

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850056

研究課題名(和文)シアノバクテリアのゲノムコピー数制御システムの構築

研究課題名(英文)Regulation mechanism of cyanobacterial multi-copy chromosome.

研究代表者

渡辺 智(Watanabe, Satoru)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：10508237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：淡水生シアノバクテリア*Synechococcus elongatus* PCC 7942は細胞あたり複数コピーの染色体を保持している。しかし複数コピーの染色体を持つ生物の増殖機構や、染色体コピー数を規定する要因は不明であった。

本研究から*S. 7942*の染色体コピー数は培地中のリン酸濃度に強く依存し、リン酸濃度の低下と共に染色体コピー数も減少すること、この制御にはリン酸欠乏ストレス応答の制御因子が関与することが示された。また*Synechocystis* sp. PCC 6803においても同様にコピー数の変動が観察されたことから、淡水性シアノバクテリアに共通した現象であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Unlike bacteria such as *Escherichia coli*, freshwater cyanobacteria are known to contain multiple chromosomal copies per cell, at all stages of their cell cycle. Our studies have revealed that DNA replication of multi-copy chromosome is not tightly coupled to cell division in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (hereafter *S. 7942*). Here, we report the growth phase-dependent regulation of chromosomal copy number: it was significantly higher during the lag phase than during the following phases. To address the factors involved in the copy number regulation, we analysed the transcriptome and metabolome at each growth phase. The results of these analyses suggest that the phosphate-starvation response occurred at the late-linear phase. Correspondingly, the phosphate ion was almost lost in the late-linear phase culture. Phosphate is a primary substrate for DNA synthesis, thus we concluded that the chromosome copy number depends on the phosphate amount in the culture.

研究分野：微生物分子遺伝学

キーワード：シアノバクテリア 細胞周期 DNA複製 細胞分裂 リン酸代謝

1. 研究開始当初の背景

植物と同様の酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアは、光合成のモデル生物として古くから世界中で研究されてきた。藻類の中でも比較的増殖速度が速く、単位面積辺りの CO₂ 固定能が植物に比べ圧倒的に高いこと、遺伝子組換えが容易であることから、バイオ燃料を始めとする有用物質生産のホストとしても注目されている (Anemaet et al., 2010)。中でも淡水性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (以下 *S.* 7942)、*Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *S.* 6803) は細胞あたり複数コピーの染色体を持つ (Binder et al., 1990) (Griese et al., 2011)。このようなゲノム倍数性は高度好熱菌、放射線耐性菌の他、いくつかの種で報告されており (Ohtani et al., 2010) (Hansen et al., 1978)、これらの生物は染色体のバックアップを常備することで UV や活性酸素による DNA 傷害からゲノム情報を保護し、環境に適応するためのロバストネスを獲得していると考えられる。しかしながら染色体コピー数を規定するメカニズムや、複数コピーの染色体複製機構については不明であった。

明暗培養により細胞分裂のタイミングを同調できる *S.* 7942 を材料とし、複数コピーの染色体 DNA の複製開始について解析した結果、*S.* 7942 の DNA 複製は光合成電子伝達に依存しており (研究成果、論文) 細胞間、複数コピーの染色体間で非同調的であることを明らかにした (Watanabe et al., 2012)。また *S.* 7942 の染色体コピー数は誘導期に一過的に増加する一方で、対数増殖期後期、定常期では減少することから大腸菌、枯草菌等のシングルコピー染色体のバクテリアと比較してシアノバクテリアは複製-分裂間の共役が厳密ではないと考えられた (研究成果、論文)。

