

光合成微生物システムバイオロジー

吉川 勝徳*¹・古澤 力^{1,2}・平沢 敬¹・清水 浩¹

石油資源の枯渇や二酸化炭素による環境問題が懸念される中、持続可能な環境調和型社会の実現にむけ、光合成微生物を用いたバイオ燃料生産が着目されている。光合成微生物は、光合成により細胞に固定した二酸化炭素をもとにバイオ燃料や化成品原料を生産することが可能であり、グルコースや植物バイオマスといった炭素源が不要である。また、他のバイオマスを用いた物質生産と比較し、食料や土地の競合問題を回避でき、持続可能な物質生産プロセスとして有用である。このような側面から、光合成微生物を用いたバイオエネルギー生産を実現化することが期待されている。すでに、光合成微生物を用いて光合成により、炭化水素や油脂、水素、ブタノールなどのバイオ燃料生産の研究が進んでいる。また、光合成微生物にグリコーゲンを生産させ、それをバイオマスとして酵母などに資化させることでバイオ燃料を生産する研究も行われている。このようななか、効率的に細胞を育種することで、光合成微生物によるバイオエネルギー生産の早期実現が望まれる。

システムバイオロジー

システムバイオロジー解析は、トランスクリプトームやプロテオーム、メタボローム、代謝フラックスなどの情報を統合的に解析し、細胞をシステムとして理解することを目指す。このような観点を育種に応用した、合理的な細胞育種が試みられている(図1)。コンピュータ上に既知の全代謝反応を再構築したゲノムスケール代謝モデルを用いて、物質生産性の向上に向けた代謝改変戦略を導出する。戦略に基づき構築した代謝改変株について代謝フラックス解析やマルチオミクス解析により細胞内の情報を解析する。得られた結果をもとに、再び代謝改

変戦略を導出し評価するといった過程を繰り返す。このような戦略は大腸菌や酵母などを用いた物質生産の研究において成功をおさめている。

しかし、光合成微生物においてはシステムバイオロジー解析による研究は少ないのが現状である¹⁾。トランスクリプトームやプロテオーム解析を用い、光応答や培養環境の変化による遺伝子やタンパク質の発現量の変化の解析などが行われているものの、メタボローム解析や代謝フラックス解析、それら統合した研究は少ない。また、光合成微生物における代謝フラックス解析は、大腸菌などのグルコースを炭素源とする微生物を対象とするのに比較し高度な技術が要求されるなど、技術開発が必要な段階でもある。筆者らは光合成微生物におけるシステムバイオロジー解析の技術の開発を進めており、以降では、ゲノムスケール代謝モデルや代謝フラックス解析を中心に解説する。

ゲノムスケール代謝モデル ゲノムスケール代謝モデルとは、既知の細胞内の全代謝反応をコンピュータ上で再構築した *in silico* 代謝モデルである。代謝モデルを用いることで、遺伝子改変や培養条件が代謝に与える影響を予測することが可能である。筆者らの研究グループでは、光合成のモデル生物である *Synechocystis* sp. PCC 6803 株において、ゲノムスケール代謝モデルを構築した。KEGGやMetaCycなどのデータベースや文献などより代謝反応を取得し、500程度の代謝物質と代謝反応を含む代謝モデルを構築した²⁾。本モデルを用いて培養条件が代謝状態に与える影響を予測し(図2)、後述する代謝フラックス解析により実験的に得られた代謝フラックスと比較したところ、よく一致することを見いだした。また、他の研究グループにおいても光合成微生物のゲノムスケール代謝モデルが構築されており、二酸化炭素の取込み速度や光量などの培養条件が増殖や代謝の流れに与える影響が解析されている³⁾。さらに、光化学系の電子伝達経路を詳細に代謝モデルに組み込むことで、強光ストレス時における増殖速度の低下を引き起こす機構を示した研究も報告されている⁴⁾。このような代謝モデルを用いることで、遺伝子改変や培養条件が代謝に与える影響を予測し、目的物質の生産性の向上につながる代謝改変戦略の導出に利用できると期待される。

代謝フラックス解析 代謝フラックス解析は、安定同位体を用いて、細胞内の代謝フラックスを定量する手法である。一部の炭素原子を¹³Cで標識した基質を用い

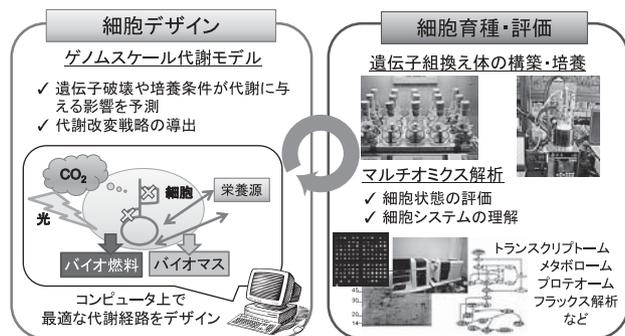


図1. システムバイオロジーに基づく育種戦略

*著者紹介 ¹大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻(特任助教) E-mail: yoshikawa@ist.osaka-u.ac.jp
²理化学研究所生命システム研究センター

