

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24658090

研究課題名(和文)ラン藻の細胞外多糖形成の機構解析

研究課題名(英文) Mechanism analysis of the extracellular polysaccharide formation form cyanobacteria

研究代表者

魚住 信之 (Uozumi, Nobuyuki)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40223515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラン藻は酸素を用いて光合成を行う微生物である。高塩性の環境ではバイオフィルムを形成した。ポリアミン合成酵素がバイオフィルム形成に関与していた。また、ヒスチジンセンサーキナーゼもバイオフィルム形成に関与することがわかった。カリウム取込み系も関与しておりカリウム輸送体の発現は概日性を示した。日周期、光合成産物の糖生産と浸透圧の変化への適応機構がバイオフィルム形成と関わっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacteria are prokaryotic microorganisms that perform oxygenic photosynthesis and are adapted to a regular cycle of light and dark periods. We found that high salt stress led to the biofilm formation of the bacteria from planktonic cells. The morphological change reflects to the adaptation to the environmental changes. To better understand the molecular mechanism, we have examined the production of polyamine, which is related with cell growth, and signal transduction pathway. The polyamine synthetic enzymes were found to be involved in the biofilm formation. Some of histidine kinases also participate in the pathway to regulate the formation of biofilm. One of the histidine kinases in K uptake transport system acted as a component in response with salt stress. The expressions were regulated by biological clock, which that help to contribute to the survival of the cells living in a stressful, light-dark cycle environment.

研究分野：生物化学

キーワード：バイオフィルム 光合成 多糖 ポリアミン ラン藻 輸送体 浸透圧 環境ストレス

1. 研究開始当初の背景

光合成細菌のラン藻 *Synechocystis* PCC6803 の水チャネル遺伝子変異株は、野生株と比較して約5倍のグリコーゲンを細胞内に蓄積する。これは浸透圧調節にかかわる輸送体の変異が多糖形成を誘導する知見である。この概念に基づいて、糖の細胞外生産の可能性を調べたところ、塩ストレスによって糖の分泌が誘導されることが分かった。この多糖は細胞壁とは異なる物質であり、 -1.4 結合を50%以上含んだ糖重合体であった。このラン藻の多糖は、病原菌でみられるバイオフィームと考えられるが、光合成生物(独立栄養生物)に特徴的な光エネルギーの余剰生産物と考えることができる。このことから、病原菌などのように培地中の養分の変換とは異なる要因で形成される分泌多糖と考えられる。

2. 研究の目的

多糖形成およびバイオフィームに形成に関与する分子の同定とその機構を解析する。ラン藻の細胞外への糖合成またはバイオフィーム形成は、菌密度の増加と光合成エネルギーの余剰処理(適応反応)および環境適応反応と考えられることから、生体膜で刺激を感知する分子と細胞増殖に関与する因子に着目して検討をはかった。

3. 研究の方法

Synechocystis PCC6803 の2種類の Kdp 系と Ktr 系の K 輸送体本体の遺伝子発現に関して、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして観察した。

アルギニン脱炭酸酵素 ADC1 と ADC2 を大腸菌において His タグ融合タンパク質として発現してカラムによる精製を行った。

Synechocystis PCC6803 の47個のヒスチジンキナーゼ破壊株ライブラリー株の塩ストレスによるバイオフィーム形成能をクリスタルバイオレット法によって検討した。マイクロタイタープレートでバイオフィーム形成度合いを評価して、一次スクリーニングとして結果を得た。マイクロタイタープレートにおいては、プレートの乾燥を防ぐ必要があったことから、培養に用いる容器のシール法や96穴の中における培養液の配置などに関して、最適化を行った。

4. 研究成果

多糖の合成に関与するポリアミン合成系の探索 多糖合成酵素の発現制御に関与すると考えられている2つの異なるアルギニン脱炭酸酵素によるポリアミン生成が関与している可能性を検討した。*Synechocystis* PCC 6803 の有する2つのアルギニン脱炭酸酵素 ADC1, ADC2 によるポリアミン生成が関与している可能性が示唆された。*Synechocystis* PCC 6803 のアルギニン脱炭酸酵素 ADC1 と ADC2 を大腸菌において His タグ

融合タンパク質として発現させた後、精製を行った。両タンパク質ともに、ほぼ生成することができた。両タンパク質の酵素反応活性をすすめたところ、ADC2 が ADC1 よりもより高い活性を示した。また、pH 依存性に関しても検討し、ADC1 と ADC2 では1ユニットの差異が検出され、ADC1 は pH7 付近、ADC2 は pH8 付近が最適であった。このことは、ADC2 が細胞内では主要な酵素活性を示すこととなり、ADC1 の意義については未知であるものの、酸性化における適応に関与している可能性が予測された。

