

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05768

研究課題名(和文)ラン藻における多種の単波長光照射によるレドックスバランス変動の予測と有用物質生産

研究課題名(英文) Prediction of redox balance and production of useful substances in cyanobacteria under different spectral light conditions

研究代表者

豊島 正和 (Toyoshima, Masakazu)

神戸大学・工学研究科・特命助教

研究者番号：90812230

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)：代謝シミュレーションにより様々な光環境下におけるATP・NADPH合成比と代謝を予測し、最適なATP・NADPHバランスとのギャップを利用した微細藻類での有用物質生産系構築を目的として、ラン藻において様々な波長の光照射下のATP・NADPH合成比を予測した。その結果、標的として選択した有用物質のリンゴ酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸の量を6種類の波長の光照射下で培養した野生株とリンゴ酸酵素欠損株について定量した。野生株では、予測通り他の色に比べて青色光照射下でリンゴ酸の量の増加が見られた。リンゴ酸酵素欠損株では、全ての光照射下において野生株に比べてリンゴ酸、フマル酸の量の増大が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球環境やエネルギー問題からグリーンエネルギーを有用物質に変える微細藻を有効利用しようとする研究が盛んに行われている。本研究では、代謝シミュレーションを用いて多種の単波長光照射下における微細藻類の光合成と代謝を予測し、その予測を元に標的有用物質としてリンゴ酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸を選択した。そして、多種の単波長光照射下におけるそれらの生産量を明らかにした。さらに遺伝子欠損株を用いて標的物質の増加を明らかにした。本研究は代謝シミュレーションが光波長の違いを利用した有用物質の増産に有効であり、代謝シミュレーションが異なる単波長光照射を組み合わせた有用物質生産系の構築に繋がることを示した。

研究成果の概要(英文)：To predict ATP/NADPH synthesis ratio and metabolism under different spectral light conditions by metabolic simulation, and to construct a useful substance production system in microalgae using the gap between the optimal ATP・NADPH balance, ATP/NADPH synthesis ratio under different spectral light conditions was predicted in cyanobacteria. As a result, the amounts of malate, fumarate, succinate, and citrate, the useful substances selected as targets, were quantified in wild strains and malate enzyme-deficient strains cultured under the six different spectral light conditions. The wild strain showed an increase in the amount of malic acid under blue light condition compared to other colors, as predicted. The malate enzyme-deficient strain showed significantly increased contents of malic acid and fumaric acid compared to the wild strain under all light conditions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シアノバクテリア 代謝 代謝シミュレーション 有用物質生産 光合成

1. 研究開始当初の背景

光合成生物は光合成により光エネルギーを ATP や NADPH の化学エネルギーに変換している。同時に大気中の二酸化炭素を利用して糖などの有機物を合成している。近年の地球環境やエネルギー問題からクリーンエネルギーを有用物質に変える光合成生物を有効利用しようとする研究が盛んに行われている。光合成生物を利用したエネルギー開発研究では、光合成効率や機能の強化が重要な課題になっており、光合成生物の中でも光合成効率も高く培養技術や遺伝子組み換え技術などのツールが整備されている微細藻類が注目されている。微細藻類は光化学系 I と II の励起のバランスを変えることで、光エネルギーの利用効率と過剰な光エネルギーから防御の相反する反応を調節し、様々な光環境下に適応する。この時、光合成の 2 個の電子伝達経路 (リニア電子伝達とサイクリック電子伝達) の駆動割合が変わり、ATP 合成と NADPH 合成比が変動するが、細胞内の様々な代謝や生理現象によりそのバランスを精密に保っている。光強度や照射光の波長に依って、光化学系 I と II の励起比が大きく変わり光合成による ATP 合成と NADPH 合成のバランスが変化する。この時に起こる最適なレドックスバランスとのギャップ (ATP 過剰・NADPH 過剰) を調節しようとする細胞の機能を利用することで効率よく有用物質生産を行なえる と考える。そのためには光化学系の励起状態が光合成電子伝達や代謝の流れに及ぼす影響を明らかにすることが重要である。

