

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23603005

研究課題名(和文)窒素固定型シアノバクテリアを利用したバイオマス生産の基盤研究

研究課題名(英文)Basic research for biomass production using nitrogen-fixing cyanobacteria

研究代表者

得平 茂樹(Ehira, Shigeki)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：90548132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、増殖に窒素肥料を必要としない窒素固定型シアノバクテリアを利用して、大気中の二酸化炭素からバイオ燃料や化成品の原料などの有用物質を生産するための基盤技術の開発を行った。二酸化炭素から有用物質を効率よく生産させるためには、シアノバクテリア細胞内での物質の流れ(代謝)を自在にコントロールする必要がある。本研究では、代謝系の遺伝子の発現を制御する因子を同定し、その改変により代謝系をコントロールすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To develop the process of biological conversion of CO₂ to fuel or chemicals by nitrogen-fixing cyanobacteria, we investigated the regulatory mechanisms of carbon metabolism, such as glycogen catabolism and sucrose synthesis in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. We succeeded in identifying the regulators of carbon metabolism and altering carbon flux within cells by engineering of the regulators.

研究分野：バイオマスエネルギー

科研費の分科・細目：時限付き分科細目

キーワード：シアノバクテリア バイオマス 糖代謝 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の枯渇や地球温暖化への対策として、カーボンニュートラルな再生可能資源である植物バイオマスを利用したバイオ燃料の生産が世界的に進められている。しかし、食料との競合や耕作地の限界などの課題に直面しており、新たなバイオマス資源の開発が求められている。海や池などに棲息する微細藻類は、植物よりもはるかに優れた光合成能力をもっており、植物に替わるバイオマス資源として注目されている。特に原核生物であるシアノバクテリアは呼吸活性が低く、昼夜サイクルがある環境ではミトコンドリアをもつ真核藻類よりも生産性にすぐれている。また、遺伝子操作が容易な種が多く、細胞構造も単純なため生物工学的な育種にも非常に適している。このようなシアノバクテリアの優位性をもとに、遺伝子操作により水素、エタノール、グリコーゲン、脂肪酸などを生産するシアノバクテリアの育種が世界的に進められている。

上述のように、光合成能力の高いシアノバクテリアなどの微細藻類は、バイオマス資源として優位性が高いのは事実である。しかしながら、現実には植物性バイオエタノールは実用化されているのに対し、微細藻類を材料としたバイオ燃料生産は実用化されていない。そこには、微細藻類の培養に特有のいくつかの問題が存在する。そのひとつが、微細藻類の窒素要求性の高さである。その培養には化学肥料などの窒素源を大量に投入する必要がある。したがって、培養における窒素源のコスト削減が、微細藻類をバイオマス資源として利用する上で重要な課題となっている。この問題を解決する微細藻類として期待されているのが、窒素固定型のシアノバクテリアである。窒素固定型シアノバクテリアは、大気中に豊富に含まれる窒素ガスを利用することができる唯一の微細藻類であり、その培養には窒素肥料を全く必要としない。

2. 研究の目的

本研究では、窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena* sp. strain PCC 7120 (以下、アナベナ) を用いて、バイオ燃料の原料となるグリコーゲンや脂肪酸の効率的な生産系を構築するために必要となる代謝工学のための基盤技術の開発に取り組む。これまでの代謝工学では、標的とする遺伝子の数だけ、場合によってはそれ以上、遺伝子操作を繰り返す必要があった。しかし、代謝系全体を制御する“パスウェイレギュレーター”を利用することで、1回の遺伝子操作で多くの代謝系遺伝子进行操作することができる。本研究では、アナベナの主要糖代謝経路のパスウェイレギュレーターを同定し、その改変による糖代謝の効率化を目指す。

3. 研究の方法

アナベナのパスウェイレギュレーターの

同定は、(1)発現相関解析による同定、(2)DNA アフィニティーカラムによる精製・同定、の2通りの方法で行った。

(1) 発現相関解析によるパスウェイレギュレーターの同定

バクテリアにおいては、代謝系遺伝子とそのレギュレーターはゲノム上で近傍に存在することが多い。しかしながら、シアノバクテリアはゲノム構造が複雑化しており、そのような例はほとんど知られていない。実際、主要な糖代謝経路の遺伝子の近傍には、レギュレーターが存在しない。そこで、ゲノム上での位置情報ではなく、発現情報をもとにレギュレーターの探索を行った。レギュレーターの発現は、その制御下にある遺伝子と同様の発現パターンを示すことが多い。様々な条件におけるトランスクリプトーム解析の結果をもとに発現プロファイリングを行い、標的とする遺伝子と同じ挙動を示すレギュレーターを探索した。プロファイリングにより選択された候補レギュレーターに関して遺伝子破壊株を作製し、その制御下にある代謝系遺伝子を同定した。

