

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780082

研究課題名(和文) リシーケンス解析によるラン藻の新規高温耐性遺伝子の探索

研究課題名(英文) Resequencing analyses to identify the genes for high temperature tolerance.

研究代表者

兼崎 友 (KANESAKI, YU)

東京農業大学・その他部局等・博士研究員

研究者番号：70380293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラン藻(シアノバクテリア)は光合成や植物の進化の研究における極めて重要なモデル生物である。しかし、バクテリアの染色体には突然変異が起きやすいため、分子生物学的な研究を進める上で大きな問題となっていた。また、これまでは有用な突然変異体が得られても、その変異遺伝子座の同定は非常に難しかった。我々は、近年急速に発展している超高速遺伝子配列解析の技術を利用して、ラン藻における様々な突然変異体の原因遺伝子同定の手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacteria are the photosynthetic microorganisms used as models for basic research on photosynthesis, evolution, and molecular genetics. Recent progress of sequencing technologies enables us to identify mutated loci in bacterial genomes. Here, we performed resequencing analysis of the genomes of five laboratory strains with different phenotypes on thermo-sensitivity. By verification of the identified mutations, we found a mutated locus which determined the thermo-sensitivity of the strains. Furthermore, we isolated the spontaneous thermo-tolerant mutants and identified a number of candidate loci for thermo-tolerance by resequencing analysis. Our strategy of genetics could efficiently identify the associated mutations in the spontaneous mutants which has altered phenotype.

研究分野：微生物学

キーワード：シアノバクテリア 次世代シーケンサー リシーケンス解析 突然変異 高温耐性

1. 研究開始当初の背景

ラン藻は植物の光合成や葉緑体の起源に関する研究における重要なモデル生物として広く用いられている。ラン藻の中でも特に分子生物学的実験に適した性質を持つ *Synechocystis* sp. PCC 6803 や *Synechococcus elongatus* PCC 7942 などは全ゲノム配列が解読され、様々な研究に利用されている。しかし、その後の研究により、ゲノム解読に用いられた株と冷凍保存株の間では表現型に幾つもの違いがあること、また“野生株”として維持されている亜型株 (substrain) が数多く存在することが判明し、問題となっていた。そこで申請者らは、次世代シーケンス技術を用いて *Synechocystis* sp. PCC 6803 の substrain についてゲノムリシーケンス解析を実施し、個々の substrain 特有の一塩基多型や欠失領域を全ゲノムレベルで多数同定する技術を開発した (Kanesaki et al., 2012, *DNA Res.*)

これらの研究成果を基に、ラン藻における環境ストレス耐性 (もしくは感受性) を獲得した突然変異株の変異部位を次世代シーケンサーを使ったリシーケンス解析で短期間に解明し、環境ストレス耐性付与に関わる新規遺伝子座を同定する研究戦略の立案を思い立った。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いたリシーケンス解析により、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の高温耐性変異株、もしくは高温感受性変異株のゲノム上の変異部位をゲノムワイドに解明し、その表現型の変化に関わる原因遺伝子座を効率的に同定する手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

我々のこれまでの研究により、リシーケンスされていない株をベースに突然変異株や遺伝子破壊株を作製・維持するリスクの高さが明らかになったため、基準となる親株として *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Nodai 株について全ゲノムリシーケンス解析をおこない、基盤となるゲノム情報の再整備をした。

(1) 国内の様々な研究機関から研究室株収集し、特に高温耐性能の違いに着目して表現型の違いを精査する。さらに市販されている冷凍保存株からもコロニーを取得し、表現型を精査する。

(2) 高温耐性において違いが見られた研究室株からゲノム DNA を抽出し、全ゲノムリシーケンス解析を実施し、原因遺伝子座の候補をリストアップする。

(3) 各候補株において変異を生じていた遺伝子座を標準型の遺伝子配列に再置換する。も

しくは、変異を持たない株の同じ遺伝子座に変異を導入することで、同様の表現型になるかどうかを検証する。

(4) 基準株に対して長期間の高温適応実験をおこない、高温耐性を獲得したコロニーを取得する。これらの株についてもリシーケンス解析を実施し、変異遺伝子座をリストアップする。

(5) 高温耐性株についてトランスクリプトーム解析を実施し、基準株と比べ高温誘導性遺伝子にどのような違いが生じたのかを調べる。

4. 研究成果

(1) 研究室株 5 株、及び市販株より単離した 3 株の表現型をプレート培養、及び液体培養下で精査した結果、1 株だけが 43 °C での生育が可能であり、他の株はこの温度での生育はできなかった。また 2 株は静置培養時の遊泳性を喪失していることが明らかとなった。

