

# 研究報告書

## 「グリコーゲンから油脂へ:シアノバクテリア変異株の代謝改変」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究者: 日原 由香子

### 1. 研究のねらい

私はこれまで、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の転写因子に関して研究を進める過程で、SII0822 転写因子欠損株では、細胞体積が野生株の 5 倍、細胞あたりのグリコーゲン蓄積量が野生株の 10 倍にも達することを見出した。「器が大きく素材に富む」この SII0822 欠損株をプラットフォームとした代謝改変により、高蓄積しているグリコーゲンを脂肪酸・油脂に変換できないか、というのが本研究の狙いである。

SII0822 は、シアノバクテリアに特有な cyAbrB 転写因子ファミリーに属している。これまでにゲノムの全塩基配列が解読されたシアノバクテリアの全てが複数コピーの cyAbrB 遺伝子を保持することから、この転写因子のシアノバクテリアにおける重要性が示唆される。*Synechocystis* sp. PCC 6803 は 2 コピーの *cyabrB* 遺伝子を持つが、そのうちの 1 つ sII0359 は生存に必須であり、完全な欠損株を得ることはできなかった。そこで SII0822 欠損株について表現型解析を進めたところ、SII0822 が通常大気条件下で窒素代謝関連遺伝子の転写活性化に働くこと、高 CO<sub>2</sub> 条件下で無機炭素取り込み関連遺伝子の転写抑制に働くこと、これらの遺伝子上流制御領域へ直接結合することなどが明らかになった。これらの結果は、SII0822 は代謝制御の鍵となる重要な転写因子であることを示しており、この転写因子の発現量や機能を制御することにより、シアノバクテリアをプラットフォームとした高効率な物質・エネルギー生産系の確立が可能なのではないかと考えた。SII0822 が代謝をどのように制御しているのかの情報は皆無であったため、本研究においては、まず SII0822 欠損株について、異なる栄養条件下で光合成活性測定や代謝解析を行い、その代謝特性を明らかにすること(研究テーマA)、そして得られた情報にもとづき、適切な代謝改変を行って脂肪酸・油脂を高生産すること(研究テーマB)を2本の柱として解析を進めた。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の SII0822 欠損株の代謝産物量や光合成・呼吸活性などを詳細に調べ、cyAbrB 転写因子がシアノバクテリアの代謝制御に不可欠であることを世界で初めて解明した(研究テーマA)。次に SII0822 欠損株の代謝解析によって得られた知見に基づき、5 項目の代謝改変を個別に行ったところ、脂肪酸生合成経路の増強、トリアシルグリセロール(TAG)の細胞内蓄積、遊離脂肪酸の細胞外放出に成功し、SII0822 欠損株は野生株に比べて、脂肪酸の高生産が可能であることが明らかとなった(研究テーマB)。今後 5 項目の代謝改変を統合することにより、更なる生産性の向上が期待される。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「SII0822 転写因子欠損株の生理学的解析」 (発表論文2)

異なる栄養条件下で培養した野生株および SII0822 欠損株について、ノーザン解析により炭素・窒素代謝関連遺伝子の発現レベルを調べると同時に、光合成活性測定およびキャピラリー電気泳動-質量分析(CE-MS)により各種代謝活性の評価を行った。

