The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	網羅的遺伝子発現解析を用いたシアノバクテリアの強光耐性機構に関する研究
Author(s)	小川, 健一
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76658
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

網羅的遺伝子発現解析を用いた
シアノバクテリアの強光耐性機構に関する研究

提出先　　大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2020 年 1 月

小 川　健 一

学位取得に関わる発表論文

学術雑誌

[1] Kenichi Ogawa, Katsunori Yoshikawa, Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu, "Transcriptome analysis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mechanisms of photoinhibition tolerance under extreme high light conditions." Journal of Bioscience and Bioengineering, **126**(5):596-602, 2018 (博士論文第 2 章)

国際会議

[1] Kenichi Ogawa, Katsunori Yoshikawa, Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu, "Development of high-light stress tolerant strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by adaptive evolution", The 13th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, GIM2016-0133, Wuhan, China, Oct. 2016 (博士論文第 3 章)

特許出願

[1] 永久保 雅夫, 清水 浩, 吉川 勝徳, 小川 健一, 戸谷 吉博, 松田 史生, "藻類及び藻類の製造方法", 公開番号 P2017-184681A, 公開日 2017 年 10 月 12 日

内容梗概

シアノバクテリアは、光合成を行う微細藻類の一種であり、酸素発生型の光合成を行う微生物である。シアノバクテリアは植物が生育できない海域などにおいても増殖可能であることや、単位面積あたりの生産性が高いことから、燃料や化学品などの分野において生産宿主として注目されている。しかしシアノバクテリアは、強い光強度によって細胞が損傷する光阻害によって、真夏の日中などに生産性が低下するという課題を有する。細胞に光阻害への耐性を付与すれば、光強度が強い環境でも物質生産性を維持することが可能となり、通年での生産性を向上させることができる。本研究は、シアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 に光阻害への耐性を付与する手法を開発した。

1 章は、本研究の背景と目的について述べた。

2 章は、これまで明らかとなっていなかった、増殖が阻害される強光条件でのシアノバクテリアの応答を初めて解析した。フォトバイオリアクターを用いた *Synechocystis* sp. PCC 6803 の培養試験の結果、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の光合成能力に対し光強度が不足する弱光条件、十分な光強度である中光条件、増殖速度が低下するほど光強度が過剰な強光条件の 3 条件が存在することを示した。さらに各条件で培養した細胞について遺伝子発現解析を行った結果、先行研究において弱光条件から中光条件で確認されていた応答が、強光条件においてより強い応答として示されることが明らかとなった。具体的には、集光機能を担う機能カテゴリー“Phycobilisome”、“Photosystem I”やクロロフィルなどに関わる遺伝子の発現量が低下し、“Chaperones”や“CO_2 Fixation”および“Photosystem II”の反応中心である D1 タンパク質のターンオーバーに関わる遺伝子の発現量が増加することが示された（以下“機能カテゴリー名”を示す)。さらに強光条件特有の応答として、鞭毛の合成に関わる遺伝子やピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼやシグマファクター（*sigA* 、*sigF*）の発現量低下が明らかとなった。

3 章は、弱光条件で増殖速度が低下することなく、強光条件で増殖速度の維持が可能な強光耐性株を初めて構築し、その耐性機構を解析した。試験管を用いた強光条件下での植え継ぎ培養の結果、野生株が増殖できない強光条件においても増殖速度が低下しない強光耐性株を獲得した。野生株と耐性株に対して中光条件と強光条件で網羅的遺伝子発現解析を行った結果、耐性株は“Phycobilisome”に関わる遺伝子と *slr1912* の発現量低下により、“Photosystem II”へのエネルギー伝達量が低減されることが示唆された。さらに耐性株は、*isiA* の発現量が増加することで“HLCC”を形成し、“Photosystem II”へのエネルギー伝達量が低減すると共に酸化ストレスから D1 プロテインやチラコイド膜を保護することで、“Photosystem II”が強光によって損傷することを防ぐことが示唆された。3 章で示された耐性株の強光耐性機構と 2 章で示された野生株における強光への応答機構を比較した結果、*slr1912* の発現量低下と *isiA* の発現量増加が耐性株特有の機構であることが示された。中

でも *isiA* の発現量増加は、エネルギー伝達量を減し酸化ストレスから保護することで、強光による“Photosystem II”の損傷を防ぐことが示唆されており、強光耐性を付与する手法として最有力であることが示された。

4 章は、*isiA* の過剰発現がシアノバクテリアへ強光耐性を付与すると共に、弱光条件での増殖速度を維持することを初めて明らかにした。3 章で示された仮説に基づき *isiA* 過剰発現株を構築し、弱光条件、中光条件および強光条件で培養した。培養試験の結果、*isiA* 過剰発現株は弱光条件で野生株と同等の増殖速度を示し、野生株が増殖できない強光条件においても速い増殖速度を示すことが明らかとなった。

5 章は、本研究の結果をまとめ、本研究より得られた強光耐性の付与に関する知見がシアノバクテリアを用いた物質生産にどのように貢献できるかを論じ、今後の展望について述べた。

目次

第 1 章 緒論 1

1.1 シアノバクテリアを用いた有用物質生産 1

1.2 シアノバクテリアに対するストレス 3

1.3 光合成系と光阻害 5

1.4 植え継ぎ培養による育種 8

1.5 網羅的遺伝子発現解析 10

1.6 本研究の目的と構成 12

第 2 章 6 種の光強度における遺伝子発現解析 15

2.1 緒言 15

2.2 実験材料と実験方法 17

2.2.1 使用菌株 17

2.2.2 培養 17

2.2.3 クロロフィル定量解析 19

2.2.4 網羅的遺伝子発現解析 19

2.3 結果と考察 21

2.3.1 増殖速度 21

2.3.2 クロロフィル定量解析 22

2.3.3 網羅的遺伝子発現解析 23

2.3.4 光強度による遺伝子発現プロファイルの変化 28

2.3.5 強光条件で特有な応答の解析 31

2.4 結言 34

第 3 章 強光耐性株の構築と遺伝子発現解析 37

3.1 緒言 37

3.2 実験材料と実験方法 39

3.2.1 培養 39

3.2.2 植え継ぎ培養 40

3.2.3 シングルコロニーアイソレーション 41

3.3 結果と考察 42

3.3.1 植え継ぎ培養 42
3.3.2 耐性株の増殖速度 43
3.3.3 クロロフィル定量解析 48
3.3.4 網羅的遺伝子発現解析 49
3.3.5 菌株間の遺伝子発現プロファイルの差異 56
3.3.6 菌株間の発現量が顕著に変化した遺伝子 64
3.4 結言 69
第 4 章 *isiA* の過剰発現による強光耐性付与の検証 72
4.1 諸言 72
4.2 実験材料と実験方法 73
4.2.1 *isiA* 過剰発現株の作成 73
4.3 結果と考察 74
4.3.1 増殖速度 74
4.4 結言 77
第 5 章 結論 78
5.1 結果のまとめ 78
5.2 本研究の寄与 80
5.3 今後の展望 82
参考文献 89
謝辞 103

第 1 章 緒論

1.1　シアノバクテリアを用いた有用物質生産

近年、温室温暖化や化石燃料の枯渇などが大きな問題となっている。国連気候変動に関する政府間パネル（IPCC）は、人類活動によって現時点までに約1℃の気温が上昇しており、今後もCO_2排出量が削減されなければ気温上昇が1.5℃を超えることで、海水面の上昇や生物多様性の減少などを引き起こし、人類の食糧や健康なども脅かされると警告する(Masson-Delmotte *et al.*, 2018)。

これらの問題の解決のために、植物のデンプンやセルロースを出発原料とし、微生物の発酵機能を利用して、バイオ燃料などの有用化学物質を生産する試みが行われている(Stephanopoulos, 2007)。微生物の発酵生産は、古くから、アルコール・発酵食品・アミノ酸・抗生物質などの生産に活用されてきた技術である (Kourkoutas *et al.*, 2004; Motoki and Seguro, 1998)。植物バイオマスを原料とした発酵による物質生産は、植物が大気中から固定化したCO_2を原料として使用するため、化石資源を原料とした場合に比べ大気中のCO_2の増加に与える影響が小さい（カーボンニュートラル）とされ（Song *et al.*, 2008)、バイオ燃料を中心に普及が進んでいる。2016年には、米国やブラジルを中心に世界で1300 億Lのバイオ燃料が生産され、市場規模は約18兆円に到達した（Zion Market Research, 2017)。さらに、国際再生可能エネルギー機関 International Renewable Energy Agency（IRENA）は、持続可能な社会の実現に向け、2030年に世界でのバイオ燃料生産量を5000 億Lと、2016年の実績に対し約4倍へ増加させるシナリオを発表している（IRENA, 2017)。しかしながら、植物バイオマスを用いた物質生産においては、原料が食料と競合することで食料価格高騰の一因になることや、作付面積が限られるなどの問題が指摘されており、他のバイオマス資源の生産が求められている。

そこで注目されているのが、シアノバクテリアである。シアノバクテリアは、光合成を行う微細藻類の一種であり、酸素発生型の光合成を行う微生物である。シアノバクテリアを用いた物質生産は、従来、ドコサヘキサエン酸などの必須脂肪酸を含有するという特徴を活用した食品や飼料の添加剤製造や、稚魚の飼料であるワムシの餌として活用されてきた。近年、シアノバクテリアは植物が生育できない海域などにおいても増殖可能であることや、単位面積あたりの生産性が高いことから、燃料や化学品など消費量の大きい分野においても注目を集めている（Satyanarayana *et al.*, 2011)。太陽光をバイオマスに変換するエネルギー効率は、植物が3%以下に留まるのに対し，シアノバクテリアは3-9%と高い変換効率を示す(Ducat *et al.*, 2011)。単位面積あたりの生産性においても、高等植物であるイネが19 ton/ha/year、サトウキビが50 ton/ha/yearであるのに対し (横山 他、2008)、シアノバクテリアは実験室で220 ton/ha/year、屋外での試験においても91 ton/ha/yearと数倍以上高い値を示す (National Academies Press, 2012)。また微生物発酵を活用する場合は植物による“CO_2 Fixation”と微生

物を用いた発酵変換の2段階の工程が必要であったが、シアノバクテリアを用いた場合は“CO_2 Fixation”と発酵変換を1段階の工程で行うことが可能であり、必要な設備の大幅な削減が見込まれる。シアノバクテリアはこのような物質生産に適した性質を持っているため、今後の大きな成長が予測されている（Sharma *et al.*, 2014）。

	植物バイオマスを用いた 従属栄養微生物による物質生産	シアノバクテリアを用いた物質生産
反応	二酸化炭素 → デンプン → 目的化合物 植物　微生物	二酸化炭素 → 目的化合物 シアノバクテリア
バイオマスの生産場所	耕作地	池や海
光合成のエネルギー効率 (バイオマスのエネルギー/ 受光エネルギー)	3%	8%
単位面積当たりの バイオマス生産速度 (t/ha/year)	19 (イネ) 50 (サトウキビ)	220 (実験室) 91 (屋外)

Fig. 1-1 植物バイオマスを用いた従属栄養微生物による物質生産とシアノバクテリアを用いた物質生産の比較

シアノバクテリアなどの微細藻類を用いた物資生産を実用化するため、培養装置の開発や培養条件に関する研究が盛んに行われている。シアノバクテリアの培養装置は、Raceway pondと呼ばれる楕円型の循環水路に撹拌パドルがついた設備が一般的であり、建設や運用コストを安価に抑えることができる（Chen *et al.*, 2009）。しかしRaceway pondは環境条件が培養条件に影響を与えることや、雑菌汚染を防ぎにくいという欠点を持ち、培養を安定させることが難しい。そこで、チューブ型やフラットパネル型などの閉鎖系の培養装置が開発され、周辺環境と遮断した培養環境を作成し培養を安定化させる試みが行われている（Chen *et al.*, 2009）。閉鎖系においても、装置コストが高くなることや洗浄に要する労力が大きいなどの課題を有しており、技術開発が進められている（Brennan and Owende, 2010）。一方培養条件については、目的化合物の濃度上昇や増殖速度の向上に向け、窒素濃度（Illman *et al.*, 2000）、リン濃度（El-Sheek *et al.*, 1995）、 硫黄濃度（Sato *et al.*, 2000）、塩分濃度（Guckert *et al.*, 1990）、光（Bandarra *et al.*, 2003）に関する検討が行われている。これらの研究に加え、*Synechocystis*属や*Synechococcus*属といったモデル生物を中心に遺伝子工学的な手法を用いた菌株育種も進められ、有用化合物種の拡大や生産効率の向上が報告されている（Wang *et al.*, 2012; Gudmundsson and Nogales, 2015）。これまでにシアノバクテリアが生産した有用化合物として、アルコール（Gao *et al.*, 2012）、アルデヒド（Atsumi *et al.*, 2009）、オレフィン（Guerrero *et al.*, 2012）、テルペン（Lindberg *et al.*, 2010）、有機酸（Angermayr *et al.*, 2014）、糖（Ducat *et al.*, 2012）などが報告されている。

1.2　シアノバクテリアに対するストレス

あらゆる生物は生育環境の変化に晒されながら生育している。環境変化が生物の生育に悪影響を与えるストレスとなった場合、弱いストレスは生育速度を低下させ、強いストレスは生物を死に至らしめる。生物のストレスに対する対処は、環境が変化する時間の長さによって 2 種類に分類される。比較的短時間の場合は、ストレスによる生物の損傷を低減しながらも、環境がもとに戻った後の環境で速い増殖を示すものが有利になる。一方、環境変化が長時間継続される場合は、変化後の環境で速い増殖を示すもとが有利になる。一般的に、前者の対処は「応答」、後者の対処は「適応」と呼ばれる（藤原・跡見、2015)。適応の能力は自然界の生育だけでなく、発酵産業において優れた性質を持つ微生物を育種する技術にも活用されている。

ストレスの種類は、温度や圧力および光などの物理的な環境変化、基質（炭素源・窒素源・電子受容体など）や溶質（pH、塩濃度）などの化学的な環境変化、外敵やウイルスなどの生物的な環境変化の 3 種類に大別することができる（藤原・跡見、2015)。微生物を用いた発酵プロセスにおいても、ストレスによる反応速度や収率の低下は大きな課題である。物理的な環境変化や化学的な環境変化に対しては、計測装置や反応装置の制御方法を開発することで、様々な物理化学的な変化を低減する工夫がなされている。また基質を徐々に添加する流加培養や、基質の添加と同時に培養液の抜き取りも行う潅流培養といった生物工学プロセスの開発や、ストレスに耐性のある菌株の選定および育種の開発が進められている(Jarboe *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008)。生物的な環境変化としては主に雑菌汚染が挙げられ、特に食品産業では製品の品質を維持する上で雑菌汚染の抑制が重要課題となる。これに対する対策としては、苛性ソーダなどを用いた装置洗浄と蒸気を用いた滅菌処理を採用することや、培養中に外部から雑菌が入らないよう装置内を外部より高い圧力に制御するなどの対策がよく用いられている。

シアノバクテリアを用いた物質生産においても、低コストで高い生産性を達成するには様々なストレスへの対処が求められる。これは、閉鎖系の培養装置を用いると物理的な環境は制御できるものの装置や運転のコストが高くなりやすく、栄養源についても安価な工業副産物を用いると不純物が多く含まれるためである。また一般的な培養プロセスよりもさらにコストを削減するには、工場排ガスや排液といった有害な物質を含むものを培地成分として利用することが求められる場合もある。シアノバクテリアなどの微細藻類を用いた燃料生産に取り組む電源開発株式会社の松本は、培養において保有すべき能力として、1.速い生育、2.高い光合成活性、3.強光耐性、4.温度耐性、5.塩濃度耐性、6.せん断応力耐性、7.付着性なし、8.酸素耐性、9.雑菌汚染耐性を挙げている（松本、2016)。このように、シアノバクテリアは多くのストレスに応答する能力が求められるため、ストレス応答について多くの研究が行われている。シアノバクテリアの研究事例として、強光（Hihara *et al.*, 2001）や紫外線（Huang *et al.*, 2002)、高温（Inaba *et al.*, 2003）や低温（Suzuki *et al.*, 2001)、

塩濃度（Kanesaki *et al.*, 2002）や酸化還元（Hihara *et al.*, 2003）が報告される。

1.3　光合成系と光阻害

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行う微生物である。酸素発生型光合成は、2 種類の光化学反応中心タンパク質複合体がチラコイド膜上に存在し、両者が協調的に機能することで、光エネルギーを化学的エネルギーに変換している（三室、2003)。2 種類の反応中心タンパク質複合体はそれぞれ、“Photosystem II”(Zouni *et al.*, 2001)、“Photosystem I”(Jordan *et al.*, 2001）と呼ばれる。“Photosystem II”において 2 分子の水を分解した結果、4 分子のプロトン、4 電子と 1 分子の酸素が発生する。この 4 電子がチラコイド膜中の“Cytochrome b_6f *complex*”を移動した後、“Photosystem I”において 2 分子の $NADP^+$を還元して 2 分子の NADPH を生じる。また電子の移動などによって生じたチラコイド膜間のプロトン勾配を利用し、3 分子から 4 分子のプロトンごとに、“ATP synthase”が 1 分子の ADP と 1 分子のリン酸（Pi）から 1 分子の ATP を合成する。この ATP がカルビンサイクルで消費されることで空気中の二酸化炭素が固定化される。このように、シアノバクテリアは光エネルギーを利用して ATP や NADPH を合成することでエネルギーを獲得し、空気中の二酸化炭素を固定化することで生育する。

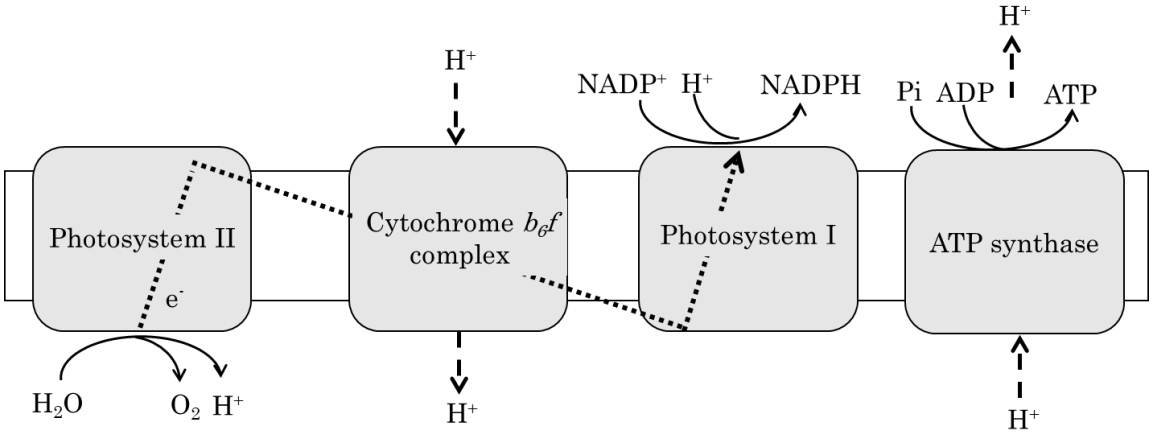

Fig. 1-2 シアノバクテリアの光合成系におけるATPとNADPH合成
実線は化学反応を、点線は電子やプロトンの移動を示す。

シアノバクテリアは温度や pH だけでなく光強度の変化に対しても適応しながら生育している。細胞の消費能力を超えて光を吸収すると、光合成の効率が低下するだけでなく過剰なエネルギーによって細胞が損傷を受けるためである。この現象は、1956 年に Kok が微細藻類の一種であるクロレラに強光を照射する実験により発見し、光阻害と呼んだ（Kok, 1956)。光阻害を防ぐため、シアノバクテリアは集光アンテナの縮小や細胞中の“Photosystem”密度の減少（Björkman, 1981; Anderson, 1986)、“Photosystem I”と“Photosystem II”の集光量を調節するステート遷移や熱放散（Campbell *et al.*, 1998;

Niyogi, 1999)、細胞の保護機構の強化（Grace and Logan, 1996）などの適応を示すことが確認されている。しかし、真夏の日中のような光強度が強い環境（光強度 2000 ~ 2500 µmol m^{-2} sec^{-1})では、適応が間に合わず、光合成系が損傷し光合成能力が低下することで増殖が阻害される。光阻害は、“Photosystem”の損傷や活性酸素による酸化ストレスを引き起こすが、最も損傷を受けるのは“Photosystem II”であることがわかっている（Aro *et al.*, 1993)。光阻害による損傷強度は、細胞が実際に吸収した光量や吸光時の細胞状態によって変化する。そのため光阻害が発生する光強度は必ずしも一定ではなく、シアノバクテリアの種類や、細胞中の光合成色素の密度、細胞密度、培養液の高さや光の波長分布により変化する（Hanelt, 1998; Jokiel *et al.*, 1984)。また光の照射方法によって培養槽内の光強度の分布が変化し、通気条件や攪拌条件も培養液の流動性を通じて菌体が光を受ける時間に影響するため、培養系によって光阻害が発生する光強度は変化する。

光阻害のメカニズムは、従来、活性酸素による“Photosystem II”の損傷という説が有力であった。光によって光合成が駆動する際、光合成の電子伝達系は活性酸素を発生する(Asada, 1999)。強光条件では活性酸素の発生量が増加し、酵素や抗酸化剤などによる消去能力を超えるため、酸化ストレスが生じてしまうというメカニズムである（Karen *et al.*, 1997; Miyao *et al.*, 1995)。この説は、アクセプターサイド説や電荷再結合説などと呼ばれ、盛んに研究されていたが、活性酸素が“Photosystem II”の修復は阻害するが損傷には影響しないことや（Nishiyama *et al.*, 2001)、“Photosystem II”の損傷は弱光条件でも生じ、その速度は光強度と比例的であること（Nishiyama *et al.*, 2004; Allakhverdiev *et al.*, 2004）など、活性酸素による“Photosystem II”損傷のメカニズムでは説明できない現象も確認された。その結果、現在は、“Photosystem II”内のマンガンクラスターの崩壊を引き金とした“Photosystem II”の損傷が原因であるという説が有力となっている（Nishiyama *et al.*, 2011; Murata *et al.*, 2012)。 この説は、“Photosystem II”のマンガンクラスターが直接光を吸収する際に損傷を受け、その後、クロロフィルが吸収する可視光によって反応中心が損傷を受けるというものである。このように光阻害のメカニズムについては盛んに研究され、“Photosystem”で生じる現象については理解が進んできている。

強光への応答については、培養条件を弱光条件（光強度 20 ~ 30 µmol m^{-2} sec^{-1}）から強光条件（200 ~ 500 µmol m^{-2} sec^{-1}）へ変化させ、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の経時変化を解析する研究が盛んに行われてきた（Hihara *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008)。先行研究により、細胞の吸光量を減少させる機構として、クロロフィル濃度の減少（Hihara *et al.*, 1998)、“Photosystem I”濃度の低下(Murakami *et al.*, 1991; Hihara *et al.*, 1998)、“Phycobilisome”濃度の低下（Grossman *et al.*, 1993）などが報告されている。また細胞が吸収した過剰なエネルギーを逃がす機構として、光合成のアンテナ（Ruban *et al.*, 2007）や“Photosystem II”反応中心(Ivanov *et al.*, 2008）におけるエネルギーの散逸が知られている。さらに、過剰な光エネルギーによって生じた損傷を回復させるため、一重項酸素の除去（Telfer, 2005)、“Photosystem II”の反応中

心タンパク質 D1 の合成による“Photosystem II”の修復（Komenda *et al.*, 2007）が報告されている。しかし、調査されている条件は、実験室で作成される強光条件は光強度 200 ~ 500 µmol m^{-2} sec^{-1} 程度のものが多く、真夏の日中のように増殖が阻害されるほどの強光条件(光強度 2000 ~ 2500 µmol m^{-2} sec^{-1})においてどのような応答が生じるか解明されていない。また、従来の研究の多くが弱光条件と強光条件の 2 条件を対象に解析を行っているため、光強度の増加に伴いどのように応答が変化するかは明らかとなっていない。

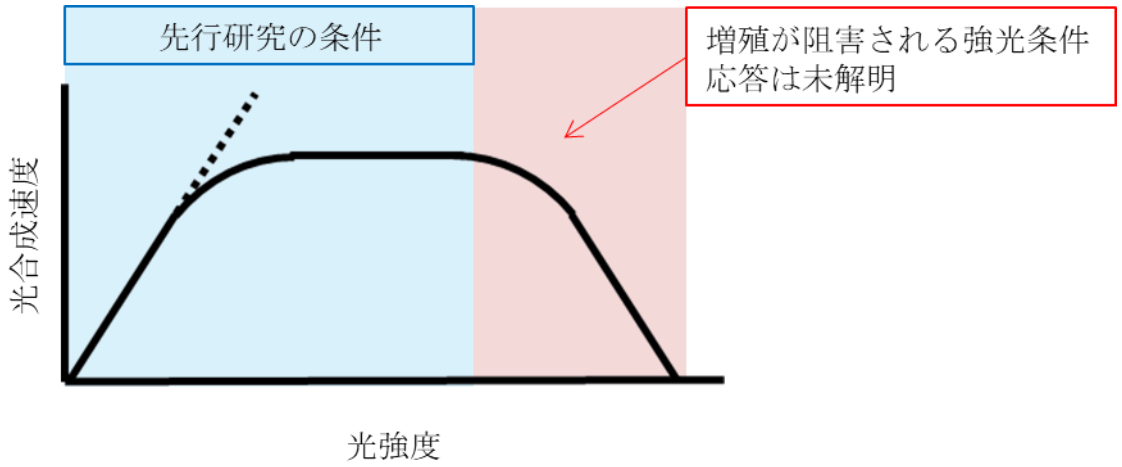

Fig. 1-3 光強度と比増殖速度の関係および先行研究での試験条件
実線は各光強度における実際の光合成速度を示す。点線は光合成速度が光強度に比例であると仮定した場合の光合成速度を示す。

光阻害の解決に向け、強光耐性株の構築に関する研究も行われている。これらの多くが、細胞が吸収する光の量を自ら減らすために、光合成のクロロフィルアンテナのサイズを縮小するものである（Nakajima *et al.*, 1999; Meils, 2009）。サイズ縮小株は野生株に比べて細胞あたりの集光量が抑えられるため、強光条件かつ高菌体密度での光合成効率を改善することができる。しかし、低菌体密度や弱光条件では細胞に吸収されずに透過する光量が増加してしまうため、光合成効率が低下してしまう。自然光で培養する場合、午前中や夕方は光強度が低くなることが避けられず、また培養初期は菌体密度が相対的に低くなるため、低菌体密度や弱光条件における効率低下は大きな課題となる。この課題の克服には、光強度に合わせて自在にアンテナサイズを操作することが望まれるが、アンテナサイズの調節におけるメカニズムは十分解明されておらず、そのような遺伝子操作は達成されていない。そのため、強光に耐性を持ちつつ低菌体密度や弱光条件においても光合成効率が低下しない菌株の構築が求められている。

1.4　植え継ぎ培養による育種

微生物は様々な環境変化に適応することが可能だが、最適な条件から大きく離れた環境は菌体の代謝活性を低下させ、最悪の場合死滅させてしまう。そのため微生物を用いた物質生産において高い生産性を達成するには、微生物に悪影響を与えるストレスの低減が重要となる。ストレス低減に向けた技術開発として、反応装置の適切な制御方法の開発と共に、ストレスに耐性のある菌株の選定および育種が行われてきた（Jarboe *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008）。