(2) DNA アフィニティーカラムによるパスウェイレギュレーターの精製・同定

(1)の方法でのレギュレーターの同定が難しい場合には、アフィニティーカラムによる精製を行った。標的遺伝子のプロモーター領域を含むDNAを固定化したカラムを用いて、細胞の粗抽出液からプロモーター領域と相互作用するレギュレーターを精製した。そして質量分析により、精製されたレギュレーターを同定した。

4. 研究成果

(1) 発現相関解析によるパスウェイレギュレーターの同定

アナベナは塩ストレス条件下で、スクロースを適合溶質として細胞内に蓄積する。50 mM NaCl 添加による細胞内スクロース量の変化を調べたところ、数時間以内に20倍以上にスクロース量が増加することが明らかとなった。塩ストレスによるスクロース合成量の増加に関わる代謝経路を明らかにするため、50 mM NaCl 添加後のスクロース代謝系遺伝子の発現変化を定量的RT-PCR方により調べた。その結果、*spsA*、*susA*、*susB* の3個のスクロース代謝系遺伝子の発現が、塩ストレスにより誘導されることが明らかとなった。*spsA* はスクロース-6-リン酸合成酵素を、*susA* と *susB* はどちらもスクロール合成酵素をコードする遺伝子であり、どれもスクロースの合成に関わることが考えられた。次に、これらの遺伝子の塩ストレス誘導を制御する転写因子を同定するため、DNA マイクロアレイを用いて塩ストレスにより発現誘導を受ける転写因子を同定した。その結果9個の転写因子が塩ストレスにより誘導されることが明らかとなった。さらに *spsA*、*susA* そして *susB* の発現との相関解析を行い、これらの

遺伝子の発現を制御する転写因子の候補として、OrrA を選抜した。

orrA 遺伝子破壊株を作製し、スクロース合成系遺伝子の発現への影響を調べた。その結果、*orrA* 遺伝子破壊株では、*spsA*, *susA*, *susB* 全ての塩ストレスによる誘導が見られなくなっていた。さらに、塩ストレス条件下でのスクロースの蓄積量を調べると、*orrA* 破壊株ではそのレベルが野生株の半分以下に低下していた。したがって、OrrA はスクロース合成系の遺伝子発現を制御することで、スクロース合成を制御するレギュレーターであることが明らかとなった。さらに、スクロース合成における OrrA の役割を調べるため、*orrA* 遺伝子の過剰発現株を作製した。*orrA* 過剰発現株では、通常培養条件下でもスクロース合成系遺伝子の発現量が増加し、さらにスクロース含量も約 2 倍に増加していた(図)。以上の結果から、OrrA はスクロース合成経路のパスウェイレギュレーターとして働くことが示された。

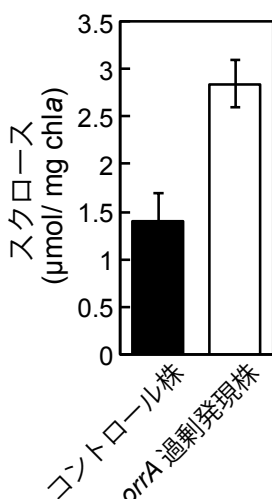


図 *orrA* の過剰発現によるスクロース含量の増加

orrA の発現を強制的に増加させた株では、細胞内のスクロース量がコントロール株の約 2 倍に増加した。

(2) DNA アフィニティーカラムによるパスウェイレギュレーターの精製・同定

これまでの研究において、*Anabaena* のグリコーゲン異化やスクロース合成の制御機構を明らかにしてきた。しかし、重要な代謝経路の一つであるペントースリン酸経路の制御機構に関しては、全く知見がなかった。そこで、ペントースリン酸経路を構成する遺伝子の発現制御機構の解明に取り組んだ。