(2) これら 8 株の研究室株について、ゲノム DNA を抽出し全ゲノムリシーケンス解析を実施し、ゲノム上の変異部位を明らかにした。変異の検出には BWA, MAQ, SAMtools, CLC genomics workbench, BreakDancer の各プログラムを併用し、極めて高精度な解析を実現した。

(3) 株間の高温耐性、遊泳性の差異の原因遺伝子座を特定すべく、変異を生じていた遺伝子座を標準型の遺伝子配列に再置換した。また、変異を持たない株の同じ遺伝子座に変異を導入した。これらの実験により、DNA ヘリカーゼをコードする *dnaB* 遺伝子の一塩基置換が高温下での生育の違いを生じている原因の一つであることが明らかとなった。また、遊泳性の差異に繋がる原因変異は、RNA ポリメラーゼのシグマ因子の一つである *sigF1* 遺伝子へのナンセンス変異であることが解明された。わずかに一塩基の変異の導入で細胞の表現型が劇的に変化することが示された。

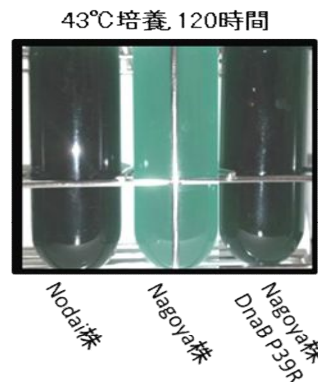


図1 高温耐性に関わる遺伝子座への変異導入試験

(4) リシーケンス解析の結果を受け、Nodai 株、Nogoya 株の 2 株を基準株とし、高温適応試験を実施して、高温耐性を獲得したコロニーを選抜した。その結果、Nodai 株からは 3 株、Nogoya 株からは 11 株の高温耐性株が得られた。これらの株について、さらにリシーケンス解析を実施し、ゲノム上の変異部位を同定した。高温感受性の Nogoya 株を親株とした変異株群では、*dnaB* 遺伝子が 2 コピーになったり、*dnaB* 遺伝子の発現量が増大する変異が観測された。一方、Nodai 株を親株とした高温耐性株群では、過去に高温ストレス応答分野では報告例の無い新規遺伝子座への変異が複数観測された。これらの変異について、現在さらなる解析と検証をおこなっている。

(5) 得られた高温耐性株のうち、一部の株についてトランスクリプトーム解析を実施し、親株との遺伝子発現プロファイルの違いを調べたが、主要な高温誘導性遺伝子は共通していた。親株と高温耐性株では生育上限温度が異なるため、この実験については、さらに条件検討が必要であることが分かった。

(6) 本研究により確立されたリシーケンス解析の手法を活用し、酸性ストレスや光ストレス条件下で得られた耐性株の変異遺伝子座も容易に同定できたことから、効率的なリシーケンス解析の手法を確立できたと言える。

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 9 件)

(1) Nishijima Y., Kanesaki Y., Yoshikawa H., Ogawa T., Sonoike K., Nishiyama Y., and Hihara Y. Analysis of spontaneous suppressor mutants from the photomixotrophically-grown *pmgA*-disrupted mutant in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research*、査読有、2015、印刷中、DOI: 10.1007/s11120-015-0143-8.

(2) Uchiyama J., Kanesaki Y., Iwata N., Asakura R., Funamizu K., Tasaki R., Agatsuma M., Tahara H., Matsushashi A., Yoshikawa H., Ogawa S., and Ohta H. Genomic analysis of parallel-evolved cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under acid stress. *Photosynthesis Research*、査読有、2015、印刷中、DOI: 10.1007/s11120-015-0111-3.

(3) Tsurumaru H., Kanesaki Y., Hashimoto S., Okizaki K., Yoshikawa H., and Yamakawa T. Draft genome of *Bradyrhizobium japonicum* Is-34 that is incompatible with Rj4-genotype soybeans.

Genome Announcement、査読有、2014、2: e01316-14、DOI: 10.1128/genomeA.01316-14.

(4) Kanesaki Y., Masutani H., Sakanaka M., Shiwa Y., Fujisawa T., Nakamura Y., Yokota A., Fukiya S., Suzuki T., and Yoshikawa H. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* 105-A, a strain with high transformation efficiency. *Genome Announcement*、査読有、2014、2: e01311-14、DOI: 10.1128/genomeA.01311-14.

