

シアノバクテリアから見出された増殖機構・環境適応機構の可塑性と有用物質生産への展開



東京農大学生命科学部 渡 辺 智

はじめに

原核藻類シアノバクテリアは多様な環境に生息し、太古の昔から地球環境を支えてきた。光合成の仕組みを最初に生み出した生物であり、葉緑体と共通の祖先をもつと考えられている。これまで大腸菌、枯草菌などのモデル微生物を用いた研究からDNA複製や転写、翻訳などの普遍的な生命現象が示された。一方、シアノバクテリアは細胞あたり複数コピーの染色体を有し、ゲノム構造や遺伝子の構成もモデル微生物とは異なっている。モデル微生物とは生き様の異なるシアノバクテリアが固有の細胞機能を備えていることは想像できるが、その詳細は不明であった。著者らはシアノバクテリアが可塑的なゲノム複製、分裂制御を有すること、様々なストレスに対して柔軟に応答するための環境適応機構を備えていることを明らかにした。またシアノバクテリアゲノム工学のための基盤技術を構築すると共に、シアノバクテリアを宿主とした有用物質生産系の構築に取り組んできた。これまでの研究概要を下記に示す。

1. シアノバクテリアのDNA複製と細胞増殖に関する研究

1-1. DNA複製の光依存性

シアノバクテリアにおける染色体コピー数の測定系、DNA複製活性の評価系を構築し、DNA複製に対する光や光化学系阻害剤の効果を解析した。その結果、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 (S. 7942) は細胞あたり2-8コピーの染色体を有すること、DNA複製は光に完全に依存し、光化学系電子伝達系の活性化がDNA複製に必要であることが示された(1, 2)。

1-2. DNA複製開始点と複製様式

大腸菌や枯草菌のゲノムにおいて複製開始点 ori および終結点 ter はゲノムのGC skewから推定が可能であり ori/ter はGの割合が高い領域と低い領域の境界に存在する。一方、淡水性シアノバクテリアのゲノムはG/Cの偏りが少ない特異なGC skewを示し ori/ter の推定は困難である(図1)。著者らは新規合成DNAをNGSにより定量的解析するRepli-seq法によりシアノバクテリアにおいて初めて ori の位置、複製様式を同定し

た。また新規合成DNAを顕微鏡観察し、複数コピー染色体の複製が染色体間で非同調的に起こることを発見した(1)。

1-3. ゲノムの細胞内分布・分配制御

Fluorescence *in situ* hybridization法によりS. 7942の複数染色体が細胞長軸に沿って均等に分布することを明らかにした(図2)。またプラスミドの分配を制御するParAタンパク質のホモログを欠損すると染色体分布異常やDNA損傷ストレスに対し感受性を示すことがわかった。ParAは、染色体分配を司るSMCやその構造的ホモログと相互作用することから、これらの因子と協調しながら細胞内の染色体分布に寄与すると考えられる(3)。

1-4. ゲノムコピー数の制御

大腸菌では定常期の細胞を新鮮な培地に移植するとDNA複製と細胞分裂が同期する。一方、S. 7942で同様の処理を行った場合では最初の分裂前にマルチラウンドの染色体複製が起こり、その後の複製は細胞分裂と同期しなかった。つまりシアノバクテリアの複製-分裂間の共役は厳密に制御されておらず、可塑的であることが示された(図3)(4)。

1-5. DNA複製の開始制御

DNA複製開始因子DnaAは大腸菌、枯草菌において必須であるのに対し*Synechocystis* sp. PCC 6803 (S. 6803) や糸状性シアノバクテリア*Anabaena* sp. PCC 7120 (A. 7120) は $dnaA$ を欠損しても顕著な表現型を示さない。一方、S. 7942において $dnaA$ 完全欠損株を取得し、そのゲノムを解析すると、 $dnaA$ 欠損株は内在性プラスミドpANLが染色体中へと挿入され、pANL挿入部位より複製が開始された。つまりS. 7942において $dnaA$ は必須であり、染色体の複製はプラスミドの複製機構によって代替できることがわかった(5)。S. 6803やA. 7120の $dnaA$ 非依存型複製についてさらに研究を進めている。

