

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658279

研究課題名(和文) 光合成における糖排出細胞の構築

研究課題名(英文) Construction of cells which excrete sugars during photosynthesis

研究代表者

都筑 幹夫(Tsuzuki, Mikio)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：70155430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円、(間接経費) 480,000円

研究成果の概要(和文)：大気中二酸化炭素濃度の上昇の問題やエネルギー需要拡大の問題に対処するため、光合成を行う生物の光合成効率を高めることが重要である。光合成の最終産物である貯蔵多糖等まで代謝させることは、受容エネルギーのロスとなっていることから、代謝中間体で細胞から排出させることを目指し、シアノバクテリアにリン酸トランスロケーターの導入を試みた。相同組換えに成功し、組換え体の性質を解析し続けている。

研究成果の概要(英文)：It is important to enhance photosynthetic efficiency in photosynthetic microorganisms for maintaining atmospheric carbon dioxide concentration and harvesting solar energy to human activities. We have tried to introduce phosphate translocator into cyanobacterial cells in order to reduce the metabolism to the final products such as glycogen. Now we are investigating the characteristics of the transformants.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：シアノバクテリア

## 1. 研究開始当初の背景

既存バイオマスの利用技術開発が進められているが、食糧等に影響しない新しいバイオマス生産系の構築は重要な課題である。その点、単細胞性のシアノバクテリアは、光合成生物としては増殖が速く、遺伝子操作が可能で、光合成研究が盛んに行われている。とはいえ、増殖の倍加時間は8時間程度で、大腸菌などに比べるとかなり遅い。これまで行われてきた光合成関連の応用研究は、光合成酵素を量的に増強したものや強光耐性を付与したものなどが多かった。申請者ら秋田県立大との共同研究で、*Synechococcus* PCC7942株でグリコーゲン合成酵素遺伝子を破壊すると、光合成活性が大きく低下することを示した(Suzuki *et al.*, 2010)。光合成中間産物の過剰蓄積が速度低下の原因と思われる。

葉緑体包膜に存在するリン酸トランスロケーターは、細胞質のリン酸と光合成炭素代謝の中間産物であるトリオースリン酸とリン酸とが交換する形で、葉緑体内外の物質輸送を行う。独国 Heldt らの研究で見出されて以来、分子レベルで明らかになっている。そこで、単細胞性シアノバクテリアの細胞膜にトリオースリン酸トランスロケーターを導入することにより、光合成炭素代謝中間体であるトリオースリン酸を細胞外に排出させ、ホスファターゼ処理によりトリオース(三炭糖)とする系を構築すれば、中間産物の排出が可能になるのではないかと考えた。

この計画と並行して遺伝子削除を進め、ゲノム縮小化の足掛かりを得たい。すでに、大腸菌や枯草菌で行われているが、光合成生物では申請者らの知る限り行われていなかった。

## 2. 研究の目的

単細胞性シアノバクテリアの細胞膜に高等植物葉緑体のトランスロケーターを発現させ、光合成炭素代謝中間体を細胞外に排出させる細胞の作製を目指す。この変異株を用いて、光合成により二酸化炭素を固定し、三炭糖(トリオース)を産生する系を構築する。また、削除しても生育できると予想される遺伝子を検討し、複数遺伝子削除の手法を構築し、その繰り返しでゲノムサ

イズを小さくした細胞の作製をめざす。

## 3. 研究の方法

申請者らがこれまで行ってきた *Synechocystis* sp. PCC6803 の遺伝子改変技術(Tabei *et al.* FEBS J. 276, 187. 2009)を用いて、高等植物(現在はホウレンソウを考えている)の葉緑体内膜に存在するトリオースリン酸トランスロケーター遺伝子を導入する。

また、解糖系酵素遺伝子の発現調節因子など、光合成とは独立の発現調節系を持つ遺伝子に関して、その発現ネットワークの知見をより明確にし、削除しても通常条件下で生育可能かどうかを検討する。