古くより用いられる育種は変異育種であり、変異剤の添加や紫外線の照射により変異を導入し、目的とする形質を選択培地などによりスクリーニングするという二段階の実験で行われる（Rowlands, 1984）。このランダムな変異育種は、ゲノム情報や生物システムに関する知見が乏しい微生物に対しても適用可能である。現在までに、エタノール耐性 (Ogawa *et al.*, 2000) やアミノ酸生産 (Demain, 2000) など、数多くの有用微生物株が育種されてきた。変異育種は、遺伝子変異が高頻度で生じるため、目的とする形質と無関係あるいは有害な変異も発生する確率が高くなってしまう（Ohnishi *et al.*, 2005）。そのため、目的とする形質に影響した変異の特定が難しく、目的に応じてその都度新たな変異株を得る必要がある。さらに、変異育種は有害な変異が同時に生じてしまうことで、物質の生産能力は高いものの、その増殖能力は野生型株よりも劣っている菌株が取得されるケースも報告されている（Ikeda, 2003）。このように、変異育種は簡便であり知見の少ない微生物にも適用可能という長所があるが、有害な変異の発生や目的形質の獲得要因が解明できないといった課題を有する。一方、分子生物学の発達により遺伝子組換え技術などの技術が発達すると、人為的に遺伝子の改変を行うことによる育種が可能となった（Cohen *et al.*, 1973）。遺伝子組換えを行うためには、細胞内のストレスへの応答機構や耐性機構を理解する必要性がある。変異育種した菌株に対し網羅的分析技術を用いて解析することで、生物システムの理解に取り組む研究が行われている（Yomano *et al.*, 1998）。また、変異株は目的とする形質に寄与しない変異も含まれているため、目的物質に関連する代謝経路に絞って解析を行う事例が報告されている (Ikeda *et al.*, 2006)。しかし、解析対象の絞り込みが難しい場合は、どの変異が目的形質に寄与しているか判断することは難しい。

生物の適応力を利用した育種技術についても、開発が進められている。生物は環境に適応する力を持ち、ストレスにより増殖速度が低下する環境におかれても、徐々に環境に適応することで増殖速度を増加させることが観察される。これは、生物の塩基配列や遺伝子発現などの変化により多様な形質が生まれ、自然淘汰により環境適者が生存することにより起こる現象と考えられており、進化の一種と言える。このような現象を実験室での育種に用いる手法として、植え継ぎ培養系での長期間培養が行われてきた（Helling *et al.*, 1987; Lenski *et al.*, 1993）。長期間の植え継ぎ培養による育種は、自然淘汰により適応した形質を有するものが選択されるため、そのような遺伝子変異が生じる頻度が低くなると期待される。また、

獲得されたストレス耐性株が類似のストレスについても耐性を示す例も報告されている(Atsumi *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2014)。そのため、植え継ぎ培養により得られた菌株と元の株を、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析、メタボローム解析などの網羅的分析技術により比較することで、遺伝子組み換えの戦略検討に有用な情報が取得できる。植え継ぎ培養と網羅的分析技術を組み合わせた例として、大腸菌における高温ストレス（Riehle *et al.*, 2003）、エタノールストレス（Horinouchi *et al.*, 2010）、グリセロールや乳酸資化(Fong *et al.*, 2005; Herring *et al.*, 2006）が報告されている。シアノバクテリアにおいても*Synechocystis* sp. PCC 6803 は全ゲノムが同定されており（Kaneko *et al.*, 1996)、酸性ストレス（Uchiyama *et al.*, 2015)、アルコールストレス（Matsusako *et al.*, 2017）について、植え継ぎ培養で取得された耐性株の網羅的解析が行われている。

1.5　網羅的遺伝子発現解析

近年、計測技術や解析技術の進歩により、安価で高速に細胞内の情報を網羅的に解析する手法が開発され、遺伝子組み換えの戦略立案に重要な役割を果たしている。網羅的解析技術の中で最初に注目を集めたのが、遺伝情報であるゲノムの塩基配列の解読である（Sterky and Lundeberg, 2000）。ゲノムの塩基配列解読技術の開発により、変異育種によって獲得された変異株と野生株のゲノムを網羅的に比較することが可能となり、目的性質に寄与する変異の探索が行われた。変異育種とゲノム配列の解析により物質生産性が向上した事例として、リジン生産株の取得が報告されている（Ikeda *et al.*, 2006）。

ゲノム配列の解読の他にも網羅的解析手法として、電気泳動などを用いたタンパク質の網羅的解析技術（Kurian *et al.*, 2006）、質量分析計を用いた細胞内外の代謝物の網羅的な解析技術（Monton and Soga, 2007）に加えて、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現量の網羅的な解析技術が開発された（Lipshutz *et al.*, 1999）。遺伝子発現の変化は、生物が環境変化へ応答する上で重要な役割を担っている。従来、遺伝子発現を解析する手法として、ノザンブロットや逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が用いられていたが、解析対象を限定する必要があった（DeRisi *et al.*, 1997）。しかし、DNA マイクロアレイが開発されたことで、一度の分析でほぼ全遺伝子を対象とする網羅的な解析が可能となった。DNA マイクロアレイは、多数の DNA 断片をガラスなどの基盤上に高密度に配置したデバイスであり、それぞれの DNA 断片は特定遺伝子のプローブになる塩基配列を含む。網羅的遺伝子発現解析は、生物のストレスに対する応答の解析で頻繁に用いられている。培養に適した環境とストレス環境で培養した微生物の遺伝子発現を比較することで、ストレスによって誘導あるいは抑制が生じた遺伝子を同定することができる（Huang *et al.*, 2002; Gunasekera *et al.*, 2008）。また、ストレス耐性に寄与する遺伝子の探索においても、網羅的遺伝子発現解析が用いられる。例えば、醸造に用いられる酵母の高いエタノール耐性に着目し、醸造用酵母と実験室酵母の遺伝子発現量を比較することで、エタノールストレス耐性に関与する遺伝子群が抽出された例が報告されている（Hirasawa *et al.*, 2007; Shobayashi *et al.*, 2007）。このように網羅的遺伝子発現解析は、野生株でストレスに応答する遺伝子の解析や耐性株においてストレス耐性に寄与する遺伝子群の抽出に有効な解析手法である。

シアノバクテリアの一種である、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の全ゲノム配列が、光合成を行う生物として初めて解読されたことで（Kaneko *et al.*, 1996）、網羅的遺伝子発現解析が可能となった。研究事例としても、*Synechocystis* の低温（Suzuki *et al.*, 2001）に始まり、浸透圧（Kanesaki *et al.*, 2002）、熱（Inaba *et al.*, 2003）、酸化還元（Hihara *et al.*, 2003）、紫外線（Huang *et al.*, 2002）など、野生株のストレス応答について多く報告されている。また、DNA マイクロアレイを用いて、強い光強度への応答に関与する遺伝子についても研究が進められてきた（Hihara *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008）。これらの研究によって強光に対する応答機構として、集光機能の抑制や

“Photosystem II”の反応中心の修復機能の活性化などが明らかとなった。しかし実験室で作成される強光条件は光強度 200 ~ 500 µmol m^{-2} sec^{-1} 程度のものが多く、増殖が阻害されるほどの強光条件での応答は解明されていない。また光強度の増加に応じて、応答がどのように変化するか明らかとなっていない。

1.6　本研究の目的と構成

シアノバクテリアは、光合成を行う微細藻類の一種であり、酸素発生型の光合成を行う微生物である。シアノバクテリアは植物が生育できない海域などにおいても増殖可能であることや、単位面積あたりの生産性が高いことから、燃料や化学品などの分野において生産宿主として注目されている。しかしシアノバクテリアは、強い光強度によって細胞が損傷する光阻害によって、真夏の日中などに生産性が低下するという課題を有する。細胞に光阻害への耐性を付与すれば、光強度が強い環境でも物質生産性を維持することが可能となり、通年での生産性を向上させることができる。本研究は、シアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 に光阻害への耐性を付与する手法を開発した。

1 章は、本研究の背景と目的について述べた。

2 章は、これまで明らかとなっていなかった、増殖が阻害される強光条件でのシアノバクテリアの応答を初めて解析した。フォトバイオリアクターを用いた *Synechocystis* sp. PCC 6803 の培養試験の結果、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の光合成能力に対し光強度が不足する弱光条件、十分な光強度である中光条件、増殖速度が低下するほど光強度が過剰な強光条件の 3 条件が存在することを示した。さらに各条件で培養した細胞について遺伝子発現解析を行った結果、先行研究において弱光条件から中光条件で確認されていた応答が、強光条件においてより強い応答として示されることが明らかとなった。具体的には、集光機能を担う機能カテゴリー“Phycobilisome”、“Photosystem I”やクロロフィルなどに関わる遺伝子の発現量が低下し、“Chaperones”や“CO_2 Fixation”および“Photosystem II”の反応中心である D1 タンパク質のターンオーバーに関わる遺伝子の発現量が増加することが示された。さらに強光条件特有の応答として、鞭毛の合成に関わる遺伝子やピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼやシグマファクター（*sigA* 、*sigF*）の発現量低下が明らかとなった。

3 章は、弱光条件で増殖速度が低下することなく、強光条件で増殖速度の維持が可能な強光耐性株を初めて構築し、その耐性機構を解析した。試験管を用いた強光条件下での植え継ぎ培養の結果、野生株が増殖できない強光条件においても増殖速度が低下しない強光耐性株を獲得した。野生株と耐性株に対して中光条件と強光条件で網羅的遺伝子発現解析を行った結果、耐性株は“Phycobilisome”に関わる遺伝子と *slr1912* の発現量低下により、“Photosystem II”へのエネルギー伝達量が低減されることが示唆された。さらに耐性株は、*isiA* の発現量が増加することで“HLCC”を形成し、“Photosystem II”へのエネルギー伝達量が低減すると共に酸化ストレスから D1 プロテインやチラコイド膜を保護することで、“Photosystem II”が強光によって損傷することを防ぐことが示唆された。3 章で示された耐性株の強光耐性機構と 2 章で示された野生株における強光への応答機構を比較した結果、*slr1912* の発現量低下と *isiA* の発現量増加が耐性株特有の機構であることが示された。中でも *isiA* の発現量増加は、エネルギー伝達量を減し酸化ストレスから保護することで、強

光による“Photosystem II”の損傷を防ぐことが示唆されており、強光耐性を付与する手法として最有力であることが示された。

4 章は、*isiA* の過剰発現がシアノバクテリアへ強光耐性を付与すると共に、弱光条件での増殖速度を維持することを初めて明らかにした。3 章で示された仮説に基づき *isiA* 過剰発現株を構築し、弱光条件、中光条件および強光条件で培養した。培養試験の結果、*isiA* 過剰発現株は弱光条件で野生株と同等の増殖速度を示し、野生株が増殖できない強光条件においても速い増殖速度を示すことが明らかとなった。

5 章は、本研究の結果をまとめ、本研究より得られた強光耐性の付与に関する知見がシアノバクテリアを用いた物質生産にどのように貢献できるかを論じ、今後の展望について述べた。

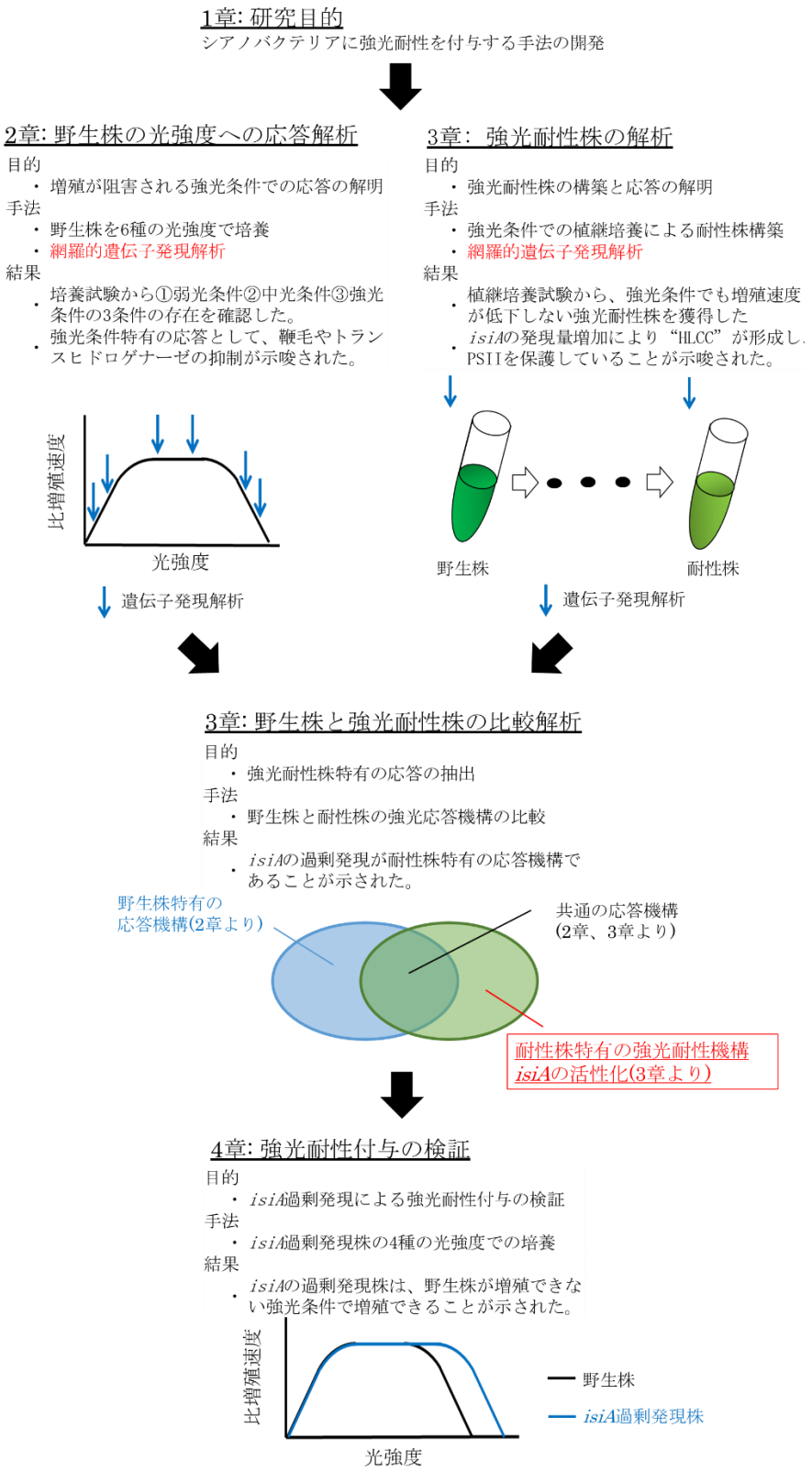

Fig. 1-4 本研究の構成とその概要

第 2 章 6 種の光強度における遺伝子発現解析

2.1 緒言

シアノバクテリアを用いた物質生産は、食料と競合しないことや高いエネルギー変換効率などの特徴を持ち、化石燃料を代替する製造プロセスとして期待されている。しかし、シアノバクテリアは真夏の日中などの光強度の強い条件では、光合成系が損傷し光合成能力が低下する光阻害という現象が生じる（Kok, 1956)。光阻害を解決することは、自然光を用いたシアノバクテリアの物質生産において、設備投資を行うことなく生産性を向上させることに繋がる。シアノバクテリアは非常に強い光強度には適応できないが、狭い範囲の光強度変化には適応することが出来る。そのため光阻害の解決には、シアノバクテリアが保有する光強度変化への適応機構を理解することが有効な手法となる。

シアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 では、弱光条件（光強度 20 ~ 30 µmol m^{-2} sec^{-1}）から強光条件（200 ~ 500 µmol m^{-2} sec^{-1}）へ変化させ、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の経時変化を解析する研究が盛んに行われてきた（Hihara *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008)。先行研究から、細胞の吸光量を減少させる機構として、クロロフィル濃度の減少(Hihara *et al.*, 1998)、“Photosystem I”濃度の低下（Murakami *et al.*, 1991; Hihara *et al.*, 1998)、“Phycobilisome” 濃度の低下（Grossman *et al.*, 1993）などが報告されている。また細胞が吸収した過剰なエネルギーを逃がす機構として、光合成のアンテナ（Ruban *et al.*, 2007）や“Photosystem II” 反応中心(Ivanov *et al.*, 2008）におけるエネルギーの散逸が知られている。さらに、過剰な光エネルギーによって生じた損傷を回復させるため、一重項酸素の除去（Telfer, 2005)、“Photosystem II”の反応中心タンパク質 D1 の合成による“Photosystem II”の修復 (Komenda *et al.*, 2007）が報告されている。このように強光への応答については盛んに研究されているが、調査されている条件は実験室で作成される強光条件は増殖が阻害されない程度の光強度であり、真夏の日中のように増殖が阻害されるほどの強光条件においてどのような応答が生じるか解明されていない。また、従来の研究の多くが弱光条件と強光条件の 2 条件を対象に解析を行っているため、光強度の増加に伴いどのように応答が変化するか明らかとなっていない。

2 章においては、光強度が不足している弱光条件から増殖が阻害されるほどの強光条件まで、光強度の増加に伴う細胞の応答を解析することを目的とした。幅広い強度の光を照射することが可能なフォトバイオリアクターを用いた光強度 30, 50, 300, 1000, 1100, 1300 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ の 6 種の光強度で培養試験を行い、細胞の光合成能力に対し光強度が不足する弱光条件、十分な光強度である中光条件、増殖速度が低下するほど過剰な強光条件の 3 条件が存在することを示した。次に、各光強度で培養した細胞に対して DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことで、弱光条件から強光条件まで光強度の増加に

伴う細胞の応答を解析した。本研究は、光強度と増殖速度の関係を評価し、増殖が阻害される強光条件も解析対象に含むことから、従来明らかとなっていない細胞の過剰な光強度に対する応答機構を解析することができる。

2.2　実験材料と実験方法

2.2.1　使用菌株

本研究では、シアノバクテリアの 1 種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 株のグルコース耐性株を使用した（以後 PCC 6803 と記載）。本株は、1996 年に全ゲノム塩基配列（3,573,471 塩基長）が決定され（Kaneko *et al.*, 1996）、7 種の潜在性プラスミド、pSYSM（119,895 塩基長）、pSYSX（106,004 塩基長）、pSYSA（103,307 塩基長）、pSYSG（44,343 塩基長）、pCC5.2（5,214 塩基長）、pCA2.4（2,378 塩基長）、pCB2.4（2,345 塩基長）をもつ。なお本株は、崇城大学の松岡正佳先生より譲渡頂いた。

2.2.2　培養

本研究では、PCC 6803 の培養に用いられる標準的な BG11 培地から、HEPES と EDTA 2Na 以外の炭素化合物を含まないように改変した改変 BG11 培地を用いた（Table 2-1）。具体的には、Na_2CO_3 と citric acid を除き、Ferric ammonium citrate を等量の Fe と NH_3 を含むように、$FeCl_2$ と NH_4Cl に置き換えた。以降では、改変 BG11 培地を BG11 培地と記載する。

Table 2-1 改変 BG11 の組成

成分	濃度（mM）
EDTA 2Na	2.7×10^{-3}
$NaNO_3$	1.8×10
H_3BO_3	4.6×10^{-2}
HEPES	2.0×10
$Na_2MoO_4\cdot2H_2O$	8.7×10^{-5}
K_2HPO_4	2.2×10^{-1}
$MgSO_4\cdot7H_2O$	3.0×10^{-1}
$CaCl_2\cdot2H_2O$	2.6×10^{-1}
$MnCl_2\cdot4H_2O$	9.1×10^{-3}
$ZnSO_4\cdot7H_2O$	7.7×10^{-4}
$CuSO_4\cdot5H_2O$	3.2×10^{-4}
$Co(NO_3)_2\cdot6H_2O$	1.7×10^{-4}
$FeCl_2\cdot4H_2O$	1.6×10^{-2}
NH_4Cl	2.5×10^{-2}

前培養は、LED を光源とするインキュベーター（TAITEC, BR-43FL）を用いて、光強度 40 μmol m^{-2} sec^{-1}、150 rpm、34℃で振とう培養を行った。植菌時の OD は 0.03、培養時間

は約 72 h とした。本培養は Fig. 2-1 が示す筒型のフォトバイオリアクター（CCS, オーダーメイド）を用いて、ワーキングボリューム 400 ml で行った。光源は特注の LED（CCS, ISL-R100X100-RRRB）を使用し、660nm の赤色光と 475nm の青色光の光強度が 5:1、培養槽中心における光強度（μmol m^{-2} sec^{-1}）が所定の設定値になるよう電圧値を調整した。通気は、空気に対して 2.5%（v/v）になるよう CO_2 を混合したガスを使用し、通気量を 1 vvm に設定した。温度は 34℃、撹拌速度は 200 rpm に設定し、pH はリアクターに 1N HCl と 1N KOH を接続することで、pH が 7.5 に維持されるよう制御を行った。植菌時の菌体は、前培養において OD が 0.6-0.7 の対数増殖期後半であるものを使用し、植菌時の OD は 0.03 とした。光強度の測定には、光量子計（LI-COR, LI-190SA 光量子センサー LI-250A ライトメーター）を用いた。菌体濃度は、分光光度計（SHIMADZU, Vmini-1240）を用いて、培養液の 730 nm における吸光度（OD）を測定することにより決定した。

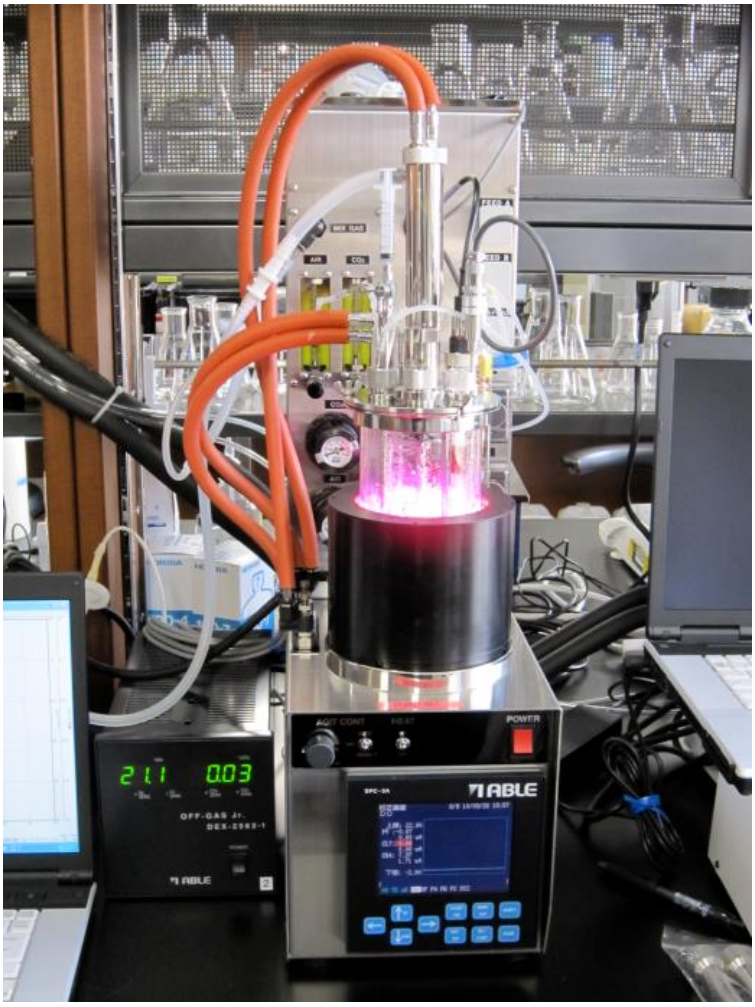

Fig. 2-1 筒型のフォトバイオリアクター

2.2.3　クロロフィル定量解析

対数増殖期の培養液 1 ml を 4℃、15000 rpm、10 min 遠心分離した後に上清を除いた。沈殿に対して 100%メタノールを 1 ml 加え、ボルテックスにより懸濁した。15 min 室温でインキュベートした後、4℃、10000 rpm で 10 min 遠心分離し、上清の 665 nm の吸光度(A_{660})を測定した。クロロフィル濃度は、クロロフィル濃度=13.4×A_{660}/A_{730} より濃度（μg ml^{-1} OD_{730}^{-1}）を求めた。

2.2.4　網羅的遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイは、Agilent 社の eArray (https://earray.chem.agilent.com/earray/) を用いて Cyanobase (http://bacterteria.kazusa.or.jp/cyanobase/)から入手された PCC 6803 の染色体と 7 つのプラスミドの基配列をもとにカスタムデザインしたものを使用した。eArray の設定条件は、BC_score (塩基組成／分布に基づくプローブのクオリティ) を高め、Tm (DNA の 50 %が二本鎖を形成し残りの 50%が 1 本鎖を形成する温度) の標準偏差を小さくすることで、信頼性の高い遺伝子発現データが得られるよう設定した。

遺伝子発現解析を行うため、終濃度 10% (w/v) のフェノール/エタノール溶液に対数増殖中期（OD = 0.6~0.7）の培養液を等量加えた。その後、4℃、8000 rpm で 5 min 遠心分離し、上清を除き、RNA 抽出操作まで-80℃で保存した。

回収した菌体からの RNA の抽出は、RiboPure™-Yeast Kit (Ambion) を用いて行った。抽出した RNA の品質評価は、超微量分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000) と 2100 バイオアナライザー (Agilent) を用いて行った。

逆転写および蛍光色素の標識は、Low Input Quick Amp Labeling WT Kit (Agilent)、Cyanine 3-CTP (Perkin Elmer)、RNeasy mini kit (Qiagen) を使用して行った。蛍光色素で標識した cRNA の品質評価は、超微量分光光度計とバイオアナライザーを用いて行った。ハイブリダイゼーションおよびスキャンは、スキャナー C version (G2505C) (Agilent) 、スキャンコントロールソフト v8.4.1 (Agilent)、Feature Extraction v10.7 (Agilent)を用いた。

データ解析は主に Matlab 2010b (The Mathworks Inc.) を用いて行った。Feature Extraction ソフトウェア (Agilent) により、シグナルに問題があると判定されたプローブのデータは、遺伝子発現量の算出から除いた。遺伝子発現量は、同一遺伝子についてデザインされた複数プローブの、シグナル強度の中央値から算出した。マイクロアレイデータ間の比較を行うために、遺伝子発現量について Quantile Normalization (Bolstad *et al.*, 2003) により正規化を行った。遺伝子発現量の有意変化については、Welch の t 検定により、両側検定 P 値 1%を有意水準として判定を行った。主成分分析については R 言語 (R Development Core Team, 2005)を用いて解析を行った。

遺伝子の機能分類については Cyanobase を参照し、発現量が変化した遺伝子における機能カテゴリーが含む遺伝子の割合が、PCC 6803 の全遺伝子における機能カテゴリーが含む

遺伝子の割合に対して有意であるか、超幾何分布に基づき検定した（Rivals *et al.*, 2007)。PCC 6803 の全遺伝子 N 個の中に、ある機能カテゴリーA に含まれる遺伝子が M 個あるとする。N 個の遺伝子から n 個の遺伝子をスクリーニング（非復元抽出）した際、カテゴリーA に含まれる遺伝子数 i が x 以上である上側累進確率 P は、$\mathrm{P} = \sum_{i=x}^{n} \binom{M}{i} \binom{N-M}{\mathrm{n}-\mathrm{i}} / \binom{N}{\mathrm{n}}$ で定義される。このように算出された P が十分に小さい場合、スクリーニングした n 個の遺伝子中にカテゴリーA に含まれる遺伝子が有意に多く含まれることを示す。本研究では、遺伝子発現量が変化した遺伝子において、上側累進確率の値が 0.05 を下回った場合、有意に多く含まれる機能カテゴリーとした。

2.3　結果と考察

2.3.1　増殖速度

シアノバクテリアなどの光合成微生物にとって、光はエネルギーを獲得する上で不可欠であるが、強光条件では細胞の損傷を行き起こすことが知られている。このことから、光強度とシアノバクテリアの増殖速度には、Table 2-2 が示す 3 フェーズが存在すると推測される。本研究は、上記 3 フェーズが存在することを確認するために、光強度 30, 50, 300, 1000, 1100, 1300 μmol m^{-2} sec^{-1} でそれぞれ 3 回ずつ培養試験を行った。

Table 2-2 光強度と増殖速度の関係

光強度条件 (光強度 μmol m^{-2} sec^{-1})	光強度が増加に伴う 増殖速度の変化
弱光条件 (光強度 30, 50)	増加
中光条件 (光強度 300, 1000)	一定
強光条件 (光強度 1100, 1300)	低下