2. 研究の目的

S. 7942 は増殖相 (誘導期、対数増殖期、定常期) に応じて染色体コピー数が変動することが示された。そこで以下に挙げる項目を目的とし研究を行った。

(1) シアノバクテリアの染色体コピー数変動に関わる要因、コピー数制御メカニズムの解明

(2) シアノバクテリア染色体コピー数の人為的制御システムの構築

3. 研究の方法

(1) 定常期において染色体コピー数が減少する要因、メカニズムの解明を目指し、以下の項目を実施した。

S. 7942 の増殖相における残存培地成分と染色体コピー数の相関解析

リン酸欠乏下における染色体コピー数減少のメカニズムの解析

各増殖相、リン酸欠乏下における遺伝子発

現の網羅的解析

各増殖相、リン酸欠乏下における代謝産物量の比較

(2) シアノバクテリア染色体コピー数を制御するシステムの構築にむけて、項目 (1) で得られた知見から、以下の解析を実施した。

リン酸欠乏ストレスを制御する転写因子、センサータンパク質の欠損、過剰発現による染色体コピー数制御の試み

S. 6803 の染色体コピー数の決定と各増殖相における染色体コピーの変動

4. 研究成果

(1) *S.* 7942 の増殖相における残存培地成分と染色体コピー数の相関解析：*S.* 7942 を 1 週間培養した後、フィルターによって細胞を分離することで培養上清を調整した。培養の前後で BG-11 培地に含まれる成分 (鉄、マンガン、ナトリウム、硫酸イオン、リン酸イオン、マグネシウム、カリウム、ホウ素、塩化物イオン、硝酸イオン) を分析、比較した。BG-11 培地の分析は株式会社ヤクルト中央研究所に依頼した。その結果、染色体コピー数の減少する定常期の培養上清では鉄リン酸イオン、鉄イオン量が 1/100 以下に、硫酸イオン、カリウムがそれぞれ 1/2、1/3 に減少することが明らかとなった (研究成果、論文)。

次に BG-11 の各成分を除いた培地を用いて、染色体コピー数への影響を解析した。その結果、リン酸水素カリウム (K₂HPO₄) を除いた BG-11 培地 (以下 P-培地) を用いて培養した場合でのみ染色体コピー数の減少が促進され、スパイク状の DNA 含量プロファイル (複製途中の細胞の減少、つまり複製開始障害) が示された。この応答は可逆的であり K₂HPO₄ の添加によって回復した。また、P-培地にリン酸二水素カリウム (KH₂PO₄)、リン酸水素ナトリウム (NaH₂PO₄)、リン酸水素二ナトリウム (Na₂HPO₄) の添加でも同様の応答が観察されたことから、染色体コピー数の変動には培養液中のリン酸量が深く関与すると考えられた。

リン酸欠乏下における染色体コピー数減少のメカニズムの解析：フローサイトメーター (FACS) を用いて P-培地交換後の DNA 含量プロファイルを経時的に解析すると P-培地では DNA 複製途中の細胞数が顕著に減少した。一方、細胞数は通常の BG-11 培地を用いたコントロールと同程度であった。細胞分裂、脂質合成の阻害剤である Cefalexin (FtsI の重合障害)、Cerulenin (FabF の障害) の添加によって細胞分裂を阻害すると、細胞が伸長し染色体コピー数の蓄積が観察された。阻害剤存在下では P-培地に置換しても染色体コピー数の減少は起こらず、スパイク状の DNA プロファイルも観察されなかった。これらの結果よりリン酸欠乏下で起こる染色体コピー数の減少は細胞分裂を伴って起こること、

DNA 複製の新規合成が阻害されること、により引き起こされると考えられた。

各増殖相、リン酸欠乏下における遺伝子発現の網羅的解析：10日間培養した定常期の培養液を新しいBG-11培地に希釈し、18時間暗所で培養した後、明所に移行して細胞分裂のタイミングを同調させた。その後、誘導期（9時間後）、対数増殖期（27時間後）、線形増殖期（48時間後）、定常期（168時間後）の細胞よりRNAを回収し、これらについてRNA-sequence（RNA-seq）法により遺伝子発現を解析した。RNA-seqは東京農業大学、生物資源ゲノム解析センターの兼崎友博士に依頼した。明所に移行した直後である誘導期では最も多くの遺伝子が変動し、48%の遺伝子が二倍以上に増加/減少した。対数増殖期、線形増殖期では遺伝子変動はほとんど検出されず、対数増殖期から定常期にかけて増加したのは83遺伝子、減少したのは135遺伝子あり全体として変動したのは6%程度の遺伝子であった。これらの結果より*S. 7942*の転写産物量の変動は増殖相よりも光環境に強く依存することが明らかとなった（研究成果、学会発表、）。

リン酸欠乏応答についても同様の解析を行った。誘導期にP-培地に置換し3時間後の細胞よりRNAを回収しRNA-seqに供した。リン酸欠乏条件において二倍以上発現量が上昇したのは15遺伝子、減少したのは7遺伝子であった。定常期と共通して増加した遺伝子にはリン酸のトランスポーター、アルカリフォスファターゼ、二成分制御系情報伝達因子、転写因子等が含まれており、染色体コピー数の制御にはこれらの遺伝子が関与すると考えられた（研究成果、学会発表、、）。

