

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 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：2011～2012

課題番号：23658160

研究課題名（和文）次世代光発酵技術の開発に向けた新規海産ラン藻 - ファージ感染系ライブラリーの構築

研究課題名（英文）Library construction of cyanobacteria- bacteriophage system for a platform toward the next generation photo-fermentation.

研究代表者

吉田天士（YOSHIDA TAKASHI）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80305490

研究成果の概要（和文）：次世代光発酵技術の確立のため、日本近海より海産窒素固定ラン藻ならびにその感染性ファージの探索を行った。日本沿岸域に、窒素固定ラン藻が豊富に存在することを明らかにし、漁場環境における本ラン藻の重要性を提示した。さらに、ファージの分離には至らなかったものの、窒素固定ラン藻を 3 株分離することに成功し、本ラン藻の応用に向けた基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：We explored dinitrogen-fixing cyanobacteria and their infectious bacteriophages in coastal areas of Japan for construction of a platform toward the next generation photo-fermentation. Our results revealed that dinitrogen-fixing cyanobacteria were abundant in the area, suggesting that the cyanobacteria may play important roles for formation of marine resource environments. In addition, we succeeded in isolation of three dinitrogen-fixing cyanobacteria that is considered to be available for photo-fermentation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：窒素固定ラン藻、ラン藻、シアノファージ、CRISPR、シアノテケ

## 1. 研究開始当初の背景

再生可能エネルギーの利用効率の向上は、省エネルギー社会化などと合わせ、2050 年までに世界の温室効果ガスの排出を半減させるというわが国の目標に向けた必須課題の一つである。そのため、植物により生成された糖をエタノールへ変換するバイオエタノール、ならびに緑藻など真核藻類によって生成される炭化水素を直接燃料に用いるバイオディーゼルといった光合成を利用したエネルギー生産が脚光を浴びている。ラン藻は、光合成原核生物であり、すべての生物圏において、主要な一次生産者として機能している

が、脂質含量に乏しいことからバイオエネルギーへの利用はなされてこなかった。ところがごく最近、ラン藻の遺伝子操作の容易さを活用し、発酵や脂質代謝に関わる外来の遺伝子を導入することにより、ラン藻によって生合成されたピルビン酸を起点として様々な有用産物を効率的に合成する組換えラン藻が作出されつつある。バイオエタノールを第一世代、バイオディーゼルを第二世代とし、このようなラン藻を用いた光発酵系ともいふべき技術が第三世代として注目されるようになっている。しかしながら、ラン藻における異種遺伝子の効率的な高発現系の構築は

まだ発展段階にある。

## 2. 研究の目的

申請者は、これまで取り組んできた基礎研究の中で、淡水性ラン藻ミクロキスティスに感染するシアノファージ (Cyanophage Ma-LMM01) を世界に先駆けて分離し、さらにその全ゲノム塩基配列の決定に成功した。現在、マイクロアレイ法を用いたパイロット実験より、ミクロキスティスへの感染過程において、ファージ遺伝子が未知の転写制御のもと、極めて高い発現を示すことを明らかにし、本転写発現調節機構を応用した極めて効率的な光発酵技術の確立を目指している。しかしながら本システムをバイオエネルギー生産系へ転換するには、限りある水資源や耕作地に依存しない海洋での生産システムを構築する必要がある。そこで注目したのが海産窒素固定ラン藻である。窒素固定ラン藻は光合成に加えて空気中のガス態窒素をアンモニア態に変換し利用可能なので、培養に炭素・窒素源を添加する必要がなく、貧栄養な環境でも生育可能である。さらに、次世代エネルギー源として注目されている水素生産能やアルコール類を産生する発酵能を有しているタイプも存在し、エネルギー生産系としても優れている。この窒素固定ラン藻に感染するシアノファージが有する遺伝子発現機構を応用すれば、高効率な光発酵系の構築につながる。したがって、本研究では次世代光発酵技術の確立を目指し、海産窒素固定ラン藻ならびにその感染性ファージを分離・性状解析してライブラリー化し、新規有用プロモーターならびに有用遺伝子資源の探索を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 海産ラン藻の分布調査