個々の部品の働きがシステム全体に及ぼす影響を解析するには、量論モデルを利用したシミュレーションによるアプローチが有効である。ゲノムスケール代謝モデルは、細胞内の化学反応を網羅的に組み込んだ数理モデルであり、光化学系の電子の流れも反応として記述することができる。Flux Balance Analysis (FBA) は、定常状態と細胞の目的関数を仮定し、線形計画法により代謝状態をシミュレーションする手法であり、暗反応においては現実の細胞の状態をよく説明することが調べられている。微細藻類のラン藻では、栄養条件と代謝について高精度に予測するモデルが構築され、FBA シミュレーションによる遺伝子改変箇所 の予測から実際にエタノールの生産性が向上した株が得られている。しかし、これまでのモデルでは、光合成に関する反応の記述が簡略化されているため、光の波長や強さなどの様々な光条件での光合成電子伝達や代謝の流れを予測することはできない。

本研究課題では、ラン藻の光合成に関わる反応を素反応に分解して、正確に記述することで 様々な光環境下での光合成電子伝達や代謝の流れを予測できるモデルを開発する。そのモデルを用いて様々な波長の光照射下における光合成と代謝の流れを予測し、有用物質生産に繋げる。

2. 研究の目的

新学術領域研究で申請者が構築した光合成電子伝達や代謝の流れを正確に予測する代謝モデルを用いて、微細藻類の光の波長に対する光化学系の励起状態と光合成電子伝達や代謝の流れを明らかにすることと、その結果を利用した有用物質生産系の構築を目的とする。本研究では、微細藻類としてラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を研究対象とする。この生物は全ゲノム配列が解読され、光合成システムの構造や代謝経路などが明らかになっており、遺伝子組換え方法も確立しているためモデル生物として多くの知見が得られている。

本研究では、以下の研究内容を実施する。

(1) 申請者が構築した *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノムスケール代謝モデルを用いた FBA シミュレーションにより明らかになりつつある ATP・NADPH 過剰な波長の光を利用して有用物質生産を行う。

(2) 特定の波長の光を照射することにより細胞内に ATP・NADPH 過剰な状態を作り、ATP 過剰な条件では 3 ヒドロキシプロピオン酸などの有機酸、NADPH 過剰条件ではメバロン酸や長鎖脂肪酸の生産を行う。

(3) 増殖に有効な光と物質生産に有効な光を使い分けることで、増殖期と生産期を制御する生産系の構築を行う。

3. 研究の方法

本研究では、シミュレーションを用いた多種の波長の光の物質生産への活用を目指し、異なる波長光照射下での有用物質の生産性を検証することにより、光の波長が物質生産性向上に繋がることを明らかにする。

(1) 申請者が構築した光合成反応を精緻化した *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションから様々な波長の光照射下での光と細胞のフラックス状態の関係を明らかにし、光合成による ATP と NADPH の生産を予測する。

(2) 生シミュレーション予測の結果から、最適な照射光波長と生産物質の組み合わせを選択する。次に、野生株または、合成経路導入株における予測された ATP 過剰な光条件では有機酸、NADPH 過剰な光条件ではメバロン酸や長鎖脂肪酸の生産性を検証する。

(3) FBA シミュレーションにより有用物質生産性の向上を目的とした遺伝子改変箇所を予測し、生産性向上株の作出を行い、目的物質の生産性を検証する。

4. 研究成果

(1) 申請者が構築した光合成反応を精緻化した *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノムスケール代謝モデルを用いたシミュレーションから 6 種類の波長の光 (Blue, ピーク波長 460 nm; Green, ピーク波長 530 nm; Yellow, ピーク波長 590 nm; Red1, ピーク波長 640 nm; Red2, ピーク波長 680 nm; White) 照射下における光合成による ATP と NADPH の生産を予測した (図 1、表 1)。その結果、Blue 光や Red2 光照射下において光合成による ATP 生産が過剰になることが予測された。また、これらの光照射下においてクエン酸回路の物質の流れが大きくなることが予測された (図 2)。

