

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440141

研究課題名(和文) 遠赤色で駆動する特異な光合成系の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive study of the unique photosynthetic system driven by far-red light

研究代表者

土屋 徹 (Tsuchiya, Tohru)

京都大学・地球環境学堂・准教授

研究者番号：20362569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Acaryochloris(アカリオクロリス)は、他の酸素発生型光合成生物が利用できない遠赤色光を光合成反応に利用することができる。本研究では、その遠赤色光で駆動する特異な光合成系の分子機構を解明するため、分子遺伝学的手法を開発することを目的とした。その結果、トランスポゾンタギングによりAcaryochlorisの突然変異体を作製することに成功した。さらに、新たな遺伝子発現抑制技術であるCRISPR干渉を行うためのベクターを開発した。

研究成果の概要(英文)：Acaryochloris marina can utilize far-red light for photosynthesis, whereas most other oxygenic photosynthetic organisms cannot use the light. In this project, we aimed to develop the molecular genetic techniques for A. marina in order to elucidate the molecular mechanism of its unique photosynthetic system driven by far-red light. In the result of this study, we succeeded in producing transposon-tagged mutants of A. marina by transposon tagging. In addition, we also succeeded in developing vectors for CRISPR interference, new technique for the repression of gene expression.

研究分野：生物学

キーワード：シアノバクテリア クロロフィルd 光合成 遠赤色光 トランスポゾンタギング

1. 研究開始当初の背景

光のエネルギーを生物が利用可能な形の化学エネルギーに変換する光合成は、人類が直面する諸問題の解決に向けて、その有効利用が期待されている。

光合成の反応では、「光合成色素」と呼ばれる光エネルギーを吸収するための色素が必要である。そこで、植物や藻類などの光合成生物は、生物種に依存して異なる光吸収特性を示す光合成色素をもち利用している。換言すれば、その生物がもっていない色素が吸収する光は光合成に利用できない。

一般に植物や藻類では、700 nm より波長の長い光のみを照射しても光合成反応が進まない。しかし、その長波長側の光である遠赤色光のみを照射しても、白色光を照射した場合と同様に生育することができる光合成生物が存在している。

シアノバクテリア（らん藻）の *Acaryochloris marina* がもつ特殊な光合成色素、クロロフィル *d* は、他の酸素発生型光合成生物が利用するクロロフィル *a* と比較すると、約 30 nm 長波長側の光を吸収する性質を示す。よって、*A. marina* は、その光合成系が遠赤色光でも駆動するため、遠赤色光のみで生育可能なのだと考えられた。そこで、クロロフィル *d* の生合成経路と関連する酵素の遺伝子の同定やクロロフィル *d* を含む光化学系の性質など、本生物の光合成系を研究することで、他の光合成生物では見いだせない新たな知見が得られることが期待された。しかし、*A. marina* を対象とした分子遺伝学的手法が確立していなかったことが、研究の進展を妨げていた。近年、私たちは本生物の形質転換系を世界で初めて開発し、保持型プラスミドを利用した外来遺伝子の導入に成功した。そこで、*A. marina* を対象とした分子遺伝学的な解析を進めることが、ようやく可能な段階になった。

2. 研究の目的

本研究では *A. marina* の特異な光合成系を対象とした分子遺伝学的解析を行うために、(1) トランスポゾンタギング系を開発し、その系による *A. marina* の順遺伝学的解析を進め、さらに (2) 逆遺伝学的解析のために *A. marina* での遺伝子ターゲティング系などの実験系を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シアノバクテリアでは複製されない自殺ベクターをもとに作製した mini-Tn5 トランスポゾンベクター (pKUT-Tn5-Em) を接合法で *A. marina* に導入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体 (変異体) を得た。得られた変異体でのトランスポゾンの挿入位置を解析した。また、変異体の作出を進め、それらの色素組成を HPLC により分析した。

(2) *A. marina* では複製されない自殺ベクターに、標的遺伝子のゲノム配列と相同な領域をクローニングし、その中に抗生物質耐性遺伝子を挿入したベクターを作製した。そのベクターを接合法、電気穿孔法により *A. marina* への導入を試みた。

(3) ゲノム編集で利用される *cas9* 遺伝子に 2 カ所の点変異を導入し、DNA 切断活性のない *dcas9* 遺伝子を作製した。また、dCas9 タンパク質の標的を決める sgRNA を発現させるための DNA 断片も作製した。この DNA 断片と *dcas9* 遺伝子を広宿主域プラスミド由来ベクターに導入し、all-in-one 型の CRISPR 干渉 (CRISPRi) ベクターを作製した。CRISPRi ベクターは、接合法によりモデルシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入した。得られたスペクチノマイシン耐性を示す形質転換体の性質を調べ、野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) *A. marina* でのトランスポゾンタギング

系の開発

これまでに作製した mini-Tn5 トランスポゾンベクターのスペクチノマイシン耐性遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子に置換したベクターを *A. marina* に導入したところ、トランスポゾンが挿入された変異体を作製することに成功した。