各増殖相、リン酸欠乏下における代謝産物量の比較：（1）と同様の手順で*S. 7942*を培養し、その後、誘導期（3、9時間後）、対数増殖期（18、27時間後）、線形増殖期（48、72時間後）、定常期（168時間後）の細胞よりメタノール抽出によって代謝産物を抽出した後、CE-TOFMSを用いて代謝産物量を測定した。CE-TOFMSは慶應義塾大学の曾我朋義教授、齋藤菜摘博士に依頼した。ゲノムコピー数の増加する誘導期では中央糖代謝、TCA回路の中間体、アミノ酸、核酸中間体、ATP、GTPが多く蓄積し、その後の対数増殖期ではこれらの代謝産物量は減少した。誘導期では各代謝反応を担う酵素が十分ではなく一部の代謝反応が制限されることで、中間産物が蓄積したと考えられる。一方、対数増殖期では代謝反応が円滑に行われており、結果的に中間産物量が低下すると考察した。その後の線形増殖期から定常期にかけて、上記の代謝産物は再び蓄積した。線形増殖期、定常期に起こる光の制限やリン酸、鉄等の栄養源の枯渇によって代謝反応が阻害されたと考えられる（研究成果、論文）。リン酸欠乏時の代謝産物量への影響も併せて解析した。P-培

地に交換し3時間後、18時間後の代謝産物量を比較した結果、リン酸欠乏条件ではdCTP、dGTP量が顕著に減少した。本研究から、誘導期における染色体コピー数の増加は代謝の各段階の反応停滞による分裂遅延により引き起こされる現象であること、またP-培地ではリン酸欠乏により引き起こされる核酸、各種代謝産物の枯渇によりDNA複製開始が阻害されていると考えられた。

（2）リン酸欠乏ストレスを制御する転写因子、センサータンパク質の欠損、過剰発現による染色体コピー数への影響：染色体コピー数の減少する定常期、リン酸欠乏ストレスのRNA-seq解析（研究成果（1））より、両条件に共通して強く誘導される転写因子PtrA（Putative transcriptional factor A）が新たに同定された。PtrAは*S. 7942*だけでなく海洋性シアノバクテリアにも保存されており（Scanlan et al., 2009）、その一種である*Synechococcus* sp. WH 8102においてPtrAはリン酸欠乏ストレス応答を正に制御することが報告されている（Ostrowski et al., 2010）。*S. 7942*においても同様の機能が考えられたため、リン酸ストレスの主要センサーであるSphS-SphR二成分制御系情報伝達因子（Aiba et al., 1993）と共に染色体コピー数制御に対する機能を解析した。*ptrA*遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子と置き換えることにより*ptrA*完全破壊株を取得した。*sphS*破壊株、*ptrA-sphS*の二重破壊株を作製し、P-培地交換後のDNA含量プロファイルを解析した。その結果*ptrA*破壊株、*sphS*破壊株はP-培地交換18時間後においてもスパイク状のプロファイルを示さなかったことから、PtrA、SphS-SphRがリン酸欠乏下における複製開始制御に関与することが示された。*ptrA-sphS*二重破壊株においてもDNAプロファイルは単独破壊と同様であったためPtrAはSphS-SphRと共通の経路を介してDNA複製開始制御に関わることも示唆された（研究成果、学会発表、、）。PtrAの過剰発現時のDNA含量プロファイルを調べると、*ptrA*、*sphS*破壊とは逆に、スパイクが出現した。今後、PtrAの制御する遺伝子を明らかにすることで染色体コピー数制御のメカニズムの解明が期待できる。

*S. 6803*の染色体コピー数の決定と各増殖相における染色体コピー数の変動：*S. 6803*も複数コピーの染色体を持つ（Labarre et al., 1989, Griese et al., 2011, Zerulla et al., 2016）。ただし、報告されたコピー数は研究グループ間で異なっており議論されて来た。Labarreらは*S. 6803*の染色体コピー数は12コピーであると発表したが、Soppaらのグループは200コピー以上であると報告した（Griese et al., 2011）。その後同グループによって、染色体コピー数は最大50コピー程度であり、培養環境で大きく変動すること