Fig. 2-2 (a) において、光強度 30, 50, 300 μmol m^{-2} sec^{-1} は、光強度が強くなるにつれ傾きが大きくなり、光強度 300, 1000 μmol m^{-2} sec^{-1} は光強度が強くなっても傾きはほぼ同じ大きさであり、光強度 1000, 1100, 1300 μmol m^{-2} sec^{-1} は光強度が強くなるにつれ傾きが小さくなることが確認された。また Fig. 2-2 (b)で各光強度における 48 h までの比増殖速度を比較すると、顕著にこの傾向が見られた。以上のことから、(1) 光強度 30, 50 μmol $m^{-2}sec^{-1}$ は弱光条件、(2) 光強度 300, 1000 μmol $m^{-2}sec^{-1}$ は中光条件、(3) 光強度 1100, 1300 μmol $m^{-2}sec^{-1}$ は強光条件と判断される。フォトバイオリアクターを用いた培養は、真夏の日中（光強度 2000 ~ 2500 μmol m^{-2} sec^{-1}）に比べ弱い光強度 1100, 1300 μmol $m^{-2}sec^{-1}$ で増殖阻害が確認された。これは、自然光が水面からの一方向の光照射によって水面付近のみを強光条件にすることに対し、フォトバイオリアクターは Fig. 2-1 が示すように円筒の周囲から光を照射するため、培養液全体を強光条件にしたためと推測される。条件間の細胞内の状態を比較するため、各培養試験において OD が 0.4 付近の培養液を回収しクロロフィル濃度の定量解析とトランスクリプトーム解析を実施した。

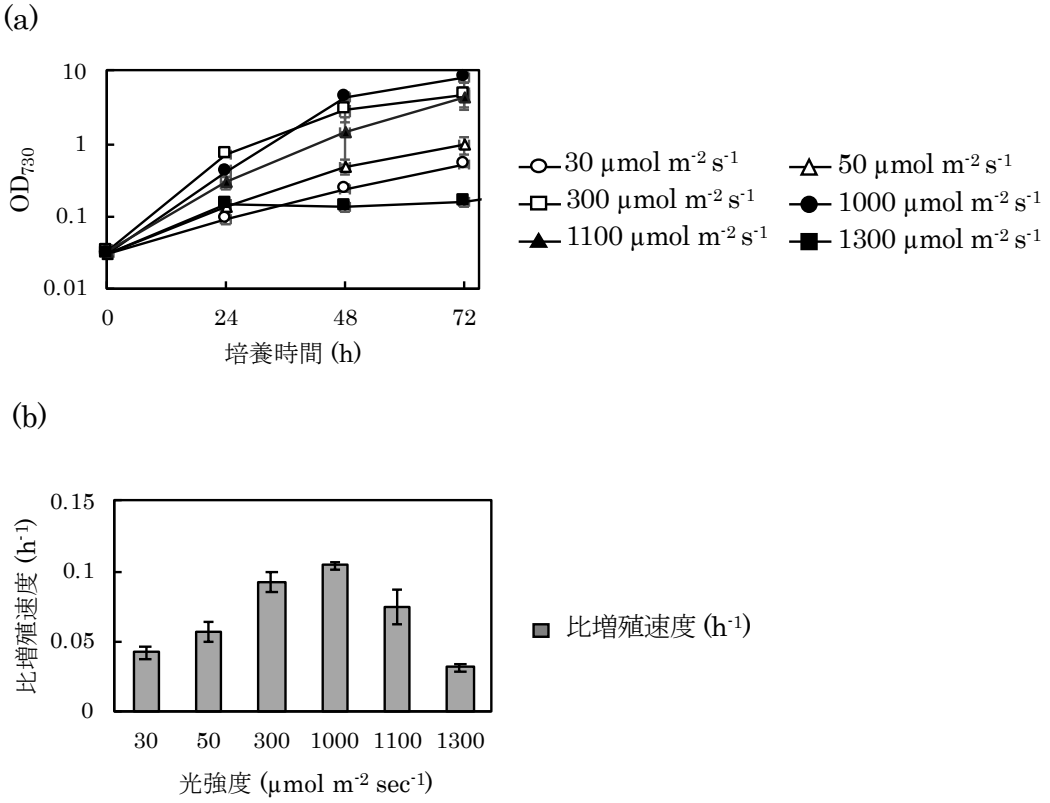

Fig. 2-2 増殖速度

(a) は増殖曲線を、(b) は 0 h と 48 h の OD より算出された比増殖速度をそれぞれ示す。エラーバーは標準偏差を示す。培養試験は、光強度 30, 50, 300, 1000, 1100, 1300 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ においてそれぞれ 3 回ずつ行った。

2.3.2 クロロフィル定量解析

クロロフィルは光合成の集光において重要な役割を担う光合成色素であり、弱光条件に比べ強光条件では細胞あたりのクロロフィル濃度が低下することが知られている (Muramatsu *et al.*, 2012)。この現象は、吸光量を適切に保つことを目的とする応答と考えられているが、光強度の増加に伴いクロロフィル濃度は徐々に低下するのか、ある光強度以上においてクロロフィル濃度が急激に減少するかはっきりしていない。本研究は、光強度とクロロフィル濃度の関係を調べるため、6 種の光強度において OD が 0.4 付近の培養液を回収し、クロロフィル濃度の定量解析を行った。

Fig. 2-3 より、クロロフィル濃度は、光強度 50 µmol m^{-2} sec^{-1} と光強度 300 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ の間で急激に減少することが確認された。これは、光強度 30 ~ 50 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ は光強度が光合成の能力に対して不足している環境であるため、吸光量の増加を目的としクロロフィルの濃度が大きくなっているのに対し、光強度が 300 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ より強い環境は、光合成の能力に対して光強度が十分であるため、吸光量の増加が不要でありクロロフィルの

濃度が小さくなっていることを示唆している。

また Fig. 2-3 より、光強度 300 μmol $m^{-2}sec^{-1}$ と光強度 1300 μmol $m^{-2}sec^{-1}$ の間では緩やかにクロロフィル濃度が減少することが確認された。これは、光合成の能力に対して光強度が十分に強い環境において、過剰な光強度による“Photosystem”の損傷である強光阻害を抑制するために、吸光量を減少させる応答と推測される。

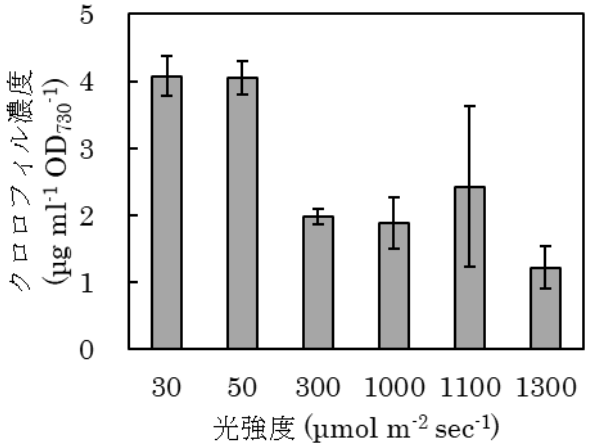

Fig. 2-3 クロロフィル濃度

各光強度でそれぞれ 3 回ずつ培養試験を行い、対数増殖期の菌体をクロロフィル定量解析に供した。エラーバーは標準偏差を示す。

2.3.3 網羅的遺伝子発現解析

本研究は、光阻害が発生している際に特有な細胞の応答を解析するために、6 種の光強度で培養することで、弱光条件、中光条件、強光条件で培養した菌体に対し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析の結果、プローブを設計した 3527 遺伝子の内、全ての条件下で遺伝子発現データが得られた 2757 遺伝子について詳細な解析を行った。データ解析において、まず遺伝子発現データ全体の傾向を理解することを目的とし、発現量データを主成分分析に供した。主成分 1 と主成分 2 の散布図を Fig. 2-4 に示す。主成分 1 は光強度が強い条件ほど高い値、光強度が弱い条件ほど低い値であることから、主成分 1 は光強度の強さに対応する軸であると考えられる。一方、主成分 2 は、同じ光強度でも分散が大きいことから、光強度によらない軸と考えられる。主成分 1 は全体の寄与率の 48%を占め、光強度との相関も見られたため、主成分 1 について解析を進めることとする。

主成分 1 の主成分負荷量の大きさが上位 1%の遺伝子を Table 2-3 に、主成分 1 の主成分負荷量の大きさが下位 1%の遺伝子を Table 2-4 に示す。主成分負荷量が上位の遺伝子の発現量は光強度の増加に対する応答の強度と正の相関があり、主成分負荷量が下位の遺伝子

の発現量は光強度の増加に対する応答の強度と負の相関があると考えられる。Table 2-3 より、主成分負荷量が上位の遺伝子は、“Photosystem II”の反応中心 D1 タンパク質をコードする遺伝子（*psbA*）や損傷を受けた D1 タンパク質を分解する FtsH をコードする遺伝子、“Chaperones”に関わる遺伝子が多いことが分かった。一方 Table 2-4 より、下位の遺伝子は“Phycobilisome”や“Photosystem I”に関わる遺伝子が多いことが分かった。この結果から、先行研究で報告されている中光条件での“Photosystem”の修復（Komenda *et al.*, 2007）や吸光量の調節（Ruban *et al.*, 2007）活性化が、増殖が阻害される強光条件において一層強く誘導されていることが示された。

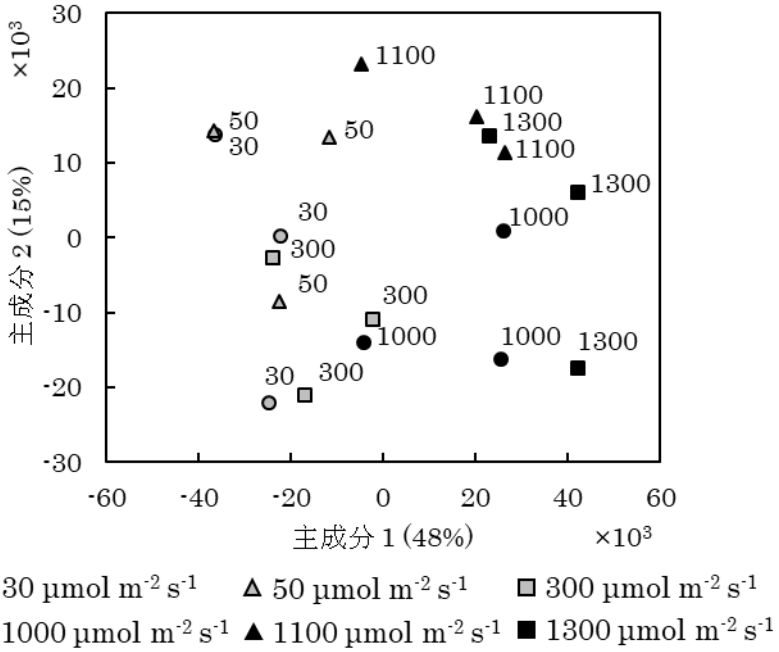

Fig. 2-4 主成分分析に基づく散布図

主成分 1 と主成分 2 に関する散布図を示す。各光強度でそれぞれ 3 回ずつ培養試験を行い、対数増殖期の菌体を用いて遺伝子発現データを取得し、主成分分析に供した。主成分 1 の寄与率は 45%、主成分 2 の寄与率は 15%である。

Table 2-3 主成分 1 の主成分負荷量上位 1%

ORF ID	既知遺伝子の別名	機能カテゴリー	主成分負荷量
slr1311	*psbA2, psba-2*	Photosystem II	10241
sll1867	*psbA3, psba-3*	Photosystem II	7111
slr2075	*groES*	Chaperones	5327
sll1621	-	Other	4966
slr0915	-	-	4560
sll1514	*hspA, hsp17*	Chaperones	3421
sll1324	*atpF*	ATP synthase	2624
sll1811	*rplR, rpl18*	Ribosomal proteins: synthesis and modification	2422
sll0933	-	-	2094
smr0002		Transposon-related functions	2046
sll0767	*rplT, rpl20*	Ribosomal proteins: synthesis and modification	2021
slr0923	*ycf65*	-	1893
sml0003	*psbM*	Photosystem II	1886
slr2120	-	-	1697
sll0306	*sigB, rpoD*	RNA synthesis, modification, and DNA transcription	1665
slr1751	*prc, tsp*	Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides	1488
sll0846	-	-	1484

sll8043	-	Transposon-related functions	1464
slr1524		Transposon-related functions	1437
slr1417	*ycf57, iscA*	-	1415
slr1283		Transposon-related functions	1337
slr1282		Transposon-related functions	1284
slr0856		Transposon-related functions	1150
slr1604	*ftsH*	Cell division	1110
slr0423	*rlpA*	-	1106
ssl2874	-	-	1092
sll0416	*groEL2, cpn60-2*	Chaperones	1053
slr0352		Transposon-related functions	770

Table 2-4 主成分 1 の主成分負荷量下位 1%

ORF ID	既知遺伝子の別名	機能カテゴリー	主成分負荷量
sll1577	*cpcB*	Phycobilisome	-13747
slr2067	*apcA*	Phycobilisome	-6911
sll1578	*cpcA*	Phycobilisome	-6039
slr1986	*apcB*	Phycobilisome	-4609
slr1634	-	-	-4289
slr1834	*psaA*	Photosystem I	-3408
sll0199	*petE*	Soluble electron carriers	-2872
slr2051	*cpcG1*	Phycobilisome	-2254
sll1579	*cpcC2*	Phycobilisome	-2168

sll1580	*cpcC1*	Phycobilisome	-1940
slr1835	*psaB*	Photosystem I	-1865
ssl3093	*cpcD*	Phycobilisome	-1844
sml0008	*psaJ*	Photosystem I	-1723
slr0376	-	-	-1629
ssr3383	*apcC*	Phycobilisome	-1460
slr0737	*psaD*	Photosystem I	-1458
ssl0563	*psaC*	Photosystem I	-1372
sll1694	*pilA1*	Chemotaxis	-1309
sll0819	*psaF*	Photosystem I	-1230
ssl1263	-	-	-928
ssr2799	*rpmA, rpl27*	Ribosomal proteins: synthesis and modification	-896
smr0006	*psbF*	Photosystem II	-848
sll1184	*ho1*	Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin	-806
smr0004	*psaI*	Photosystem I	-792
slr0374	-	-	-773
sll1338	-	-	-728
slr0447	*urtA, amiC*	-	-668
sll1746	*rplL, rpl12*	Ribosomal proteins: synthesis and modification	-658

2.3.4　光強度による遺伝子発現プロファイルの変化

次に、各光強度において発現量が変化した特長的な遺伝子を特定するため、増殖速度が最大であった光強度 300 µmol m^{-2} sec^{-1} を基準とし、各光強度について、P 値 1%を有意水準とした t 検定により遺伝子発現量の有意変化の判定を行った。Table 2-5 は、各光強度で発現量が増加した遺伝子の数、減少した遺伝子の数、変化した遺伝子の数を示す。発現量が変化した遺伝子数は、光強度 1000 µmol m^{-2} sec^{-1} が 11 であり、その他の条件は 45~108 遺伝子であった。遺伝子発現量データを得た遺伝子数が 2757 であり有意水準が P 値 1%であることから、約 28 遺伝子が偽陽性になるため、光強度 1000 µmol m^{-2} sec^{-1} はほとんど遺伝子発現に変化がなかったと言える。培養試験において光強度 300 µmol m^{-2} sec^{-1} と光強度 1000 µmol m^{-2} sec^{-1} はいずれも「光強度が強くなっても増殖速度がほぼ一定であるフェーズ」であり、両条件とも増殖に最適な光強度であったことが遺伝子発現にほとんど変化が無かった理由と考えられる。

Table 2-5 各光強度で発現量が優位に変化した遺伝子数

光強度（µmol m^{-2} s^{-1}）	30	50	1000	1100	1300
発現量が増加した遺伝子数	44	61	8	71	23
発現量が減少した遺伝子数	64	45	3	25	22
発現量が変化した遺伝子数	108	106	11	96	45

光強度 300 µmol m^{-2} s^{-1} とその他の光強度における遺伝子発現データを t test ($p < 0.01$) に供した。

続いて、光強度の変化に対して応答する遺伝子機能カテゴリーを特定するため、2 つ以上の条件で発現量が変化した遺伝子に有意に多く含まれる機能カテゴリーを、超幾何分布に基づいて解析した。発現量が変化した遺伝子が有意に多く含まれる機能カテゴリーを、Fig. 2-5 にまとめた。

Fig. 2-5 より、“Chemotaxis”に関わる遺伝子は弱光条件である光強度 30, 50 µmol m^{-2} sec^{-1} において遺伝子発現量が増加した遺伝子群に多く含まれることが分かった。これは、弱光条件 PCC 6803 の光合成能力に対して光強度が不足する環境であるため、光源へ物理的に近づくことで受光量を大きくしようという応答であると推測される。先行研究においても、弱光条件では細胞の受光量を増加させるために、光源方向へ移動する正の“Chemotaxis”が広く知られている(Feinleib and Curry, 1971)。光強度 300 µmol m^{-2} sec^{-1} 以上の中光条件や強光条件では“Chemotaxis”に関わる遺伝子発現量はほとんど変化がなく、光強度光強度 300 µmol m^{-2} sec^{-1} 以上は PCC 6803 の光合成能力に対し十分な光強度であることが示唆された。

また、“CO_2 Fixation”に関わる遺伝子は、弱光条件である光強度 30, 50 µmol m^{-2} sec^{-1} において遺伝子発現量が減少した遺伝子群に多く含まれることが分かった。これは、弱光条件が、光強度の不足から明反応での ATP の合成量が他の条件に比べて少ないために、ATP を消費する“CO_2 Fixation”反応が抑制されたことを示唆している。また、弱光条件における“CO_2 Fixation”反応の抑制は、Fig. 2-2 で示されるように、弱光条件における増殖速度が中光条件に比べて小さかったことの主要因であると推測される。

一方で“Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin”や“Photosystem I”、“Phycobilisome”に関わる遺伝子は、弱光条件である光強度 30, 50 µmol m^{-2} sec^{-1} において遺伝子発現量が増加した遺伝子群に多く含まれ、強光条件である光強度 1100, 1300 µmol m^{-2} sec^{-1} において遺伝子発現量が減少した遺伝子群に多く含まれることが分かった。“Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin”は光合成色素の合成に関わる遺伝子群であり、Fig. 2-3 で確認された光強度の増加に伴うクロロフィル濃度の減少が、遺伝子発現量の制御によって生じていることが示唆された。また“Photosystem I”と“Phycobilisome”は吸光を担う複合体の合成に関わる。これらの応答は、光強度が不足する環境では ATP 合成量を増加させるために吸光に関わる機能が活性化し、光強度が過剰に強い環境では光阻害を抑制するために吸光に関わる機能が抑制されることを示唆する。

主成分分析に供した際には、Table 2-3 が示すように“Photosystem II”の反応中心をコードする *psbA* が光強度と強い正の相関を示したが、機能カテゴリー解析の結果、“Photosystem II”は有意な変化を示さなかった。これは、光阻害で損傷を受けるのが“Photosystem II”の反応中心に集中しているため、“Photosystem II”の他のタンパク質の損傷が小さく、新規合成量を増加させる必要がないためであると推測される。

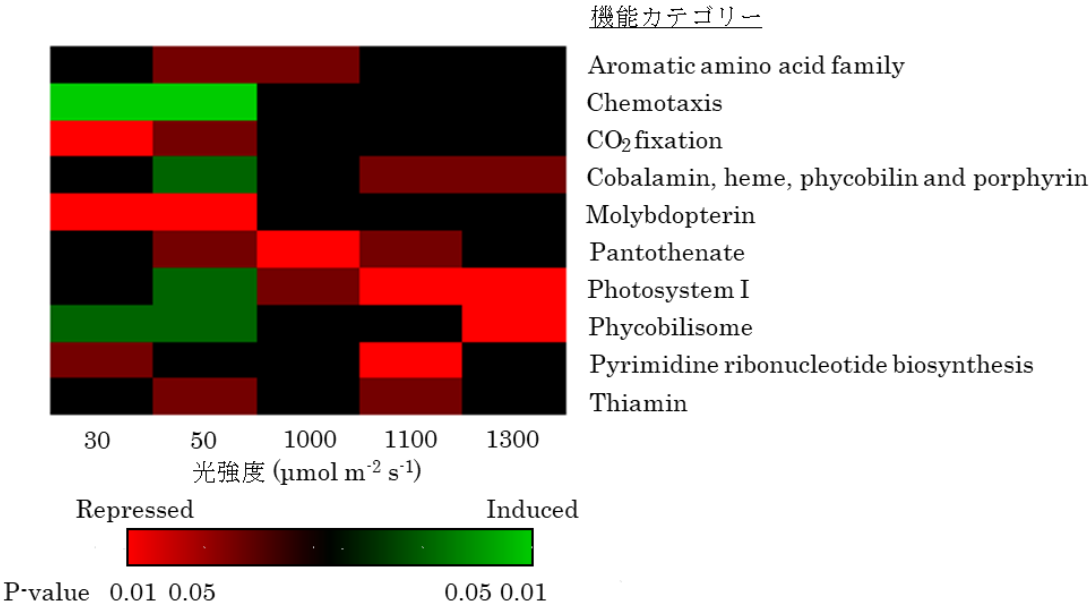

Fig. 2-5 機能カテゴリー解析

発現量が変化した遺伝子における機能カテゴリーが含む遺伝子の割合が、測定した総遺伝子における機能カテゴリーが含む遺伝子の割合に対して有意であるか、超幾何分布に基づき検定を行った。上図は 2 つ以上の光強度で、発現量が変化した遺伝子が有意に多く含まれる機能カテゴリーを示す。図下部の数字は、各培養における光強度 (μmol m^{-2} sec^{-1})を、図右の文字は各列の機能カテゴリーを示す。各機能カテゴリーにおいて、濃い赤色は発現量が減少した遺伝子について 0.01 > P-value であることを、薄い赤色は発現量が減少した遺伝子について 0.05 > P-value > 0.01 であることを示す。一方、濃い緑色は発現量が増加した遺伝子について 0.01 > P-value であることを、薄い緑色は発現量が増加した遺伝子について 0.05 > P-value > 0.01 であることを示す。

2.3.5　強光条件で特有な応答の解析

次に、増殖が阻害される強光条件における応答を詳細に解析するため、強光条件である光強度 1100, 1300 μmol m^{-2} sec^{-1} と弱光条件および中光条件である光強度 30, 50, 300, 1000 μmol m^{-2} sec^{-1} 遺伝子発現データを t 検定に供し、発現量が増加した遺伝子と減少した遺伝子それぞれに対して超幾何分布に基づく機能カテゴリー解析を行った。

Table 2-6 より、"Chaperones"に属する *hspA*、*htpG*、*dnaJ* が強光条件で発現量を増加させていたことが明らかとなった。"Chaperones"に関わる遺伝子は、強光条件で遺伝子発現量が増加し、過剰な光エネルギーにより発生する過酸化物から細胞を保護する役割を担っていることが報告されている（Hihara *et al.*, 2001）。本研究の結果から、増殖が阻害されるほどの強光条件において、過酸化物から細胞を保護するため、"Chaperones" に関わる遺伝子の発現量が増加していることが示唆された。

一方、"Photosystem I"、"Phycobilisome"、といったカテゴリーに加え"Chemotaxis"の *pilT2*、*pilA2*、*pilJ* や、"Nicotinate and nicotinamide"の *pntA* や *pntB*、"RNA synthesis, modification, and DNA transcription"の *sigA* や *sigF* が強光条件で発現量が減少した遺伝子であることが明らかになった。

"Chemotaxis"は、Fig. 2-5 で示されるように弱光条件において遺伝子発現量が増加し、光源に向かい移動することで集光量を増加させる役割を果たす。一方強光条件では、藻類の一種であるクラミドモナスにおいて光源から遠ざかる方向への移動が活性化することが報告されているが（Feinleib *et al.*, 1971)、本研究の結果より PCC 6803 はそのような応答を示さないことが示唆された。さらに、この結果は細胞移動に関わる鞭毛や繊毛などのタンパク質を欠損させることは、シアノバクテリアを生産宿主にした物質生産において生産性を向上させることを示唆する。それは、シアノバクテリアの培養は光が十分照射された場所で攪拌機などの装置によって混合された環境で行われることが一般的であり、このような環境においては鞭毛や繊毛の合成に用いられる ATP やアミノ酸を節約し、目的物質の合成に使用する方が生産性に貢献するためである。

"Nicotinate and nicotinamide"カテゴリーに属する *pntA* と *pntB* の発現量が減少したことから、NADH と NADPH のバランスが強光条件への適応に関わっていることが示唆された。ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ（PntAB）は NADPH + NAD^+ ⇔ $NADP^+$ + NADH を触媒する酵素である。PCC 6803 におけるピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼの役割は未知の部分が残っているが、弱光条件や混合影響条件では NADH から NADPH を合成するものと推測されている（Kämäräinen *et al.*, 2017)。本研究において、光強度が増加するに伴い *pntA* と *pntB* の発現量が著しく低下したことは、強光条件は光合成による NADPH の生産量が高くなり、NADH から $NADP^+$へ電子を渡す重要性がなくなったことを示唆する。このようにピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼは強光条件での生育において重要でないが、強光条件での物質生産性を向上させる上では大きな役割が期待される。先行研究において、トランスヒドロゲナーゼの活性化は、

NADH を消費する乳酸合成における収率と生産速度を向上させることが報告されている(Angermayr *et al.*, 2012)。これらの結果より、強光条件におけるシアノバクテリアのトランスヒドロゲナーゼの過剰発現は、NADH を消費する反応の促進と通じて、乳酸生産やその他の NADH を要する物質生産の生産性向上に寄与することが示された。

PCC 6803 は強光への応答に関与する転写制御因子として、*hik33*、*rpaB*、*sigD* および *pedR* などを持つことが知られている（Waasbergen *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2007; Imamura *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006)。しかし本研究では、これらの転写制御因子ではなく、*sigA* と *sigF* の発現量が強光条件である光強度 1100, 1300 μmol m^{-2} s^{-1} において著しく低下することが確認された。*sigA* と *sigF* は PCC 6803 において転写の開始を仲介するシグマファクターである（Pollari *et al.*, 2009)。SigA タンパク質は生育に必須であり(Pollari *et al.*, 2009)、SigF タンパク質は“Chemotaxis”に重要な役割を果たす鞭毛タンパク質をコードする *pilA1* と *pilA2* の転写制御を行うため（Bhaya *et al.*, 1999)、強光への応答に関与しない遺伝子であると見做されていた。本研究においても、*pilA2* の発現量は強光条件で低下しており、SigF タンパク質が鞭毛タンパク質をコードする遺伝子の制御に関わっていることが示唆された。さらに、*pntA* や *pntB* の発現量あるいは *pilA2* の発現量は、転写制御因子である *sigA* や *sigF* の発現量と正の相関があり(Fig. 2-6)、*sigA* や *sigF* の発現量を調節することで操作できる可能性が示唆された。

Table 2-6 強光条件で有意に発現量が変化した遺伝子に関する機能カテゴリー解析

機能カテゴリー	上側累進確率		*遺伝子*
	誘導	抑制	
Chaperones	0.015	-	*hspA, htpG, dnaJ*
Photosystem I	-	0.000	*psaJ, psaB, psaI, psaF, psaL, psaK*
Phycobilisome	-	0.002	*cpcB, cpcA, cpcC2, cpcC1*
RNA synthesis, modification, and DNA transcription	-	0.001	*slr1861, sigA, sigF, slr1859, slr1856*
Nicotinate and nicotinamide	-	0.006	*pntA, pntB*
Chemotaxis	-	0.013	*pilT2, pilA2, pilJ*

強光条件で有意に発現量が増加あるいは減少した遺伝子を含む機能カテゴリーを、超幾何分布に基づき検定した。表中の数字は、遺伝子発現量が変化した遺伝子における上側累進確率を示す。遺伝子は、強光条件で発現量が変化した遺伝子名を示す。