(2) 変異体の作出と、色素組成の変化した変異体のスクリーニング

トランスポゾンタギングによる変異体作製を進め、それらの色素組成を解析したが、クロロフィル *d* 量が有意に減少した変異体は得られなかった。これは、トランスポゾンタギングの効率がモデルシアノバクテリアと比較すると著しく低いため、十分な数の変異体をスクリーニングできなかつたためだと考えられた。トランスポゾンタギングの効率を上げるための条件検討も行ったが、有効な改善策は見つからなかった。しかし、スクリーニングの過程で、黄色を呈する変異体を単離することができた。トランスポゾンの挿入位置から原因遺伝子の候補を絞り、候補遺伝子の導入による機能相補実験 (図 1) により、原因遺伝子をモリブデンコファクター合成に関与する *moaA* 遺伝子と特定した。モリブ



図 1. 黄色を呈する変異体の機能相補実験

デンコファクターは、硝酸還元酵素にも必要とされることから、変異体が黄色を呈するの

は、窒素源不足によるものと判明した。この結果は、*A. marina* で順遺伝学的解析が初めて可能となったことを意味した。

(3) 遺伝子ターゲティング系の開発

定法に基づき、標的配列と相同な DNA 断片中に抗生物質耐性遺伝子を挿入したものをプラスミドとして *A. marina* に導入し、相同組換えによる遺伝子ターゲティングを試みた。自殺ベクターを接合法により導入する手法や電気穿孔法を検討したが、目的とする形質転換体は得られなかった。標的は、光化学系 II 複合体のサブユニットへのヒスチジンタグの導入であったが、他の生物では光合成活性に影響を与えないことがわかっているため、形質転換体は得られなかったのは、必須遺伝子の破壊のように遺伝子ターゲティングにより細胞に悪い影響が与えられたからではないと考えられた。

(4) モデルシアノバクテリアをもちいた遺伝子発現抑制系の開発

遺伝子ターゲティング系の開発が遅れていることから、標的遺伝子の破壊による逆遺伝学的解析を行う目処が立たなかつたため、別の手法の開発を試みた。CRISPRi は、ゲノム編集で利用される Cas9 の変異体である dCas9 を標的配列に結合させて転写を抑制することができる新しい技術であった (図 2)。そこで、広宿主域プラスミド由来の

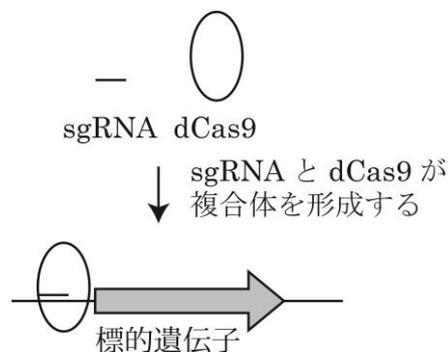


図 2. CRISPRi の原理

dCas9 が sgRNA と相補的な配列に結合し標的遺伝子の発現 (転写) を抑制する。

all-in-one 型 CRISPRi ベクターを開発し、モデルシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 で、その機能を検証した。標的遺伝子としては、クロロフィル生合成経路の酵素である DVR の遺伝子とカロテノイド生合成経路の酵素である CrtR の遺伝子を選択した。その結果、適切なプロモーターを組み合わせた形質転換体では、誘導剤であるアンヒドロテトラサイクリンの添加により DVR 遺伝子の破壊時に蓄積される 8-ビニルクロロフィル *a* が蓄積し、*crtR* 遺伝子の破壊時に蓄積しなくなるゼアキササンチンがほとんど検出されなくなった。開発したベクターを適用することで、今後 *A. marina* で CRISPRi での遺伝子発現抑制による逆遺伝学的解析が可能になるとと思われる。

これらの成果は、遠赤色光で駆動する光合成系の分子機構の解明に向けた実験系の開発が着実に進展していることを示している。

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 3件)

①Watabe, K., Mimuro, M. and Tsuchiya, T. (2015) Establishment of the forward genetic analysis of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC 11017 by applying *in vivo* transposon mutagenesis system *Photosynth. Res.* 125 (1-2): 255-265. 査読有、doi:10.1007/s11120-015-0082-4

②Watabe, K., Mimuro, M. and Tsuchiya, T. (2014) Development of a high-frequency *in vivo* transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 55 (11): 2017-2026. 査読有、doi:10.1093/pcp/pcu128

[学会発表] (計 5件)

①早川 諒、土屋 徹、CRISPR 干渉法を適用したシアノバクテリアの光合成色素組成の改変、第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017 年 3 月 22 日

②Tsuchiya, T. and Watabe, K. Molecular

genetic analysis of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*. International meeting "Photosynthesis Research for Sustainability - 2014" in honor of Vladimir A. Shuvalov, Russia, 2014 年 6 月 4 日

[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

土屋 徹 (TSUCHIYA, Tohru)
京都大学・地球環境学堂・准教授
研究者番号：20362569

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()