照射光	光合成による ATP/NADPH 合成比
Blue	140
Green	9.75
Yellow	2.28
Red1	2.49
Red2	10.50
White	3.41

表 1 FBA シミュレーションによる ATP/NADPH 合成比予測

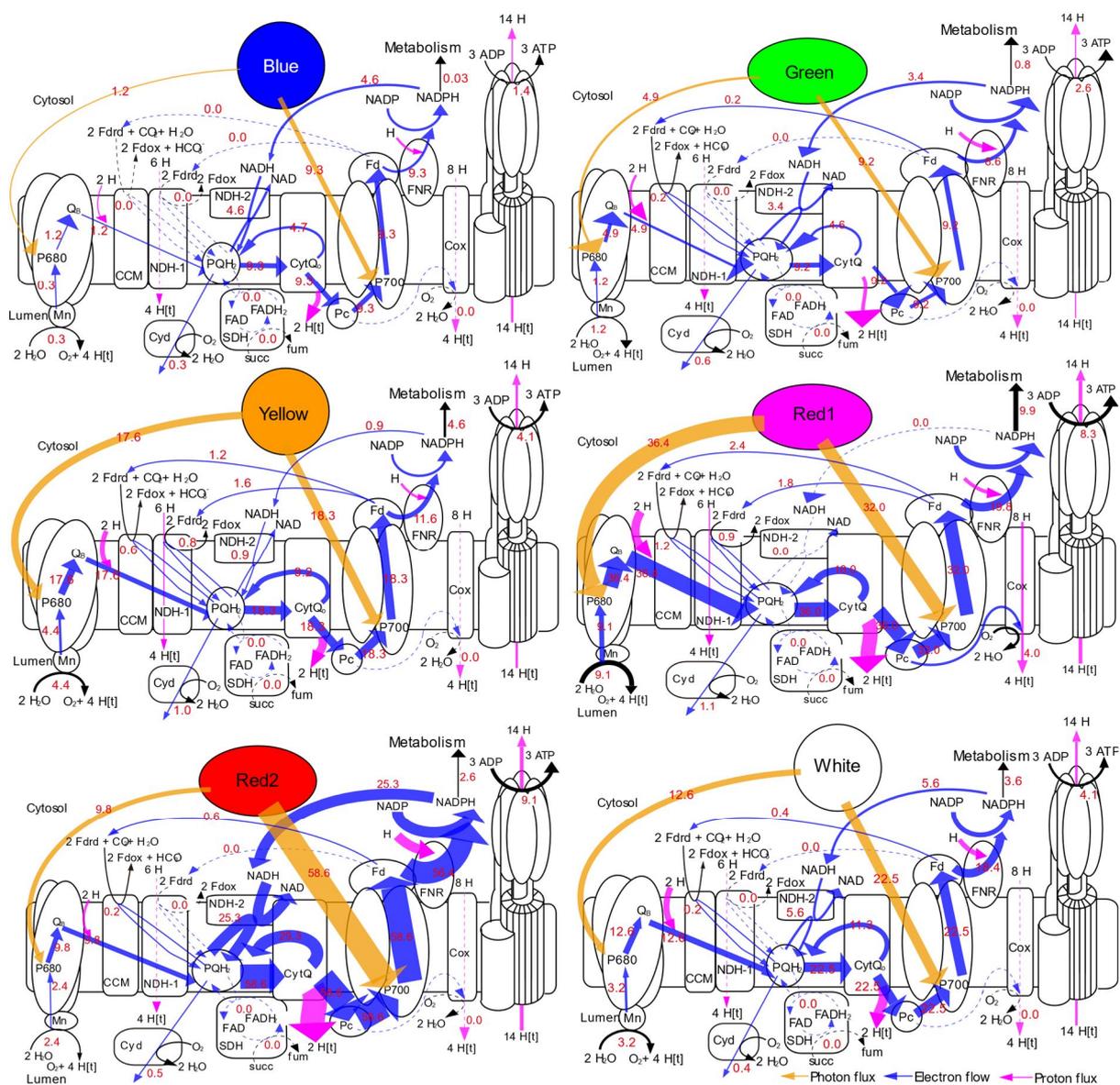


図 1 FBA シミュレーションによる光合成電子伝達のフラックス分布予測

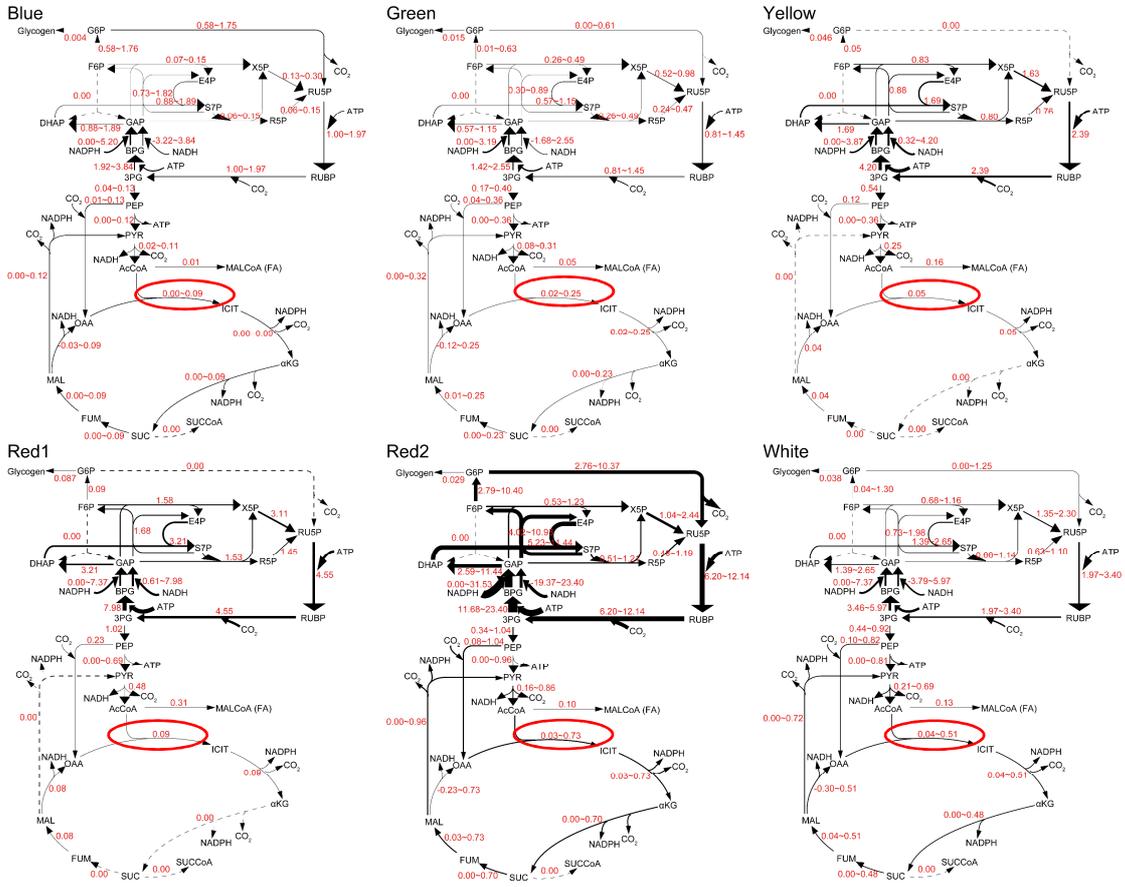


図2 FBA シミュレーションによる中央代謝のフラックス分布予測

(2) シミュレーションの結果からクエン酸回路で合成される有機酸であるリンゴ酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸が Blue 光や Red2 光照射下において増加することが考えられ、本研究の有用物質生産系の標的として、これらの有機酸を選択した。予測の検証を行うため、6 種類の波長の光照射下における *Synechocystis* sp. PCC 6803 細胞内のリンゴ酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸の量を測定した。その結果、リンゴ酸、フマル酸が Blue 光照射下において他の光照射下よりも増加していた (図3)。

