

2024年2月15日

## 光合成微生物シアノバクテリアにおける新奇プラスミド複製因子の発見

### ポイント

- ・ 光合成微生物であるシアノバクテリア (\*1) が持つプラスミド (\*2) の複製に関わるタンパク質 CyRepX (Cyanobacterial Rep-related protein encoded on pSYSX)を同定しました。また複数のシアノバクテリア種に保存されていることをゲノム情報解析により明らかにしました。
- ・ CyRepX が複製に関わる他のタンパク質と類似した構造を持つことが立体構造予測により示唆されました。
- ・ CyRepX を導入した発現ベクター (\*3) を開発し、既存のベクターと併用して外来遺伝子を発現できることを示しました。
- ・ シアノバクテリアはカーボンニュートラルな有用物質生産ホストとして期待されており、本研究で開発されたベクターはシアノバクテリアの産業利用を加速させる新たな遺伝子工学ツールとして期待できます。

### 発表論文

本研究成果は国際学術誌「Frontiers in Microbiology」のオンライン版に掲載されました。

著者： Kazuma Ohdate, Minori Sakata, Yutaka Sakamaki, Kaisei Maeda, Kaori Nimura-Matsune, Ryudo Ohbayashi, Wolfgang R. Hess and Satoru Watanabe

タイトル： Discovery of Novel Replication Proteins for Large Plasmids in Cyanobacteria and Their Potential Applications in Genetic Engineering

掲載誌名： Frontiers in Microbiology (2024)

掲載日：現地時間2月14日

### 概要

東京農業大学大学院バイオサイエンス専攻、大館和真、坂田実乃里 修士課程学生、坂巻裕 博士課程学生（研究当時）、荷村（松根）かおり 博士研究員、渡辺智 准教授、東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所、前田海成 助教、静岡大学理学部、大林龍胆 助教および Freiburg 大学 Wolfgang R. Hess 教授らの研究グループは、光合成微生物であるシアノバクテリアのプラスミド複製に関わるタンパク質 CyRepX を新たに同定し、これを用いたベクターを開発しました。

### 発表内容

CO<sub>2</sub>を固定しつつ炭素化合物を合成する光合成微生物シアノバクテリアは、大腸菌や枯草菌などのモデル微生物とは異なり、複数の大型のプラスミドを持つ種が数多く見つかっています。プラスミドは細胞内で複製されることで維持されますが、複製機構が同じプラスミドは同じ細胞では共存できません（不和合性と呼ばれます）。シアノバクテリアが複数のプラスミドを同じ細胞に持つということは、それぞれのプラスミドの複製機構が異なっており、互いに協調しながら細胞機能を担うと考えられます。しかしながら、シアノバクテリアにおいてプラスミドの複製に関する情報は極めて限られていました。

*Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 PCC 6803) は一番最初に全ゲノム配列情報が完全解読されたシアノバクテリアであり、主染色体の他に 4 つの大型プラスミド (pSYSM, pSYSX, pSYSA, pSYSG) を持つことが知られています (図 1)。研究グループは、これまでに pSYSA の複製に関わる因子 CyRepA を同定しましたが (文献 1, 2)、他の大型プラスミドの複製因子は不明でした。本研究では PCC 6803 のゲノムライブラリーを用いた網羅的スクリーニングを実施し、新たに複製活性を持つ領域を二箇所 (*slr6031*、*slr6090* 遺伝子) 見つけました (図 2)。この二つの遺伝子は共に pSYSX 上に存在しており、配列が酷似していることから同様の機能を持つホモログであると考えられました。

*slr6031*、*slr6090* 遺伝子がコードするタンパク質 Slr6031、Slr6090 は幅広いシアノバクテリア種に保存されている一方で、その機能は配列情報だけからでは全くわかりませんでした。そこで立体構造予測プログラムを用いて解析を進めた結果、Slr6031、Slr6090 の立体構造が他の微生物が持つ DNA 複製関連タンパク質と似ていることに気がつきました。次に *slr6031*、*slr6090* 遺伝子を用いて発現ベクター-p6031 および p6090 を構築し異種のシアノバクテリアである *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (以下 PCC 7942) を用いて複製活性を評価しました。p6031 および p6090 は共に PCC 7942 において保持されたことから、Slr6031/Slr6090 を新規の複製因子として CyRepX (Cyanobacterial Rep-related protein encoded on pSYSX) と命名しました (図 3 左)。