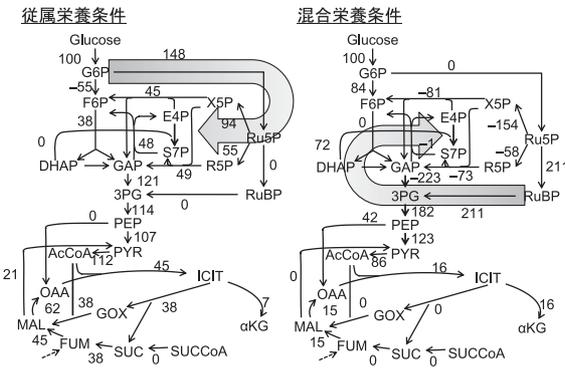


図2. ゲノムスケール代謝モデルを用いた *Synechocystis* sp. PCC 6803 株の代謝フラックスの予測結果例。従属栄養条件は、グルコースのみを炭素源とし光合成を行わない条件、混合栄養条件は、グルコースを炭素源とし光合成を行う条件とした。値は、予測した代謝フラックスを示し、グルコースの取込み速度を100に規格化した値である。負の値は矢印と逆方向へのフラックスを示す。

たとき、 ^{13}C は通過する代謝経路に依存して各代謝物質に分布する。そのため、各代謝物質中の ^{13}C で標識された割合（ ^{13}C 濃縮度）を測定することで、代謝フラックスを求めることができる。これまで、酵母や大腸菌で行われている ^{13}C 標識グルコースを用いた代謝フラックス解析では、連続培養や対数増殖期など代謝の定常状態において ^{13}C 標識基質を資化させ、各代謝物質の ^{13}C 濃縮度が定常となるまで培養する。その後、質量分析計などにより測定した ^{13}C 濃縮度から代謝フラックスを求める。このように、グルコースなどの複数の炭素数を持つ基質の場合、 ^{13}C 濃縮度の定常において各代謝物質の ^{13}C 濃縮度は代謝状態を反映して異なり、代謝フラックスを求めることができる。シアノバクテリアにおいても、グルコースを栄養源とする条件下で、代謝フラックス解析が行われている^{5,6)}。

しかし光合成による二酸化炭素のみを炭素源とする条件（光独立栄養条件）では、二酸化炭素は1炭素分子であるため、同様の手法を用いることができない。 ^{13}C 標識二酸化炭素を用いた場合では、 ^{13}C 濃縮度の定常において全代謝物質の ^{13}C 標識比率が等しくなり、代謝状態の情報を失うためである。しかし、代謝物質の ^{13}C 濃縮度が定常に到達するまでの経時変化の情報も代謝状態を反映する。そこで、 ^{13}C 標識二酸化炭素を用いる場合は、 ^{13}C 濃縮度の経時変化の情報が必要となる（図3）^{7,8)}。筆者らは、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株を光独立栄養条件下で培養し、 ^{13}C 標識炭酸塩を培地に添加した。その後の細胞内代謝物質の ^{13}C 濃縮度の変化を最短1分間隔で解析した。また、中枢代謝経路の代謝物質が ^{13}C で標識されていく過程を表現する連立微分方程式を構築し、測定した ^{13}C 濃縮度の経時変化の情報に対して、代謝フ

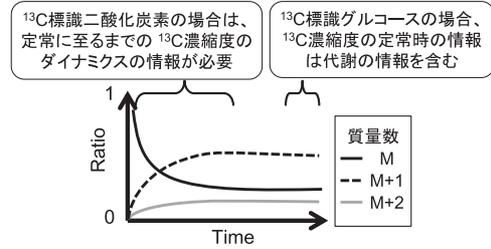


図3. ^{13}C 標識基質を細胞に取り込ませたときの代謝物質中の ^{13}C 濃縮度の経時変化の概念図

ラックス分布をフィッティングすることで、代謝フラックスを求めることに成功した⁹⁾。

システムバイオロジー解析 筆者らは、上述のように構築した技術を用いて、システムバイオロジー解析に基づき光合成微生物の代謝機構の解析を進めている。筆者らは、光独立栄養条件と、光合成阻害剤を加えグルコースのみを基質とする光合成阻害条件において、代謝フラックス解析、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析により統合的に細胞状態を解析した。結果、光合成阻害条件では、酸化リン酸化経路の代謝フラックスが増大しており、関連するようにその経路の代謝物質濃度や遺伝子発現量の増加もみられた¹⁰⁾。また、筆者らは *Synechocystis* sp. PCC 6803 株の中枢代謝経路に関する遺伝子について網羅的な遺伝子破壊株の構築を進めている。本株を用いて遺伝子破壊による細胞状態の変化をシステムバイオロジー解析をすることで、光合成微生物の細胞システムの詳細な理解を目指している。

今後の展望

光合成微生物のシステムバイオロジーは、解析技術が整備された段階にある。今後、光合成微生物におけるシステムバイオロジー解析が進むことで、細胞システムの理解が深まり、また光合成微生物を利用したバイオエネルギー生産の実現が期待される。

文 献

- 1) Jamers, A. *et al.*: *Aquat. Toxicol.*, **92**, 114 (2009).
- 2) Yoshikawa, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 347 (2011).
- 3) Knoop, H. *et al.*: *Plant. Physiol.*, **154**, 410 (2010).
- 4) Nogales, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **4**, 202 (2012).
- 5) Yang, C. *et al.*: *Metab. Eng.*, **4**, 202 (2002).
- 6) 仲嶋 翼ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p.188 (2011).
- 7) Avantika, A. *et al.*: *Phytochemistry*, **68**, 2302 (2007).
- 8) Young, J. D. *et al.*: *Metab. Eng.*, **13**, 656 (2011).
- 9) 仲嶋 翼ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p.59 (2012).
- 10) 吉川勝徳ら：日本農芸化学会2012年度大会講演要旨集, 3B19p19 (2012).