

# 研究報告書

## 「多様な光スイッチの開発による細胞外多糖生産の光制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 成川 礼

### 1. 研究のねらい

本研究提案は、これまでに私が同定してきた新規光センサー群を利用し、光受容部位と制御系との新たな組み合わせを創出し、転写活性や酵素活性を光により厳密に制御することで、シアノバクテリアにおいて高効率な物質生産系の確立を目指します。これまでに私は、シアノバクテリアから紫／緑色光センサー、青／緑色光センサー、赤／緑色光センサーなど多様な新規光質センサーを同定してきました。また、これらの光センサーが走光性や光依存的な細胞凝集などの光応答現象を制御していることも解明されつつあります。光センサーの光感知機構や細胞レベルでの制御機構について、さらなる基礎的な解析を進めることで、後述する光スイッチ開発のための基盤データ取得を目指します。

緑色光や遠赤色光は光合成にあまり利用されないため、これらの光を制御光として用いることで、光合成活性をあまり損なうことなく光質制御が可能です。また、化学物質添加による制御では、物質を除くことが困難な故に、操作が不可逆ですが、光による制御は培地に何も添加する必要がなく、培地の再利用により何度も制御が可能である点でも非常に有用です。これらの特性に着目し、まずは、緑色光と遠赤色光の間で変換する光スイッチを開発します。光感知からのシグナル伝達としては、セカンドメッセンジャーに着目します。特に、c-di-GMP を結合して活性化するセルロース合成酵素が同定されているため、c-di-GMP 合成型光スイッチの開発を目指します。また、cAMP 結合型転写因子とその結合 DNA 配列がよく分かっているため、転写制御系として、cAMP 合成型光スイッチの開発を目指します。これらの制御系を組み合わせることで、代謝フローを改変しつつ、酵素活性を直接的に制御し、高効率な生産系構築が期待されます。将来的には、セルロース合成酵素以外の糖転移酵素に関しても、光による制御を試みることで、より汎用性のある制御系を構築したいと考えています。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

光合成生物は光をエネルギーとして利用し、それ故に最重要な情報としても認識し、高度な光応答機構を備えています。一方、光合成による物質生産を産業化するには、生産効率向上が必須です。シアノバクテリアにおいては、主に、シアノバクテリオクロムと呼ばれる光センサーが、多様な光質を感知し、走光性や光依存的な細胞凝集等を制御していることが解明されつつあります。本研究では、シアノバクテリオクロムによる光感知機構の解明・受容光質の改変・光センサーと制御系の新たな組合せの創出を通じ、シアノバクテリアにおいて、細胞外多糖、特にセルロースの生産を光で制御する系の構築を目指しました。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A: 遠赤／緑色光変換型光スイッチの開発に向けて

光合成による物質生産を光で制御する際、光合成の生産性を維持するためには、光合成の光質と制御の光質を分離する必要があります。開発対象のシアノバクテリアは青・橙～赤色光を光合成に用いるため、遠赤色光と緑色光を制御光として用いることで、光合成の生産性を下げずに光による制御が可能になると期待できます。そこで、本研究では、遠赤色光と緑色光の間で変換する光スイッチの創出を目指し、以下の研究を行ってきました。開発土台として、これまでに光変換機構の解明が進んでいる、赤／緑色光変換型光センサーを選定しました。

1. 赤／緑色光変換型光センサーの機構・構造解明 (Narikawa R et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013)

赤／緑色光変換型光センサーである AnPixJg2 の赤色光吸収型の結晶構造を決定しました。これにより、色素とタンパク質の相互作用の詳細が明らかとなり、特定の光質を吸収する仕組みに対する理解が深まり、吸収光質改変に向けた情報基盤が整ったといえます。

2. 赤／青色光変換型光センサーの発見 (Narikawa R et al. Biochemistry, 2014)

赤／緑色光変換型サブファミリーの中から、赤／青色光変換型光センサー (AM1\_1186g2) を発見しました。AM1\_1186g2 の赤色光吸収型は赤／緑色光変換型と同様ですが、赤色光照射により、過渡的にシステイン残基が色素と共有結合を形成することで、青色光吸収型に変換することを見いだしました。

3. 遠赤／橙色光変換型光センサーの開発 (特願 2014-202984, Narikawa R et al. Sci. Rep., 2015)

赤／緑色光変換型光センサーは本来、フィコシアノビルリンという色素を結合しますが、それよりも長波長の光を吸収する色素であるビリベルジンを結合するタンパク質を、アカリオクロリスというシアノバクテリアから探索しました。その結果、AM1\_1557g2 がフィコシアノビルリンだけでなく、ビリベルジンも高効率で結合し、遠赤色光と橙色光の間で変換することを見いだしました。

### 研究テーマ B: セカンドメッセンジャーを介した光制御

セカンドメッセンジャーを介した情報伝達は、情報の増幅・拡散に有利なため、c-di-GMP と cAMP に着目し、その制御系の理解と新たなスイッチの開発を目指しました。

1. c-di-GMP を介したセルロース生産制御機構の解明 (Enomoto et al. J. Biol. Chem., 2014 の一部)

先行研究として、好熱性シアノバクテリアにおいて、低温光条件下でセルロースを蓄積し細胞が凝集すること、青色光依存的 c-di-GMP 合成酵素がその凝集を制御することが明らかになっていました。私は、セルロース合成酵素に存在する推定 c-di-GMP 結合ドメインを欠失させることで、この光依存的細胞凝集が消失することを見いだしました。また、青／緑色光センサ