兵庫県農林水産技術センター調査船「たじま」により日本海兵庫県沖で調査を行った。2011年8月に Station 2 (35°50.2N, 134°19.8E) および Station 7 (37°20.2N, 134°19.8E) で表層から深度 100 m 層まで深度別に海水を採取した。採取した海水試料から直接 DNA を抽出し、窒素固定酵素をコードする *nifH* 遺伝子を対象としたクローン解析を行った。

兵庫県農林水産技術センター調査船「新ひょうご」に瀬戸内海で調査を行った。2012年4~9月に大阪湾、紀伊水道や播磨灘地点において海水を採取した。本海水サンプルから抽出した DNA に対して、窒素固定ラン藻のリアルタイム PCR による定量 (対象: トリコデスミウム属ラン藻、*nif* 遺伝子配列に基づくラン藻系統群 Group A・B・C) および単細胞性窒素固定ラン藻の 16S rRNA 遺伝子を対象としたクローン解析を行った。

### (2) 光発酵に向けた有用海産窒素固定ラン藻の分離

本研究では、遺伝子組み換えが容易と推定される単細胞性窒素固定型ラン藻に絞った。試料を遮光ポリびんで研究室まで持ち帰り、一般的な海産ラン藻培地 ASP2 培地より窒素源を除いた ASP2-N 培地に添加し、試料の由来環境に合わせた培養条件下 (温度、光強度) で 1~2 週間集積培養する。集積培養後、アガロースによる ASP2-N 平板培地に塗抹し、さらに培養する。出現した緑色のコロニーを釣菌して新たな平板培地に画線する作業を 3 回繰り返す、純粋な新規ラン藻株を樹立した。

樹立した株に対して形態 (細胞形状、細胞サイズ、分裂様式、シースの有無) を調べ、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析を行い、ラン藻の生理・分類学的特性を調べた。

### (3) ファージの単離

ラン藻株分離地点より得た海水を、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のヌクレオポアフィルターでろ過し、ファージ画分を得た。これを、アガロース平板培養に一面に生えた宿主菌株に供し、形成されるプラーク (溶菌斑) を探索した (プラーク形成法)。

## 4. 研究成果

### (1) 海産ラン藻の分布調査

日本海におけるラン藻および窒素固定生物の多様性調査を行った。ラン藻の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析の結果、Station 2 および Station 7 両地点でシネコッカス属に属する配列が優占していた (全体の 97%)。一方で、残り 3% の配列はプロクロコッカス HL タイプに属し、いずれも表層から得られた。これはプロクロコッカス HL タイプが強光条件下に適応していることと一致する。*nifH* 遺伝子クローン解析の結果、定点 Station 7 の深度 30、75 m およびクロフィル極大層 (深度 50 m 付近) に、単細胞性窒素固定ラン藻 Group A に属する *nifH* 遺伝子が初めて検出された (図 1)。先行研究により、Group A はゲノム中に炭素同化経路や光化学系 II を欠くため、炭素源を外部に依存する

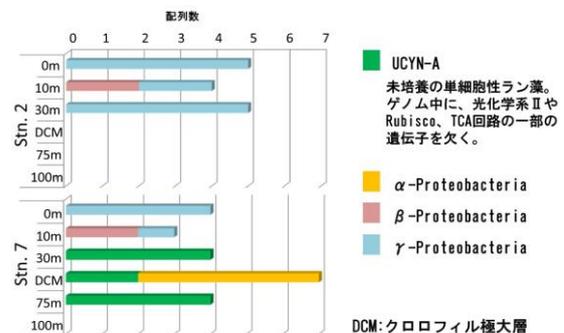


図 1. *nif* 遺伝子に基づくクローン解析

ことが示されており、円石藻の一種と共生関係にあることが知られている。一次生産者の多い深度であるクロロフィル極大層付近に分布していたことは、Group A が円石藻の一種と共生関係にあることと合致している。また、他の *nifH* 遺伝子は  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -プロテオバクテリアに由来しており (図 2)、日本海では従属栄養性の細菌が窒素固定による窒素供給に大きく寄与している可能性が示唆された。本研究は日本海におけるラン藻および窒素固定生物の分布を初めて明らかにした研究であり、その成果は国際誌 *Fisheries Science* 誌に掲載された。