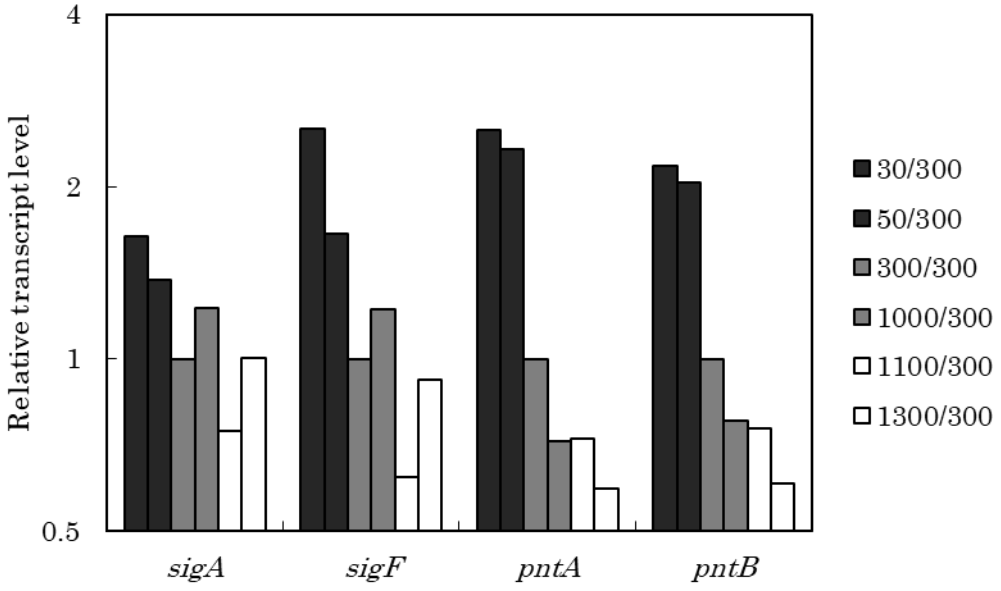

Fig. 2-6 シグマファクターおよびピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の発現量比

sigA、*sigF*、 *pntA*、 *pntB* について、光強度 300 μmol m^{-2} sec^{-1} を基準とした各光強度での遺伝子発現量の比を示す。

2.4　結言

シアノバクテリアなどの光合成微生物にとって、光はエネルギーを獲得する上で不可欠であるが、強光条件では細胞の損傷を行き起こすことが知られている。しかし、先行研究において調査されている条件は、増殖が阻害されない程度の光強度であり、真夏の日中のように増殖が阻害されるほどの強光条件においてどのような応答が生じるか解明されていない。本章は、光強度が不足している弱光条件から増殖が阻害されるほどの強光条件まで、光強度の増加に伴う細胞の応答を解析することを目的とした。本研究はまず、幅広い強度の光を照射可能なフォトバイオリアクターを用いた培養試験およびクロロフィル定量解析から、光強度 30, 50 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ は PCC 6803 の光合成能力に対し光強度が不足する弱光条件であり、光強度 300, 1000 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ は十分な光強度である中光条件であり、光強度 1100, 1300 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ は増殖速度が低下するほど過剰な光強度である強光条件であることを示した（Fig. 2-2, Fig. 2-3）。次に、弱光条件、中光条件および強光条件（光強度 1100, 1300 µmol $m^{-2}sec^{-1}$）で培養した細胞について遺伝子発現プロファイルを比較することで、増殖が阻害される強光条件への PCC 6803 の応答機構を詳細に解析した。

Fig. 2-7 に光強度の増加に伴う PCC 6803 の応答機構を示す。弱光条件（光強度 30, 50 µmol $m^{-2}sec^{-1}$）は中光条件（光強度 300, 1000 µmol $m^{-2}sec^{-1}$）に比べて、先行研究で報告されていた通り（Hihara *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008)、集光機能を担う“Phycobilisome”、“Photosystem I”やクロロフィルなどに関わる遺伝子の発現量が増加し、細胞を保護する“Chaperones”、 “CO_2 Fixation”や“Photosystem II”の反応中心である D1 タンパク質のターンオーバーに関わる遺伝子の発現量が低下した。これらの応答は強光条件（光強度 1100, 1300 µmol $m^{-2}sec^{-1}$)においてさらに強まっており、“Phycobilisome”、“Photosystem I”やクロロフィルなどに関わる遺伝子の発現量が低下し、“Chaperones”や D1 タンパク質のターンオーバーに関わる遺伝子の発現量が増加することが明らかとなった。強光条件特有の応答としては、鞭毛の合成に関わる遺伝子（*pilA2*）やピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ（*pntA*, *pntB*）やシグマファクター（*sigA*, *sigF*）の発現量低下が確認された（Table 2-6, Fig. 2-6)。PCC 6803 において、鞭毛は Fig. 2-5 で示されるように、弱光条件において光源に向かい移動することで集光量を増加させる役割を果たすが、強光条件では光源から遠ざかるような応答は確認されなかった。さらに、シアノバクテリアの培養を機械的な撹拌が行われる環境で行う場合、鞭毛や繊毛のタンパク質を欠損させることで、ATP やアミノ酸の消費量を節約し、物質生産性を向上させることが示唆された。ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼは、弱光条件や混合影響条件では NADH から NADPH を合成する役割を担っている（Kämäräinen *et al.*, 2017)。本研究において、光強度が増加するに伴い *pntA* と *pntB* の発現量が著しく低下しており、強光条件は光合成による NADPH の生産量が高いため、NADH から $NADP^+$へ電子を渡す重要性がなくなったと推測される。一方、シアノバクテリアを用いた乳酸に代表される NADH

を要する物質生産は、細胞内の NADH の供給量を増加させることで、生産性を向上させることができる。そのため、強光条件でトランスヒドロゲナーゼを過剰発現させれば、生産量の多い NADPH から NADH に電子を供給し、生産性を向上させる可能性が示された。さらに、*pntA* や *pntB* の発現量あるいは *pilA2* の発現量は、転写制御因子である *sigA* や *sigF* の発現量と正の相関があり（Fig. 2-6)、*sigA* や *sigF* の発現量を調節することで操作できる可能性が示唆された。

本章は、1100 μmol m^{-2} s^{-1} を超える光強度が光阻害を起こし増殖を阻害することを示した。このような環境では、集光機能の抑制や“Photosystem II”反応中心の修復機構の活性化に加え、鞭毛合成、ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼやシグマファクターの遺伝子発現量減少が PCC 6803 の強光条件への応答に関わっていることを示した。

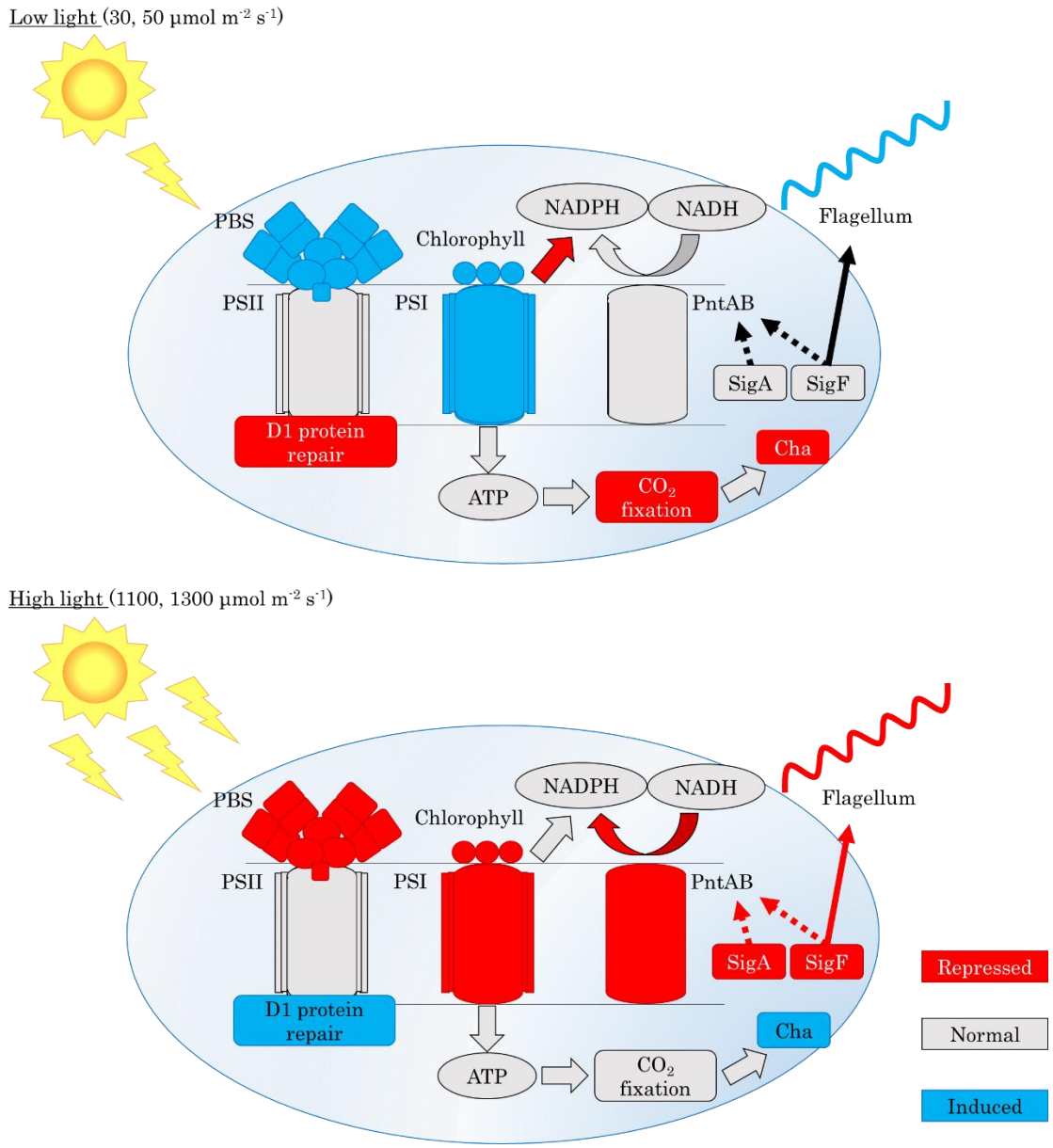

Fig. 2-7 光強度の増加に伴うシアノバクテリア野生株の応答

中光条件に対し、弱光条件および強光条件で誘導あるいは抑制されたタンパク質や複合体を示す。赤色は抑制を、灰色は通常の状態を、青色は誘導を示す。太い矢印は代謝反応を、細い線は転写制御を、細い点線は転写制御の可能性があることをそれぞれ示す。

第 3 章 強光耐性株の構築と遺伝子発現解析

3.1 緒言

シアノバクテリアを用いた物質生産は、光エネルギーを高効率で化合物に変換する製造プロセスであるとし注目を集めているが、培養中に発生するストレスが菌体活性を阻害し、物質生産性を低下させるという課題を有している。中でも光阻害は、真夏の日中のような過剰な光強度により増殖や物質生産が阻害される現象であり、光阻害を克服すれば自然光を用いた物質生産において生産性を向上させることが可能である。そのため、シアノバクテリアへ強光耐性を付与する手法の開発が望まれている。

生物にストレス耐性を付与する手法として、生物が保有する環境変化への適応能力の解析や変異育種によって獲得された菌株の解析を通じて、目的性質に寄与する遺伝子を同定し、遺伝子組み換え技術により生物に付与する手法が報告されている（Yomano *et al.*, 1998)。2 章は、光強度の増加に伴うシアノバクテリアの応答の解析を行い、これまで解明されていなかった増殖が阻害される強光条件での応答を明らかにした。この知見をもとに遺伝子組み換え技術を用いてシアノバクテリアへ強光耐性の付与を目指すことも可能であるが、強光条件に応答した遺伝子は多くあり、効率的に強光耐性株を構築するには遺伝子組み換えを行う対象候補を絞り込むことが望まれる。3 章において育種を用いて強光耐性株を構築することが出来れば、2 章で示された野生株における強光への応答機構と比較し強光耐性株特有の耐性機構を抽出することできる。耐性株特有の機構を同定すれば、強光耐性の付与に向け、非常に有力な遺伝子組み換えの戦略を提案することができる。

先行研究では、変異育種による強光耐性株の構築として、光合成のクロロフィルアンテナのサイズ縮小株（Nakajima *et al.*, 1999, Meils, 2009）が開発された。サイズ縮小株は高菌体密度（1×10^9 cell/ml）であれば光阻害が改善されるものの、低菌体密度や弱光条件では増殖速度が低下するという課題を抱えている。この課題の克服には、光強度に合わせて自在にアンテナサイズを操作することが望まれるが、アンテナサイズの調節におけるメカニズムは解明されておらず、そのような遺伝子操作は達成できていない。一方変異育種でない菌株構築技術として、生物の適応力を利用した育種技術も開発が進められている。これは長期間ストレス環境で植え継ぎ培養を行うことで、そのストレス環境に適応した菌株を取得する手法であり、遺伝子変異が生じる頻度が低いため有用な変異を同定しやすいと期待される（Helling *et al.*, 1987; Lenski *et al.*, 1993)。シアノバクテリアにおいても PCC 6803 は全ゲノムが同定されており（Kaneko *et al.*. 1996)、酸性ストレス（Uchiyama *et al.*, 2015)、アルコールストレス（Matsusako *et al.*, 2017）について、植え継ぎ培養で取得された耐性株の網羅的解析が行われている。

3 章では、長期間強光条件で植え継ぎ培養を行うことで PCC 6803 の強光耐性株の構築に取り組み、網羅的遺伝子発現解析を用いた耐性機構の解析を行った。さらに 2 章で示さ

れた野生株における強光への応答機構と比較することで、強光耐性株特有の耐性機構として *isiA* の過剰発現を見出し、強光耐性の付与に向けて非常に有力な戦略を明らかにした。

3.2　実験材料と実験方法

3.2.1　培養

前々培養、前培養はLEDを光源とするインキュベーター（TAITEC, BR-43FL）を用いて、光強度 40 μmol m^{-2} sec^{-1}、150 rpm、34℃で振とう培養を行った。植菌時の OD は 0.03、培養時間は約 72 h とした。

本培養は、植え継ぎ培養による増殖速度の変化を正確に評価するため、植え継ぎ培養と同じ培養系を使用した。植え継ぎ培養は、ストレスにより菌体が死滅してしまうことを防ぐため同時に複数系列の培養を行うことが有効であり、試験を長期間実施する必要があるため、培養液量の小さい試験管培養系を採用することとした。試験管培養は、試験管（φ3 cm×20 cm, 71-059-042, Iwaki）を用いてワーキングボリューム 30 ml 培養を実施した。培養系は、水槽（テトラ)、ワンタッチフィルター（テトラ)、ポンプ　（ジェックス，e-AIR 400wb)、ヒーター　（ジェックス，　Compact Slim ホットパック 150BLK)、マイクロチューブラック（heathrow scientific)、試験管立（TOP)、フラスコダイバーリング　（アズワン)、フィルター　（Millipore，　Millex®-FG)、シリコ培養栓（TOP, T-32)、LED 光源（HAYASHI, LA-HDF158AS）を用いて構築した（Fig. 3-1)。水槽内の水温を 34℃に保ち、ポンプを用いて試験管内の培地へ絶えず泡ができる程度の通気量で空気を通気した。また、通気により培養液の攪拌を行った。試験管は、LED 光源側の水槽の内壁に接する位置に設置した。培養時の光量は、光源から最も近い試験管表面で光強度 4000 から 9000 μmol m^{-2} sec^{-1} と、真夏の日中（光強度 2000 ~ 2500 μmol m^{-2} sec^{-1}）よりも強い光強度に設定した。

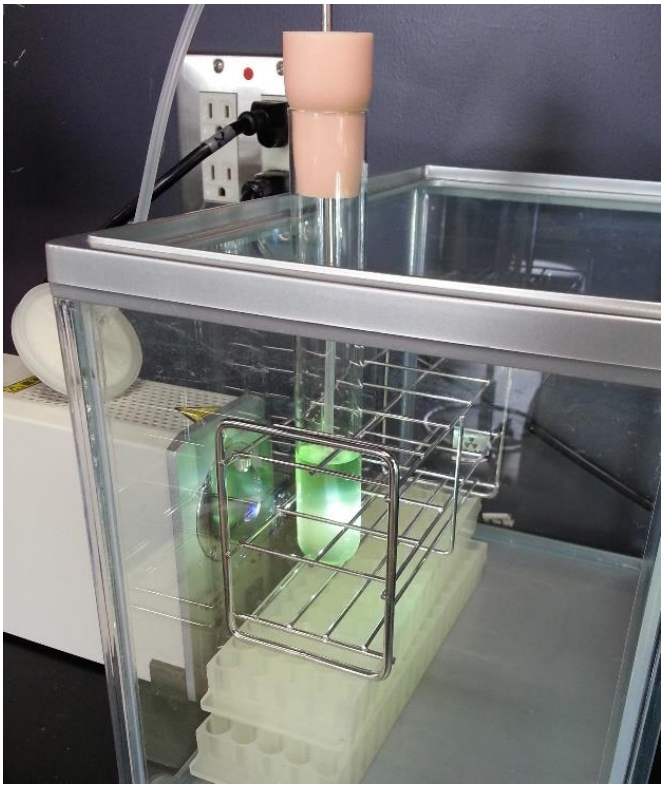

Fig. 3-1 試験管培養系

3.2.2 植え継ぎ培養

本研究では、培養液の一部を新たな培養液に移すことで培養を継続するものを、植え継ぎ培養と呼ぶ。項目 3-2-1 に記載した試験管による培養系を採用し、4 系列で試験を実施した。本研究では、4 系列について独立に植え継ぎ培養を行うのではなく、最も到達 OD が高い系列の培養液を、全系列の新たな培養液へ植え継いだ。植え継ぎ時の初期 OD は、植え継ぎ培養開始時は 0.03 とし、その後、増殖速度の増加に伴い、対数増殖期での植え継ぎを継続するため、徐々に初期 OD を小さくし、植え継ぎ 6 回目以降の培養では、初期 OD を 0.01 とした。なお、第 1 回目の植え継ぎ後の培養では増殖速度が小さかったため、培養初期の低い OD による強光ストレスが原因と推測し、2 回目の植え継ぎ時の初期 OD は 0.06 となるように植え継いだ。また培養時間も、対数増殖期での培養を継続するため、増殖速度に合わせて変化させた。光強度については、植え継ぎ培養開始時は 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} に設定したが、より強い強光ストレスを与えるため、植え継ぎ 9 回目以降の培養では徐々に光強度を大きくし、植え継ぎ培養終了時の光強度は、9000 μmol m^{-2} sec^{-1} とした。植え継ぎ培養終了時に全ての系列の培養液を混合し、培養液に等量の 30%グリセロール溶液を加え、－80℃で保存した。以降、植え継ぎ培養終了時に獲得された菌株を耐性株と呼ぶ。

3.2.3　シングルコロニーアイソレーション

植え継ぎ培養により獲得した耐性株を、改変 BG11（Table 2-1）に 1.5% 寒天、0.3%チオ硫酸ナトリウムを添加した平板培地に塗布し、インキュベーター（三洋電機、 MIR 154）を用いて光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1}、34℃で培養を行った。形成されたコロニーは LED を光源とするインキュベーター（TAITEC, BR-43FL）を用いて、光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1}、150 rpm、34℃で振とう培養を行い増殖させた。以下では、単離耐性株と記載する。

3.3　結果と考察

3.3.1　植え継ぎ培養

試験管を用いた液体培養系を用い、初期 OD が 0.03 となるように植菌し、様々な光強度と増殖速度の関係を調べた結果、光強度が 5500 µmol m^{-2} sec^{-1} を超えると増殖速度が低下し、光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} を超えると死滅することが確認された。植え継ぎ培養を行う際の光強度は、「強光のストレスを受け増殖が阻害されるが、増殖が可能である環境」が望ましいと考え、本研究では光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} で植え継ぎ培養を行うこととした。試験管を用いた培養は、真夏の日中（光強度 2000 ~ 2500 µmol m^{-2} sec^{-1}）に比べて光強度が強い 5000 µmol $m^{-2}sec^{-1}$ で増殖の阻害が確認された。これは、自然光が水面に対し均一な強度の光を照射することで水面付近を全て強光条件にすることに対し、試験管培養は Fig. 3-1 が示すように LED の点光源を用いたことで、水面の一部分のみ強光条件にしたためと推測される。

本研究は植え継ぎ培養を 4 系列で行い、各植え継ぎ世代において最大の増殖速度を示した系列を新たな培地へ植え継いだ。植え継ぎ培養は光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} で開始し、植え継ぎ回数 9 回目から段階的に光強度を 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} まで増加させた（Fig. 3-2）。なお、光強度を増加させることは強光ストレスを増大させるため、強いストレスに対して耐性のある菌株の獲得が期待される一方、ストレスにより菌体が死滅してしまうことを防ぐため、4 本中 2 本の試験管に対してのみ光強度を高めた。

Fig. 3-2 は、植え継ぎ培養の光強度と植え継ぎ系列の比増殖速度を示す。光強度が一定の条件下での植え継ぎ培養（培養開始から植え継ぎ回数 8 回目まで）において、増殖速度は大きく増加した。なお、植え継ぎ回数 7 回目までの培養では到達 OD が高くなってしまったため、比増殖速度を正確に求めることができていない。さらに、光強度を段階的に増加した環境下の植え継ぎ培養（植え継ぎ回数 9 回目から培養終了まで）においても、光強度の増加に対して大きな増殖速度の低下は見られず、ほぼ同程度の増殖速度を保った。植え継ぎ培養終了時には、野生株で増殖がほぼ見られなかった光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} においても、植え継ぎ培養における菌株は大きな増殖速度を示した。なお、植え継ぎを行う際に、培養液 100 µl を BG11 平板培地に塗布し、雑菌汚染が生じていないことを確認した。

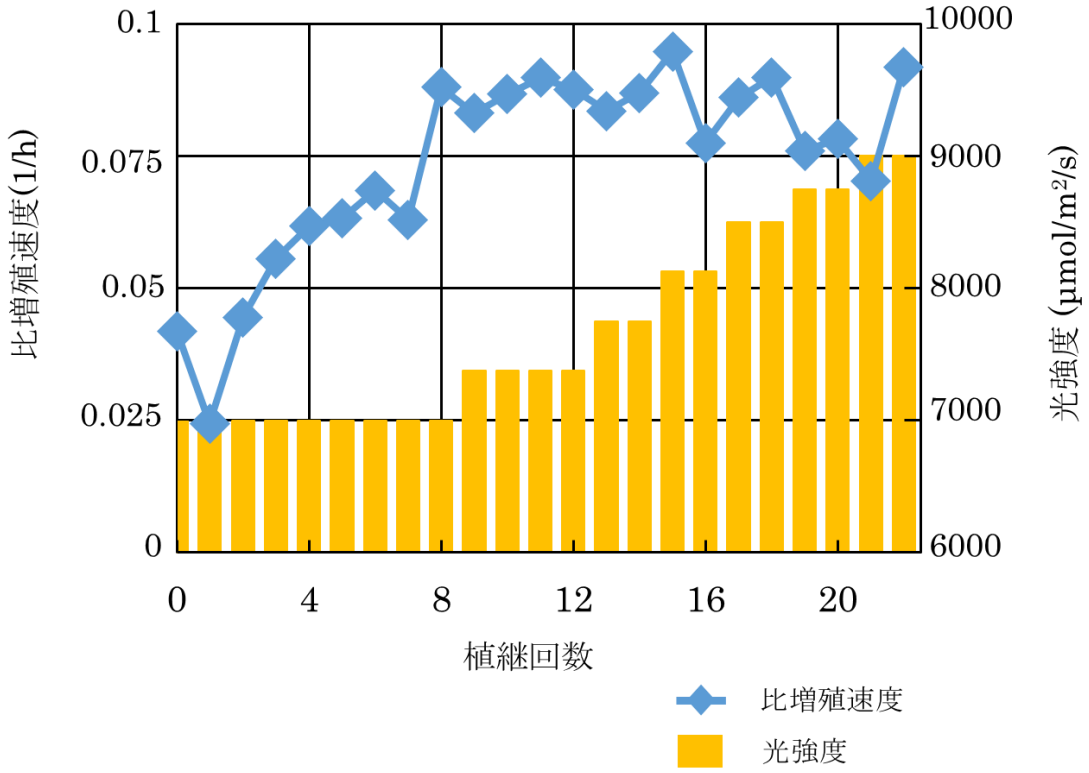

Fig. 3-2 植え継ぎ培養時の光強度と比増殖速度

植え継ぎ培養における光強度および植え継ぎ系列の比増殖速度を示す。植え継ぎ培養開始時は光強度を 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} に設定したが、植え継ぎ回数 9 回目から段階的に光強度を増加させ、培養終了時には光強度を 9000 μmol m^{-2} sec^{-1} に設定した。植え継ぎ系列は、4 つの培養系列中で最大の増殖速度を示した系列で、新たな培地に植え継いだものを指す。

3.3.2 耐性株の増殖速度

野生株と耐性株について、光強度 40 μmol m^{-2} sec^{-1} で前々培養および前培養を行った後、光強度 40, 4000, 7000, 9000 μmol m^{-2} sec^{-1} で本培養を行った。本培養試験はそれぞれの光強度で 3 回ずつ実施した。なお光強度 40 μmol m^{-2} sec^{-1} については、試験管培養系では光強度が弱すぎて作成できないことから、前々培養や前培養と同じ LED を光源とするインキュベーターで培養試験を行った。

培養試験の結果、野生株は光強度が 4000 μmol m^{-2} sec^{-1} から 9000 μmol m^{-2} sec^{-1} に増加するに伴い増殖速度が低下し、光強度 9000 μmol m^{-2} sec^{-1} では増殖できないことが確認された。野生株の光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} の増殖結果は、培養間の差が大きく、強光ストレスにより表現型にゆらぎが生じていると考えられる。一方、耐性株は光強度が増加しても増殖速度の低下は見られず、野生株が増殖できない光強度 9000 μmol m^{-2} sec^{-1} においても増殖速度が低下しないことから、耐性株が強光ストレス耐性を獲得したことが示された (Fig. 3-3)。さらに、耐性株は光強度 40 mol m^{-2} sec^{-1} においても野生株と同等の増殖速度を

示した。光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} と光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} の野生株の OD_{730} を比較すると、光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} の方が OD_{730} は小さな値を示している。光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} は OD_{730} が小さいことから、PCC 6803 の光合成能力に対し光強度が不足する弱光条件であると判断される。耐性株は弱光条件である光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} おいて野生株と同等の増殖速度を示しており、強光耐性と弱光条件での増殖性の両方を兼ね備えていることが明らかとなった。従来の先行研究で取得された強光耐性株は弱光条件での増殖速度が低下するという欠点を有しており、本研究で取得された耐性株は先行研究と異なる耐性機構を有していると推測される。