が報告されたが (Zerulla et al., 2016)、Soppaらの解析はPCRに基づいた定量であり、FACSを用いて検証する必要があると考えた。*S. 6803*のコピー数及び、増殖相によるコピー数の変動、リン酸欠乏時の応答について解析した。*S. 7942*のDNA含量プロファイルをスタンダードとして、染色体コピー数を見積もると、誘導期では5~18コピーであるのに対し、対数増殖期、定常期では2~6コピーであり、*S. 7942*と同様、*S. 6803*も増殖相に応じて染色体コピー数を変動させることが明らかとなった。また、リン酸を欠乏した培地では複製開始が阻害され、コピー数の減少が促進された。この点も*S. 7942*と同様であった。

おわりに：染色体コピー数は培養環境に依存しており、リン酸を欠乏させることで、*S. 7942*の染色体を1~3コピーまで減少させることに成功した。*S. 7942*ではDNA複製と細胞分裂間の制御が大腸菌、枯草菌等のシングルコピーのバクテリア程厳密ではなく、定常期やリン酸欠乏条件下では、分裂に比べてDNA複製の頻度が減少することでコピー数の減少が起こると考えられる。さらにRNA-seq解析から染色体コピー数の減少はPtrA、SphS-SphRといったリン酸ストレス制御因子によって調節されていることが明らかとなった。誘導期では代謝中間体と共に染色体コピー数が一時的に増加すること、阻害剤を用いた研究から細胞分裂阻害によっても染色体数は増加することも示された。染色体コピー数は細胞の状態と密接にリンクしており、コピー数を自在に調節するためには、越えるべきハードルも多く残されている。しかしながら、本研究より複数コピーの染色体を持つシアノバクテリアの増殖機構の全体像を明らかにできた。これらの知見は藻類工学の進展に大きく貢献することが期待される。

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7件)全て査読有り

Watanabe S, Yoshikawa H, Estimation of the Chromosomal Copy Number in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, Bio-protocol.2016, in press

Ohbayashi R, Akai H, Yoshikawa H, Hess WR, Watanabe S, A tightly inducible riboswitch system in *Synechocystis* sp. PCC 6803, J Gen. Appl. Microbiol. 2016, in press.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/advpub/0/advpub_2016.02.002/article

Ohbayashi R, Watanabe S, Ehira S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H, Diversification of DnaA dependency for

DNA replication in cyanobacterial evolution, ISME J. 2016 May;10(5):1113-21. doi: 10.1038/ismej.2015.194.

Watanabe S, Ohbayashi R, Kanesaki Y, Saito N, Chibazakura T, Soga T, Yoshikawa H, Intensive DNA Replication and Metabolism during the Lag Phase in *Cyanobacteria*, PLoS One. 2015 Sep 2;10(9):e0136800. doi: 10.1371/journal.pone.0136800.

Schuerger N, Ruppert U, Watanabe S, Nürnberg DJ, Lochnit G, Dienst D, Mullineaux CW, Wilde A, Binding of the RNA chaperone Hfq to the type IV pilus base is crucial for its function in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Mol Microbiol. 2014 May;92(4):840-52. doi: 10.1111/mmi.12595.

Nakamoto H, Fujita K, Ohtaki A, Watanabe S, Narumi S, Maruyama T, Suenaga E, Misono TS, Kumar PK, Goloubinoff P, Yoshikawa H, Physical interaction between bacterial heat shock protein (Hsp) 90 and Hsp70 chaperones mediates their cooperative action to refold denatured proteins., J Biol Chem. 2014 Feb 28;289(9):6110-9. doi: 10.1074/jbc.M113.524801.

Ohbayashi R, Watanabe S, Kanesaki Y, Narikawa R, Chibazakura T, Ikeuchi M, Yoshikawa H, DNA replication depends on photosynthetic electron transport in cyanobacteria., FEMS Microbiol Lett. 2013 Jul;344(2):138-44. doi: 10.1111/1574-6968.12166.