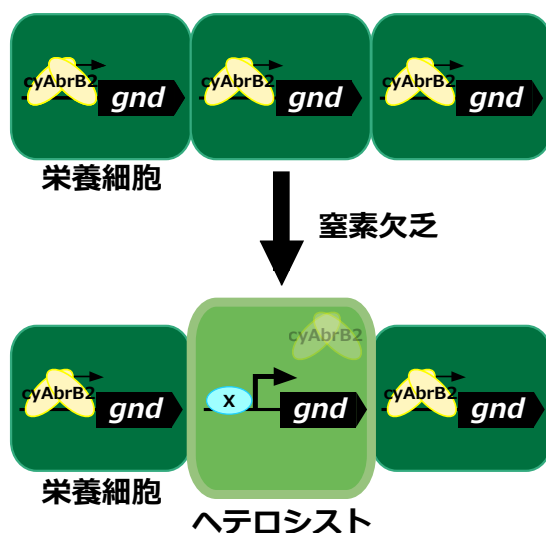
ペントースリン酸経路を構成する遺伝子の発現を調べたところ、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素をコードする *gnd* 遺伝子が窒素欠乏条件下で顕著な発現誘導を示した。*gnd* プロモーター領域を用いたアフィニティー精製により、*Anabaena* の粗タンパク質から cyAbrB2 タンパク質が得られた。組換え cyAbrB2 を用いたゲルモビリティシフト解析により、cyAbrB2 が *gnd* プロモーターに特異的に結合することが示された。以上の結果か

ら、cyAbrB2 が *gnd* 遺伝子の発現を制御する転写因子である可能性が示唆された。

gnd 遺伝子の発現制御における cyAbrB2 の役割を明らかにするため、*Anabaena* を用いて *cyabrB2* 遺伝子破壊株と過剰発現株を作製した。遺伝子破壊株においては、窒素源存在下での *gnd* 発現レベルが増加していた。しかし、窒素欠乏による発現誘導は、遺伝子破壊株でも観察された。一方、過剰発現株では窒素欠乏条件下での *gnd* 発現レベルが低下していた。これらの結果から、cyAbrB2 が *gnd* の発現を抑制する転写因子であることが明らかとなった。また、窒素欠乏による *gnd* の誘導には、他の因子も関与していると考えられる。

cyAbrB2 による *gnd* の発現制御機構をさらに理解するため、GFP をレポーターとして *gnd* と *cyabrB2* の発現局在を調べた。その結果、*gnd* の発現は、窒素欠乏条件下で形成されるヘテロシストにおいてのみ誘導されることが明らかとなった。一方、*cyabrB2* の発現はヘテロシストにおいて低下することが示された。

以上の結果から cyAbrB2 による *gnd* 遺伝子の発現制御機構を考察する。栄養細胞においては、*gnd* の発現は cyAbrB2 により窒素条件によらず抑制されている。一方、ヘテロシストでは、cyAbrB2 の発現量が低下することで *gnd* の発現抑制が解除されると共に、*gnd* の転写を誘導する別の因子が働くことで *gnd* の発現が誘導される。今後は、*gnd* 以外のペントースリン酸経路の遺伝子発現に AbrB2 が関与するのか明らかにし、さらに *gnd* の発現誘導に関わる因子の同定を進める必要がある。



Anabaena sp. PCC 7120 における *gnd* 遺伝子の発現制御機構のモデル図

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 11 件)

- ① Ehira, S., Ohmori, M. (2014) NrrA directly regulates expression of the *fraF* gene and antisense RNAs for *fraE* in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* 160:844-850. 査読有
- ② Watanabe, M., Semchonok, D.A., Webber-Birungi, M.T., Ehira, S., Kondo, K., Narikawa, R., Ohmori, M., Boekema, E.J., Ikeuchi, M. (2014) Attachment of phycobilisomes in an antenna-photosystem I supercomplex of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:2512-2517. 査読有
- ③ Ehira, S. (2013) Transcriptional regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Russ. J. Plant Physiol.* 60:443-452. 査読有
- ④ Kushige, H., Kugenuma, H., Matsuoka, M., Ehira, S., Ohmori, M., Iwasaki, H. (2013) Genome-wide and heterocyst-specific circadian gene expression in the filamentous cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Bacteriol.* 195:1276-1284. 査読有
- ⑤ Ehira, S., Ohmori, M. (2012) The redox-sensing transcriptional regulator RexT controls expression of thioredoxin A2 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 287:40433-40440. 査読有
- ⑥ Ehira, S., Ohmori, M. (2012) The *pknH* gene restrictively expressed in heterocysts is required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* 158:1437-1443. 査読有
- ⑦ Tanaka, Y., Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H. (2012) Coordinated regulation of *gnd* encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase by two transcriptional regulators GntR1 and RamA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 194:6527-6536. 査読有
- ⑧ Ehira, S., Ohmori, M. (2011) NrrA, a nitrogen-regulated response regulator protein, controls glycogen catabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 286:38109-38114.