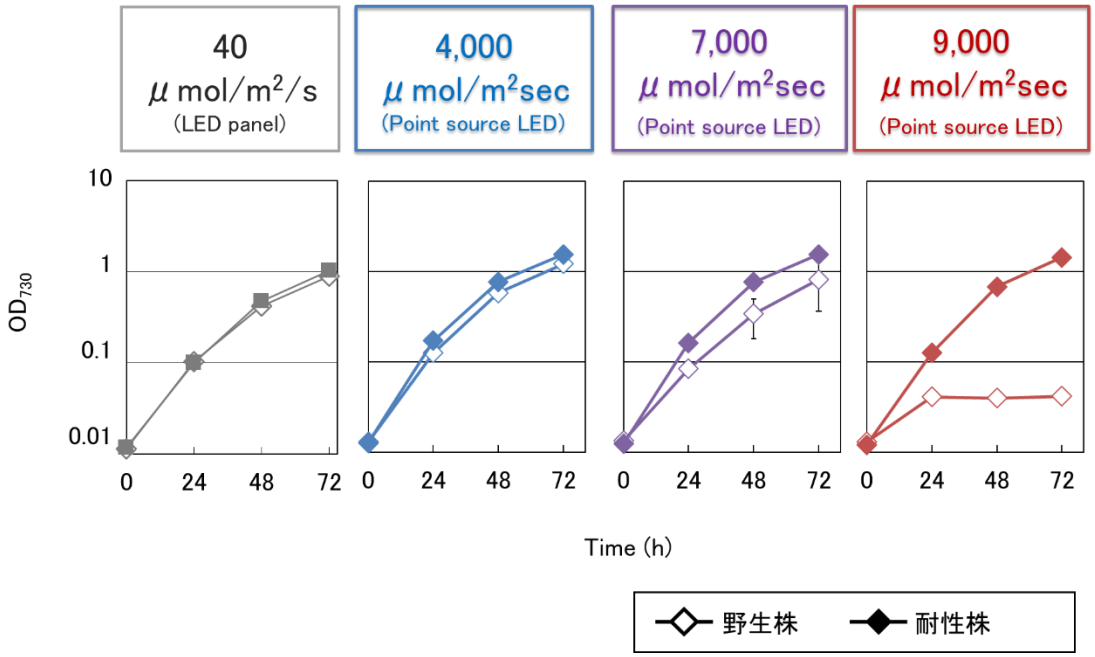

Fig. 3-3 野生株と耐性株の培養試験結果

野生株と耐性株について、光強度 40, 4000, 7000, 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} で本培養をそれぞれ 3 回行った際の OD_{730} の経時変化を示す。エラーバーは 3 回の培養試験における標準偏差を示す。

次に、強光耐性の安定性を評価した。育種により取得されたストレス耐性は、その性質が不安定である場合、ストレスの無い環境で培養を行うことで耐性が失われる可能性がある。本研究の培養試験は、通常三角フラスコを用いた弱光条件（光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1}）での種菌培養を前々培養 72 h、前培養 72 h の計 144 h 実施している。本試験は弱光条件での長期種菌培養による耐性の安定性を評価するため、弱光条件での種菌培養を 360 h 実施した。この時間は弱光条件での倍化時間が 12 h であることから、約 30 世代に相当する。種菌培養の後、試験管培養系を用い中光条件（4000 µmol m^{-2} sec^{-1}）および強光条件（9000 µmol m^{-2} sec^{-1}）で増殖を評価した。

弱光条件下での長期間植え継ぎ培養の結果より、耐性株は弱光条件において野生株とほ

ぼ同等の増殖速度を示した（Fig. 3-4)。また本培養の試験結果より、耐性株は弱光条件で長期間培養しても増殖速度に変化はなく、強光耐性が失われないことが確認された（Fig. 3-5 D)。また野生株の培養結果や耐性株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} での培養試験結果から、野生株と耐性株の増殖は共に、弱光条件で長期間培養したことによりほとんど影響されないことが示された（Fig. 3-4)。以上より、本研究で取得された強光耐性株は弱光条件で長期間培養しても耐性株の強光ストレス耐性は維持されることが確認された。

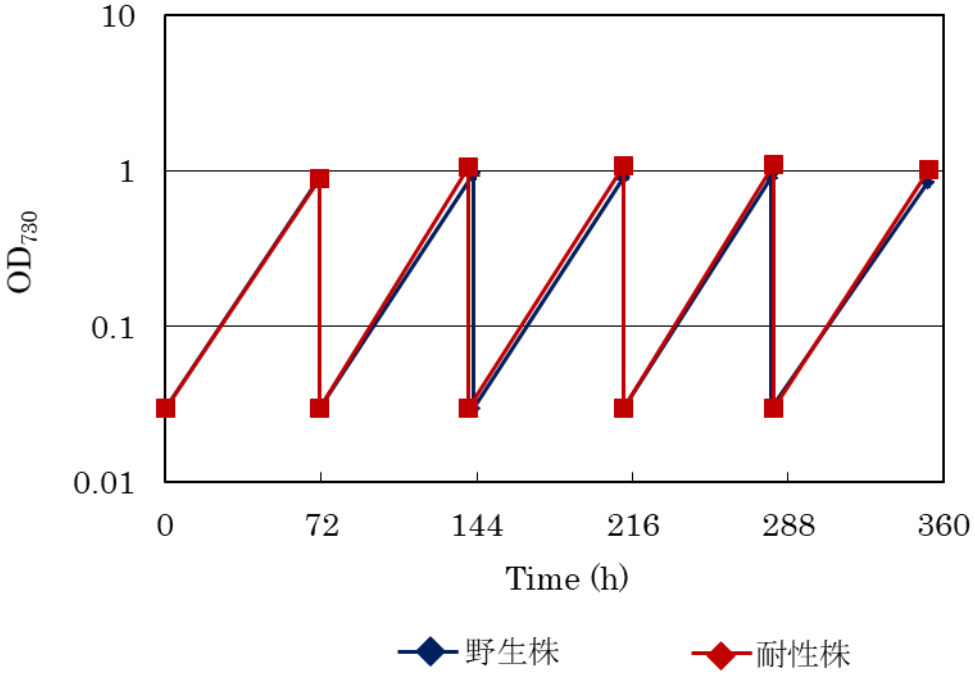

Fig. 3-4 弱光条件における野生株と耐性株の増殖の比較
三角フラスコを用いた培養における（光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1})、野生株と耐性株の増殖を示す。エラーバーは 6 回の培養における標準偏差を示す。

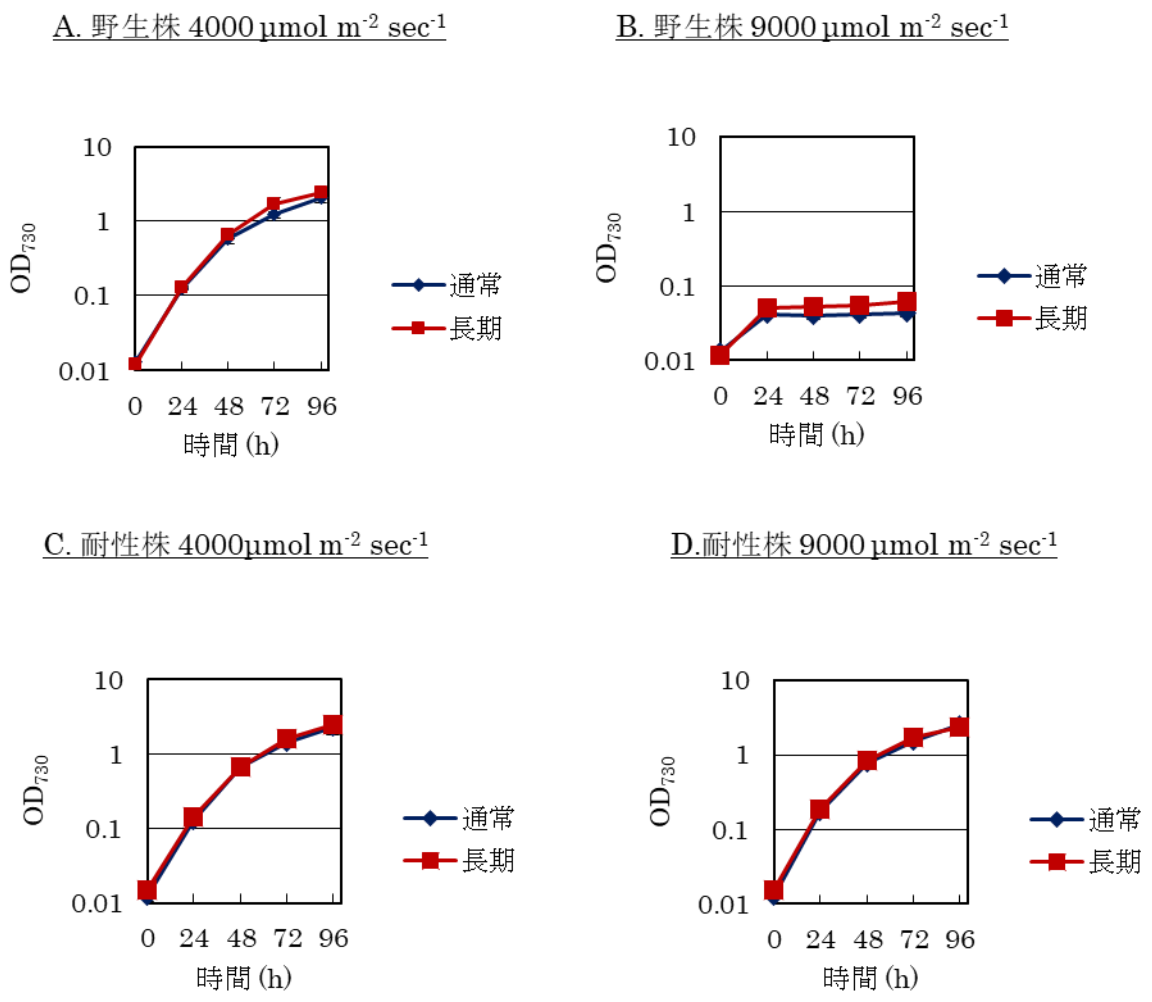

Fig. 3-5 長期弱光条件での培養後の増殖と通常の前培養後の増殖の比較
通常通り 144h の前培養を行った後の増殖「通常」と、約 30 世代という長期間、弱光条件下で培養した後の増殖「長期」を比較した。(A) 野生株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1}、(B) 野生株の光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1}、(C) 耐性株の光強度 4000 µmol m^{-2}、(D) 耐性株の光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1}、における培養結果をそれぞれ示す。エラーバーは 3 回の培養間における標準偏差を示す。

耐性株はスクリーニングを行っていないため幅広い性質を持つ菌体の集団である可能性があるため、コロニー間で弱光条件や強光条件での増殖速度に差異があるか評価した。まずは耐性株にシングルアイソレーションを行い、単離耐性株 1、単離耐性株 2、単離耐性株 3、単離耐性株 4 の 4 株を取得した。野生株、耐性株および単離耐性株を光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} で前々培養および前培養を行った後、弱光条件である光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} と強光条件である光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} の 2 条件でそれぞれ 3 回培養を行った (Fig. 3-6)。なお光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} については、試験管培養系では光強度が弱すぎて作成できな

いことから、前々培養や前培養と同じ LED を光源とするインキュベーターで培養試験を行った。本培養の結果、野生株は光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} では耐性株と同等の増殖速度を示すが、光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} では増殖できないことが確認された。一方単離耐性株は、単離耐性株間に弱光条件および強光条件で増殖速度の差異はほとんどなく、いずれも弱光条件と強光条件の両条件で耐性株と同等の増殖速度を示した。単離耐性株と耐性株の増殖速度がほぼ同じであることから、弱光で増殖速度が低下しない強光耐性を持つ菌株で構成されることが示された。

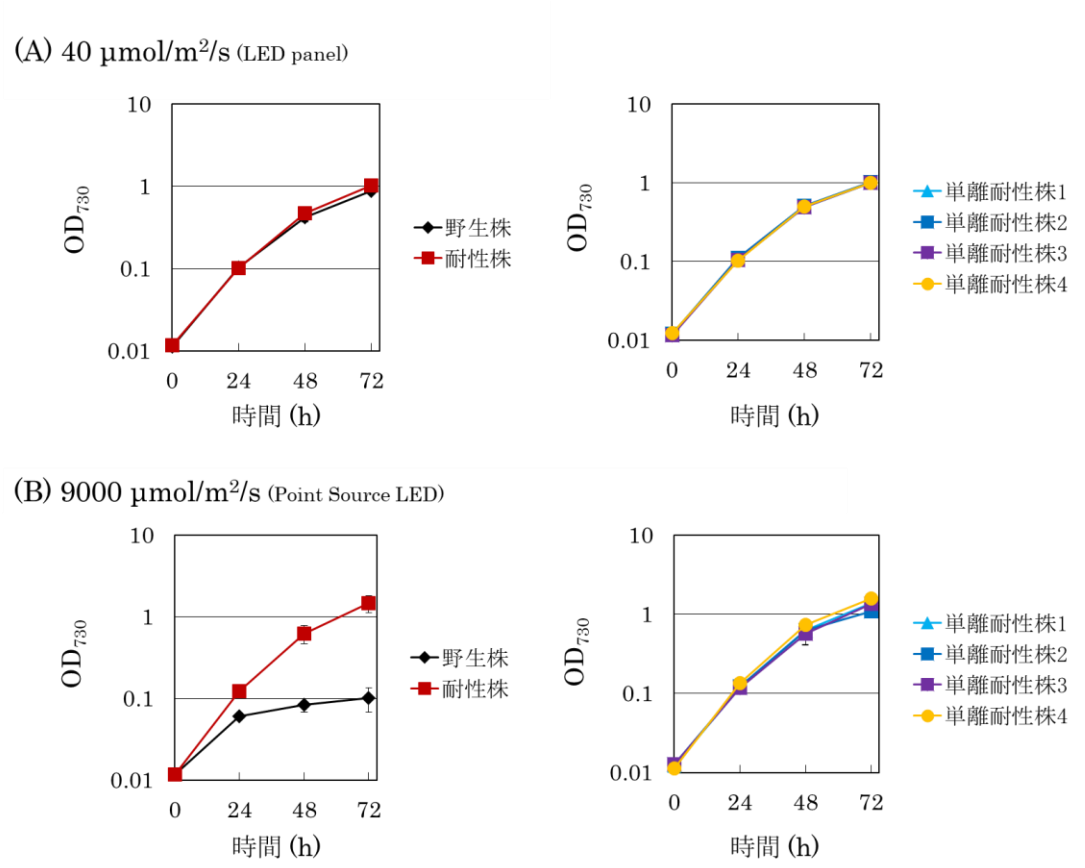

Fig. 3-6 単離耐性株の増殖曲線

野生株、耐性株、単離耐性株 1-4 の増殖曲線を比較した。単離耐性株 1、単離耐性株 2、単離耐性株 3、単離耐性株 4 は、耐性株にシングルアイソレーションを行い取得された各菌株を示す。(A) LED パネルを用いた光強度 400 µmol m^{-2} sec^{-1}、(B) 点光源を用いた光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1}、における培養結果。エラーバーは 3 回の培養試験による標準偏差を示す。

3.3.3　クロロフィル定量解析

クロロフィルは光合成の集光において重要な役割を担う光合成色素であり、強光条件では細胞あたりのクロロフィル量が減少することが知られている（Muramatsu *et al.*, 2012）。本研究においても 2 章において、光強度の増加に伴い細胞あたりのクロロフィル濃度が増加することが確認された（Fig. 2-3）。また変異育種による強光耐性株の構築例として、光合成のクロロフィルアンテナのサイズ縮小株が報告されている（Nakajima *et al.*, 1999; Meils, 2009）。強光条件での植え継ぎ培養によって獲得された強光耐性機構がクロロフィル量の減少によるものであるか調べるため、光強度 4000, 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} で培養した野生株と耐性株を対数増殖期に回収し、クロロフィル濃度を測定した。

Fig. 3-7 より、野生株は従来の知見通り、光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} に対して光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} では、クロロフィル濃度が約 50%減少した。一方耐性株は、光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} に対して光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} で、クロロフィル濃度が約 20%しか減少しなかった。この結果は、耐性株において、シアノバクテリアは強光条件下で細胞中のクロロフィル濃度を低くすることで過剰な光吸収を防ぐという応答が弱まったことを示す。本研究で獲得された耐性株は、クロロフィル濃度の減少に加え、新たな強光耐性機構を有しているため、クロロフィル濃度を減少させて過剰な光吸収を防ぐ必要が無かったと推測される。

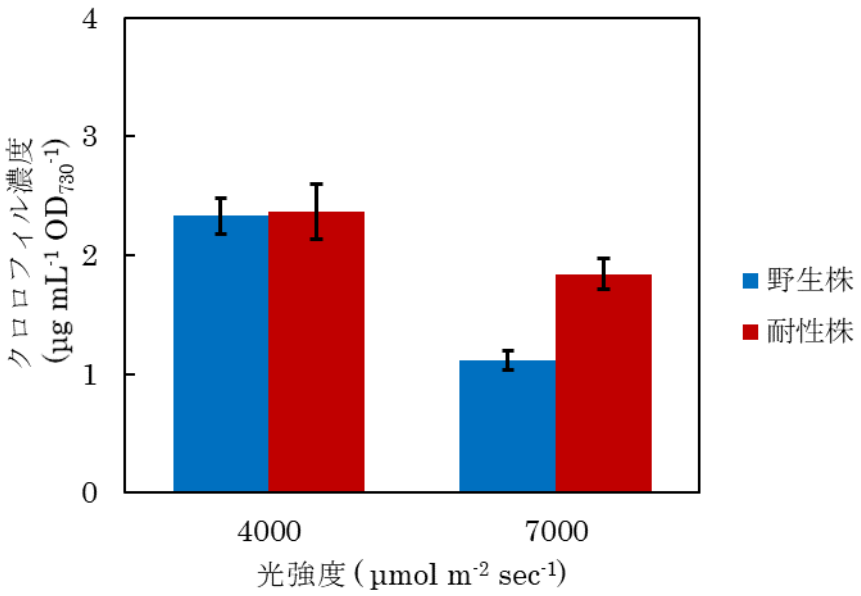

Fig. 3-7 クロロフィル定量解析の結果
光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} と 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} でそれぞれ 3 回培養した野生株と耐性株をクロロフィル濃度測定に供した。エラーバーは 3 回の定量解析における標準偏差を示す。

3.3.4　網羅的遺伝子発現解析

本研究で獲得された耐性株の強光耐性機構を解析するため、光強度 4000, 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} で培養した野生株と耐性株を対数増殖期に回収し、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析に供した。本研究は、プローブを設計した 3527 遺伝子の内、全ての条件下で遺伝子発現データが得られた 2892 遺伝子について詳細な解析を行った。

Table 3-1 は菌株間および光強度間で発現量が変化した遺伝子数を示す。遺伝子発現量の有意変化については、Welch の t 検定により、両側検定 P 値 1%を有意水準として判定を行った。発現量が変化した遺伝子数が最も多いのは、野生株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} と耐性株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 間であった。一方、野生株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} と野生株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} の間や、耐性株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} と耐性株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} の間は、発現量が変化した遺伝子数が少なかった。以上のことから、光強度の違いより菌株の違いが、遺伝子発現量に大きな影響を与えていることが明らかとなった。

Table 3-1 発現量が変化した遺伝子数

	W(H) / W(M)	T(M) / W(M)	T(H) / W(H)	T(H) / T(M)
発現量が増加した遺伝子数	2	27	132	7
発現量が減少した遺伝子数	3	48	171	4
発現量が変化した遺伝子数	5	75	303	11

Welch の t 検定により、両側検定 P 値 1%を有意水準として遺伝子発現量が有意に変化したと判定された遺伝子数を示す。W(M): 野生株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件 、W(H): 野生株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件、T(M): 耐性株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件、T(H): 耐性株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件。

遺伝子発現データ全体の傾向を理解するため、発現量データを主成分分析に供した。主成分 1 と主成分 2 の散布図を Fig. 3-8 に示す。主成分 1 は野生株と耐性株が、特に光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} においてよく分離されていることから、主成分 1 は強光ストレス耐性に関する遺伝子発現の違いに対応する軸であると推測される。一方、主成分 2 は、光強度や培養系列などにも対応しておらず、これらの要素に寄らない軸であると考えられる。主成分 1 は全体の寄与率の 33%を占め、強光ストレス耐性との相関も見られたため、主成分 1 について解析を進めることとする。

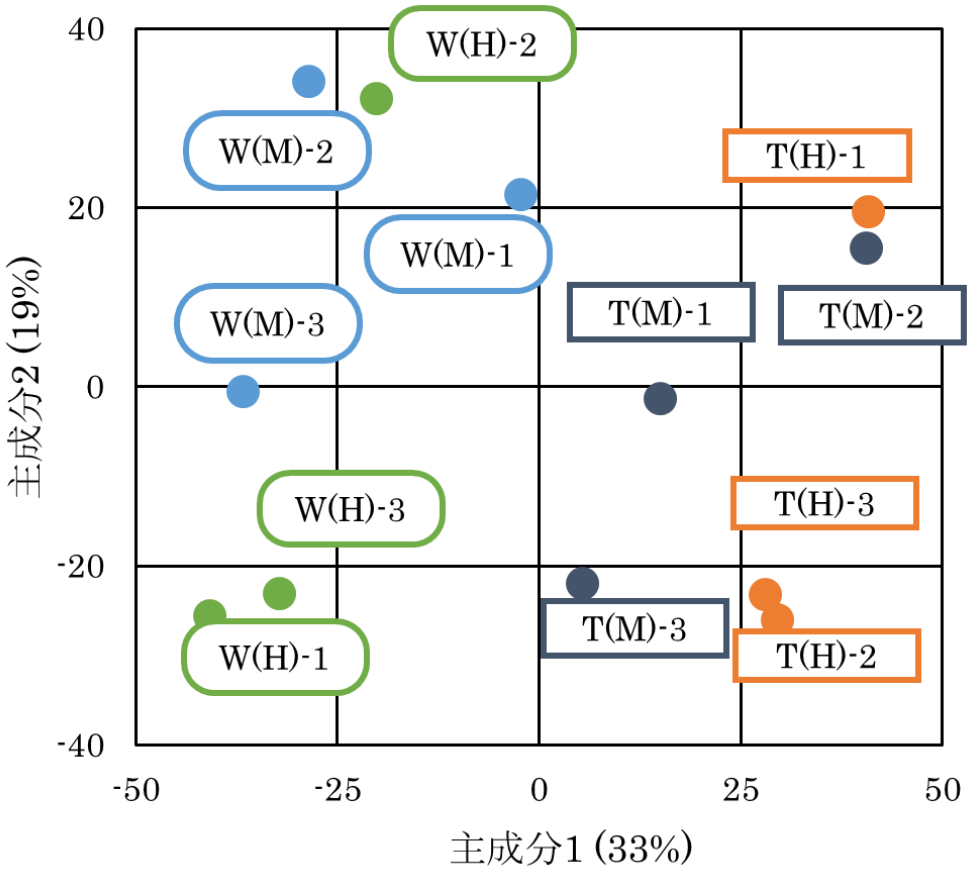

Fig. 3-8 主成分分析結果

主成分 1 と主成分 2 に関する散布図である。光強度 4000、7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件でそれぞれ 3 回ずつ培養試験を行い、対数増殖期の菌体について遺伝子発現データを取得し、主成分分析に供した。主成分 1 の寄与率は 33%、主成分 2 の寄与率は 19%である。W (M)-1: 野生株を光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件で 1 回目に培養した際に取得された遺伝子発現データ。以下同様に、W (M)-2: 野生株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件 2 回目、W (M)-3: 野生株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件 3 回目の遺伝子発現データ。W (H)は野生株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件、T (M)は耐性株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件、T (H)は耐性株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件を示す。

主成分 1 の主成分負荷量が大きい遺伝子の上位 1%を Table 3-2 に示す。主成分負荷量が大きい遺伝子の発現量は、耐性株の強光ストレス耐性と正の相関があると考えられる。Table 3-2 が示す遺伝子の中でも *ndhD2* と *psbM* は、先行研究の知見から強光耐性機構に関与する可能性が高い遺伝子であるため、下記で仮説を述べる。なお、"Transposon-related functions"については、Table 3-6 で考察を述べる。

ndhD2

ndhD2 (*slr1291*) は、NADH デヒドロゲナーゼのサブユニットをコードする遺伝子であり、光合成の電子伝達ではなく、呼吸における電子伝達への影響において役割を担っていると考えられている (Ohkawa *et al.*, 2000)。また、*ndhD2* は光強度に依存して転写を制御する PedR (Ssl0564) によって、発現量を制御されていると報告されている。通常の環境では PedR により *ndhD2* の発現量を抑制され、強光条件では PedR が構造変化により不活性化することで、*ndhD2* の発現量が増加する (Nakamura *et al.*, 2006)。

pedR と、PedR に転写を活性化されていると考えられる遺伝子である *chlL* (*slr0749*)、*chlB* (*slr0772*)、*slr1957* と、PedR に転写を抑制されていると考えられる遺伝子である *ndhD2* の発現量を Table 3-3 に示す。*chlN* (*slr0750*) は PedR により転写を活性化されていると考えられるが、本研究で遺伝子発現量データを得ることができなかった。Table 3-3 から、野生株では、光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} に対して光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} において、*pedR* の発現量はあまり変化がないが、*chlL*, *chlB*, *slr1957* の発現量は著しく低下し、*ndhD2* の発現量が増加していることがわかった。この結果は、先行研究における知見とよく一致しており、PedR が光強度に依存して構造を変化させ、これらの遺伝子の転写を調節していることが支持された。一方耐性株では、野生株に比べて *pedR* の発現量が非常に低く、*chlL*, *chlB*, *slr1957* の発現量においても *pedR* と同様の傾向が見られた。一方、*ndhD2* の発現量は、野生株に比べ、植え継ぎで発現量が大きく増加した。以上より、耐性株では、*pedR* の発現量の減少により、*chlL*, *chlB*, *slr1957* の発現量の減少と *ndhD2* の発現量増加が起きたと推測される。また、耐性株は、これらの遺伝子の光強度による発現量変化が小さく、*pedR* の発現量減少により、PedR の構造変化による *ndhD2* らの遺伝子の発現量を調節する効果が、小さくなったと示唆された。

PedR に発現量を調節されている遺伝子の強光条件において果たす役割は明らかになっていない。しかし、これらの遺伝子の発現量が強光条件で減少し、耐性株においても減少したことから、PedR による発現量の調節は、強光条件での生育に重要な機能を持つ可能性が示唆された。

psbM

psbM は、"Photosystem II"のサブユニットをコードする遺伝子であり、"Photosystem II"の二量体の安定化に寄与すると言われている。また *psbM* の破壊株では、強光条件における

酸素発生量が、野生株に比べ急速に低下することが報告されている（Bentley *et al.*, 2008)。以上より、耐性株は、*psbM* の発現量が増加することで、強光条件において“Photosystem II”の二量体が安定化し、“Photosystem II”の機能低下を防ぐことができたと推測される。

Table 3-2 主成分 1 の主成分負荷量上位 1%

ORF ID	既知遺伝子の別名	機能カテゴリー	主成分負荷量
sll1660	-		0.97
slr1417		*ycf57, iscA*	0.95
slr1501	-	Other	0.94
sll0710	-		0.92
sll1061	-		0.92
sll1397		Transposon-related functions	0.92
slr0613	-		0.91
ssr2972	-		0.91
slr1117	-		0.90
sll0699		Transposon-related functions	0.89
slr1772	-	Other	0.88
sll1062	-		0.87
sll1652	-		0.86
slr1778	-		0.85
slr1413	-		0.85
slr1100	-		0.84
slr1777	*chlD*	Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin	0.84
slr0722	-		0.83
sll0700		Transposon-related functions	0.83
sll0709	*llaI.2*		0.83
slr0724	*sohA, prlF*		0.82
sll0933	-		0.82
slr1291	*ndhD2*	NADH dehydrogenase	0.81
sml0003	*psbM*	Photosystem II	0.81
sll1187	*lgt, umpA*	Membranes, lipoproteins, and porins	0.81
sll1054	-		0.80
sll0712	*cysM*	Serine family / Sulfur assimilation	0.78

Table 3-3 *pedR* と *pedR* に転写が制御される遺伝子の発現量変化

ORF ID	既知遺伝子の別名	W(H)/W(M)	T(M)/W(M)	T(H)/W(H)	T(H)/T(M)
ssl0564	*pedR*	1.2	0.6	0.6	1.2
slr0749	*chlL, frxC*	0.5	0.4	0.8	0.9
slr0772	*chlB*	0.4	0.2	0.5	1.1
slr1957	-	0.4	0.3	0.7	1.0
slr1291	*ndhD2*	1.4	5.2	5.2	1.4

表中の数字は、各条件で取得された 3 データの中央値の比を示す。W(M): 野生株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件 、W(H): 野生株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件、T(M): 耐性株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件、T(H): 耐性株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件