光独立栄養条件下では、SII0822 欠損株は、野生株と同等以上の光合成活性を示すこと、

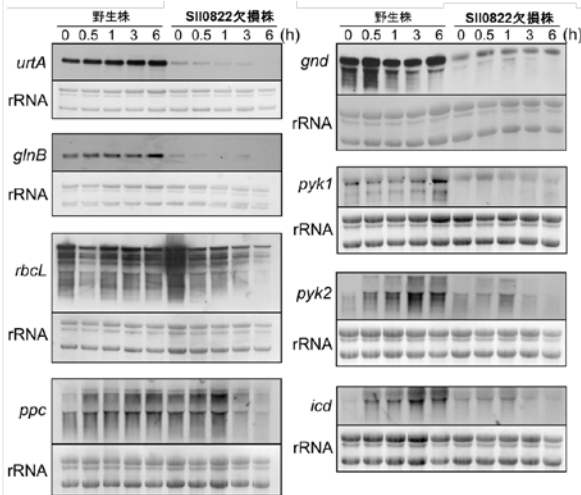


図1 光独立栄養条件から光混合栄養条件にシフト時の遺伝子発現変動

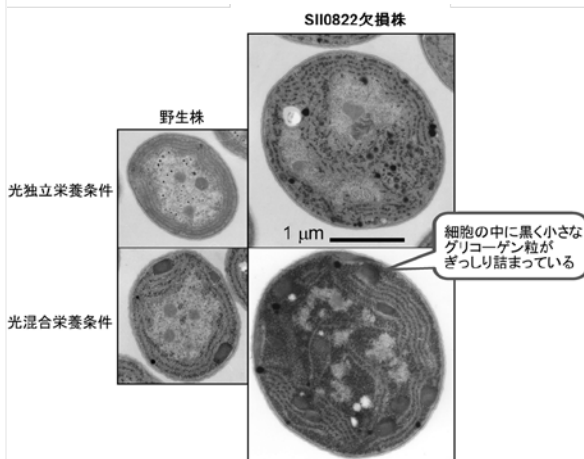


図2 異なる栄養条件下での電子顕微鏡写真

窒素代謝・糖代謝関連遺伝子の発現レベルが低いこと、糖リン酸が野生株より高蓄積している一方、糖異化経路でより下流に位置するピルビン酸や 2-オキソグルタル酸といったいくつかの重要な中間体量が少ないことが明らかになった。これらの結果より、SII0822 欠損株では CO<sub>2</sub> 固定が活発に行われている一方、解糖系下流部分の活性が低く、結果として余剰糖がグリコーゲンとして蓄積している可能性が示された。

培地にグルコースを添加し、光合成と糖代謝の両者が活発に行われる光混合栄養条件下では、SII0822 欠損株が厳しい増殖阻害を受けることを見出した。この条件下の SII0822 欠損株では、糖異化、CO<sub>2</sub> 固定、窒素同化等に関連する遺伝子群の発現レベルが野生株に比べて顕著に低く(図1)、細胞内にグリコーゲンが高蓄積し(図2)、CO<sub>2</sub> 固定活性の大きな低下が観察された。このことは、栄養条件の変動に応答しての遺伝子発現制御、ひいては代謝活性の制御に SII0822 転写因子が必須であることを示している。

SII0822 遺伝子欠損株で蓄積量の少ないピルビン酸および 2 オキソグルタル酸を培地に添加したところ、光混合栄養条件下での増殖の改善が観察された。特に 2 オキソグルタル酸を添加した場合には、SII0822 欠損株は光独立栄養条件下と同様な増殖を示した。この条件下において、

CO<sub>2</sub> 固定、呼吸、窒素同化等の顕著な活性化が観察されたことから、SII0822 欠損株の光混合栄養条件下での致死原因が代謝活性の停滞によることが強く示唆された。光混合栄養条件下では各種代謝活性が低下する一方、光合成電子伝達活性は維持されるため、おそらく還元力の供給過剰により生育阻害が引き起こされると考えられる。また、光混合栄養条件下では 2 オキソグルタル酸がシグナル物質として細胞内代謝に広汎な影響を与え得ることが本研究により新たに示された。

以上の結果より、SII0822 は、炭素・窒素代謝の停滞を防いで円滑に進行させる調節に関与しており、変動する栄養条件下での生存に不可欠な転写因子であることが明らかになった。

### 研究テーマB「脂肪酸・油脂の高生産に向けての代謝改変」

SII0822 欠損株においては、CO<sub>2</sub> 固定活性に対して各種代謝活性が不活発であり、結果として余剰糖がグリコーゲンとして高蓄積していることが明らかとなった。そこで、この知見に基づ