ポリアミン合成系の酵素であるアルギニン脱炭酸酵素の2つの酵素の変異株の多糖形成を共焦点レーザー顕微鏡による観察と菌形成時におけるガラス板への吸着観察を SEM 画像写真で検討した。adc1 変異株よりも、adc2 変異株の方がバイオフィーム形成量は大きく、Adc1 よりも Adc2 が大きな活性を示すことから、アルギニン脱炭酸酵素によって生産されるポリアミンの含量が高いことで、バイオフィームの形成が抑制されると予想できる。一方、大腸菌から精製した Adc1 と Adc2 のタンパク質の見かけの分子量が計算値と差があることから、タンパク質の一部が分解されている可能性が考えられた。そこで、タンパク質を酵素分解して生産されたペプチドを分析した。この結果、タンパク質の分解がなく、全タンパク質として生成されており、見かけの分子量の違いは、電気泳動の差異による移動に過ぎないことが予測された。

光合成による糖生産に関わる輸送体の発現

二酸化炭素を光合成によって等へ変換する機能を利用して独立栄養成長をとげるラン藻の代謝と生合成反応は日周期に依存する。炭素の固定と炭素化合物の変換により、細胞内の浸透圧の変化が生じることから、それに関与する塩ストレスの反応に関与する輸送体の発現も調整されると考えられた。高浸透圧への適応に関して、Ktr 系と Kdp 系は分担しているが、その関与に関しては後者の方が小さいことがわかった。これにより、高浸透圧や塩ストレスへの適応には、Kdp 系が補助的な役割をしており、塩ストレスによって誘導されるバイオフィーム形成に関与があることがわかった。

Synechocystis PCC6803 の2種類の Kdp 系と Ktr 系の K 輸送体本体の遺伝子発現を検討した。両輸送体の kdpA と ktrB の遺伝子発現の転写量のピークが日出付近になった。*Synechocystis* PCC6803 の水チャネルや機械受容性チャネルなどの発現は宵の口にピークを迎えることと比較して、Kdp 系と Ktr 系は日中の光合成と深い関係があることが予測された。光合成生産物の蓄積が浸透圧を上昇させることから、生物時計によって発現が制御されるという関連性された。

バイオフィーム生産を制御する二成分系の検討

塩ストレスによってバイオフィーム形成が誘導されることから、二成分系の関与が強く示唆された。*Synechocystis* PCC6803 のヒスチジンキナーゼ遺伝子の破壊株ライブラリーの中から、塩ストレスによるバイオフィーム形成能の測定を行った。野生株と同様に塩ストレスでバイオフィーム形成される変異株は対象から除外して、それとは逆または変化しない変異株を取得した。これらの変異株の中には Hik12, Hik14, Hik17 などがあり、これらの遺伝子の前後に存在するレスポンスレギュレーターに関して存在を確認した。これらのレスポンスレギュレーターが上記のヒスチジンキナーゼと相互作用する可能性を Bacterial two hybrid 法によって検討した。相互作用の可能性が示されてレスポンスレギュレーターには c-di-GMP の合成を触媒すると予想される部位が存在した。以上の頃から、二成分制御系の中に、高塩ストレスで誘導されるバイオフィーム形成に関与するものが存在することが明らかとなった。

細胞外の多糖は浸透圧に関して影響を受けることがわかった。糖生産を制御する浸透圧を制御する K 輸送体に関して調べた。これまでに明らかになっている Ktr 系以外に Kdp 系が存在するがその情報は限られていたため、*Synechocystis* PCC6803 の Kdp オペロンとその制御因子と考えられるヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターの遺伝子を大腸菌にクローン化した。この遺伝子配置は大腸菌とは異なる構成である。この結果、大腸菌で Ktr 系よりも小さい輸送活性を示すことが明らかとなった。また、この二成分系の破壊株を用いて発現解析を行ったところ、これらは発現制御系と機能していることがわかった。

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 6 件)

Checchetto, V., Segalla, A., Sato, Y., Bergantino, E., Szabo, I., and Uozumi, N. Involvement of potassium transport systems in the response of *Synechocystis* PCC 6803 cyanobacteria to external pH change, high-intensity light stress and heavy metal stress. *Plant Cell Physiol.* 57, 862-877 (2016) doi:10.1016/j.molp.2015.12.004 査読有

Carraretto, L., Teardo, E., Checchetto, V., Finazzi, G., Uozumi, N., and Szabo, I. Ion channels in plant bioenergetic organelles chloroplast and mitochondria: from molecular identification to function.