[学会発表](計35件)

渡辺智、大林龍担、辻出巨寛、兼崎友、千葉櫻拓、吉川博文、複数コピーゲノムを持つシアノバクテリアの複製・増殖機構、第89回日本細菌学会、2016年3月、大阪国際交流センター(大阪)

辻出巨寛、渡辺智、橋本千晴、大林龍担、兼崎友、吉川博文、*Synechococcus elongatus* PCC 7942におけるゲノムコピー数制御機構の解析、第89回日本細菌学会、2016年3月、大阪国際交流センター(大阪)

美田知也、細村匡太郎、渡辺智、兼崎友、板谷光泰、吉川博文、合成生物“シアノバチルス”を用いた大規模異種ゲノム発現の試み、藍藻の分子生物学2015、2015年11月、かずさアカデミアホール(木更津)

辻出巨寛、渡辺智、橋本、大林龍担、兼崎友、吉川博文、*Synechococcus elongatus* PCC 7942におけるゲノムコピー数制御機構の解析、藍藻の分子生物学2015、2015年11月、かずさアカデミア

ホール(木更津)
沼倉萌、大林龍胆、赤井秀人、吉川博文、渡辺智、*Synechocystis* sp. PCC 6803 における遺伝子発現制御系の改良、*藍藻の分子生物学* 2015、2015年11月、かずさアカデミアホール(木更津)
中町愛、大林龍胆、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 における DNA 複製開始制御機構の解析、*藍藻の分子生物学* 2015、2015年11月、かずさアカデミアホール(木更津)
大林龍胆、山本純也、渡辺智、吉川博文、暗所における代謝活性の違いが生み出す DNA 複製制御の多様性、*藍藻の分子生物学* 2015、2015年11月、かずさアカデミアホール(木更津)
内桶香那、渡辺智、野田明日翔、中武詩津花、湯本真実、大林龍胆、兼崎友、千葉櫻拓、吉川博文、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 におけるマルチコピーゲノムの分布・分配制御機構の解析、*藍藻の分子生物学* 2015、2015年11月、かずさアカデミアホール(木更津)
渡辺智、大林龍胆、山本純也、兼崎友、千葉櫻拓、吉川博文、複数コピーゲノムを持つシアノバクテリアの細胞増殖戦略、*日本微生物生態学会第30回大会*、2015年10月、土浦市亀城プラザ(茨城)
Watanabe S, Cell division-uncoupled DNA replication and metabolism in cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942, 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, August 2015, Tuebingen, (Germany)
Ohbayashi R, Watanabe S, Ehira S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H, Variety of dependency on DnaA protein for DNA replication among cyanobacterial lineages, 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, August 2015, Tuebingen, (Germany)
Kanesaki Y, Ohbayashi R, Watanabe S, Yoshikawa H, Identification of the associated genes for substrain-specific phenotypes of a cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, 15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, August 2015, Tuebingen, (Germany)
Watanabe S, DNA Replication of Cyanobacterial Multi-Copy Chromosomes, The German-Japanese Binational Seminar 2015 Harvesting Light: From light to biotechnological products, March 2015, Atami (Japan)
Watanabe S, DNA Replication of Cyanobacterial Multi-Copy Chromosomes, Tokyo Tech-HHU Dusseldorf Joint Symposium on Photosynthesis as a New

chemical Resource, March 2015, Tokyo (Japan)
渡辺智、大林龍胆、兼崎友、齋藤菜摘、千葉櫻拓、曾我朋義、吉川博文、シアノバクテリアにおける増殖相に依存したゲノムコピー数制御機構、第9回ゲノム微生物学会、2015年3月、神戸大学(兵庫)
細村匡太郎、渡辺智、兼崎友、板谷光奏、吉川博文、合成生物学の申し子“シアノバチルス”の転写装置起動の試み、第9回ゲノム微生物学会、2015年3月、神戸大学(兵庫)
大林龍胆、中町愛、渡辺智、吉川博文、シアノバクテリアにおける DnaA による明暗周期での DNA 複製制御、2015年3月、神戸大学(兵庫)
Yamamoto J, Ohbayashi R, Ehira S, Hihara Y, Chibazakura T, Watanabe S, Yoshikawa H, Relationship between carbon metabolism and DNA replication under the dark condition in cyanobacteria, 第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学(東京)
Ohbayashi R, Nakamachi A, Watanabe S, Yoshikawa H, Regulation mechanism of DNA replication initiation depends on light-dark cycle in cyanobacteria., 第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学(東京)
Watanabe S, Ohbayashi R, Kanesaki Y, Saito N, Hirota R, Shigenobu N, Chibazakura T, Soga T, Yoshikawa H, Control of chromosome copy number depending on growth phase in cyanobacteria, 9th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria, September 2014, Texel (Netherlands)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 智 (WATANABE, Satoru)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：10508237