2. シアノバクテリアの環境応答に関する研究

2-1. 孤立二成分制御系シグナル伝達機構(TCS)のパートナーシップ

大腸菌、枯草菌において環境応答センサーであるヒスチジン

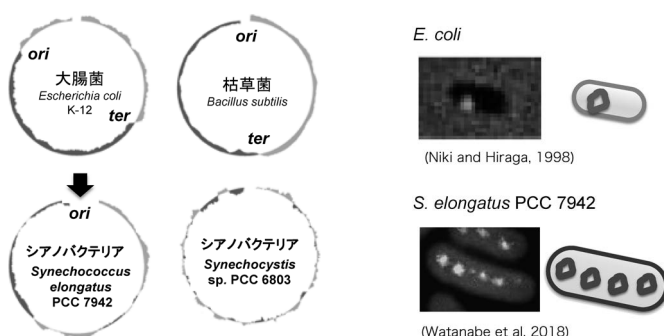


図1. GC skew の比較

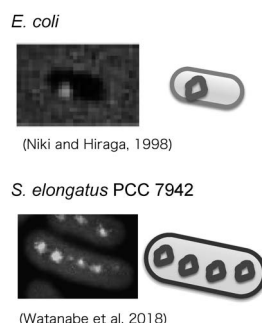


図2. 染色体 ori 領域の細胞内分布

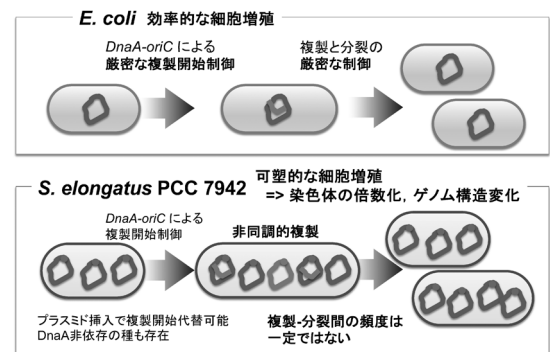


図3. シアノバクテリアに見出された可塑的な細胞増殖機構

キナーゼ (Hik) とレスポンスレギュレーター (Rre) はゲノム中でオペロン形成しておりパートナーを容易に推定できる。一方、シアノバクテリアではオペロンを形成する Hik-Rre が少なく、孤立した TCS が多いことがわかった。孤立 TCS についてタンパク質間相互作用解析とリン酸基転移解析を行い、新規パートナーを多数同定した。また複数の Rre と相互作用を示す Hik や多段階リン酸リレーの可能性を示した (6)。

2.2. 熱ショックタンパク質 (HSP) の特異的機能の解析

HSP70/DnaK, HSP40/DnaJ はバクテリアにおいて主要な HSP であり、ストレスから細胞を保護する働きを持つ。ゲノム解析からシアノバクテリアは全ての種において複数コピーの DnaK, DnaJ を持つことが示された。個々の機能解析やタンパク質間相互作用解析より、シアノバクテリアは熱や強光ストレス耐性だけでなく、光合成タンパク質の発現制御にも DnaK, DnaJ を利用することが明らかになった (7)。また真核生物において多様な役割をもつ一方、原核生物での機能が未知であった HSP90/HtpG について解析した結果、HtpG は変性タンパク質のリフォールディングに寄与するだけでなく、代謝酵素と直接相互作用してヘムの代謝調節に関わることも示された (8)。

3. シアノバクテリアを用いたゲノム工学技術構築と物質生産研究

3.1. シアノバクテリアゲノム工学技術の構築

複数コピー染色体を持つシアノバクテリアは遺伝子改変に手間と時間を要し、複雑なゲノム改変は困難である。この問題を解決するために、枯草菌ゲノム上で予め遺伝子改変を構築する新規ゲノム改変システムを構築し、シアノバクテリアゲノム改変の迅速化、大規模化に成功した。

3.2. シアノバクテリアによる物質生産研究

培地コストが低く植物よりも生育の早いシアノバクテリアは物質生産のホストとして有望である。物質生産のモデルケースとして医薬品や香料の原料となるベンゼン系化合物 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) に着目し、S. 7942 を用いて DOI 生産系を確立した (9)。現在、植物や藻類由来の高付加価値物質を生産するシアノバクテリアの分子育種に取り組んでいる。