一型 c-di-GMP 合成酵素の色素結合領域を、赤／緑色光センサー型に置換することで、緑色光下で c-di-GMP 合成が活性化されるキメラタンパク質の取得に成功しました。

## 2. 光スイッチによる cAMP 生産制御系の構築

赤／緑色光変換型光センサードメインと cAMP 合成酵素ドメインとの融合タンパク質を、リンカーの長さを変えた形で網羅的に作製し、赤／緑色光条件下での活性を測定しました。その結果、赤色光下で cAMP 合成が活性化されるキメラタンパク質の取得に成功しました。

## 3. 今後の展開

このように本研究では、シアノバクテリアの光感知機構の解明とそれを基にした光スイッチの開発を行ってきました。研究テーマ A に関しては、新規に発見した赤／青色光センサーにビリベルジンを結合させることができれば、遠赤／緑色光スイッチが構築可能と考えています。また、研究テーマ B の成果を基に、cAMP によるセルロース合成酵素遺伝子の転写制御と c-di-GMP によるセルロース合成酵素や他の代謝酵素の活性制御を組み合わせ、シアノバクテリア細胞内でセルロースの生産を光制御できると考えています。まだ開発途上ではありますが、今後、さらに解析を進めることで、光合成の生産性を下げることなく、光によって細胞外多糖生産を光制御できると考えています。また、細胞外多糖を蓄積すると細胞は凝集しますので、物質生産と共に細胞回収も行うことができ、より効率的なシステムが構築できると期待しています。今回は、セカンドメッセンジャーに絞って光制御系構築を目指しましたが、将来的には、多様な酵素ドメインに光センサーを融合することで、様々な代謝の光制御系構築をしていきたいと考えています。

## 4. 評価

### (1) 自己評価

(研究者)

私の研究では、「光受容」と「セカンドメッセンジャーを介したシグナル伝達」を要素技術として、最終的には、それらを組み合わせることでセルロース生産の光制御系の構築を目指しました。要素技術の開発については、三年間でそれぞれ成果を出すことができたと自負しています。特に前者に関しては論文 3 本を出すことができました。また、まだ論文としてまとまる段階にはありませんが、構想当初には予想していなかったような成果も得られています。研究実施体制としては、2 年間研究補助者を雇用することで、研究を大幅に加速することができました。また、HPLC、分光光度計、光源、細胞培養器、細胞破碎機などを購入することで、適切に実験環境を構築することができました。研究期間中に研究成果に関してプレスリリースを二回行い、特許も一件出願中であり、社会への波及効果も大きいと考えています。

(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)

(研究総括)

「多様な光スイッチの開発による細胞外多糖生産の光制御」というタイトルだが、「多様な光スイッチの開発」という点においては、大きな成果をあげたと評価できる。特に、色素結合

領域の結晶構造決定と遠赤色光センサーの発見という研究成果については、それぞれ論文発表、プレスリリースを行っており、社会への波及効果という点でも優れている。ただし、開発した「多様な光スイッチ」を基にした「細胞外多糖生産の光制御」については、3年の期間では十分に研究を進展できなかったといえる。後者についても、期間終了後の進展を大いに期待している。また、成川研究者は本さきがけ研究の成果が認められ、日本ゲノム微生物学会での研究奨励賞受賞、静岡大学へのプロモーション、科研費若手 A の予算獲得などに成功している。これらは成川研究者が今後、世界的に当該研究分野を牽引していく人材として有望であることを意味しており、本さきがけ研究が成川研究者の飛躍につながったと確信している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Narikawa R, Ishizuka T, Muraki N, Shiba T, Kurisu G, Ikeuchi M. Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2013, 110, 918–923.
2. Narikawa R, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Fushimi K, Ikeuchi M. A new type of dual-Cys cyanobacteriochrome GAF domain found in cyanobacterium *Acaryochloris marina*, which has an unusual red/blue reversible photoconversion cycle. Biochemistry, 2014, 53, 5051–5059.
3. Enomoto G, Nomura R, Shimada T, Ni-Ni-Win, Narikawa R, Ikeuchi M. Cyanobacteriochrome SesA is a diguanylate cyclase that induces cell aggregation in *Thermosynechococcus*. J. Biol. Chem., 2014, 289, 24801–24809
4. Narikawa R, Nakajima T, Aono Y, Fushimi K, Enomoto G, Ni-Ni-Win, Itoh S, Sato M, Ikeuchi M. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll d-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. Sci. Rep., 2015, 5, 7950

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.  
発 明 者: 成川 礼、佐藤守俊、池内昌彦  
発明の名称: 蛍光を発する複合体  
出 願 人: 静岡大学  
出 願 日: 2014/10/1  
出 願 番 号: 2014-202984

### (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)

受賞

2013 年日本ゲノム微生物学会研究奨励賞

プレスリリース



1. 「新規光受容体シアノバクテリオクロムの立体構造決定 ―光による細胞制御へ期待―  
(2012年12月18日)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20121218/index.html>

2. 「遠赤色光を吸収する光変換・蛍光タンパク質を発見 ～光スイッチや蛍光プローブへの応用に向けて～」(2015年1月22日)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150122-2/index.html>