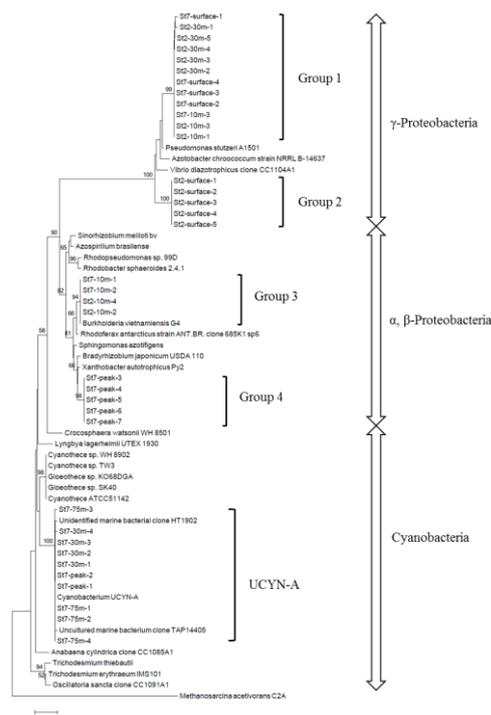


図 2. 日本海海水試料から得られた *nifH* 遺伝子に基づく NJ 系統樹

次に、瀬戸内海における窒素固定ラン藻の分布調査を行った。リアルタイム PCR の結果、トリコデスミウム属ラン藻および Group B はいずれの地点・時期からも検出されなかった。一方で、Group A は大阪湾奥、紀淡海峡および紀伊水道定点で 6 月に最も多く検出された ( $6 \times 10^3$ - $1.5 \times 10^4$  *nifH* gene copies  $L^{-1}$ )。6 月の現場水温は 18-22°C であり、これは Group A が外洋域で最も多く検出される水温である 19-24°C とほぼ一致する。Group C は大阪湾、紀淡海峡および紀伊水道定点で 4、6 月に  $4.1 \times 10^3$ - $1.2 \times 10^4$  *nifH* gene copies  $L^{-1}$  検出された。注目すべきことに、Group C は播磨灘定点において 9 月に最大  $1.9 \times 10^5$  *nifH* gene copies  $L^{-1}$  検出され、外洋における分布調査に比べて非常に高密度に存在していた。また、単細胞性窒素固定ラン藻由来の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った結

果、Group A と最も近縁な配列 (相同性 99%、A-1 グループとする)、Group C に属するシアノテケ SKTU126 株およびシアノテケ ATCC51142 株と最も近縁な配列 (それぞれ相同性 99-100%、前者を C-1、後者を C-2 グループとする) が得られた。以上の結果から、単細胞性窒素固定ラン藻 Group A および Group C が瀬戸内海に幅広く多量に分布していることが明らかになった。

## (2) 窒素固定ラン藻の分離と性状解析

日本海および瀬戸内海に面した潮間帯由来の海水試料から集積培養系を作成した結果、培養開始約 1~2 ヶ月後に、フラスコの底部に緑色・暗緑色のマットや、緑色の浮遊性の凝集体が確認された。これらの集積培養系から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を決定した結果、大阪府長松海岸由来海水試料由来の集積培養系ではリングピア属が、京都府琴引浜の砂試料からはフォルミディウム属、琴引浜の海水試料からハパロシフォン属に由来する配列が得られた。これらはいずれも糸状性の窒素固定ラン藻であった。

一方で、兵庫県洲本市五色浜および和歌山県由良町海岸から得られた集積培養系からは、単細胞性窒素固定ラン藻であるシアノテケ属に属する配列が得られた。以上の結果より、今回の実験手法を用いると、窒素固定ラン藻 に由来する集積培養系が獲得可能であることが分かった。また、サンプルを採取した地点や、用いた試料によって確認される窒素固定ラン藻は異なっていたため、沿岸環境には互いに異なる多様な窒素固定ラン藻が存在している可能性が示唆された。