主成分 1 の主成分負荷量の大きさが下位 1%の遺伝子を Table 3-4 に示す。主成分負荷量が小さい遺伝子の発現量は、耐性株の強光ストレス耐性と負の相関があると考えられる。Table 3-4 が示す *ycf4*、*nblB1*、*atpI, atpC, atpG, atpD*、*petN* と *psbM* について、強光耐性機構への関与に関する仮説を述べる。

atpI, atpC, atpG, atpD

これらの遺伝子は“ATP synthase”のサブユニットをコードする遺伝子である。耐性株において、“ATP synthase”の存在量が減少したことが示唆された。

強光条件では、過剰な光エネルギーによる細胞の損傷を防ぐため、“Photosystem”で吸収したエネルギーの多くを熱として放散していることが知られている（Baker, 2008)。シアノバクテリアにおいても、同様の機構の存在が示されている（Kirilovsky, 2007; Bailey *et al.*, 2008)。熱放散は、*Arabidopsis thaliana* を用いた研究で、チラコイドルーメン内の pH の低下を探知して駆動されることが報告されている。光強度が上昇すると光合成の電子伝達量が増加するため、チラコイド膜を介したプロトン勾配が大きくなり、ルーメン内の pH が低下する。この pH 低下を探知し、熱放散が行われるのである（Munekage *et al.*, 2001)。

耐性株において、“ATP synthase”の存在量減少は、チラコイド膜を介したプロトン勾配を拡大させ、ルーメン内の pH を低下させると推測される。これは *Arabidopsis thaliana* で報告されている熱放散が行われる状態と一致する。以上より、耐性株における“ATP synthase”の存在量の減少は、強光ストレス耐性株において熱放散を誘導し、過剰な光エネルギーの解消に重要な役割を担ったことが示唆された。

ycf4

ycf4 は“Photosystem I”の会合に関わる遺伝子である。先行研究において、*ycf4* の変異株では、クロロフィルに対するフィコシアニンの割合と、“Photosystem I”に対する“Photosystem II”の割合が、増加すると報告されている（Wilde *et al.*, 1995)。本研究の遺伝

子発現データにおいて、耐性株において、“Photosystem I”のサブユニットをコードする遺伝子の発現量が低下する傾向が見られた。そのため、“Photosystem I”に関わる遺伝子の発現量低下と *ycf4* の発現量低下は、“Photosystem I”の存在量を減少させることで過剰な光エネルギーの吸収を防ぎ、強光ストレス耐性に繋がったと推測される。

nblB1

nblB1 は“Phycobilisome”の分解に関わるとされる遺伝子である（Dolganov *et al.*, 1999)。耐性株では、“Phycobilisome”の分解に関わる *nblA* の発現量が増加する傾向が見られたが、同じく“Phycobilisome”の分解に関わる *nblB1* は発現量が大きく低下した。NblA と NblB1 の機能の違いとして、NblA は“Phycobilisome”のリンカープロテインの分解に関わるが、NblB1 はリンカープロテインの分解に関わらないという報告がある（Li *et al.*, 2002)。詳細は不明だが、NblB1 が分解に関わるタンパク質が、強光耐性に寄与している可能性が示唆された。

petN

petN は“Cytochrome b_6f *complex*”のサブユニットをコードする遺伝子であり、欠損株の培養結果から、生育に必須の遺伝子と考えられている（Schneider *et al.*, 2007)。本研究の発現解析結果では、*petN* の遺伝子発現量と強光耐性には負の相関があることが示され、*petN* が強光条件における電子伝達系に影響を与えることが示唆された。

Table 3-4 主成分 1 の主成分負荷量の下位 1%

ORF ID	既知遺伝子の別名	機能カテゴリー	主成分負荷量
sll0226	*ycf4*	Photosystem I	-0.99
sll0931	-		-0.98
sll1663	*nblB1*	Phycobilisome	-0.98
sll1322	*atpI, atpB*	ATP synthase	-0.96
slr0742	-		-0.95
sll1327	*atpC, atpG*	ATP synthase	-0.95
sll1321	-	ATP synthase	-0.94
sll1323	*atpG*	ATP synthase	-0.94
sgl0002	-		-0.94
sml0004	*petN, ycf6*	Cytochrome b6/f complex	-0.93
sll1325	*atpD, atpH*	ATP synthase	-0.91
slr1416	*morR*		-0.90
sll1665	-		-0.89
sll1043	*pnp*	RNA synthesis, modification, and DNA transcription	-0.88
slr0250	-		-0.88
slr0977	*rfbA*		-0.87
ssr2142	*ycf19*		-0.86
slr1096	*phdD, lpd*	Pyruvate dehydrogenase	-0.85
sll0224	-		-0.85
sll0932	-		-0.85
slr0728	-		-0.82
sll1677	-	Adaptations and atypical conditions	-0.82
slr1127	-		-0.82
slr0964	-		-0.81
slr0739	*crtE*	Carotenoid	-0.81
slr1790	-		-0.81
slr0966	*trpA*	Aromatic amino acid family	-0.80

3.3.5　菌株間の遺伝子発現プロファイルの差異

耐性株の強光耐性機構に関与している遺伝子機能カテゴリーを特定するため、1 つ以上の条件間で発現量が変化した遺伝子に有意に多く含まれる機能カテゴリーを、超幾何分布に基づいて解析した。なお、遺伝子発現変化が有意であるかに関する判定は、Weltch の t 検定を用いて有意水準を 1%として実施した。発現量が変化した遺伝子が有意に多く含まれる機能カテゴリーを、Fig. 3-9 に示す。なお、同じ菌株の光強度が異なる条件間は、発現量が変化した遺伝子が非常に少なく（Table 3-1)、全ての遺伝子機能カテゴリーにおいて発現量が変化した遺伝子は 1 遺伝子以下であった。そのため、同じ菌株の光強度が異なる条件については、詳細な解析から除くこととする。以下では、菌株間の遺伝子発現変化、すなわち野生株の光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} と耐性株の光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} 間および野生株の光強度 4000 μmol m^{-2} sec^{-1} と耐性株の光強度 4000 μmol m^{-2} sec^{-1} 間の変化について、解析を進める。

Fig. 3-9 より、光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} で耐性株は“Phycobilisome”、“Ribosomal proteins: synthesis and modification”、“RNA synthesis, modification, and DNA transcription”の 3 つのカテゴリーで発現量が減少した遺伝子を有意に多く含むことが明らかとなった。Table 3-5 は、上記 3 カテゴリーについて、光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} 条件で耐性株の発現量が減少した遺伝子を示す。一方、光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} で耐性株は“Transposon”カテゴリーで発現量が減少した遺伝子を有意に多く含むことが明らかとなった（Fig. 3-9, Table 3-6)。また、光強度 4000 μmol m^{-2} sec^{-1} で耐性株は“Cell division”および“Menaquinone and ubiquinone”の 2 つのカテゴリーで発現量が減少した遺伝子を有意に多く含むことが分かった(Fig. 3-9, Table 3-7)。以下では、これらの発現量が減少した遺伝子を有意に多く含む遺伝子機能カテゴリーと強光耐性の関係について示された仮説を述べる。

主成分分析は、耐性株において“ATP synthase”の存在量が減少したことを示唆したが(Table 3-4)、機能カテゴリー解析は“ATP synthase”のカテゴリーの変化を示さなかった。これは、“ATP synthase”に関わる遺伝子の多くで発現量が変化したものの、発現量の変化量が小さく、多くの遺伝子が Welch の t 検定において有意水準である 1%を満たさなかったためである。

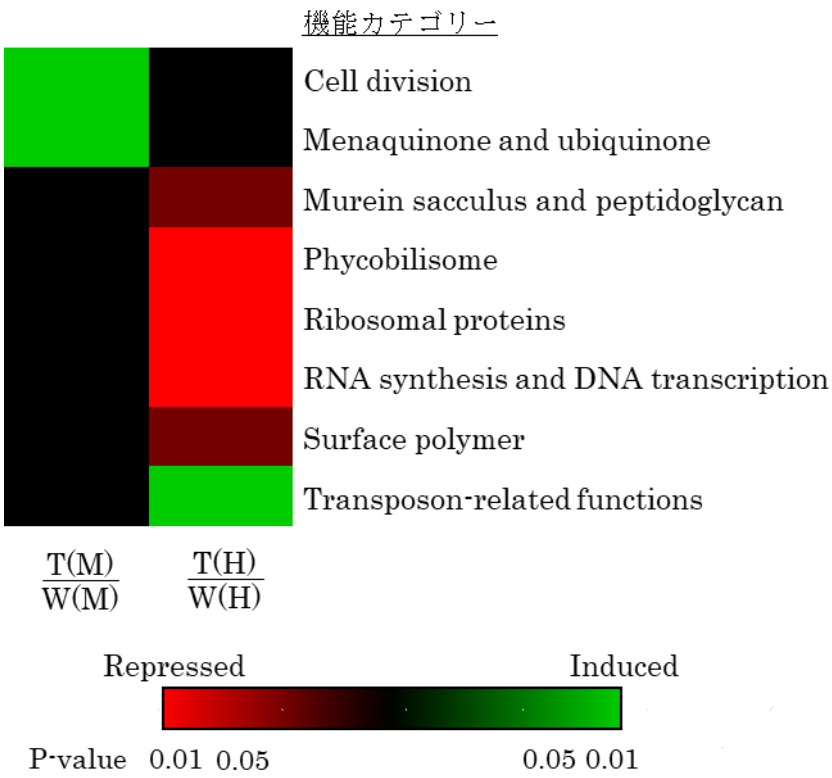

Fig. 3-9 機能カテゴリー解析

発現量が変化した遺伝子における機能カテゴリーが含む遺伝子の割合が、測定した総遺伝子における機能カテゴリーが含む遺伝子の割合に対して有意であるか、超幾何分布に基づき検定した。上図は 1 つ以上の条件間で、発現量が変化した遺伝子が有意に多く含まれる機能カテゴリーを示す。各機能カテゴリーにおいて、濃い赤色は発現量が減少した遺伝子について 0.01 > P-value であることを、薄い赤色は発現量が減少した遺伝子について 0.05 > P-value > 0.01 であることを示す。一方、濃い緑色は発現量が増加した遺伝子について 0.01 > P-value であることを、薄い緑色は発現量が増加した遺伝子について 0.05 > P-value > 0.01 であることを示す。W (M): 野生株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件 、W (H): 野生株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件、T (M): 耐性株の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件、T (H): 耐性株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件

Phycobilisome

Table 3-5 は、光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件で野生株に対し耐性株の“Phycobilisome”のサブユニットをコードする遺伝子（*cpc,apc*）の発現量が低下していることを示す。“Phycobilisome”は光を吸収する巨大な複合体で、吸収したエネルギーを主に“Photosystem II”に送る役割を担う（MacColl, 1998; Bald *et al.*, 1996）。強光条件では、過剰な光エネルギーの吸収を防ぎ、順化に必要なタンパク質の基質を供給するために、“Phycobilisome”が分解されることが知られている（Muramatsu *et al.*, 2012)。本研究の 2 章においても、野生株が光強度の増加に伴い“Phycobilisome”を抑制することが示された（Fig. 2-5、Table 2-3、 Table 2-5)。耐性株は“Phycobilisome”の存在量を減少させることで、過剰な光エネルギーの吸収を防いでいることが示唆された。一方、野生株は光強度の増加に伴い“Phycobilisome”と同様に“Photosystem I”も抑制したが（Fig. 2-5、Table 2-3、 Table 2-5)、耐性株では“Photosystem I”の抑制が見られなかった。強光条件では主に“Photosystem II”が損傷を受けるので(Aro *et al.*, 1993)、耐性株は“Photosystem II”の損傷を防ぐために“Phycobilisome”のみ抑制したと推測される。

Ribosome

Table 3-5 は、光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件で野生株に対し耐性株の“Ribosome”に関わる遺伝子の発現量が低下していることを示す。“Ribosome”は mRNA をタンパク質に変換する翻訳過程で重要な役割を果たすタンパク質である。シアノバクテリアが強光を受ける過酸化物が発生し細胞に損傷を与えるため、細胞を保護する“Chaperones”や“Photosystem II”反応中心などのタンパク質合成が活性化する（Hihara *et al.*, 2001)。耐性株は強光条件下で“Ribosome”に関わる遺伝子の発現量を低下させたことから、強光条件に適応し過酸化物の合成を防ぐことができたため、これらのタンパク質合成が必要なかったと推測される。

転写調節因子

Table 3-5 は、光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件で野生株に対し耐性株の転写調節に関わる遺伝子の発現量が低下していることを示す。転写調節因子の中で *slr1912* に注目する。*slr1912* の機能は putative PP2C-type protein phosphatase であるが、“PP2C-type phosphatase”は“Phycobilisome”のエネルギー伝達において重要な働きを示すことが知られている。*Arabidopsis thaliana* において、“PP2C-type phosphatase”に属する PPH1 や TAP38 が活性化すると“Phycobilisome”は主に“Photosystem II”にエネルギーを伝達し、PPH1 や TAP38 が抑制されると“Phycobilisome”は主に“Photosystem I”にエネルギーを伝達する(Shapiguzov *et al.*, 2010; Pribil *et al.*, 2010)。シアノバクテリアのゲノム上で PPH1 や TAP38 をコードする遺伝子は同定されていないが、植物細胞の葉緑体はシアノバクテリアが共生したものであるため、植物細胞と同様に“PP2C-type phosphatase”が抑制されると、“Phycobilisome”は主に“Photosystem I”にエネルギーを伝達すると推測される。そのため、

耐性株は強光条件で putative PP2C-type protein phosphatase である *slr1912* の発現量を減少させることで、“Phycobilisome”の吸収したエネルギーを“Photosystem I”へ伝達していることが推測された。

Fig. 3-10 は耐性株の“Phycobilisome”および *slr1912* に関わる遺伝子の抑制と、“Photosystem I”に関する遺伝子の発現量維持から導かれた、“Phycobilisome”のエネルギー伝達に関する仮説を示す。野生株は、“Phycobilisome”が吸収したエネルギーを主に“Photosystem II”に伝達する。一方耐性株は、“Phycobilisome”に関わる遺伝子の発現量が低下しており、“Phycobilisome”におけるエネルギー吸収量がそもそも少ないことが示唆された。さらに *slr1912* の発現量が低下したことによって、“Phycobilisome”が吸収したエネルギーに占める“Photosystem II”へのエネルギー伝達量が低下したと推測される。“Phycobilisome”での吸収エネルギー量が少なく、さらにエネルギーの伝達割合が低下するため、“Phycobilisome”から“Photosystem II”に伝わるエネルギー量は非常に少なくなったと予想される。一方“Photosystem I”は、“Phycobilisome”での吸収エネルギー量が少ないものの、エネルギーの伝達割合が増加するため、“Phycobilisome”から“Photosystem I”に伝わるエネルギー量は野生株とあまり変わらなかったと予想される。これは、強光条件で耐性株の“Phycobilisome”に関係する遺伝子発現量は低下したが、“Photosystem I”に関わる遺伝子の発現量に変化が見られなかった知見と合致する。耐性株は強光条件で、“Photosystem”のエネルギー伝達元である“Phycobilisome”を抑制し、さらに *slr1912* を抑制し“Photosystem I”の存在量を維持することで、“Phycobilisome”が吸収したエネルギーを“Photosystem I”で処理し、“Photosystem II”の損傷を防いでいるものと推測される（Fig. 3-10)。

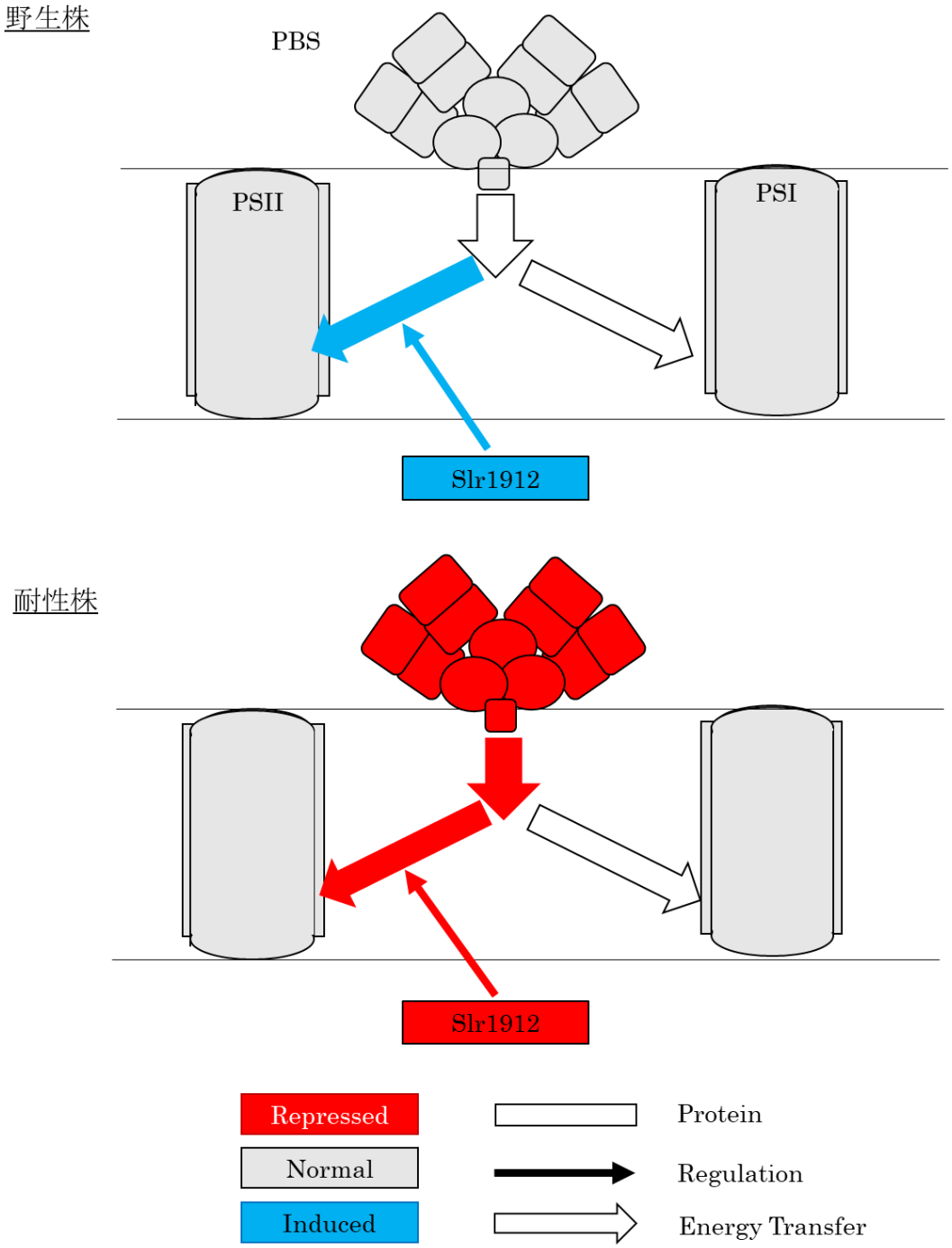

Fig. 3-10 耐性株の“Phycobilisome”からのエネルギー伝達
赤色は抑制状態を、灰色は通常状態を、青色は誘導状態を示す。細い線は転写制御を、四角はタンパク質を、太い矢印はエネルギー伝達をそれぞれ示す。

Table 3-5 光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} 条件で耐性株の発現量が減少した遺伝子

機能カテゴリー	ORF ID	既知遺伝子の別名	機能
Phycobilisome	*sll1663*	-	phycocyanin alpha phycocyanobilin lyase related protein
	slr2051	*cpcG1*	phycobilisome rod-core linker polypeptide
	sll1579	*cpcC2*	phycobilisome rod linker polypeptide
	ssr3383	*apcC*	phycobilisome small core linker polypeptide
	slr1459	*apcF*	phycobilisome core component
Ribosomal proteins: synthesis and modification	*sll1822*	*rpsI, rps9*	30S ribosomal protein S9
	sll1819	*rplQ, rpl17*	50S ribosomal protein L17
	sll1816	*rpsM, rps13*	30S ribosomal protein S13
	sml0006	*rpmJ, rpl36*	50S ribosomal protein L36
	sll1808	*rplE, rpl5*	50S ribosomal protein L5
	sll1804	*rpsC, rps3*	30S ribosomal protein S3
	sll1803	*rplV, rpl22*	50S ribosomal protein L22
	sll1801	*rplW, rpl23*	50S ribosomal protein L23
	sll1745	*rplJ, rpl10*	50S ribosomal protein L10
	sll1744	*rplA, rpl1*	50S ribosomal protein L1
	slr0361	-	probable ribosomal large subunit pseudouridine synthase B
	sll0754	-	ribosome binding factor A
RNA synthesis, modification, and DNA transcription	*sll1043*	*pnp*	polyribonucleotide nucleotidyltransferase
	slr1912	-	putative PP2C-type protein phosphatase
	sll1818	*rpoA*	RNA polymerase alpha subunit
	slr1856	-	phosphoprotein substrate of icfG gene cluster
	slr1469	*rnpA*	protein subunit of ribonuclease P (RNase P)

	ssr1600	-

Transposon

Table 3-6 は光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件で野生株に対し耐性株の“Transposon”に関わる遺伝子の発現量が増加していることを示す。“Transposon”はゲノム上の位置を転移できる遺伝子であり、“Transposon”に関係する遺伝子が活性化していることは、ゲノムに変化が起きている可能性が高いことを示す。

Table 3-6 光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件で耐性株の発現量が増加した遺伝子

機能カテゴリー	*遺伝子*	機能
Transposon-related functions	*sll1397*	putative transposase
	sll0699	putative transposase
	slr1075	putative transposase
	sll0650	putative transposase
	slr0856	putative transposase
	slr1524	putative transposase
	sll1999	putative transposase
	slr2112	putative transposase
	slr1282	putative transposase
	sll1860	putative transposase
	sll0315	putative transposase
	slr0230	putative transposase
	ssr1175	putative transposase
	slr0703	putative transposase
	smr0002	putative transposase
	sll8043	putative transposase

Cell division

Table 3-7 は光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件で野生株に対し耐性株の“Cell division”に関わる遺伝子の発現量が増加していることを示す。以下では、*ftsH* に注目することとする。*ftsH* は PCC 6803 のゲノム上に *slr1390*, *slr1604*, *slr0228*, *sll1463* の 4 遺伝子が見つかっている。*ftsH* は、損傷した“Photosystem II”の反応中心 D1 タンパク質を分解する機能を持ち、強光により損傷した D1 タンパク質のターンオーバーにおいて重要な役割を果たす (Nixon *et al.*, 2005)。2 章においても、光強度と *slr1604* (*FtsH*)の発現量に正の相関が確認された (Table 2-3)。耐性株は、増殖が阻害されない程度の光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} においても *slr1604* (*FtsH*)の発現量を増加させ、D1 タンパク質の分解を促進することで、“Photosystem II”の機能を維持しやすい性質を持つことが示唆された。但し、D1 タンパク質をコードする psbA は遺伝子発現量に有意な変化を示さなかったことから、D1 タンパク質のターンオーバーが活性化されたとは言えない。

Table 3-7 光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} 条件で耐性株の発現量が増加した遺伝子

機能カテゴリー	ORF ID	既知遺伝子の別名	機能
Cell division	*slr1604*	*ftsH*	cell division protein FtsH
	slr2102	*ftsY*	cell division protein FtsY
Menaquinone and ubiquinone	*slr0611*	*sds*	solanesyl diphosphate synthase
	slr0926	*ubiA, cyr*	4-hydroxybenzoate-octaprenyl transferase

3.3.6　菌株間の発現量が顕著に変化した遺伝子

耐性株において発現量が大きく変化した遺伝子を解析するため、光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} における耐性株と野生株の遺伝子発現量の相乗平均の比を評価した。Table 3-8 は耐性株で発現量が最も増加した 10 遺伝子、Table 3-9 は耐性株で発現量が最も減少した 10 遺伝子をそれぞれ示す。

Table 3-8 より、耐性株では *isiA* が他の遺伝子に比べ、顕著に発現量が増加していることが確認された。*isiA* は、強光条件への応答ではなく、鉄枯渇条件で細胞内に蓄積するタンパク質をコードする遺伝子として発見された（Laudenbach *et al.*, 1988)。*isiA* の強光条件への応答は、発現量が増加するという報告（singh *et al.*, 2007)、と増加しないという報告(Kopecna et al. 2012)があり、どのような変化が生じるのか明らかとなっていない。そこで、本研究 2 章の野生株における培養データを用いて強光条件での *isiA* の発現量を評価した(Fig. 3-11)。

Fig. 3-11 の横軸は、増殖速度が最大であった中光条件（光強度 300 µmol m^{-2} sec^{-1}）の *isiA* 遺伝子発現量平均に対する、強光条件（光強度 1100, 1300 µmol m^{-2} sec^{-1}）の各培養における *isiA* 遺伝子発現量の相対値を示す。Fig. 3-11 の横軸より、中光条件に対して強光条件の *isiA* 遺伝子発現量は、3 回の培養中 2 回の培養では 2 倍以内の増加に留まるが、1 回の培養は 8 倍以上と大幅に増加していることが明らかとなった。この結果は、強光条件で野生株の *isiA* 発現量は安定していないことを示しており、先行研究によって強光条件での *isiA* の発現量に関する分析結果が異なっていたことと合致する。一方 Fig. 3-11 の縦軸は、強光条件における野生株の比増殖速度を示す。Fig. 3-11 より、強光条件では *isiA* 遺伝子の発現量が大きいほど野生株の比増殖速度が高い傾向が示された。以上より、*isiA* の発現量増加は強光条件での増殖に貢献するものの、野生株では強光条件で *isiA* の発現量は安定していないことが示唆された。

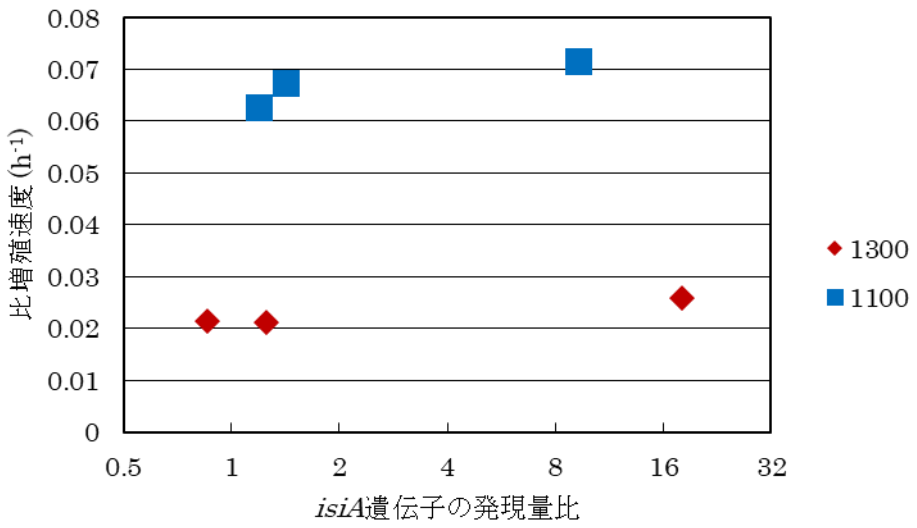

Fig. 3-11 野生株をフォトバイオリアクターを用いて強光条件で培養した際の *isiA* の遺伝子発現量比と比増殖速度

遺伝子発現量および比増殖速度の試験データは、本研究 2 章のフォトバイオリアクターを用いた野生株の培養試験と遺伝子発現解析より取得した。横軸は、光強度 300 µmol m^{-2} sec^{-1} の *isiA* 遺伝子発現量の平均と、光強度 1100, 1300 µmol m^{-2} sec^{-1} の *isiA* 遺伝子発現量の比を示す。縦軸は、強光条件における野生株の比増殖速度を示す。比増殖速度は 0 h と 72 h の OD より算出した。凡例は野生株をフォトバイオリアクターで培養した際の光強度を示す。

isiA は元々鉄枯渇条件で誘導される遺伝子として発見されたこともあり、強光耐性との関連についてはあまり注目されてこなかった。しかし 2005 年より、*isiA* の破壊株が強光条件での生育が阻害されることや（Havaux *et al.*, 2005）、*isiA* を破壊すると“Phycobilisome”が吸収したエネルギーの伝達先を“Photosystem II”から“Photosystem I”へ変更できなくなることが発見された（Wang *et al.*, 2010）。近年、光合成系が形成する複合体に関する研究が進んだことで、IsiA は強光条件で PsaD および Hli と“強光に誘導されるカロテノイド結合タンパク質複合体”“High Light-Inducible Carotenoid-Binding Protein Complex”(“HLCC”)をチラコイド膜上に形成することが明らかとなった（Daddy et al., 2015）。さらに、“HLCC”を構成する遺伝子を欠損させると、“Phycobilisome”が吸収したエネルギーを“Photosystem I”へ伝達する機構や酸化ストレスから D1 プロテインやチラコイド膜を保護する機構が低下することが示された（Daddy *et al.*, 2015）。

