

シグマ因子 SigE 過剰発現によるシアノバクテリアバイオプラスチックの増産

小山内崇^{1, 2}・及川彰¹・沼田圭司³・豊岡公徳¹・佐藤繭子¹・桑原亜由子¹・飯嶋寛子¹・土肥義治³・斉藤和季^{1,4}・平井優美¹

1. 理化学研究所植物科学研究センター 2. JST さきがけ 3. 理化学研究所バイオマス工学研究プログラム
ム 4. 千葉大学薬学部

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

E-mail: tosanai@psc.riken.jp

Home Page: <http://labs.psc.riken.jp/msru/>

光合成微生物であるラン藻（シアノバクテリア）は、環境・エネルギー技術への応用展開が期待されている。本研究では、RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE を用いて、生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシブタン酸 PHB の増産を目指した。SigE 過剰発現により、PHB の合成酵素量が増加するとともに、培養液あたりの PHB 量が、野生株と比較して有意に増加することがわかった。我々は、代謝酵素ではなく、転写制御因子の改変による糖代謝制御という代謝工学の新しい方法論に挑戦している。

1. はじめに

微細藻類を用いたバイオエネルギー・バイオマテリアルの生産は、第三世代のバイオマス資源と位置付けられ、世界中で研究開発が進められている。日本でも、東日本大震災の被災地を活用した緑藻による油脂生産が国会で議論されるなど、社会的な注目を集めている。

本研究で用いているシアノバクテリアは、別名ラン藻とも呼ばれるが、他の藻類とは異なり原核生物である。酸素発生の光合成を行い、植物葉緑体の起源となった細菌であり、相同組換えによる遺伝子改変が可能なことから、基礎・応用研究のレベルで広く用いられている。中でも、*Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis*) は、もっと広く用いられている非窒素固定型のラン藻種である。非窒素固定型のラン藻は、窒素欠乏時に集光装置であるフィコビリソームを分解し、窒素栄養源とするとともに、グリコーゲンやポリヒドロキシブタン酸 (PHB) を蓄積する。

PHB は、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の一種であり、側鎖にメチル基を持つポリエステルである。*Synechocystis* の PHB は、アセチル CoA から三段階の反応で合成され、それらの反応には、PhaA, B, C, E の 4 つのタンパク質が関与する。先行研究により我々は、PHA 合成酵素の発現を制御する因子として、RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE を同定した[1,2]。SigE は、グリコーゲン異化、解糖系、酸化的ペントースリン酸

(OPP)経路などの糖異化遺伝子群の正の制御因子として知られている[1-5]。本研究では、この SigE を用いて、*Synechocystis* における糖異化の促進と PHB の増産を行った。

2. 解析データおよび方法

本研究では、野生株 (GT 株) を親株とし、光化学系 II 反応中心 D1 タンパク質 *psbAII* のプロモーターを用いて SigE 過剰発現株 (GOX50) を作製し、細胞内の変化を以下の方法で調べた。

mRNA 量はリアルタイム PCR、タンパク質量はウェスタンブロット、代謝産物量はキャピラリー電気泳動 マススペクトロメトリー (CE-MS)、PHB 解析は抽出・精製・秤量、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、および NMR 測定により行った。

3. 結果と考察

SigE 過剰発現株では通常培養条件下で、糖異化酵素が mRNA、タンパク質レベルで増加することが知られている[2]。これらの遺伝子発現変化により、SigE 過剰発現では、グリコーゲン量の減少とアセチル CoA やクエン酸の増加が見られる[2]。本研究では、PHB が合成される窒素欠乏下での遺伝子発現および代謝の変化を、

野生株および SigE 過剰発現株で調べた。

窒素欠乏 3 日後のタンパク質量を調べたところ、SigE 過剰発現株では、グリコーゲンホスホリラーゼ GlgP、イソアミラーゼ GlgX、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ G6PD が、野生株と比べて有意に増加していることがわかった。また、多くの糖異化酵素が、窒素欠乏時に増加することがわかった。

次に、PhaA, B, C, E タンパク質量を調べるために、大腸菌を用いた GST 融合タンパク質の発現、精製を行った。PhaB, C, E については精製を行い、組換えタンパク質を用いた抗体作製を行った。PhaA に関しては、精製過程での分解が見られたため、合成ペプチドを用いて抗体を作製した。

PhaA, B, C, E タンパク質量を測定したところ、SigE 過剰発現株で、PhaB, C, E が通常培養条件下で増加していることがわかった。また、両株ともに窒素欠乏が進むにつれ、すべての PHA 合成酵素が増加すること、SigE 過剰発現株では、PhaA タンパク質量が野生株よりも有意に増加することがわかった。

窒素欠乏時の PHA 量を、クロロホルム、ヘキサン、メタノールを用いた抽出・精製により調べたところ、培養開始時の窒素源濃度に関わらず、SigE 過剰発現株で増加することがわかった (図 1)。現在解析中であるが、これまでのところ、野生株と SigE 過剰発現株では、PHA の分子量は類似しており、両株ともに PHB のみが合成されることがわかっている。

これまでに SigE 過剰発現株では、グリコーゲン量が減少することが知られているが、CE-MS の結果より、SigE 過剰発現株では、糖リン酸、糖ヌクレオチドなどの量が増加することがわかった。また、窒素欠乏時にクエン酸量が増加することがわかった。これらの結果を踏まえると、PHB 量の更なる増加には、多糖類や TCA サイクルへの代謝の流れを減少させることが有効であることが示唆された。

4. 今後の展望

本研究では、酸素発生型光合成微生物であるラン藻を用いてバイオプラスチックの増産を目指している。我々の培養条件では、糖や油などの炭素源を用いず、二酸化炭素ガスを炭素源として細胞を培養している。ラン藻細胞内の PHB 蓄積量(乾燥細胞重量あたり)は、従属栄養細菌である *Ralstonia eutropha* に比べると一桁低い。しかしながら、シグマ因子を用いた PHB 生産により、野生株の 2 倍以上の PHB 量 (培養液あたり) を得ることができた。代謝工学では、酵素の改変や過剰

発現が最もオーソドックスな方法であるが、我々は、転写制御因子を用いた代謝改変という新しい方法論でのバイオプラスチック生産を目指している。これらの新手法では特許取得が可能だけでなく、転写制御因子改変株を解析により、「意外な代謝関連因子」を見つけることができる。一例を挙げると、光受容体フィトクロム遺伝子 *cph1* が、糖異化・PHA 合成酵素遺伝子と同様に、SigE 制御下にあることがわかっている。また、SigE 過剰発現株では、光合成電子伝達活性や細胞サイズが変化する。これらの結果は、糖代謝と光合成電子伝達および細胞形態の密接な相互作用を示唆しているかもしれない。基礎研究の成果を利用して応用展開を行うことが本流であると思われるが、我々の研究では、応用研究を進める過程で基礎研究の重要な発見が可能であると考え、ラン藻転写制御因子改変株を用いた研究を進めている。

参考文献

- [1] Osanai T, *et al.*: J. Biol. Chem., 280, 30653-30659 (2005)
- [2] Osanai T, *et al.*: J. Biol. Chem., 286, 30962-30971 (2011)
- [3] Osanai T, *et al.*: J. Biol. Chem., 280, 30684-30690 (2005)
- [4] Osanai T, *et al.*: DNA Res., 31, 185-195 (2006)
- [5] Osanai T, *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 6860-6865 (2009)

図1 培養液100mlあたりの PHB量