単細胞性窒素固定ラン藻が認められた集積培養系から分離実験を行った結果、洲本市五色浜から Gs-1 株が、由良町海岸から YR-1 株、YR-2 株がそれぞれ得られた (図 3)。また、大阪湾水柱由来の集積培養系からもラン藻様生物の増殖が確認された。いずれの株も形態・分子系統的な解析の結果、シアノテケ属ラン藻に分類された。また、*nifH* 遺伝子を決定した結果、いずれも Group C が属するクレードに含まれ、Group C タイプの単細胞性窒素固定ラン藻であることが示された。Gs-1 および YR-1、-2 株の 16S rRNA 遺伝子は、上述の研究結果 (2) における C-1 グループと非常に高い相同性を示した (99%; Fig. 2)。この結果から非常に近縁なタイプが瀬戸内海水柱にも存在することが示唆された。一方で、潮間帯から得られた分離株はいずれも培養器底部でコロニーやマット状構造を形成することから、付着する基盤の多い潮間帯という環境に適応したタイプであった。このように、なぜ水柱と潮間帯という大きく異なる環境に非常に近縁なタイプが存在したのか

は次の課題である。日本沿岸海域において Group C が分布する環境を明らかにし、さらにその分離株を確立した。Group C は水素生産能や発酵能、グリコーゲンの貯蔵など、数々の有用代謝経路を有しているため、今回の研究成果は、次世代光発酵系として有用な窒素固定ラン藻獲得手法の基盤になると考えられる。

本研究結果から、瀬戸内海に Group C が存在していることが (2) の研究に加えて支持され、その生息域が潮間帯から水柱環境まで幅広いことが示唆された。

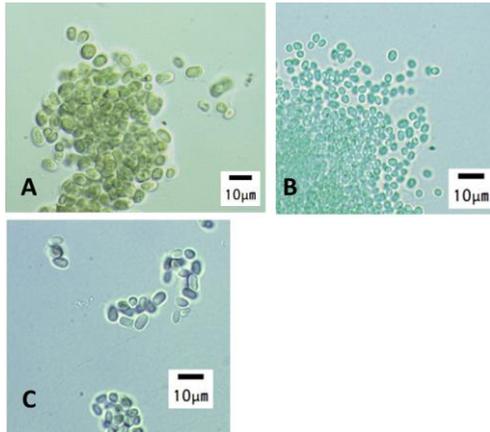


図 3. 窒素固定ラン藻分離株の蛍光顕微鏡写真 A)Gs-1 B)YR-1 C)YR-2

### (3) ファージの分離

福井県小浜市の試料よりシアノテアケ分離株を溶菌する画分を得た。性状を解析したところ、ファージではなく細菌による溶菌であることが明らかとなった。また、データベースに公開されているシアノテアケゲノムから、CRISPRスペーサーと呼ばれる過去に感染したウイルス部分配列を用いて、公表されているメタゲノムデータを検索したが、シアノテアケウイルスの推察される配列は見出すまでには至らなかった。

そこで全ゲノム配列が決定されているラン藻に対してCRISPR/Casシステムの分布とタイプを明らかにした。今回対象としたラン藻に感染するシアノファージに由来する配列はデータベース上に存在せず、シアノファージラン藻感染系の組み合わせが膨大に存在することが示唆された。

## 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 1 件)

Hashimoto, R., Yoshida, T., Kuno, S., Nishikawa T. and Sako, Y. 2012. The first assessment of cyanobacterial and

diazotrophic diversities in the Japan Sea. Fish. Sci. 78:1293-1300. DOI: 10.1007/s12562-012-0548-7

[学会発表] (計 3 件)

- ① 橋本 怜弥 「日本海におけるラン藻および窒素固定生物の分布調査」平成 24 年度日本水産学会春季大会、2011 年 3 月 27 日、東京海洋大学、東京品川
- ② 橋本 怜弥 「日本沿岸環境に認められた窒素固定ラン藻の多様性」平成 24 年度日本水産学会秋季大会、2012 年 9 月 15 日、水産大学校、下関市
- ③ 橋本 怜弥 「瀬戸内海における窒素固定ラン藻の分布と多様性」平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 28 日、東京海洋大学、東京品川

[その他]

ホームページ等

<http://www.microbiology.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 天士 (YOSHIDA TAKASHI)  
京都大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：80305490

### (2) 研究分担者

左子 芳彦 (SAKO YOSHIHIKO)  
京都大学・農学研究科・教授  
研究者番号：60153970