以上より、強光条件で *isiA* の発現量が増加すると、“HLCC”が形成され、“Phycobilisome”が吸収したエネルギーを“Photosytem I”へ伝達する機構や、酸化ストレスから D1 プロテインやチラコイド膜を保護する機構が活性化し、強光によって“Photosystem II”が損傷することを防ぐことができると推測される（Fig. 3-12）。

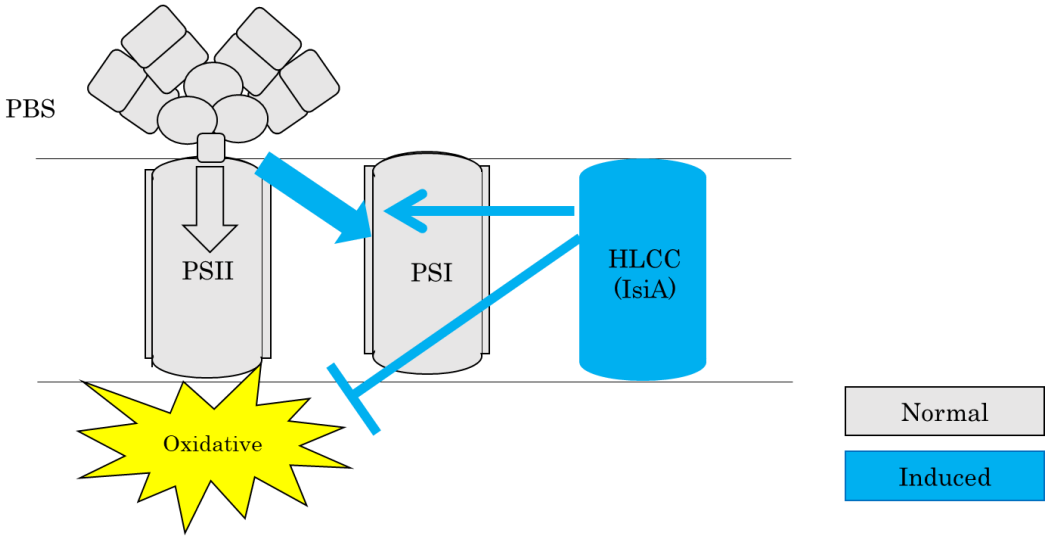

Fig. 3-12 *isiA* の発現量増加による強光耐性機構の仮説

灰色は通常状態を、青色は誘導状態を示す。細い線は転写制御を、太い矢印はエネルギー伝達をそれぞれ示す。PBS は“Phycobilisome”、PSII は“Photosystem II”、PSI は“Photosystem I”、HLCC は“High Light-Inducible Carotenoid-Binding Protein Complex”を示す。

Table 3-8 光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} で耐性株において発現量が増加した遺伝子

ORF ID	既知遺伝子の別名	機能	機能カテゴリー	発現量比
sll0247	*isiA*	iron-stress chlorophyll-binding protein, homologous to psbC (CP43)	Photosystem II	27.1
sll0248	*isiB*	flavodoxin	Soluble electron carriers	9.4
ssl2920	-	hypothetical protein		7.7
slr1417	*ycf57, iscA*	hypothetical protein YCF57		7.4
sll1054	-	hypothetical protein		7.2
ssr2194	-	unknown protein		6.8
sll0249	-	hypothetical protein		6.3
slr1913	-	hypothetical protein		5.3
ssl5070	-	unknown protein		5.2
slr1282		putative transposase	Transposon-related functions	5.2

光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} において耐性株で遺伝子発現量が最も増加した上位 10 遺伝子を示す。発現量比は、野生株の光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} における遺伝子発現量に対する耐性株の光強度 7000 μmol m^{-2} sec^{-1} における遺伝子発現量の相乗平均を示す。

一方、Table 3-9 より強光条件では“Chaperones”に関わる遺伝子の発現量が耐性株において減少していることが示された。“Chaperones”に関わる遺伝子は、強光条件で遺伝子発現量が増加し、過剰な光エネルギーにより発生する過酸化物から細胞を保護する役割を担っていることが報告されている（Hihara *et al.*, 2001）。本研究においても、強光条件にて“Chaperones”に関わる遺伝子の発現量を増加させることが確認されている（Table 2-3、Table 2-6)。耐性株は“Chaperones”に関わる遺伝子の発現量が減少していることから、植え継ぎ培養にて獲得した機構により、過酸化物の発生を防ぐことができたことが推測される。またこのように“Chaperones”に属するタンパク質の合成量が減少したことは、Table 3-5 が示す耐性株における“Ribosome”に関係する遺伝子発現量の減少の一因になったと推測される。

Table 3-9 光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} で耐性株において発現量が減少した遺伝子

ORF ID	既知遺伝子の別名	機能	機能カテゴリー	発現量比
sll1514	*hspA, hsp17*	16.6 kDa small heat shock protein, molecular chaperone	Chaperones	0.1
slr2076	*groEL1, cpn60-1*	60kD chaperonin	Chaperones	0.2
slr1963	-	water-soluble carotenoid protein		0.2
slr0967	-	hypothetical protein		0.2
ssl3769	-	unknown protein		0.2
ssr1155	-	hypothetical protein		0.2
slr0447	*urtA, amiC*	periplasmic protein, ABC-type urea transport system substrate-binding protein		0.2
sll1745	*rplJ, rpl10*	50S ribosomal protein L10		0.2
sll1322	*atpI, atpB*	ATP synthase A chain of CF(0)		0.2
sll0170	*dnaK2, dnaK*	DnaK protein 2, heat shock protein 70, molecular chaperone	Chaperones	0.2

光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} において耐性株で遺伝子発現量が最も減少した下位 10 遺伝子を示す。発現量比は、野生株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} における遺伝子発現量に対する耐性株の光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} における遺伝子発現量の相乗平均を示す。

3.4　結言

シアノバクテリアを用いた物質生産において、光阻害は自然光を用いた培養の生産性を向上させる上で解決すべき課題となっている。しかし先行研究で取得された強光耐性株は、クロロフィルアンテナサイズを縮小するものであり、強光条件での増殖速度が向上するものの、低菌体密度や弱光条件での増殖速度が低下してしまっていた。そこで本研究は、クロロフィルアンテナサイズ以外の方法で強光耐性株を構築すべく、生物の適応力を利用し強光条件での長期間植え継ぎ培養を用いることで、強光耐性株の構築に取り組んだ。強光環境下での植え継ぎ培養の結果、野生株が増殖できない強光条件においても増殖速度が低下しない強光耐性株を獲得した。野生株と強光耐性株に対して網羅的遺伝子発現解析を行った結果、強光条件で耐性株は“Phycobilisome”、“Ribosome”および転写調節因子に関わる遺伝子の発現量が低下していることが示された。また、強光条件で耐性株は *isiA* の発現量が著しく増加しており、“Chaperones”に関わる遺伝子の発現量が低下していることが示された。

Fig. 3-13 は耐性株が獲得したと推測される強光耐性機構を示す。耐性株は“Phycobilisome”の合成に関係する遺伝子の発現量が低下しており、集光量を削減していると推測される。さらに、転写調節因子の一種であり“PP2C-type phosphatase”の機能を持つ *slr1912* の発現量を抑制し、“Phycobilisome”から“Photosystem II”へのエネルギー伝達を抑制することで、“Photosystem II”への過剰なエネルギー供給を防いだと推測される。先行研究において、光阻害では主に“Photosystem II”が損傷を受けることが報告されており（Aro *et al.*, 1993)、耐性株における“Phycobilisome”や Slr1912 の抑制を通じた“Photosystem II”へのエネルギー伝達の削減は、“Photosystem II”の損傷を抑制する働きがあったことが示唆された。

また、耐性株は *isiA* の発現量が増加していることが確認された。IsiA は強光条件で PsaD および Hli と“HLCC”（強光に誘導されるカロテノイド結合タンパク質複合体）をチラコイド膜上に形成し、“Phycobilisome”が吸収したエネルギーを“Photosystem I”へ伝達する機構や酸化ストレスから D1 プロテインやチラコイド膜を保護する機構に関与することが報告されている（Daddy *et al.*, 2015)。強光条件で *isiA* の発現量が増加すると、“HLCC”が形成され、強光によって“Photosystem II”が損傷することを防ぐことができると推測される。

耐性株は、“Ribosome”や“Chaperones”に関係する遺伝子の発現量が低下していることが確認された。“Chaperones”は過酸化物から細胞を保護する役割を担っていることが報告されている（Hihara *et al.*, 2001）。耐性株は、“Photosystem II”へのエネルギー伝達量の削減や“Photosystem I”と“Photosystem II”の複合体形成を通じて、“Photosystem”でのエネルギー伝達を正常化し過酸化物の発生を抑制したため、“Chaperones”を合成する必要が無くなったことが示唆された。また“Chaperones”の合成抑制は“Ribosome”でのタンパク質合成の抑制に繋がり、“Ribosome”に関係する遺伝子の発現量が低下したと推測される。

強光耐性株は、野生株と共通の強光応答機構に加えて、野生株には見られない耐性株特有

の強光耐性機構を有すると推測される。強光耐性株は野生株が増殖できない強光条件においても増殖が阻害されないことから、耐性株特有の強光耐性機構が強光耐性を付与する機構と推測される。本研究は耐性株特有の強光耐性機構を明らかにすることで、野生株に強光耐性を付与する手法の提案を目指した。

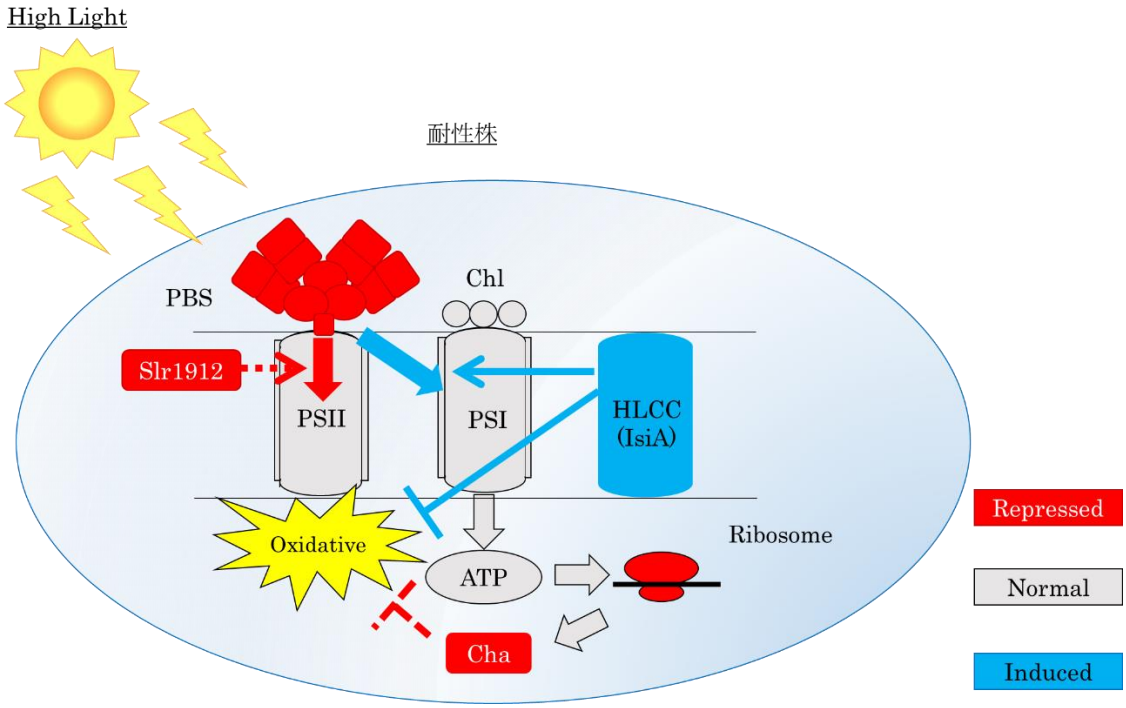

Fig. 3-13 耐性株が獲得したと推測される強光耐性機構
赤色は抑制状態を、灰色は通常状態を、青色は誘導状態を示す。細い線は制御関係を、四角はタンパク質を、太い矢印はエネルギーおよび化合物の伝達をそれぞれ示す。

Fig. 3-14 は、Fig. 2-7 と Fig. 3-13 をもとに、野生株特有の強光応答機構、野生株と耐性株に共通の強光応答機構、耐性株特有の強光耐性機構を分類したものである。野生株特有の応答機構としては、“Chaperones”の活性化、D1 タンパク質の合成活性化、“Photosystem I”の抑制、クロロフィル合成の抑制、トランスヒドロゲナーゼの抑制、鞭毛合成の抑制が挙げられる。また共通の強光応答機構は、損傷した D1 タンパク質の分解活性化や“Phycobilisome”の抑制が挙げられる。強光耐性を付与する手法の開発に向け、最も注目すべき耐性株特注の強光耐性機構は、*isiA* の活性化、“Ribosome”の抑制、*slr1912* の抑制を通じた“Phycobilisome”から“Photosystem I”へのエネルギー伝達活性化の 3 点が発見された。これら 3 点は、Fig. 3-13 が示すようにいずれも強光耐性に大きく貢献しているものと推測される。しかし、“Ribosome”の抑制は耐性株において“Chaperones”などのタンパク質が不要になった結果と推測されるため、野生株に強光耐性を付与する手法という点では適切と

は言えない。残る *isiA* の誘導と *slr1912* の抑制はいずれも強光耐性の付与に有効と推測される。

slr1912 の抑制は、“Phycobilisome”から“Photosystem II”へのエネルギー伝達の抑制に関わる。一方 *isiA* の誘導は、“Phycobilisome”から“Photosystem II”へのエネルギー伝達に加え、酸化ストレスから D1 プロテインやチラコイド膜を保護する機構にも関与する。また野生株において、強光条件下での *isiA* の発現量は安定していないが、*isiA* の発現量が大きいと強光条件での増殖速度が速い傾向が確認された（Fig. 3-11）。以上より 3 章では、*isiA* の発現量増加が *slr1912* の抑制より“Photosystem II”の保護に多く関与しており、野生株において *isiA* の発現量増加が強光条件での増殖速度を向上させる傾向が示されていることから、強光耐性付与に向けた第一候補とした。この仮説の検証を行うため、4 章では *isiA* の過剰発現株を作成し、光強度による増殖速度への影響を評価した。

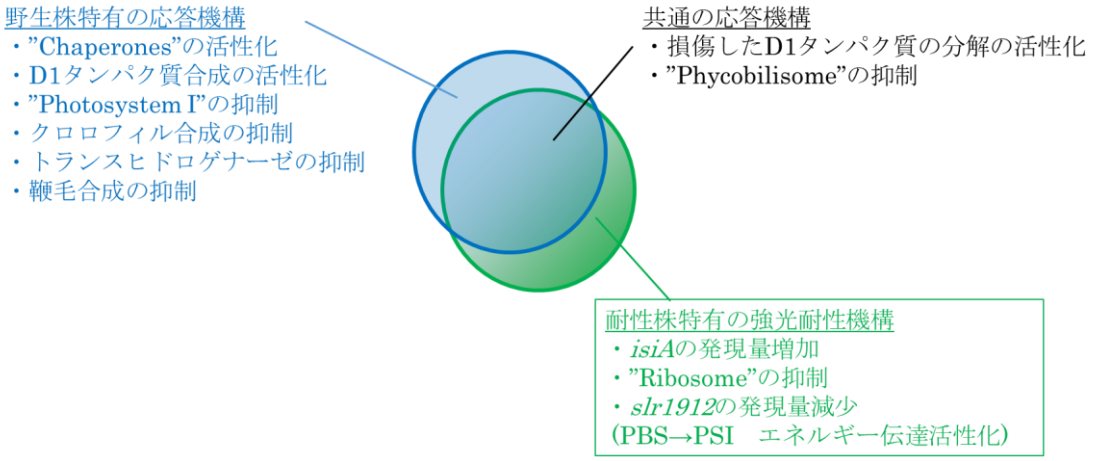

Fig. 3-14 野生株特有の強光応答機構、野生株と耐性株に共通の強光応答機構、耐性株特有の強光耐性機構の分類

青い円は野生株の強光への応答機構を、緑色の円は耐性株の強光耐性機構を、2 つの円が重なる部分は野生株と耐性株の共通する応答機構を示す。

第 4 章 *isiA* の過剰発現による強光耐性付与の検証

4.1　諸言

シアノバクテリアを用いた物質生産は、光エネルギーを高効率で化合物に変換する製造プロセスと期待されているが、強い光を受けると物質生産性が低下する光阻害という課題を有している。光阻害の解決に向け、変異育種を用いて光合成のクロロフィルアンテナサイズが縮小した菌株を取得し、細胞が吸収する光の量を自ら減らす事例が報告されている(Nakajima *et al.*, 1999; Meils, 2009)。サイズ縮小株は、強光条件かつ高菌体密度での光合成効率を改善することができるが、低菌体密度や弱光条件では細胞に吸収されずに透過する光量が増加し、光合成効率が低下する。自然光で培養する場合、午前中や夕方は光強度が低くなることが避けられず、また培養初期は菌体密度が相対的に低くなるため、低菌体密度や弱光条件における効率低下は大きな課題となる。そのため、強光に耐性を持ちつつ低菌体密度や弱光条件においても光合成効率が低下しない菌株の構築が求められている。変異育種でない菌株構築技術として、生物の適応力を利用した育種技術も開発が進められている。これは長期間ストレス環境で植え継ぎ培養を行うことで、そのストレス環境に適応した菌株を取得する手法であり、遺伝子変異が生じる頻度が低いため有用な変異を同定しやすいと期待される (Helling *et al.*, 1987; Lenski *et al.*, 1993)。そのため、植え継ぎ培養により得られた菌株と元の株を、網羅的遺伝子発現解析などの網羅的分析技術により比較することで、遺伝子組み換えの戦略検討に有用な情報が取得できる。

本研究は 3 章において、長期間強光条件で PCC 6803 の植え継ぎ培養を継続することで強光耐性株を取得した。さらに 3 章は野生株と耐性株に対し網羅的遺伝子発現解析を行い、2 章が示す野生株の強光応答機構と比較することで、*isiA* の活性化、“Ribosome”の抑制、*slr1912* の抑制が強光耐性株特有の応答であることを明らかにした。3 つの強光耐性株特有の応答の中でも、*isiA* の発現量増加は、エネルギー伝達量の低減と酸化ストレスからの保護を通じて強光による“Photosystem II”の損傷を防ぐことが示唆されており、強光耐性を付与する手法として最有力であることが示された。

4 章は、野生株に遺伝子組み換え技術を用いて *isiA* を過剰発現させることで、弱光条件での増殖速度を低下させることなく強光耐性を付与できるか検証を行った。野生株、耐性株、*isiA* 過剰発現株の 3 菌株を用いて、光強度 40, 4000, 7000, 9000 μmol m^{-2} sec^{-1} の 4 条件で培養を行い、*isiA* の過剰発現による弱光条件および強光条件での増殖速度への影響を評価した。

4.2　実験材料と実験方法

4.2.1　*isiA* 過剰発現株の作成

Table 4-1 に記載のプライマーisiA_NdeI_F と isiA_BamHI_R を用いて PCC 6803 のゲノム DNA から *isiA* を増幅させ、PCR 産物を pGEM-T easy (Promgega) を用いてクローニングした。次に、プラスミドを *Nde*I と *Bam*HI で切断し、強力な *psbA2* プロモーターと *slr1608* のニュートラルサイトと相動性のある領域を持つ pSlr0168-psbA2p-me-Sm プラスミドの相当する領域にクローニングし、pSlr0168-psbA2p-isiA-Sm プラスミドを得た (Yoshikawa *et al.*, 2015)。pSlr0168-psbA2p-isiA-Sm プラスミドを Fig. 4-1 に示す。pSlr0168-psbA2p-isiA-Sm プラスミドを PCC 6803 へ導入することで形質転換を行い、ストレプトマイシンを含む修正 BG11 平板培地に塗布しスクリーニングを行った。単離された菌株は、プライマーslr0168_check_F と slr0168_check_R を用いた PCR にて配列の確認を行った。単離された菌株は、以下で *isiA* 過剰発現株と記載する。

Table 4-1 *isiA* 過剰発現株の作成に使用したプライマー.

プライマー名	配列（5’→3’）
isiA_NdeI_F	catATGGGAGACCAGGGATTAATTC
isiA_BamHI_R	ggatcCTAGGTTTGCAAGGAATCAAACG
slr0168_check_F	CCCATCGTAAAATTCGTTCC
slr0168_check_R	CTGGTGTAAATTCGCAAACG

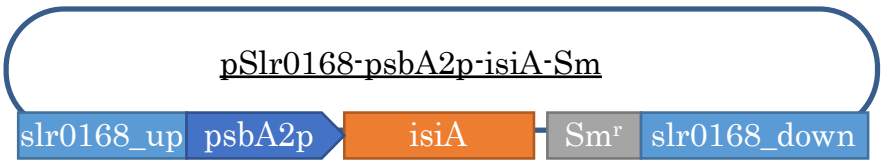

Fig. 4-1 pSlr0168-psbA2p-isiA-Sm プラスミド
slr0168_up は slr0168 のニュートラルサイトの上流領域を、*psbA2*p は PCC 6803 における *psbA2* のプロモーターを、*isiA* は PCC 6803 における *isiA* を、Sm^r は pCDFDuet-1 (Merck Ltd, German) のストレプトマイシン耐性遺伝子を、slr0168_down は slr0168 のニュートラルサイトの下流領域を示す。

4.3　結果と考察

4.3.1　増殖速度

isiA 遺伝子の過剰発現による弱光環境および強光環境での増殖速度への影響を評価するため、野生株、耐性株、*isiA* 過剰発現株の 3 菌株について異なる光強度条件で培養試験を行った。3 菌株は、光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} で前々培養および前培養を行った後、光強度 40, 4000, 7000, 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} で本培養を行った。本培養試験はそれぞれの光強度で 3 回ずつ実施した。

Fig. 4-2 は、各菌株における光強度と比増殖速度を示す。比増殖速度は 24 h の OD と 48 h の OD より算出した。野生株は光強度が 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} から 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} に増加するに伴い増殖速度が低下し、光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} では増殖できないことが確認された。一方 *isiA* 過剰発現株は、光強度が 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} から 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} に増加するに伴い増殖速度が低下するものの、光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} においても増殖可能であることが示された。光強度 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} において野生株が増殖出来ないことに対し、*isiA* 過剰発現株は増殖可能であることから、*isiA* の過剰発現が強光条件での増殖を向上することが明らかとなった。*isiA* の過剰発現が強光耐性に寄与することはこれまで明らかとなっておらず、本研究が初めて発見した。なお耐性株は、光強度が 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} から 9000 µmol m^{-2} sec^{-1} に増加させても増殖速度が維持されることから、耐性株は *isiA* の過剰発現以外にも強光耐性に貢献する機構を保有することが示された。

また、耐性株および *isiA* 過剰発現株は、光強度 40 mol m^{-2} sec^{-1} や培養初期の低菌体密度においても親株と同等の増殖速度を示した。光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} における野生株の比増殖速度が光強度 4000 µmol m^{-2} sec^{-1} における野生株の比増殖速度に比べて遅いことから、光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} は PCC 6803 の光合成能力に対し光強度が不足する弱光環境であると判断される。耐性株だけでなく *isiA* 過剰発現株も弱光環境である光強度 40 µmol m^{-2} sec^{-1} において親株と同等の増殖速度を示しており、*isiA* の過剰発現が弱光環境での増殖を阻害しないことが示された。従来の強光耐性株は、菌体濃度が低い環境や弱光環境において光が吸収されずに透過してしまうことで、増殖速度が低下するという課題を有していた。*isiA* の過剰発現は、低菌体密度や弱光環境の増殖を阻害することなく、強光環境での増殖を向上させることをシアノバクテリアで初めて達成した。自然光を用いたシアノバクテリアの物質生産において *isiA* を過剰発現させることは、菌体密度や光強度によらず高い生産性を達成することを可能とし、生産コストを大きく削減することに繋がる。なお、*isiA* 過剰発現株は野生株に比べて強光条件で増殖速度を改善したが、耐性株に比べると低い増殖速度であった。このことは、耐性株が *isiA* の発現量増加以外にも強光条件での増殖に寄与する性質を持つことを示している。*isiA* 以外の強光耐性機構については、5.3 (85 ページ) で考察を述べる。

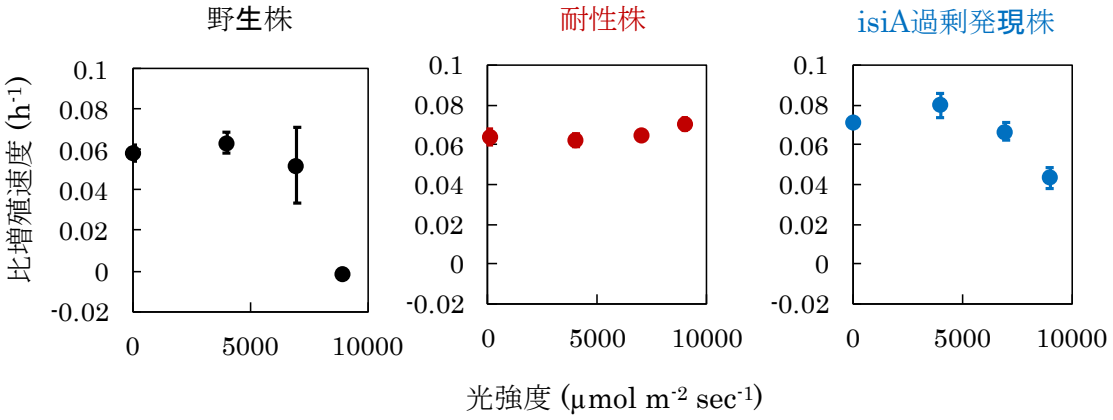

Fig. 4-2 野生株、耐性株、*isiA* 過剰発現株の培養試験結果
培養試験は、野生株、耐性株および *isiA* 過剰発現株を用いて、光強度 40, 4000, 7000, 9000 μmol $m^{-2}sec^{-1}$ においてそれぞれ 3 回ずつ行った。比増殖速度は 24 h の OD と 48 h の OD より算出した。エラーバーは標準偏差を示す。

isiA の過剰発現が強光耐性を付与し、他の条件での増殖に対しても悪影響がないメカニズムであるにも関わらず、野生株では確認されなかった。これは、強光耐性が工業生産には必要な性質であるものの、自然界での生育には中立な性質であり、自然界では生育に中立な性質が定着する可能性が低いためと推測される。