さらに研究グループは p6031/p6090 の有用性を検証しました。CyRepA 配列を用いて作られた pYS ベクターと比較すると、CyRepX を搭載する p6031/p6090 ベクターの細胞内でのコピー数は少なく、GFP の発現量や安定性は低いことがわかりました。しかし興味深いことに、PCC 7942 細胞内において p6031/p6090 は pYS や他のプラスミドと共存できることが示され、PCC 6803 の細胞内で起こっている「プラスミド同士の協調」を人為的に再現することができました (図 3 右)。

シアノバクテリアはカーボンニュートラルな次世代の有用物質生産ホストとして期待されています。CyRepX の発見はシアノバクテリアにおけるプラスミド複製の理解だけでなく、新しい遺伝子工学ツールの開発にも貢献できる画期的な成果です。

## 今後の展望/波及効果

CO<sub>2</sub> 削減と物質生産を両立させるシアノバクテリアを用いたものづくりは時代のニーズに合った技術です。CyRepX を用いたベクター-p6031/p6090 は既存のベクターと組み合わせ使用できることが示されており、シアノバクテリアの産業利用を加速させる新たな遺伝子工学ツールとして期待ができます。また本研究はシアノバクテリアの基礎研究の発展にも大きく貢献できます。シアノバクテリアではプラスミドの複製機構についても情報が乏しく、CyRepX の発見が DNA 複製やゲノム科学分野に新たな知見をもたらすと期待できます。

本研究は、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 先端的低炭素化技術開発 (ALCA) (JPMJAL1608)、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) (JPNP17005)、JSPS 科研費 (20K05793、23H02130、JP22J13447) および生物資源ゲノムセンターの共同利用・共同研究拠点事業の支援を受けて実施されました。

## 用語注釈

\*1 シアノバクテリアは藍藻とも呼ばれる原核微細藻類です。植物の葉緑体の祖先生物と考えられており植物と同様の酸素発生型光合成により増殖します。シアノバクテリアは多種多様な生物群であり海、湖沼、氷河など地球上の様々な環境に生息しています。増殖に有機炭素源を必要とせず、光合成により CO<sub>2</sub> を吸収しながら成長すること、さらに植物よりも増殖が早いことから、持続型物質生産を可能とする次世代ホストとして世界中で注目されています。

\*2 プラスミドとは、微生物の細胞内に存在する DNA 分子で、染色体 DNA とは別のシステムで独立して複製します。大腸菌などでは 10 kbp 程度のプラスミドが一般的ですが、シアノバクテリアは例外的に 100 kbp 規模の巨大なプラスミドを保持する種が多く見つかっています。

\*3 発現ベクターとは、細胞内での遺伝子発現のために設計されたプラスミドです。発現ベクターには、発現させる配列 (本研究の場合、GFP 遺伝子) やその発現を制御するための配列、マーカー遺伝子 (薬剤耐性遺伝子など) に加え、ホストの細胞内での複製に必要な“自律複製領域”が必要です。本研究で構築した p6031 および p6090 ベクターは大腸菌の複製開始領域 ColE1 とシアノバクテリアの複製のための領域として CyRepX を持っており、大腸菌とシアノバクテリアの両方の細胞内で複製できます。このようなベクターをシャトルベクターと呼びます。

### 参考文献

1. Kaltenbrunner et al., Regulation of pSYSA defense plasmid copy number in *Synechocystis* through RNase E and a highly transcribed asRNA, *Front Microbiol.*, 2023, 1112307.
2. Sakamaki et al., Characterization of a cyanobacterial rep protein with broad-host range and its utilization for expression vectors, *Front Microbiol.*, 2023, 1111979.