〔学会発表〕 (計 25 件)

- ① 得平茂樹, 木村聡, 大森正之「Regulation of sucrose synthesis in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120」第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月
- ② 得平茂樹, 西山英里, 藤木耕平「The orphan response regulator NrrA controls glycogen catabolism in cyanobacteria」第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 東京, 2014 年 3 月

- ③ Ehira, S. 'Regulation of sugar metabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120' 18th International Congress on Nitrogen Fixation, Miyazaki, Japan, October 2013
- ④ 得平茂樹, 藤木耕平, 西山英里「シアノバクテリアにおいて糖代謝を制御するレスポンスレギュレーター-NrrA の活性制御」第 4 回日本光合成学会年会, 名古屋, 2013 年 5 月
- ⑤ 得平茂樹「シアノバクテリアにおけるレドックスによるチオレドキシシン発現制御」第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月
- ⑥ 得平茂樹, 木村聡, 大森正之「糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 における塩ストレス応答の制御機構」第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 滋賀, 2013 年 3 月
- ⑦ Ehira, S. 'Regulation of glycogen catabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120' Physiology and Biotechnology of Microalgae, Moscow, Russia, October 2012
- ⑧ 得平茂樹, 大森正之「糸状性シアノバクテリアを用いた細胞間分業による効率的バイオ燃料生産」第 64 回日本生物工学会大会, 神戸, 2012 年 10 月
- ⑨ 得平茂樹, 大森正之「Regulation of compatible solute synthesis in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120」第 28 回日本微生物生態学会大会, 愛知, 2012 年 9 月
- ⑩ Ehira, S., and Ohmori, M. 'Regulation of glycogen metabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120' 14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Porto, Portugal, August 2012
- ⑪ 得平茂樹, 大森正之「シアノバクテリアにおいてチオレドキシシンの転写を制御するレドックス応答性転写因子 RexT」第 3 回日本光合成学会年会, 横浜, 2012 年 6 月
- ⑫ 得平茂樹, 大森正之「窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 における炭素・窒素代謝制御」第 53 回日本植物生理学会年会, 京都, 2012 年 3 月
- ⑬ 得平茂樹, 大森正之「シアノバクテリアにおける細胞分化に伴う糖代謝系変換制御」第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 東京, 2012 年 3 月
- ⑭ Ehira, S. 'Regulation of glycogen metabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120' The 6th German-Japanese Binational Seminar, Freiburg-Munzingen, Germany, October-November 2011
- ⑮ 得平茂樹, 大森正之「窒素固定型シアノバクテリアにおける炭素・窒素代謝制御」

第 27 回日本微生物生態学会大会，京都，
2011 年 10 月

- ⑩ Ehira, S., and Ohmori, M. 'Regulation of carbon and nitrogen metabolism in cyanobacteria' International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011
- ⑪ 得平茂樹，大森正之「窒素固定型シアノバクテリアにおける糖代謝制御」第 2 回日本光合成学会年会，京都，2011 年 6 月

〔図書〕（計 2 件）

- ① Ohmori, M., Ehira, S. (2014) *Spirulina: an example of cyanobacteria as nutraceuticals*. p. 103-118. In Sharma, N.K., Stal, L.J., Rai, A.K. (ed) *Cyanobacteria: An Economic Perspective*. John Wiley & Sons, Ltd.
- ② 得平茂樹，大森正之 (2012)「第 2 章 藍藻（シアノバクテリア）のゲノム解析と生理機能」竹山春子監修『微細藻類によるエネルギー生産と事業展望』シーエムシー出版

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=molgen>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

得平 茂樹 (EHIRA, Shigeki)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：90548132