き、以下の5項目を代謝改変の戦略として研究を進めた(図3)。

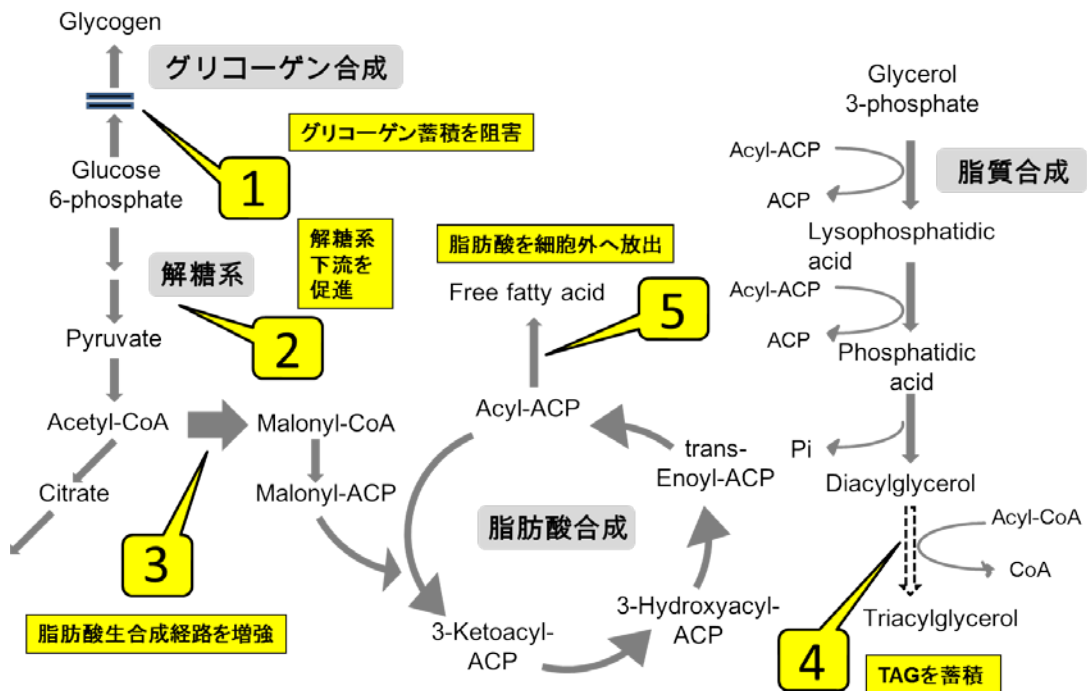


図3 代謝改変の戦略

1. グリコーゲンの蓄積を阻害し、余剰糖を異化経路へ回す。2. SII0822 欠損株で停滞していると考えられる解糖系下流を促進する。3. アセチル CoA からマロニル CoA への変換を促進することにより脂肪酸合成経路を増強する。ここまでの代謝改変で増産された脂肪酸を、4. TAGとして細胞内に蓄積、または、5.遊離脂肪酸として細胞外へ放出させる。

代謝改変の試みを始めた当初は、SII0822 欠損株の形質転換効率が低いため、形質転換体を得られないという問題に直面し、研究の進行が大幅に遅れたが、形質転換効率の改善に効果があると報告されていた、エキソヌクレアーゼをコードする *recJ* 遺伝子の破壊により、形質転換効率を約 140 倍向上させることができた。以下、5つの項目の個別の達成状況を記す。

1. グリコーゲン合成経路の鍵酵素 ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子の破壊を行ったところ、野生株バックグラウンドでは完全破壊株が得られ、グリコーゲンの蓄積も検出されなくなったが、SII0822 欠損バックグラウンドでは完全破壊株が得られず、グリコーゲン量も全く減少しなかった。他の代謝改変と組み合わせて行っても遺伝子破壊の進行は観察されなかった。次に、グリコーゲン分解酵素 glycogen phosphorylase の条件誘導によるグリコーゲンの強制的分解を試みたが、ゲノム上に導入した *Pspac-glgP* 遺伝子のコピー数が増加せず、IPTG 誘導してもグリコーゲン量は減少しなかった。以上の結果から、グリコーゲン蓄積は SII0822 欠損株の生存に必須であると考えられる。

2. SII0822 欠損株では、糖異化関連遺伝子の転写活性化に関与しているシグマ因子をコードする *sigE* 遺伝子の発現レベルが低い。このことから、SigE の過剰発現により糖代謝を促進することができるのではないかと考え、*PpsbA2* プロモーターを用いて恒常的高発現株を作製した。この株について代謝解析を行ったところ、解糖系下流の産物量が増加し、SII0822 欠損株で蓄積量の多い乳酸が減少するなど、糖代謝の促進効果が認められたが、グリコーゲン量の減少や脂肪酸量の増加は観察されなかった。



3. 脂肪酸生合成経路の鍵酵素をコードする *accBCDA* を *PpsbA2* プロモーターに連結して恒常的に過剰発現させた。この株の脂質解析を行ったところ、*accBCDA* 過剰発現により脂肪酸生合成経路が増強されること、SII0822 欠損バックグラウンドで増強効果がより顕著であることが明らかになった。SII0822 欠損株に対して過剰発現を行った場合、脂質分子種の中では MGDG (1.7 倍) の増加が顕著であり、膜脂質中の脂肪酸分子種の中では、パルミチン酸 (1.4 倍)、オレイン酸 (2.6 倍) の増加が顕著であった。

4. 条件誘導プロモーター *Pspac* に *Acinetobacter* sp. ADP1 由来の *wax-dgaT* 遺伝子を連結して発現させたところ、野生株バックグラウンドにて、IPTG 濃度依存的な TAG の蓄積を検出した。薄層クロマトグラフィーにて中性脂質を展開後、スポットをかき取り定量を行ったところ、TAG の蓄積量は全膜脂質の 5%ほどであることが明らかになった。