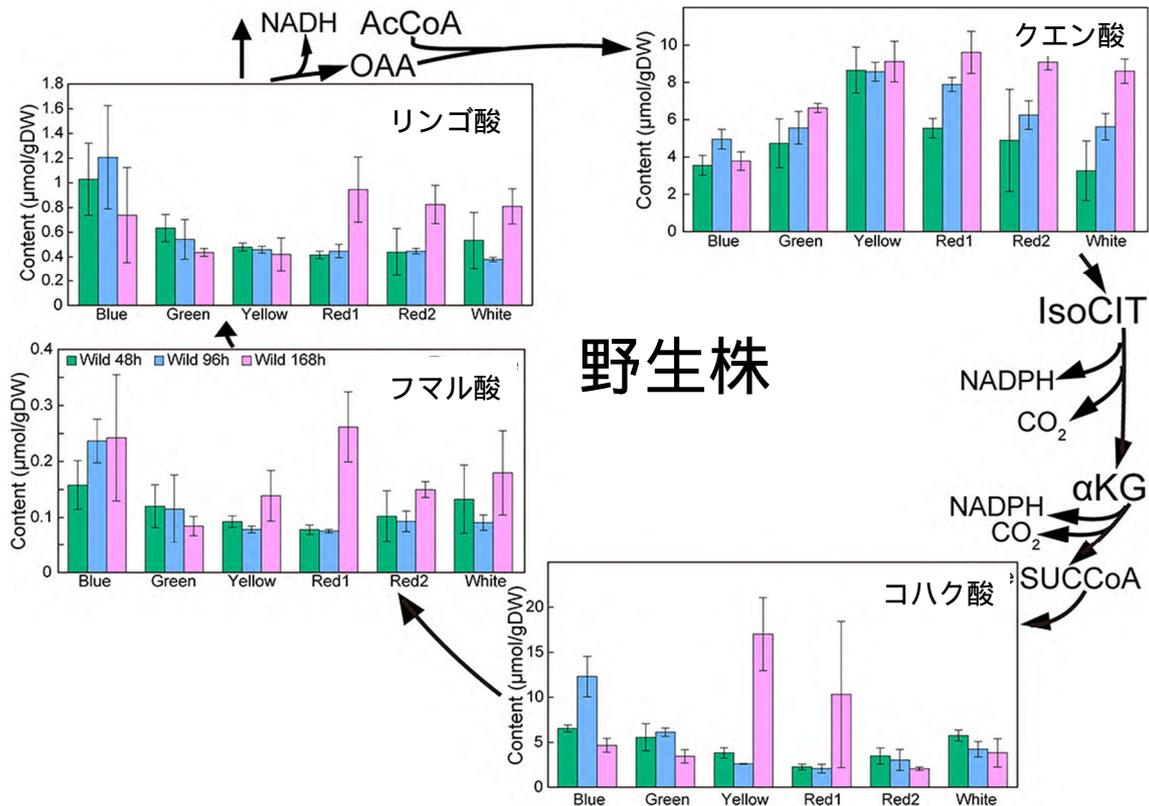


図3 6種類の波長の光照射下における *Synechocystis* sp. PCC 6808 野生株細胞内のリンゴ酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸の定量

(3)さらに、標的とした有機酸が増加すると考えられるリンゴ酸酵素の欠損を行なった株を用いて6種類の波長の光照射下におけるリンゴ酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸の量を測定した。その結果、全ての光照射下においてリンゴ酸とフマル酸の量が顕著に増加した(図4)。特にYellow光、Red1光照射下においてそれらの量が50倍以上に増大していた。この結果は、代謝シミュレーションの予測とは異なっており、Yellow光、Red1光照射下におけるリンゴ酸酵素の利用について新たな知見となった。