## 4. 研究成果

(1)シアノバクテリアへの外来のリン酸トランスロケーター遺伝子導入

アラビドプシス葉緑体胞膜に存在するリン酸トランスロケーターの遺伝子を、アラビドプシス cDNA ライブラリーを鋳型にしたネステッド PCR により得た。この外来遺伝子をシアノバクテリアで発現させるため、遺伝子導入用のプラスミドの構築を行った。シアノバクテリアへは相同組み換えにより、遺伝子導入を行うことを計画した。ゲノム上で外来遺伝子が挿入されても影響のない位置を選び、相同組み換えにより外来配列を挿入する事を試みた。そのために挿入位置の上流約0.5Kbp と、下流の約0.5Kbp の配列をクローニングし、2つの相同配列間に、リン酸トランスロケーター遺伝子発現用 DNA 配列を挟む構成で構築した。

リン酸トランスロケーター遺伝子の発現のためのDNA配列は、PCC6803のチトクロームCの上流配列の下流にリン酸トランスロケーターのORFを結合させた。PCC6803のチトクロームCは銅イオンの存在下では転写が抑制され、銅イオンが存在しない場合には転写が誘導される。そのため、チトクロームCの上流配列を用い、その下流に発現を誘導させたい遺伝子のORFをつなぐことにより、銅の有無による遺伝子発現の誘導・抑制が可能である。

まず、PCC6803のチトクロームCの上流配列をPCR法を用いて増幅し、pGEM-T easy vector にクローニン

グした。アラビドプシスのリン酸トランスロケーターをコードするORF部分を増幅し、pGEM-T easy vector にクローニングした。

制限酵素によりチトクロームCの上流配列の上流側を切断し、クロラムフェニコール耐性遺伝子配列の断片をマーカーとして挿入した。作製されたクロラムフェニコール耐性遺伝子配列の断片とチトクロームCの上流配列が結合した配列を、クローニングされたリン酸トランスロケーターのORF部分の上流に挿入し、3つの断片(クロラムフェニコール耐性遺伝子配列::チトクロームCの上流配列::リン酸トランスロケーターのORF)が繋がったものを得た。これをさらに、相同組み換えのための約0.5Kbpの2つの配列の中に結合させ、シアノバクテリア形質転換用のプラスミドを構築した。

(2)大腸菌でのリン酸トランスロケータータンパク質の大量発現

アラビドプシス・リン酸トランスロケーターのタンパク質をヒスチジンタグとの融合タンパク質とし、pet15b ベクターを用いて大腸菌で大量に発現させた。IPTG 処理により蛋白質発現を誘導したところ、アミノ酸配列から予想される分子量のタンパク質が誘導された。しかし、N末端側についているヒスチジンタグを用いたタンパク質の精製は、さらに条件検討が必要であることが判明した。

(3)シアノバクテリアへのリン酸トランスロケーター遺伝子の導入

作製したシアノバクテリア形質転換用のプラスミドを用い、*Synechocystis* sp. PCC6803 を形質転換した。薬剤耐性を指標に、遺伝子導入された変異株を選抜した。遺伝子導入株では、PCC6803のチトクロームCの上流配列により調節されるように構成し導入したリン酸トランスロケーター遺伝子は、銅イオンの添加により転写が抑制され、銅イオンの非存在下で転写が誘導される。

遺伝子導入株でリン酸トランスロケーター遺伝子を発現すると、光合成中間産物が細胞外に排出されることで、生育が低下する可能性が考えられた。そこで、培養液中の銅イオンの有無と、生育速度の関係を野生株と遺伝子導入株で比較した。培養液中に銅イオンを

加えた場合には、リン酸トランスロケーター遺伝子の発現は遺伝子導入株でも抑制されていると予想されるが、野生株と同様の生育速度を示した。一方、培養から銅イオンを抜いた場合、遺伝子導入株でリン酸トランスロケーター遺伝子が発現していると予想される。この条件で、野生株も遺伝子導入株も生育速度が低下したが、その程度は同様であったことから、株細胞内でのリン酸トランスロケーター遺伝子の発現の影響は大きくないと推定された。遺伝子導入株で発現させたリン酸トランスロケーターが生体内で機能していない可能性、細胞外のリン酸濃度を高くしないとトリオースの輸送が十分行われない可能性、中間産物の排出が生育に影響しない可能性などが考えられ、機能の確認が必要である。

