店及び推定プロモーター領域を決定した。各推定プロモーター領域周辺の塩基配列を精査し、*R. sphaeroides* FJ1 株で報告されている PhaR 結合モチーフ配列 (5' - CTGCN₃₋₄GCAG-3') (*FEMS Microbiol Lett* 302(2):138-143) を探索した。

(3) *phaC1* および *phaR* の破壊が水素高生産株に及ぼす影響の評価

構築済みであった水素高生産株 (*Appl Microbiol Biotechnol* 103(23-24):9739-9749) の *phaC1* 破壊株、*phaR* 破壊株、*phaC1/phaR* 二重破壊株をそれぞれ作製し、酢酸を炭素源とした光属栄養培養における生育、水素生産、酢酸消費、PHB 生産を評価した。また得られたデータから各株で消費された酢酸がどのような割合でバイオマス、PHB、水素に分配されているのか、定量的な比較解析を実施した。

4. 研究成果

(1) RNA-seq 解析による PhaR 制御下遺伝子の網羅的な解析

野生株、*phaC1* 破壊株、*phaR* 破壊株、*phaC1/phaR* 二重破壊株についてそれぞれ酢酸を炭素源とした際の転写物を網羅的に解析し、良好なデータを取得した。野生株-*phaC1* 破壊株、野生株-*phaR* 破壊株、野生株-*phaC1/phaR* 二重破壊株、*phaC1* 破壊株-*phaC1/phaR* 二重破壊株の計4つの組み合わせで発現変動解析を実施した結果、*phaC1* 破壊株-*phaC1/phaR* 二重破壊株の組み合わせで最も多くの発現変動遺伝子が同定されたため、その内容を精査した。その結果、*phaR* の破壊によって既知の PhaR 制御下遺伝子である *phaP* の発現量が 2.0 倍上昇していたのに加えて、

を及ぼすためと推察される。興味深いことに、*phaC1/phaR* 二重破壊株では消費された酢酸由来の電子のうち60%が水素生産、40%がバイオマス等に用いられており、PHB生産抑制によって期待される以上の水素収率向上が観察され、その分バイオマス等に用いられる電子の割合が低下していた。このことは *phaR* の破壊により異化的な代謝が亢進することを示しており、代謝フラックスが大きく変化していることが推察された。

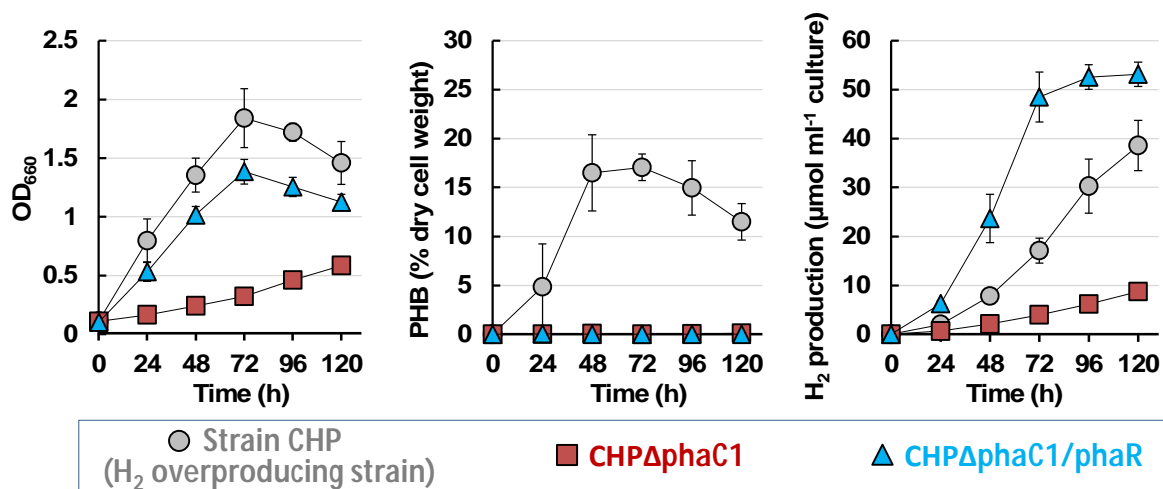


図 4. 水素生産株での *phaC1* 破壊、*phaC1/phaR* 二重破壊が酢酸からの水素生産に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Tetsu, Teramoto Haruhiko, Inui Masayuki	4. 巻 88
2. 論文標題 Construction of a Rhodobacter sphaeroides Strain That Efficiently Produces Hydrogen Gas from Acetate without Poly(β-Hydroxybutyrate) Accumulation: Insight into the Role of PhaR in Acetate Metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 00507-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.00507-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 哲、寺本 陽彦、乾 将行
2. 発表標題 Rhodobacter sphaeroidesにおけるポリヒドロキシ酪酸を介した代謝調節機構の解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 哲、寺本 陽彦、乾 将行
2. 発表標題 Rhodobacter sphaeroidesにおけるPHBを介した代謝調節機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------