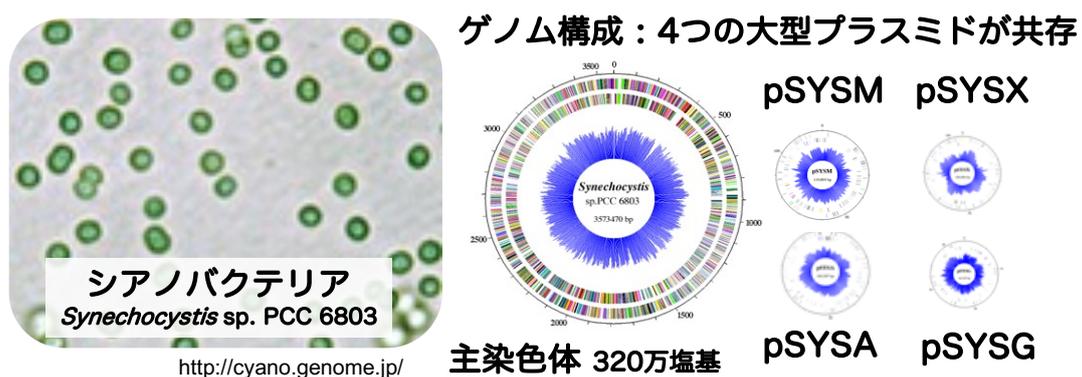


図 1. シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム構成

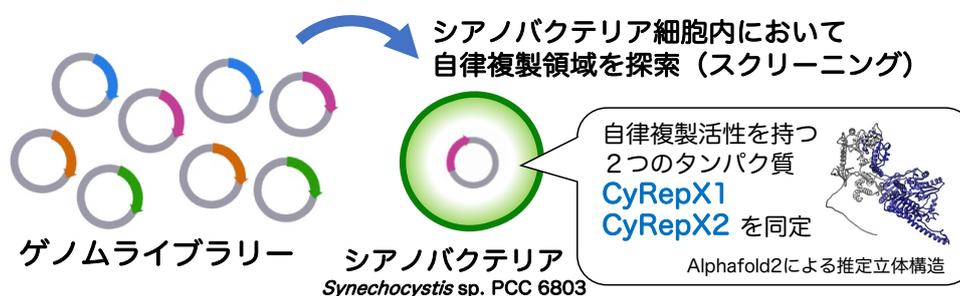


図 2. シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の自律複製領域の探索

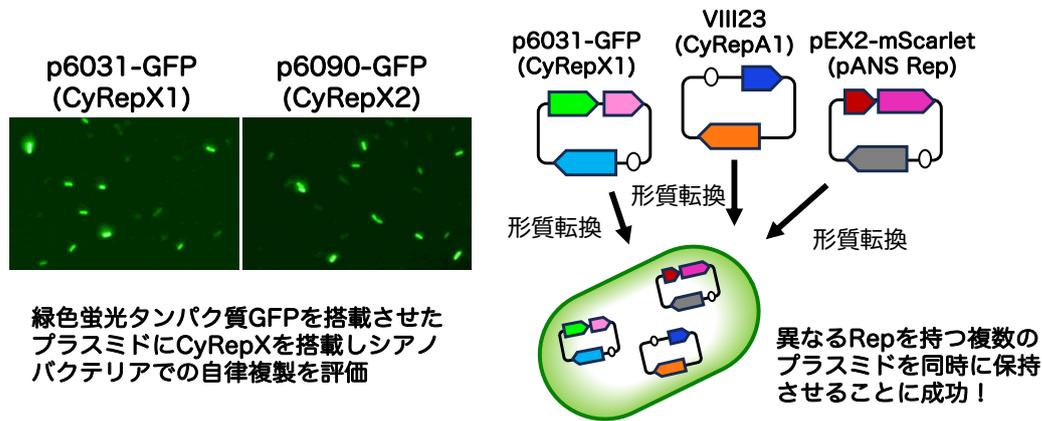


図3. 異種シアノバクテリア (PCC 7942) を用いた CyRepX の有用性評価

【本件に関するお問い合わせ】

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1  
 東京農業大学生命科学部バイオサイエンス学科 准教授  
 渡辺 智 (わたなべ さとる)  
 Email : [s3watana@nodai.ac.jp](mailto:s3watana@nodai.ac.jp)  
 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1  
 東京農業大学 企画広報室  
 E-mail : [info@nodai.ac.jp](mailto:info@nodai.ac.jp)  
 TEL : 03-5477-2650 FAX : 03-5477-2804

〒226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259  
 東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 助教  
 前田 海成 (まえだ かいせい)  
 Email : [kmaeda@res.titech.ac.jp](mailto:kmaeda@res.titech.ac.jp)  
 〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1  
 東京工業大学 総務部 広報課  
 E-mail : [media@jim.titech.ac.jp](mailto:media@jim.titech.ac.jp)  
 TEL : 03-5734-2975 FAX : 03-5734-3661

〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836  
 静岡大学理学部 生物科学科 助教  
 大林 龍胆 (おおばやし りゅうどう)  
 Email : [ohbayashi.ryudo@shizuoka.ac.jp](mailto:ohbayashi.ryudo@shizuoka.ac.jp)  
 〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836  
 静岡大学 総務部 広報・基金課  
 Email : [koho\\_all@adb.shizuoka.ac.jp](mailto:koho_all@adb.shizuoka.ac.jp)