なお、本研究と関連する形で、藻類におけるリン酸の影響を検討してきているが、ヒ素の細胞内挙動がリン酸の影響を受けることから、文献①を本報告の発表文献として掲げる。

(4)遺伝子削除を目的とした、独立栄養及び従属栄養関連遺伝子の調節遺伝子の区分け

解糖系遺伝子 *fbxA* がグルコースとシグナル光のみで遺伝子発現調節が行われることが明らかになっていたが、本手法を用いることにより、複数の2成分制御系が関与すること(発表文献③)が明らかになり、その他の解糖系及びペントースリン酸回路の遺伝子の発現調節にも同様のシグナル系(カスケード)が存在することが明らかになった。また、本遺伝子修飾技術の結果として関連することから、発表文献②も本報告に掲げる。

## 5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計3件)

- ①Tabei, Y., Okada, K., Horii, E., Mitsui, M., Nagashima, Y., Sakai, T., Yoshida, T., Kamiya, A., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Two regulatory networks mediated by light and glucose involved in glycolytic gene expression in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.*, 査読有、vol. 53, 2012, pp.1720-

1727. DOI: 10.1093/pcp/pcs115
- ②Aoki, M., M. Tsuzuki, N. Sato, Involvement of sulfoquinovosyldiacylglycerol in DNA synthesis in *Synechosysteis* sp. PCC 6803, BMC Research Note, 査読有、Vol.5、2012、pp.98. DOI: 10.1186/1756-0500-5-98
- ③Miyashita, S., S. Fujiwara, M. Tsuzuki, T. Kaise, Rapid biotransformation of arsenate into oxo-arsenosugars by a freshwater unicellular green alga *Chlamydomonas reihardtii*, Biosci. Biotech. Biochem., 査読有、Vol.75、2011、pp.522-530. DOI: 10.1271/bbb,100751

[学会発表] (計11件)

- ①都筑幹夫、藻類大量培養技術の新しい展開ー固相表面連続培養系についてー、第5回『藻類バイオ燃料生産技術研究会』、2014年3月10日、名古屋大
- ②西弘貴、辻下真貴、佐藤典裕、藤原祥子、都筑幹夫、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803のヒ素耐性に及ぼすポリリン酸代謝の影響、ユーグレナ研究会第29回研究集会、2013年11月9日、筑波大学
- ③都筑幹夫、生物学側から見る微細藻類の特徴と産業利用の可能性～生命科学からの特徴、社会の期待にどう応えるか～、平成25年度第2階バイオ産業研究会講演会、2013年11月6日、大阪市工業試験所
- ④西弘貴、佐藤典裕、藤原祥子、都筑幹夫、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803のポリリン酸キナーゼ遺伝子破壊株 ( $\Delta ppk1$ ) の解析、第15回マリンバイオテクノロジー学会、2013年6月1～2日、沖縄県那覇市
- ⑤都筑幹夫、微細藻類の基礎知識 ～種類・培養・光合成特性・応用展開について～、微細藻類セミナー ～藻類の基礎知識～バイオ燃料開発、大量培養技術、実用化へ向けた将来展望まで～、2013年5月22日、東京・大井町
- ⑥岡田克彦、長島祥晃、堀井瑛介、都筑幹夫、*Synechocystis* sp. PCC6803の光合成-解糖系酵素遺伝子の発現調節に関わる複数の調節系、第54回日本植物生理学会年会、2013年3月23日、岡山大学
- ⑦青木元秀、都筑幹夫、佐藤典裕、SQDGは *Synechocystis* sp. PCC6803のDNA複製に関与する、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月17日、京都
- ⑧岡田克彦、堀井瑛介、田部井陽介、吉田拓也、神谷明男、藤原祥子、都筑幹夫、*Synechocystis* sp. PCC6803におけるに系統の発現誘導光シグナル、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月17日、京都
- ⑨長島祥晃、岡田克彦、都筑幹夫、*Shynochocystis* sp. PCC 6803の従属栄養条件下における *sll1334*の役割、日本植物学会第75回大会、2011年9月18日、東京
- ⑩小林里美、都筑幹夫、佐藤典裕、亜硫酸がシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942の光合成に及ぼす影響、日本植物学会第75回大会、2011年9月18日、東京
- ⑪都筑幹夫、藤原祥子、光合成を行う微生物の利用とその生理学、第1回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム、2011年7月9日、東京医大

6. 研究組織

(1)研究代表者

都筑 幹夫 (TSUZUKI, Mikio)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：70155430

(2)研究分担者

岡田 克彦 (OKADA, Katsuhiko)  
東京薬科大学・生命科学部・助教  
研究者番号：40301551