5. アシル ACP シンテターゼ遺伝子を破壊し、チオエステラーゼ遺伝子を導入することで脂肪酸分泌生産能を付与した結果、菌体外に放出される脂肪酸量が、SII0822 欠損バックグラウンドでは野生株に比べて 1.5~2 倍に向上することを見出した。

### 3. 今後の展開

本研究において SII0822 欠損株が野生株に比べて脂肪酸の高生産が可能な株であることが明らかになった。現段階では、この株に高蓄積しているグリコーゲンを炭素源として脂肪酸生合成系へ供給することが出来ていない。今後は、それにも関わらず、なぜ野生株に比べて高生産が可能なのか、生理学解析によって明らかにすると同時に、グリコーゲン量を減少させ、余剰糖を炭素源とした物質生産を行う方策を考えていく必要がある。これらが達成できた暁には、SII0822 の改変による代謝の人為的制御、および欠損株を用いての物質生産は、高効率なエネルギー・物質生産を達成する上での有力な手段となると期待される。また、本研究では TAG 合成酵素の条件誘導により、野生株バックグラウンドで TAG の蓄積に成功した。今後は更なる代謝改変により、この株における TAG 蓄積量の増加を試みると同時に、未だポジティブな結果の得られていない SII0822 欠損株について、TAG の蓄積条件を検討していく予定である。

*cyAbrB* 転写因子はシアノバクテリアの種内に広く保存されているため、SII0822 欠損株を用いた物質生産技術を確立することができれば、将来的には *Synechocystis* 以外の有用種の代謝改変にも、その技術を応用することができると期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

さきがけ研究期間内に、SII0822 転写因子が各種代謝経路の活性制御に重要な役割を果たしていることを明らかにし、SII0822 欠損株を物質生産プラットフォームとして使用していくための基礎的な知見を取得した。またこれらの知見に基づいて実際に代謝改変を行い、脂肪酸合成系の増強、および遊離脂肪酸の細胞外への排出等に関して、SII0822 欠損株が野生株に比べ高生産が可能な系であることを明らかにした。以上の点から SII0822 欠損株を用いた応用研究の導入段階までを達成することができたと考える。現段階では、この株に高蓄積しているグリコーゲンを炭素源として脂肪酸生合成系へ供給することが出来ていない。この株の長所を最大限に生かすためには、余剰糖を脂肪酸・油脂生産の原料とすることが必須であるため、今後はグリコーゲン量を減少させる方策を見つけ出し、結果の得られている代謝改変と統合することが最重要課題であると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

細胞体積が野生株の 5 倍、細胞あたりのグリコーゲン蓄積量は野生株の 10 倍にも達するシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の SII0822 転写因子欠損株について、さまざまな酵素遺

伝子を欠失・導入して、この株の代謝改変を行い、高蓄積しているグリコーゲンを、脂肪酸に変換し、最終的には油脂として蓄積させる研究を行っている。研究開始当初の想定を超える困難な状況を着実に突破し、論文や特許として成果を取りまとめ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CREST との融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、当初の目標についても更なる進展を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. Muramatsu M, Hihara Y. Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. J Plant Res. 2012, 125(1), 11–39.   |
| 2. Kaniya Y, Kizawa A, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Kaneko Y, Nishiyama Y, Hihara Y. Deletion of the transcriptional regulator cyAbrB2 deregulates primary carbon metabolism in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. Plant Physiol. 2013, 162(2), 1153–1163. |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 招待講演

- 2011/10/30–11/3 “cyAbrB transcriptional regulators and their physiological roles”  
The 6th German–Japanese Binational Seminar “Microalgal Products: From Metabolic Fundamentals to Promising Applications”
- 2013/3/22 「シアノバクテリアの順化応答と転写因子」  
第 54 回日本植物生理学会年会シンポジウム「進化的視点からシグナル伝達系を考える—シアノバクテリアから高等植物まで」
- 2013/11/20 「シアノバクテリアを用いた油脂生産系の構築」  
第 1 回 SUPER FORUM シンポジウム
- 2013/11/22 「cyAbrB 転写因子と代謝制御」  
ラン藻の分子生物学 2013
- 2013/11/30 「小さな藻類から大きなパワーを引き出す」  
埼玉大学・戸田市連携講座
- 2013/12/16–18 “Significance of the cyAbrB2 transcriptional regulator in metabolic regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803”  
Indo–Japanese Workshop, supported by DST–JSPS
- 2014/3/7 “Key transcriptional factors of light–harvesting and metabolic regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803”  
1st International Workshop of Cyanofactory

#### プレスリリース

- シアノバクテリアの代謝を制御する転写因子の働きを解明 —エネルギー・物質生産への応用に期待— (2013 年 5 月)  
<http://www.saitama-u.ac.jp/announce/20130507-2.pdf>