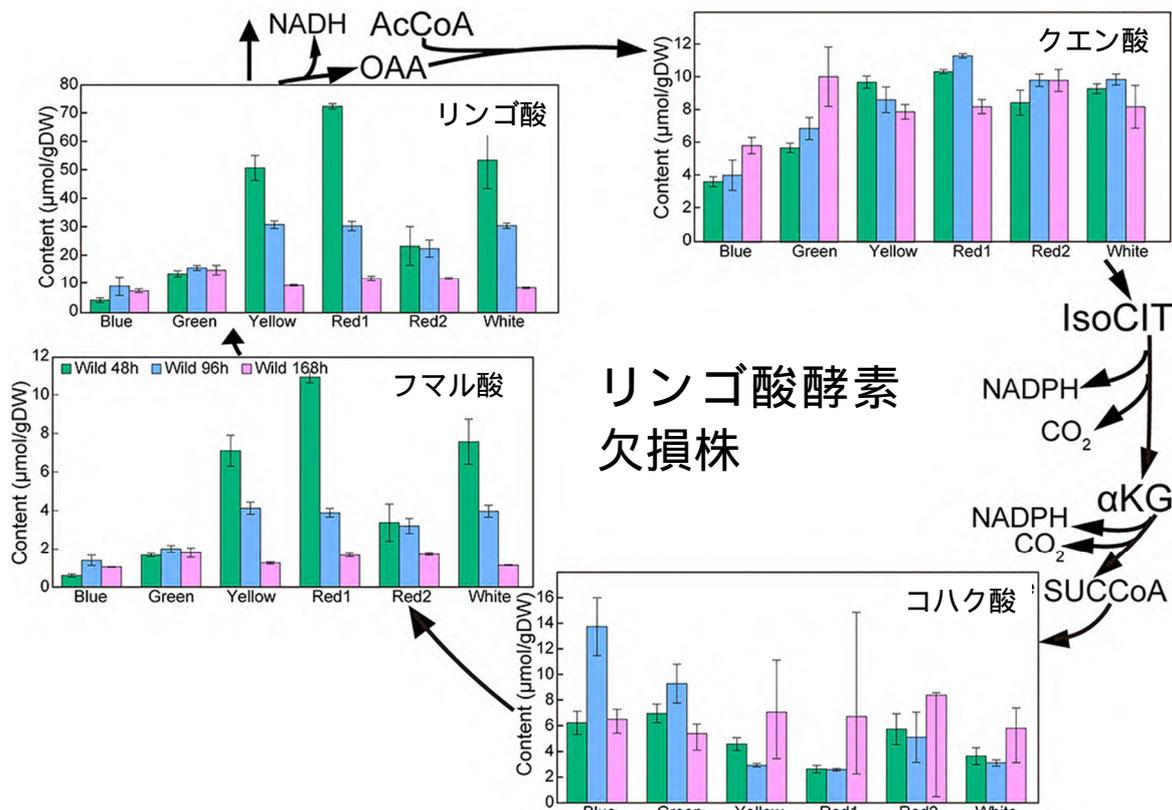


図4 6種類の波長の光照射下におけるリンゴ酸酵素欠損株細胞内のリンゴ酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸の定量

代謝シミュレーションによる予測により示されたように、Blue光照射下においてクエン酸回路で合成されるリンゴ酸とフマル酸の量が他の光照射下に比べて増加していたことから、代謝シミュレーションを利用することにより異なる波長の光を用いた有用物質の生産性向上が可能であることが示された。本研究は、これまでの光の強弱だけでなく光質が新たな物質生産系の構築に繋がることを示しており、さらに代謝シミュレーションを利用することにより、より合理的・効率的に有用物質生産系の構築ができることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 豊島正和, 戸谷吉博, 清水浩
2. 発表標題 異なる波長の光照射下におけるSynechocystis sp. PCC 6803の有機酸生産
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
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
---------	---------