おわりに

細胞内の酸化還元バランスが攪乱されると、有害な活性酸素種 (ROS) が発生する。ROS が発生しやすい細胞内環境をもつ光合成生物は ROS に対する防御機構を備える必要がある。大腸菌、枯草菌が高度に洗練された細胞増殖を行う一方、シアノバクテリアは DNA 複製開始や複製-分裂間の制御を可塑化することで染色体数を増やし、さらに孤立 TCS や HSP の機能多様化により細胞内外からのストレスに対する幅広い環境適応能力、頑強性を獲得したと考えられる。これら増殖機構・環境適応機構の可塑性は葉緑体にも見出される特徴であり、植物細胞の共生進化の歴史を紐解く上でも重要な発見である。

光から有機物を安価に生産できるシアノバクテリアは有用物質生産における究極のホストと言っても過言ではない。エネルギーの枯渇や、温暖化など地球レベルでの問題が深刻化する中で、これからシアノバクテリアが果たす役割は大きい。今後、シアノバクテリアの基礎と応用を両輪とした研究を進めることで、シアノバクテリアの産業利用の促進に貢献したい。

(引用文献)

1) Watanabe S, Ohbayashi R, Shiwa Y, Noda A, Kanesaki Y,

Chibazakura T, Yoshikawa H. Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes. *Mol. Microbiol.*, Vol. 83, p 856-865, (2012)

- 2) 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.*, Vol. 344, p 138-144, (2013)
- 3) Watanabe S, Noda A, Ohbayashi R, Uchioke K, Kurihara A, Nakatake S, Morioka S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H. ParA-like protein influences the distribution of multi-copy chromosomes in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology*, Vol. 164, 1, p 45-56, (2018)
- 4) Watanabe S, Ohbayashi R, Kanesaki Y, Saito N, Chibazakura T, Soga T, and Yoshikawa H. Intensive DNA replication and metabolism during the lag phase in cyanobacteria. *PLoS One*, Vol. 10, e0136800, (2015)
- 5) Ohbayashi R, Watanabe S, Ehira S, Kanesaki Y, Chibazakura T, and Yoshikawa H. Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution. *ISME J.*, Vol. 10, p 1113-1121, (2016)
- 6) Kato H, Watanabe S, Nimura-Matsune K, Chibazakura T, Tozawa Y, and Yoshikawa H. Exploration of a possible partnership among orphan two-component system proteins in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 76, p 1484-1491, (2012)
- 7) Watanabe S, Sato M, Nimura-Matsune K, Chibazakura T, Yoshikawa H. Protection of *psbA* transcript from ribonuclease degradation *in vitro* by DnaK2 and DnaJ2 chaperones of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 71, p 279-282, (2007)
- 8) Watanabe S, Kobayashi T, Saito M, Sato M, Nimura-Matsune K, Chibazakura T, Taketani S, Nakamoto H, Yoshikawa H. Studies on the role of HtpG in the tetrapyrrole biosynthesis pathway of the cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 352, p 36-41, (2007)
- 9) Watanabe S, Ozawa H, Kato H, Nimura-Matsune K, Hirayama T, Kudo F, Eguchi T, Kakinuma K, Yoshikawa H. Carbon-free production of 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 82, 1, p 161-165, (2018)

謝 辞 本研究は、東京農大学生命科学部 (旧応用生物科学部) バイオサイエンス学科にて行われたものです。学生の頃から今日に至るまで、終始ご指導を賜りました東京農業大学名誉教授 吉川博文先生、同大学教授 千葉櫻拓先生、同大学 荷村 (松根) かおり先生、武蔵野大学教授 門多真理子先生に心から感謝申し上げます。また東京工業大学教授 田中寛先生、Freiburg 大学教授 Wolfgang R. Hess 先生には、本研究を発展させるにあたり、公私に渡り親身にご支援いただきましたことを深く感謝いたします。日頃より温かいお言葉とご助言をいただきました立教大学名誉教授 河村富士夫先生、慶應義塾大学教授 板谷光泰先生、東京農業大学教授 朝井計先生に厚く御礼申し上げます。多くの共同研究者の先生方より貴重なご意見・ご助言を賜りました。全ての方のお名前を挙げることはできませんが、心から御礼申し上げます。本研究の成果は、東京農業大学バイオサイエンス学科、細胞ゲノム生物学研究室 (旧微生物分子遺伝学研究室) の修了生、在学生の皆様のご尽力、ご支援によるものです。皆様には改めて感謝の意を表します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関東支部長・浅見忠男先生 (東京大学大学院農学生命科学研究科教授) に厚く御礼申し上げます。