Mol. Plant 9, 371-395 (2016)
doi: 10.1016/j.molp.2015.12.004 査読有

Nanatani, K., Shijuku, T., Takano, Y., Zulkifli, L., Yamazaki, Y., Tominaga, A., Souma, S., Onai, K., Morishita, M., Ishiura, M., Hagemann, M., Suzuki, I., Maruyama, H., Arai, F., and Uozumi, N. Comparative analysis of kdp and ktr mutants reveals distinct roles of the potassium transporters in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Bacteriol.* 197, 676-687 (2015)
DOI 10.1128/JB.02276-14 査読有

Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder J.I. and Uozumi, N. HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field *Curr. Opin. Biotechnol.* 32, 113-120 (2015)
doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.025. 査読有

Nanatani, K., shijuku, T., Akai, M., Yukutake, Y., Yasui, M., Hamamoto, S., Onai, K., Mrishita, M., Ishiura, M., and Uozumi, N. Characterization of the role of a mechanosensitive channel in osmotic down shock adaptation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 *Channels* 7, 229-328 (2013)
DOI 10.4161/chan.25350 査読有

Akai, M. Onai, K. Morishita, M. Mino, H. Shijuku, T. Maruyama, H. Arai, F. Itoh, S. Hazama, A. Checchetto, V. Szabò, I. Yukutake, Y. Suematsu, M. Yasui, M. Ishiura, M. Uozumi, N. Aquaporin AqpZ 1 is involved in cell volume regulation and sensitivity to osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803 *J. Bacteriol.* 194, 6828-6836. (2012)
DOI 10.1074/jbc.M111.236380 査読有

[学会発表](計 8 件)

富永昇、三浦のぞみ、佐伯千香、七谷圭、魚住信之
Synechocystis sp. PCC6803 の細胞外多糖生産を調節する機構解析
日本農芸化学会 2013 年度大会、平成 25 年 3 月 24-27 日、東北大学、仙台市

七谷圭、四十九俊彰、高野洋佑、山崎智子、Lalu Zulkifli、赤井政郎、飯塚龍、松本秀之、丸山央峰、新井史人、魚住信之
Synechocystis sp. PCC 6803 の浸透圧調節に関与する Kdp 系 K トランスポーターの機能解析

創立 90 周年記念 第 64 回日本生物工学会大会、平成 24 年 10 月 23-26 日、神戸国際会議場、神戸市

Uozumi, N., Nanatani K., and Hamamoto, S. Membrane transport system conferring the salinity tolerance to bacteria and plant cells. Tohoku Gakuin University, 6th Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012, June 5, 2012, Sendai

牧野恒平, 富永昂, 堀籠智子, 三浦のぞみ, 七谷圭, 相馬聡, 茅森俊介, 佐伯千香, 鈴木石根, 魚住信之
シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の塩ストレスによるバイオフィルム形成誘導メカニズムの解析
日本農芸化学会 2014 年度大会、平成 26 年 3 月 27-30 日、明治大学、川崎市

牧野恒平, 七谷圭, 井田智章, 澤智裕, 佐伯千香, 鈴木石根, 兵藤守, 早川芳宏, 赤池孝章, 魚住信之
ラン藻の塩誘導性バイオフィルム形成に関与する二成分系 c-di-GMP 合成酵素の同定
第 37 回日本分子生物学会年会、平成 26 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜、横浜市

永山達也, 久米井智裕, 牧野恒平, 井田智章, 赤池孝章, 鈴木石根, 七谷圭, 魚住信之
シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の塩ストレス誘導性バイオフィルム形成に必要なヒスチジンキナーゼの同定とシグナル伝達機構
日本農芸化学会 2015 年度大会、平成 27 年 3 月 28-30 日、岡山大学、岡山市

西坂敦, 解良康太, 七谷圭, 佐伯千香, Nur Illany binti Mohd Siran, 牧野恒平, 魚住信之
シアノバクテリアのポリアミンを介したバイオフィルム誘導機構の解明
藍藻の分子生物学 2015, 平成 27 年 11 月 16-17 日, かずさアカア카데미パーク, 木更津市

吉澤優一郎, 永山達也, 解良康太, 七谷圭, 鈴木石根, 魚住信之
Synechocystis sp. PCC6803 の高塩ストレス誘導型バイオフィルム形成におけるヒスチジンキナーゼ hik43 の解析
藍藻の分子生物学 2015, 平成 27 年 11 月 16-17 日, かずさアカア카데미パーク, 木更津市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

魚住信之 (UOZUMI Nobuyuki)

東北大学・大学院工学研究科バイオ工学専攻・教授

研究者番号: 40223515