(5) Ehara A., Suzuki H., Kanesaki Y., Yoshikawa H., and Amachi S. Draft genome sequence of strain Q-1, an iodide-oxidizing alphaproteobacterium isolated from natural gas brine water. *Genome Announcement*、査読有、2014、2: e00659-14、DOI: 10.1128/genomeA.00659-14.

(6) Ohki K., Nguyen Q.T., Yoshikawa S., Kanesaki Y., Okajima M., Kaneko T. and Tran H.T. Exopolysaccharide production by a unicellular 1 freshwater cyanobacterium *Cyanothece* sp. isolated from a rice field in Viet Nam. *Journal of Applied Phycology*、査読有、2014、26: 265-272、DOI: 10.1007/s10811-013-0094-4.

(7) Ohbayashi R., Watanabe S., Kanesaki Y., Narikawa R., Chibazakura T., Ikeuchi M., and Yoshikawa H. DNA replication depends on photosynthetic electron transport in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*、査読有、2013、344: 138-144、DOI: 10.1111/1574-6968.

(8) Kanesaki Y., Imamura S., Minoda A., and Tanaka K. External light conditions and internal cell cycle phases coordinate accumulation of chloroplast and mitochondrial transcripts in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Research*、査読有、2012、19: 289-303、DOI: 10.1093/dnares/dss013.

(9) Suzuki M., Eda Y., Ohsawa S., Kanesaki Y., Yoshikawa H., Tanaka K., Muramatsu Y., Yoshikawa J., Sato I., Fujii T., and Amachi S. Iodide oxidation by a novel multicopper oxidase from - proteobacterium strain Q-1. *Applied and Environmental Microbiology*、査読有、2012、78: 3941-3949、DOI: 10.1128/AEM.00084-12.

[学会発表](計 9 件)

(1) 兼崎 友、重信直人、小田しおり、齋藤夏帆、宮澤和己、渡辺智、吉川博文：高温、強酸性温泉からの極限環境紅藻の新規単離と有用形質の探索

日本農芸化学会 2015 年大会（岡山）2015 年 3 月 27-29 日（招待講演）

(2) 兼崎 友、重信直人、小田しおり、齋藤夏帆、渡辺 智、吉川博文：有用形質を持つ極限環境紅藻の新規単離と環境ストレス応答遺伝子の解析

第 56 回 日本植物生理学会（東京）2015 年 3 月 16-18 日

(3) 兼崎 友：次世代シーケンス技術の発展から考える微生物ゲノム研究の行方

第 13 回微生物研究会（東京）2014 年 7 月 26 日（招待講演）

(4) Kanesaki Y., Ozawa K., Suzuki M., Shiwa Y., Watanabe S., and Yoshikawa H. : Resequencing analyses of laboratory strains of *Synechococcus elongatus* PCC 7942

第 55 回 日本植物生理学会（富山）2014 年 3 月 18-20 日

(5) 小澤啓悟、兼崎 友、志波優、渡辺智、吉川博文：*Synechococcus elongatus* PCC 7942 研究室株間のリシーケンス解析と表現型の差異に関わる原因遺伝子座の探索

第 8 回日本ゲノム微生物学会（東京）2014 年 3 月 6-8 日

(6) 内桶香那、渡辺 智、野田明日翔、中武詩津香、兼崎 友、千葉櫻拓、吉川博文：*Synechococcus elongatus* PCC 7942 におけるマルチコピーゲノムの分配制御機構

第 8 回日本ゲノム微生物学会（東京）2014 年 3 月 6-8 日

(7) 兼崎 友：バクテリアのリシーケンス解析から見えてきたこと 東京大学 GCOE プログラム ゲノム情報ビッグバンから読み解く生命圏・第 33 回 GCOE 談話会（東京）2012 年 11 月 5 日

(8) 兼崎 友、吉川博文：Genome analyses of the EPS-producing cyanobacteria

第 35 回 日本分子生物学会（福岡）2012 年 12 月 11-14 日

(9) Kanesaki Y., Shiwa Y., Tajima N., Suzuki M., Watanabe S., Sato N., Ikeuchi M., and Yoshikawa H. : Whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains.

International Symposium on Phototrophic Prokaryotes(ポルトガル)2012 年 8 月 10-15 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nodai-genome.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼崎 友 (KANESAKI YU)
東京農業大学・その他部局等・博士研究員
研究者番号：70380293

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし