

令和 3 年 8 月 16 日現在

機関番号：84307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05395

研究課題名(和文)シアノバクテリアの細胞分化による代謝分業を改変・利用した光合成嫌気発酵生物の創出

研究課題名(英文) Development of artificially differentiated cells using multicellular cyanobacterium towards anaerobic photosynthetic bioproduction

研究代表者

肥後 明佳 (Higo, Akiyoshi)

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：20790249

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)：多細胞性シアノバクテリアであるアナベナは光合成を行う栄養細胞と窒素固定を専門に行うヘテロシスト細胞の2種類の細胞からなる多細胞性の微生物である。シアノバクテリアは光エネルギーを利用した物質生産ホストとして注目を集めているが、光合成により酸素を発生するので、嫌気発酵による物質生産には不向きである。本研究では、内部が嫌氣的に保たれたヘテロシスト内で効率よく物質生産を行わせるため、ヘテロシスト特異的に遺伝子発現をノックダウンし、人工的な代謝改変を行うためのシステムを新たに構築した。さらに、実際にそのシステムを応用し、アナベナによるエタノール生産増産に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

太陽光を利用できるシアノバクテリアによる有用物質の生産は、低炭素社会の実現に向け、重要な課題の一つである。単細胞性のシアノバクテリアを利用する研究が多いが、酸素を発生する光合成と発酵生産はうまくかみ合わず、生産のボトルネックになっていることが多かった。本課題では2種類の細胞からなる多細胞性シアノバクテリアの特徴を最大限活かした物質生産系を構築した。細胞腫特異的な遺伝子発現ノックダウンが可能であるシステムを新たに開発し、光合成と物質生産の分業システムを人工的にデザイン・構築し、効率的な微生物によるモノづくりを実現した。

研究成果の概要(英文)：Anabaena sp. PCC 7120 is a filamentous multicellular cyanobacterium composed of vegetative cells and heterocysts, specialized cells for nitrogen fixation. While cyanobacteria have attracted much attention as hosts of photosynthetic bioproduction in recent years, oxygen-evolving photosynthesis conflicts with anaerobic fermentation. In the present study, heterocysts, in which microoxic conditions are maintained to protect nitrogenase from oxygen, are repurposed as a bioproduction factory by development of heterocyst-specific conditional gene knockdown system. The spatio-temporal gene regulation system realized artificial metabolic division of labor, which resulted in enhanced bioethanol production.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 シアノバクテリア 代謝改変 物質生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、光合成能力を利用した、二酸化炭素を原料とするバイオ燃料の生産研究が単細胞性シアノバクテリアや緑藻を中心に行われてきている。しかし、光合成と嫌気発酵を両立させることは困難であり、生産性が上がらないことの大きな要因になっていた。また、生産性向上のための代謝改変を行うための遺伝子発現制御ツールがシアノバクテリアでは不足しており、その開発は喫緊な課題であった。

2. 研究の目的

窒素固定性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 は、光合成を行う栄養細胞と、約 10 細胞に 1 個の割合で存在する、窒素固定を行うヘテロシストが数珠状に連なる多細胞生物である。ヘテロシストは内部が嫌氣的であり、また、栄養細胞とは逆に糖の異化が活発であるので、嫌気発酵に適している。本研究課題では、2 種類の細胞それぞれに光合成と嫌気発酵を分業させることで高効率のバイオ燃料生産を行うことを目的とする。この目的を達成するためには、2 種類の細胞それぞれで遺伝子発現を特異的に制御するシステムが必須である。そこで、新たにヘテロシスト特異的な遺伝子発現抑制系の開発を行うことを第一の目的とした。さらに、この系を応用し 2 種類の細胞それぞれ個別に代謝改変し、ヘテロシストでの嫌気発酵の最適化・集約化を第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 様々な生物で実績のある遺伝子発現抑制法である CRISPRi 法と、自身がすでに開発した、ヘテロシスト特異的にターゲット遺伝子の発現を活性化するシステムや、*Anabaena* 用に開発してきた遺伝子発現制御システムを適切に組み合わせ、新たに遺伝子回路を構築するという合成生物学的な手法により、ヘテロシスト特異的な遺伝子発現抑制系の開発を行った。

(2) (1) で新たに *Anabaena* 用に最適化した CRISPRi 遺伝子発現抑制法を必須遺伝子である *cyabrB1* に適用し、*cyabrB1* の機能解析を行った。窒素源存在下でもヘテロシストを形成するという *cyabrB1* ノックダウン株の表現型について、RT-qPCR 法によりノックダウンにより変動した遺伝子を探索し、その機能を探った。

4. 研究成果

CRISPRi 遺伝子発現抑制法と、独自に開発したヘテロシスト特異的な遺伝子発現誘導系を組み合わせ、誘導剤の添加時のみヘテロシスト特異的にターゲット遺伝子の発現を抑制するシステムを構築することができた。さらに、このシステムを応用し、エタノール生産増産へとつなげた。また、派生した研究として、必須遺伝子でありこれまで解析が困難であったシアノバクテリアに高度に保存された転写因子をコードする *cyabrB1* の機能解析にも取り組んだ。*cyabrB1* をノックダウンすると、培地中に窒素源がある状態でも、ヘテロシスト形成に必要な遺伝子である *hetP* や *hepA* の発現が誘導され、ヘテロシストが形成された。以上の成果により、人為的にヘテロシスト形成を誘導し、光合成と嫌気発酵を効率よく分業させるための基盤が整った。以下にそれぞれについて詳しく述べる。

(1) ヘテロシスト特異的な遺伝子発現抑制系の開発と物質生産への応用

これまでに *Anabaena* で開発してきた遺伝子発現制御系を組み合わせ、目的の機能を果たす回路の構築を目指した。試行錯誤の結果、図 1A 示すような遺伝子発現ネットワークを構築した。遺伝子発現誘導剤である aTc を添加すると trigger RNA が発現する。また、sgRNA も発現する。ヘテロシスト特異的に発現するプロモーター P_{coxB11} の制御下には、5' 非翻訳領域に switch RNA を含む *dcas9* がある。Trigger RNA と switch RNA が複合体を形成すると、*dcas9* の上流のリボソーム結合サイトが露出し、翻訳が可能となる。すなわち、aTc 存在下、ヘテロシスト内でのみ、dCas9 タンパク質が翻訳される。よって、aTc 存在下でヘテロシストでのみターゲット遺伝子の発現抑制が起こるようになる。ターゲットとしては、グルタミン合成酵素遺伝子 *glnA* を選択した。図 1B では、ウエスタンブロッティング解析により、システム 2e あるいは 2f で、aTc 存在下 (+)、ヘテロシストでのみ (H)、GlnA の発現量が減少していることが示されている。対照的に、sgRNA を含まないネガティブコントロールのシステム 2c では GlnA の発現抑制は起こっていない。また、栄養細胞とヘテロシスト全体 (W) では GlnA の発現抑制は起こらなかった。図 1C では、これらの結果を定量化してある。以上の結果により、ヘテロシスト特異的な遺伝子発現抑制系の開発に成功したと結論した。

エタノール生産の基質であるピルビン酸は、一部のアミノ酸合成の出発物質でもある。したがって、窒素同化の入り口となるグルタミン合成酵素の発現をヘテロシストのみで抑制することにより、ヘテロシスト内で、バイオ燃料生産とアミノ酸合成との基質や補酵素の競合が回避され、ヘテロシストがバイオ燃料を集中的に生産する細胞になることが期待された。実際に、*Anabaena*

ヘテロシストでエタノール生産遺伝子を発現させた株で、グルタミン合成酵素をヘテロシスト特異的に抑制すると、エタノール生産量が約 1.2 倍増加した。このようにして、単細胞性生物ではなしえない、2 種類の細胞での分業化・専門化による高効率なバイオ燃料生産を達成できた。また、開発したヘテロシスト特異的な遺伝子発現抑制系は、ヘテロシストで発現する遺伝子の機能解析にも応用しうる成果である。

(2) *cyabrB1* の機能解析

CRISPRi 法を、*cyabrB1* に適用し解析を行った。*cyabrB1* はシアノバクテリアで高度に保存された転写因子であるが、必須遺伝子のため、これまで解析が困難であった。*cyabrB1* を CRISPRi 法でノックダウンすると、窒素源存在下でも 0.6% のヘテロシストを形成することが明らかになった。RT-qPCR 解析を行ったところ、*cyabrB1* ノックダウンにより、ヘテロシスト形成を促進する *hetP* や *hepA* 遺伝子が誘導されたためであると推測された。また、*cyabrB1* のパラログである *cyabrB2* のクックアウト株で、さらに *cyabrB1* をノックダウンすると、窒素源存在下でも 4.5% のヘテロシストを形成することが明らかになった (図 2)。

hetP や *hepA* は、ヘテロシスト形成のマスターレギュレーターである HetR により遺伝子発現が活性化されることが既に示されている。*hetR* 破壊株での *cyabrB1* ノックダウン実験や、ゲルモビリティ-シフトアッセイの結果から、*CyAbrB1* は、HetR とは独立に *hetP* や *hepA* の発現を抑制することが示唆された。

以上の結果から、*hetP* や *hepA* は、*CyAbrB1* と HetR との間の発現量のバランスにより制御されているという仮説を提案した。すなわち、窒素源がある状態では、*CyAbrB1* による抑制が優勢であり、*hetP* や *hepA* の遺伝子発現は抑制され、ヘテロシストは形成されない。一方、窒素飢餓シグナルにより HetR の量が増加すると、HetR が優勢になり、両遺伝子の発現が ON になり、ヘテロシストが形成される。窒素源非存在条件下で *cyabrB1* を強制発現すると、ヘテロシストを形成できなくなるという結果から、この仮説が支持された。

cyabrB1 の機能の一端を明らかにしたものの、*CyAbrB1* による *hetP* や *hepA* の発現抑制という機能では、*cyabrB1* が必須遺伝子であることを説明できない。今後、*CyAbrB1* のターゲット遺伝子を網羅的に同定することが、重要な課題となる。また、窒素源存在下でヘテロシストを形成できることは、多大なエネルギーを要する窒素固定反応を行うことなく目的物質の生産へとつなげられ、物質生産研究へと応用できる。

以上のように、応用研究と基礎研究を相互に補完しながら、研究を進めることができた。これにより、*Anabaena* の細胞分化、代謝分業を制御する上で基礎的な知見や基盤となる技術が整ってきた。

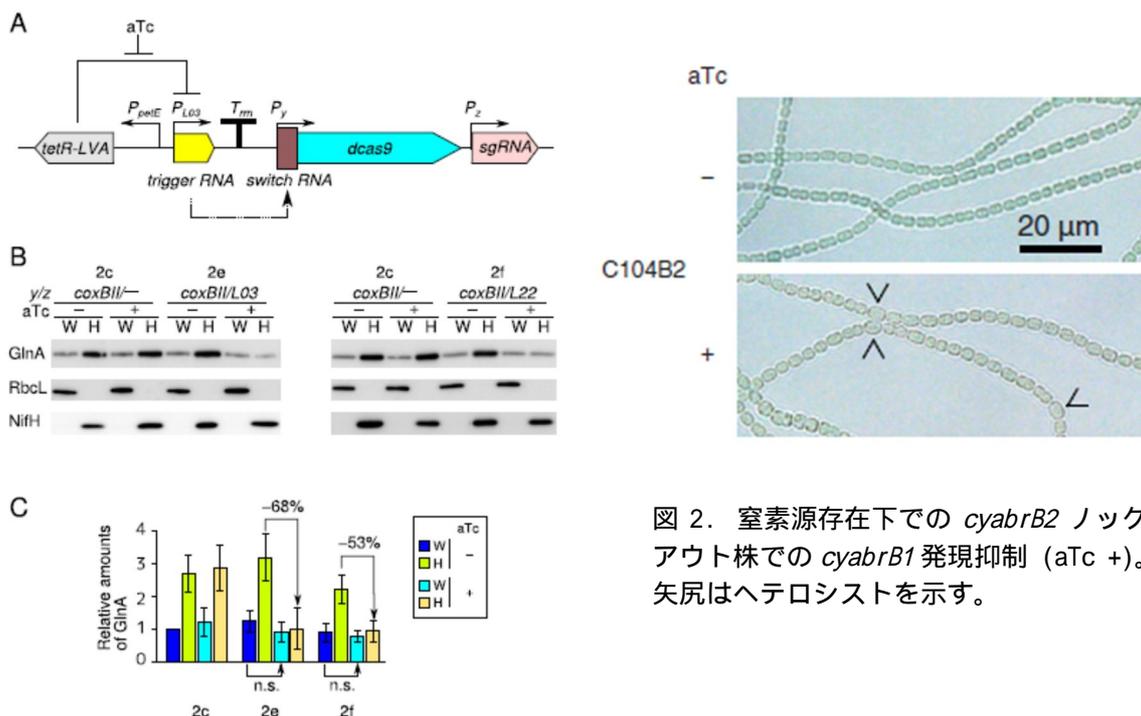


図 2. 窒素源存在下での *cyabrB2* ノックアウト株での *cyabrB1* 発現抑制 (aTc +)。矢尻はヘテロシストを示す。

図 1. ヘテロシスト特異的な GlnA の発現抑制。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Higo Akiyoshi, Nishiyama Eri, Nakamura Kota, Hihara Yukako, Ehira Shigeki	4. 巻 201
2. 論文標題 cyAbrB Transcriptional Regulators as Safety Devices To Inhibit Heterocyst Differentiation in Anabaena sp. Strain PCC 7120	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00244-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00244-19	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 -

1. 著者名 Higo Akiyoshi, Ehira Shigeki	4. 巻 103
2. 論文標題 Anaerobic butanol production driven by oxygen-evolving photosynthesis using the heterocyst-forming multicellular cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2441 ~ 2447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-09635-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higo Akiyoshi, Ehira Shigeki	4. 巻 8
2. 論文標題 Spatiotemporal Gene Repression System in the Heterocyst-Forming Multicellular Cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 641 ~ 646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.8b00496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 得平 茂樹、肥後 明佳
2. 発表標題 酸素発生型光合成で駆動する嫌気発酵プロセス
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菱田温子, 肥後明佳, 松谷峰之介, 荷村(松根)かおり, 渡辺智, 得平茂樹, 日原由香子
2. 発表標題 CRISPRi を用いたシアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 の <i>cyAbrB1</i> 転写因子の機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------