太陽光を用いてシアノバクテリアの工業生産を行う場合、受光量を最大化するため、培養槽は日射量の多い場所を選択し、設置される。また、菌体数を増加させる培養工程は、増殖速度を最大化させるため、対数増殖期などの低い菌体密度で実施される。そのため、シアノバクテリアの工業生産では、強光条件かつ低菌体密度で培養できる性質が求められる。しかし自然界では、シアノバクテリアが生育する池や川の水面より上に植物の枝葉が張り出すことで、太陽光が遮られ光強度が低下することがある。また光が遮られない場合も、増殖に適した条件ではシアノバクテリアの菌体密度が高くなるため、水面付近の菌体は強光に晒されるが、大部分の菌体は水面より下にいることで強度の低下した光を受けることになる。そのため、自然界でシアノバクテリアが強光に晒される機会はむしろ稀であり、強光耐性はシアノバクテリアの生育に中立的な性質であると推測される。

自然界においては増殖に優位性を持たない *isiA* 過剰発現株は母集団に対して少数派であるため、母集団の菌体数が減少した際に消滅する可能性が高い。しかし、母集団の細胞濃度が低い条件で *isiA* 過剰発現株が出現した場合や、*isiA* 過剰発現株が生き残る場合など、*isiA* 過剰発現株が消滅しない可能性も否定できない。そのため、本研究で用いた PCC 6803 は *isiA* 過剰発現ではなかったが、自然界においては *isiA* 過剰発現株が存在している可能性がある。但し、本研究は工業利用に向いた PCC 6803 に強光耐性を付与することを目的として研究を進めてきたので、天然からこのような株を探索することについてはこれ

以上立ち入らない。なお、本研究においては確認されなかったが、*isiA* の過剰発現が強光条件以外のストレスに対し増殖速度の低下を引き起こす可能性がある。また自然界において窒素源の栄養源の枯渇などが生じた際には、無駄なタンパク質の合成は不利に働く。このような場合は、*isiA* の過剰発現は自然界において自然淘汰されると推測する。今後、*isiA* の過剰発現株を有効利用する際には使用する環境で不利に働く現象がないか監視することが必要である。

4.4　結言

シアノバクテリアを用いた物質生産において、強光条件での物質生産性の低下が大きな課題となっており、強光耐性を付与する手法の開発が求められている。しかし従来の強光耐性を付与する手法は、受光量を削減するため、低菌体密度や弱光環境での生育が阻害されてしまう。そのため、低菌体密度や弱光環境で増殖を阻害せずに強光耐性を付与する手法の開発が望まれる。

4 章は、低菌体密度や弱光環境での増殖の維持と強光耐性の付与に向け、3 章で提言された *isiA* の過剰発現株を構築し、弱光環境および強光環境での増殖速度を評価した。野生株と *isiA* 過剰発現株を用いた培養試験の結果、野生株が増殖できない強光条件においても、*isiA* 過剰発現株は増殖可能であることが示された。さらに、*isiA* 過剰発現株は、低菌体密度や弱光条件においても野生株と同等の増殖速度を示すことが明らかとなった。*isiA* の過剰発現が強光耐性に寄与することはこれまで明らかとなっておらず、本研究が初めて明らかにしたものである。また、低菌体密度や弱光環境での増殖を阻害することなく強光環境での増殖を向上させる手法はこれまで報告されておらず、本研究が初めて示すものである。この成果によって、シアノバクテリアを用いた物質生産は、菌体密度や光強度によらず高い生産性を達成することが可能となる。

なお、*isiA* 過剰発現株は、強光条件での増殖速度が野生株より速いものの、耐性株に比べると遅いことが示された (Fig. 4-2)。このことから、*isiA* 遺伝子の過剰発現は耐性株が持つ主な強光耐性機構の 1 つであり、耐性株は *isiA* 遺伝子の過剰発現以外にも強光耐性に寄与する機構を持つことが示された。

第 5 章 結論

5.1 結果のまとめ

シアノバクテリアは、光合成を行う微細藻類の一種であり、酸素発生型の光合成を行う微生物である。シアノバクテリアは植物が生育できない海域などにおいても増殖可能であることや、単位面積あたりの生産性が高いことから、燃料や化学品などの分野において生産宿主として注目されている。しかしシアノバクテリアは、強い光強度によって細胞が損傷する光阻害によって、真夏の日中などに生産性が低下するという課題を有する。細胞に光阻害への耐性を付与すれば、光強度が強い環境でも物質生産性を維持することが可能となり、通年での生産性を向上させることができる。本研究は、シアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 に光阻害への耐性を付与する手法を開発した。

2 章は、これまで明らかとなっていなかった、増殖が阻害される強光条件でのシアノバクテリアの応答を解明するため、光強度が不足している弱光環境から増殖が阻害されるほどの強光環境まで、光強度の増加に伴う細胞の応答を解析した。フォトバイオリアクターを用いた PCC 6803 の培養試験の結果、PCC 6803 の光合成能力に対し光強度が不足する弱光条件、十分な光強度である中光条件、増殖速度が低下するほど光強度が過剰な強光条件の 3 条件が存在することを示した。さらに各条件で培養した細胞について遺伝子発現解析を行った結果、先行研究において弱光条件から中光条件で確認されていた応答が、強光条件においてより強い応答として示されることが明らかとなった。具体的には、集光機能を担う“Phycobilisome”、“Photosystem I”やクロロフィルなどに関わる遺伝子の発現量が低下し、“Chaperones”や“CO_2 Fixation”および“Photosystem II”の反応中心である D1 タンパク質のターンオーバーに関わる遺伝子の発現量が増加することが示された。さらに強光環境特有の応答として、鞭毛の合成に関わる遺伝子やピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼやシグマファクター（*sigA* 、*sigF*）の発現量低下が明らかとなった。

3 章は、植え継ぎ培養を用いて、弱光条件で増殖速度が低下しない強光耐性株を構築し、その耐性機構を解析した。試験管を用いた強光条件下での植え継ぎ培養の結果、野生株が増殖できない強光条件においても増殖速度が低下しない強光耐性株を獲得した。野生株と耐性株に対して中光条件と強光条件で網羅的遺伝子発現解析を行った結果、耐性株は“Phycobilisome”に関わる遺伝子と *slr1912* の発現量低下により、“Photosystem II”へのエネルギー伝達量が低減されることが示唆された。さらに耐性株は、*isiA* の発現量が増加することで、“Photosystem I”および“Photosystem II”と複合体を形成し、強光条件での光合成活性が向上したことが推測された。3 章で示された耐性株の強光耐性機構と 2 章で示された野生株における強光への応答機構を比較し、耐性株特有の機構を抽出した結果、*slr1912* の発現量低下と *isiA* の発現量増加が耐性株特有の機構であることが示された。中でも *isiA* の発現量増加は、エネルギー伝達量の低減と酸化ストレスからの保護を通じて強光による

“Photosystem II”の損傷を防ぐことが示唆されており、強光耐性を付与する手法として最有力であることが示された。

4 章は、3 章で示唆された *isiA* 遺伝子の発現量増加による強光耐性の付与について検証を行った。*isiA* 過剰発現株を弱光条件、中光条件および強光条件で培養した結果、*isiA* 過剰発現株は弱光条件で野生株と同等の増殖速度を示し、野生株が増殖できない強光条件においても高い増殖速度を示した。これにより、*isiA* 遺伝子の過剰発現がシアノバクテリアの強光耐性に寄与することが明らかとなった。

5.2　本研究の寄与

本研究が、シアノバクテリアの強光耐性にもたらす寄与を述べる。

2 章は、これまで明らかとなっていなかった、増殖が阻害される強光条件でのシアノバクテリアの応答を解明した。先行研究において調査されている条件は、増殖が阻害されない程度の光強度であり、真夏の日中のように増殖が阻害されるほどの強光条件においてどのような応答が生じるか明らかになっていなかった。また、従来の研究の多くが弱光条件と強光条件の 2 条件を対象に解析を行っているため、光強度の増加に伴いどのように応答が変化するか解明されていなかった。これらの課題に対し、本研究はまず 6 種の光強度条件で培養試験を実施することで、PCC 6803 の光合成能力に対し光強度が不足する弱光条件、十分な光強度である中光条件、増殖速度が低下するほど光強度が過剰な強光条件の 3 条件が存在することを確認した。光強度条件を PCC 6803 の光合成能力を用いて定義した上で遺伝子発現解析に供することで、従来明らかとなっていなかった増殖速度が低下する過剰な強光条件の応答を解析することが可能となった。次に、弱光条件、中光条件および強光条件で培養した菌株を遺伝子発現解析に供し、強光条件の応答を、弱光条件から中光条件で確認されていた応答が強光条件においてより強くなったものと、強光条件で特有に発生した応答に分類した。強光条件で特有に発生した応答について解析を進めた結果、鞭毛や繊毛のタンパク質の欠損やトランスヒドロゲナーゼの活性化が、強光条件におけるシアノバクテリアの物質生産性を向上させることが示唆された。また 2 章で野生株の応答を明らかにしたことは、3 章で強光耐性株特有の応答を特定することを可能にし、*isiA* の過剰発現が強光耐性に寄与することを見出すことに貢献した。

3 章は、植え継ぎ培養を用いて、初めて弱光条件で増殖速度を低下しない強光耐性株を構築し、その耐性機構を解析した。従来の強光耐性株は、クロロフィルアンテナサイズを縮小させるため、強光条件での増殖速度は改善するものの、低菌体密度あるいは弱光条件での増殖速度が低いという課題を有していた。そこで本研究は、クロロフィルアンテナサイズ以外の方法で強光耐性株を構築すべく、生物の適応力を利用し強光条件での長期間植え継ぎ培養を用いることで、強光耐性株の構築に取り組んだ。強光環境下での植え継ぎ培養の結果、野生株が増殖できない強光条件においても増殖速度が低下しない強光耐性株を獲得した。本研究で取得された耐性株は、PCC 6803 の光合成能力に対し不足する弱光条件や低菌体密度において、野生株と同等の増殖速度を示した。弱光条件や低菌体密度で増殖速度が低下しない強光耐性株は未だ報告されておらず、本研究が初めて取得に成功した。次に、野生株と強光耐性株に対して網羅的遺伝子発現解析を行った結果、強光耐性機構に関して、“Phycobilisome”と *slr1912* の抑制および *isiA* の活性化によって過酸化物の発生が抑制されたという有力な仮説を示した。さらに 2 章で得られた野生株における強光への応答機構と比較することで、*isiA* の過剰発現が強光耐性の付与に有効である可能性が高いことを示した。

4 章は、*isiA* 過剰発現株を構築し、野生株および耐性株と共に弱光条件から強光条件で培養した。その結果、野生株において *isiA* を過剰発現させることで強光耐性を付与し、野生株が増殖できない過剰な光強度においても増殖が可能となることを初めて示した。*isiA* の過剰発現が強光耐性に寄与することはこれまで明らかとなっておらず、本研究が初めて明らかにしたものである。さらに *isiA* 過剰発現株は、耐性株と同様に、弱光条件での増殖速度が野生株と同等であることが示された。自然光でシアノバクテリアを用いた物質生産を行う場合、*isiA* を過剰発現させれば、朝や夕方など光強度が弱い条件と日中の光強度の強い条件の両方で高い増殖速度を示し、設備投資を行うことなく一日あたりの生産性を向上できることが示された。

5.3　今後の展望

本研究は、シアノバクテリアの細胞に強光耐性を付与することで、自然光におけるシアノバクテリアの物質生産性を向上させることを目的とした。2 章は、これまで未知であった野生株の強光条件での野生株の応答を示した。3 章は、植え継ぎ培養を用いて弱光条件で増殖速度を低下しない強光耐性株を初めて獲得し、さらに強光耐性機構と野生株の応答機構を比較することで、*isiA* の過剰発現が強光耐性に寄与する可能性が高いことを初めて示した。4 章は *isiA* 過剰発現株を構築し培養試験を行うことで、*isiA* の過剰発現は弱光条件で増殖速度を維持しつつ、強光耐性を付与することを実証した。

本研究の最大の貢献は、*isiA* の過剰発現が弱光条件で増殖速度を維持しつつ、強光耐性を付与することを実証したことにある。これは、朝や夕方など光強度が弱い条件と日中の光強度の強い条件の両方で高い生産性を達成し、一日あたりの生産性を向上できることを示す。ここでは、実生産条件を仮定し、*isiA* 過剰発現による強光耐性を実生産に適用した場合の工業的な効果を試算する。実生産条件は屋外培養による通年生産であり、適切な強度の光が 1 日あたり 12 h 照射されているが、夏の 3 ヶ月の間は日中の 4 h が強光条件であり、残りの 8 h が適切な強度であると仮定する。つまり、強光条件の時間は 365 days/year × 3 months / 12 months × 4 h/day = 365 h/year、適切な光強度の時間は 365 days/year × 12 h/day – 365 h/day = 4015 h/year である。適切な光強度条件における生産速度は野生株と *isiA* 過剰発現株共に 1 kg/h、強光条件における野生株の生産速度は 0 kg/h、*isiA* 過剰発現株の生産速度は Fig. 4-2 より 0.5 kg/h とする。この仮定に基づき年間の生産量を計算すると、野生株の 1 年間の生産量が 4015 kg/h であるのに対し、*isiA* 過剰発現株の生産量は 4198 kg/h と約 4.5%多いことが示された (Table 5-1)。*isiA* の過剰発現は、設備費および変動費を増加させることなく生産量を約 4.5%向上させるため、製造業における売上高利益率が一般に 5%程度であることを考慮すると、収益を大きく改善することが期待される。なお、耐性株のように強光条件でも最適な光強度条件と同等の生産速度を達成する手法を確立した場合、生産量を約 9%増加させることが可能である。そのため、真夏の光強度においても全く生産速度が低下しない強光耐性の確立が望まれる。

Table 5-1 野生株と *isiA* 過剰発現株の生産量比較

菌株	適切な光強度条件			強光条件			合計
	生産速度 kg/h	時間 h/year	生産量 kg/year	生産速度 kg/h	時間 h/year	生産量 kg/year	生産量 kg/year
野生株	1.0	4015	4015	0.0	365	0	4015
isiA 過剰発現株	1.0	4015	4015	0.5	365	183	4198

isiA の過剰発現の実生産への適用に関する展望としては、*isiA* の過剰発現がどの範囲の生物種で有効であるか検証することが挙げられる。本研究はシアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 について *isiA* の過剰発現の有効性を証明したが、他のシアノバクテリアにおいても有効であるか、さらには他の光合成微生物で効果があるかは検証できていない。IsiA は“Photosystem II”を構成する CP43 であり、光合成生物が一般に保有するタンパク質である（Laudenbach *et al.*, 1988)。そのため、*isiA* の過剰発現が幅広い生物種で強光耐性に寄与することが期待され、その幅広さ次第では、シアノバクテリアや微細藻類だけでなく、トウモロコシやユーカリなど食品から製紙に至る幅広い産業で原料生産性を向上させる可能性を秘めている。

isiA の過剰発現を屋外培養で使用するには、自然光における強光耐性を確認する必要がある。そこで 2 章と 3 章の培養結果を元に、自然光における光強度と増殖速度の関係を推測した。最適な光強度における比増殖速度に対し、2 章は光強度 1100 µmol m^{-2} sec^{-1}、3 章は光強度 7000 µmol m^{-2} sec^{-1} で比増殖速度が 70-80%程度へ低下したことから、これらの光強度が自然光で光阻害が発生する光強度 2000 µmol m^{-2} sec^{-1} に相当すると推測される。この推測に基づき、2 章の光強度に 2000 / 1100 を、3 章の光強度に 2000 / 7000 を乗じることで、自然光の光強度に換算した（Fig. 5-1)。Fig. 5-1 は、野生株は自然光では光強度 1000 µmol m^{-2} sec^{-1} 付近で比増殖速度が最大となり、光強度 1800 µmol m^{-2} sec^{-1} 付近から増殖が徐々に阻害され、光強度 2500 µmol m^{-2} sec^{-1} では増殖できないことを示す。さらに、この補正に基づき、Fig. 4-2 における光強度を自然光に換算した（Fig. 5-2)。Fig. 5-2 より、*isiA* 過剰発現株は、自然光では光強度 2000 µmol m^{-2} sec^{-1} においても増殖阻害が軽減され、光強度 2500 µmol m^{-2} sec^{-1} においても増殖可能であると推測される。今後は、遺伝子組み換え菌の封じ込めなどの懸案を解決した上で、自然光における *isiA* 過剰発現株の増殖性が実験によって評価されることが期待される。

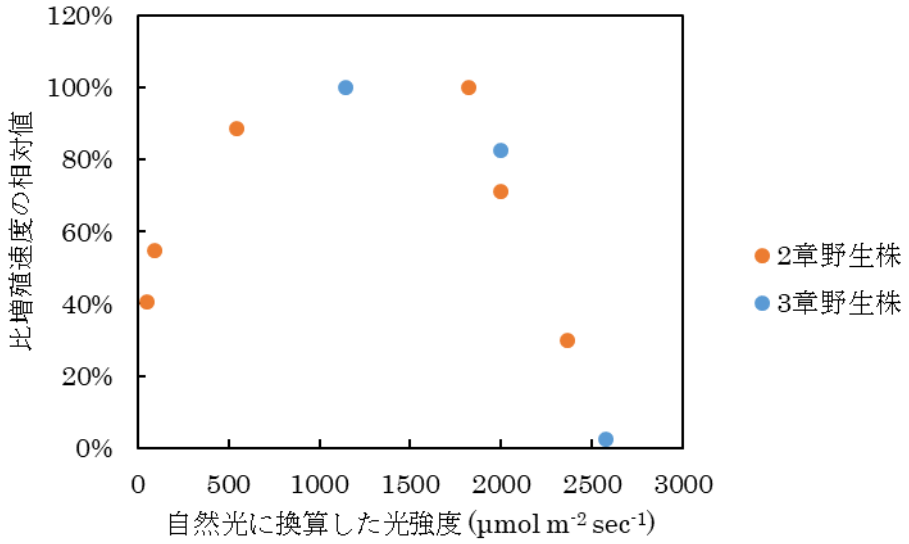

Fig. 5-1 自然光に換算した光強度における野生株の比増殖速度の相対値
縦軸は、各培養系の最適な光強度における比増殖速度と各光強度における比増殖速度の相対値を示す。横軸は、2 章の光強度に 2000 / 1100 を、3 章の光強度に 2000 / 7000 を乗じることで、自然光に換算した光強度を示す。

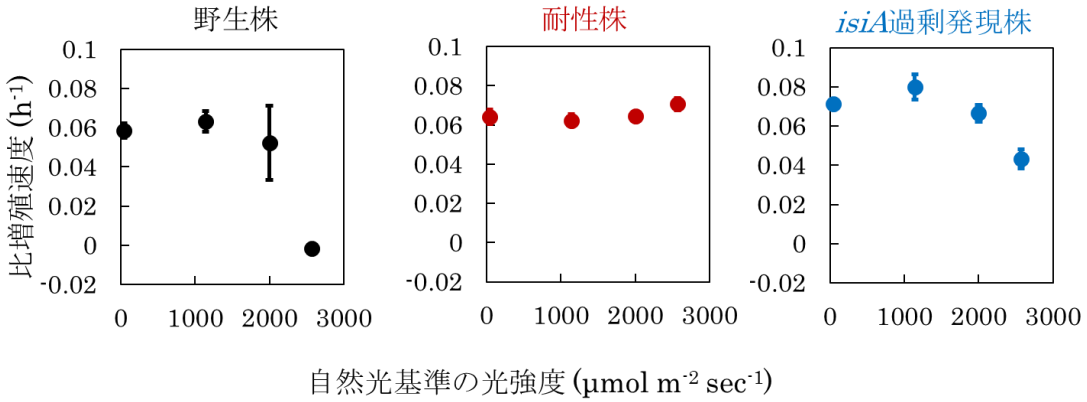

Fig. 5-2 自然光基準の光強度における比増殖速度
縦軸は各光強度における比増殖速度を示す。横軸は、3 章の光強度に 2000 / 7000 を乗じることで、自然光基準に換算した光強度を示す。

isiA の過剰発現を実生産で利用するには、光強度の動的変化に対する応答の評価が必要となる。*isiA* 過剰発現株は、Fig. 4-2 が示す通りいずれの光強度においても野生株と同等以上の増殖速度を示した。しかし本研究は、光強度の違いに対する応答を解析することを目的としたため、自然光のように光強度を動的に変化させた際の応答は評価していない。動的に

光強度が変化することで光阻害を誘発するという報告もあり（Yamori *et al.*, 2012)、産業利用を行う上で、光強度の動的変化に対する応答は、確認が必要な項目の一つと考えられる。

isiA の過剰発現を産業利用するには強光耐性以外のストレス耐性へ与える影響に関する評価も必要となる。*isiA* 過剰発現株は Fig. 4-2 が示すように、従来の強光耐性株の課題であった弱光条件での増殖速度の低下が見られなかった。しかし野生株が進化の過程で生育環境に適応することを考慮すると、*isiA* の過剰発現によって何らかの機能が低下している可能性が高い。シアノバクテリアが保有すべき能力として、1.速い生育、2.高い光合成活性、3.強光耐性、4.温度耐性、5.塩濃度耐性、6.せん断応力耐性、7.付着性なし、8.酸素耐性、9.雑菌汚染耐性を挙げており（松本、2016)、*isiA* の過剰発現を産業利用するには、強光耐性以外の能力に与える影響の評価が必要となる。

isiA の過剰発現によって形成された“HLCC”が、強光耐性や弱光での増殖維持に寄与する機構の解明も望まれる。IsiA が強光条件で形成する“HLCC”は、“Phycobilisome”が吸収したエネルギーを“Photosystem I”へ伝達する機構や酸化ストレスから D1 プロテインやチラコイド膜を保護する機構に関わることが確認されている（Daddy *et al.*, 2015)。本研究において、強光条件で *isiA* の発現量が増加すると、“HLCC”が形成され、強光によって“Photosystem II”が損傷することを防ぐことが示唆された（Fig. 3-12)。更に *isiA* の過剰発現は、従来の強光耐性付与手法とは異なり、弱光条件での増殖速度を低下させないことも示された（Fig. 4-2)。しかし、“HLCC”がどのように“Photosystem”に関与しているか明らかとなっておらず、弱光条件における機能や、強光条件におけるエネルギーの伝達や酸化ストレスからの保護のメカニズムも解明されていない。“HLCC”の機能やそのメカニズムを解析することは、シアノバクテリアが光強度の変化に対する応答メカニズムの解明に大きく貢献し、強光耐性を付与する手法を確立する上で重要な知見となることが期待される。

isiA 過剰発現株は野生株に比べて強光条件で増殖速度を改善したが、耐性株に比べると低い増殖速度であった。このことは、耐性株が *isiA* の発現量増加以外にも強光条件での増殖に寄与する性質を持つことを示している。Fig. 5-3 は、2 章および 3 章より得られた強光条件でのシアノバクテリアの改質方針を示す。*isiA* 以外の改質点として、まず“Phycobilisome”と *slr1912* の発現量の抑制が挙げられる。“Phycobilisome”の合成に関する遺伝子の発現量低下は、細胞の集光量を削減すると推測される。さらに、転写調節因子の一種である *slr1912* の発現量を抑制し、“Phycobilisome”から“Photosystem II”へのエネルギー伝達を抑制することで、光阻害で主に損傷を受ける“Photosystem II”への過剰なエネルギー供給を防ぐことが期待される。特に *slr1912* は、これまで強光耐性との関連がほとんど議論されていない転写調節因子であるため、*slr1912* が発現量を制御する遺伝子群の解析を進めることは、学術的にも産業利用においても意義が大きい。また、*slr1912* の抑制は“Photosystem I”へのエネルギー伝達量を増加させるため、“Photosystem I”の活性とバランスさせることで、その効果を大きくできると期待される。以上より、*slr1912* の機能につい

て“Phycobilisome”の抑制や“Photosystem I”の活性化と合わせて研究が進むことで、強光耐性を向上させる手法の開発が期待される。

Fig. 5-3 は、鞭毛合成の抑制や *sigA* およびピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼの活性化も、強光条件でのシアノバクテリアの物質生産に有効である可能性を示す。PCC 6803 において、鞭毛は弱光条件で光源に向かい移動し集光量を増加させる役割を果たすが、中光条件から強光条件ではそのような機能は必要でない。さらに、シアノバクテリアの培養は機械的な撹拌が行われる環境で行う場合が多く、鞭毛や繊毛のタンパク質を欠損させることは、ATP やアミノ酸の消費量の節約を通じて、物質生産性の向上に繋がる可能性が高い。一方、ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼは、弱光条件や混合影響条件では NADH から NADPH を合成する役割を担っている（Kämäräinen *et al.*, 2017)。2 章において、光強度が増加するに伴い *pntA* と *pntB* の発現量が著しく低下しており、強光条件は光合成による NADPH の生産量が高いため、NADH から $NADP^+$へ電子を渡す重要性がなくなったと推測される。一方、シアノバクテリアを用いた乳酸に代表される NADH を要する物質生産は、細胞内の NADH の供給量を増加させることで、生産性を向上させることができる。そのため、強光条件でトランスヒドロゲナーゼを過剰発現させれば、NADPH から NADH に多くの電子を供給し、生産性を向上させる可能性が示された。さらに、*pntA* や *pntB* の発現量は、転写制御因子である *sigA* の発現量と正の相関があり、*sigA* の発現量を調節することで操作できる可能性が示された。強光耐性を付与された菌株に対し、鞭毛合成の抑制や *sigA* およびピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼの活性化を行うことは、物質生産性を一層向上させる手段となり得る。

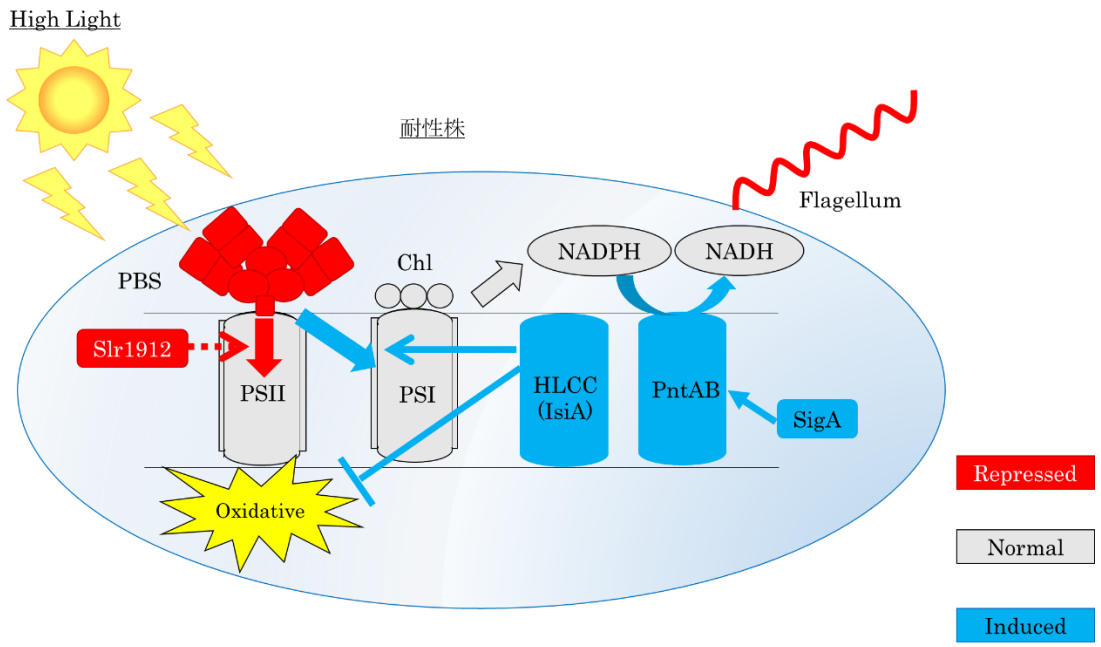

Fig. 5-3 本研究が示す強光条件でのシアノバクテリアの改質方針
赤色は抑制状態を、灰色は通常状態を、青色は誘導状態を示す。細い線は制御関係を、四角はタンパク質を、太い矢印はエネルギーおよび化合物の伝達をそれぞれ示す。

さらにシアノバクテリアの物質生産プロセスを効率的に改良するには、強度や菌体濃度に応じた細胞内代謝の予測モデルを構築し、栄養源の濃度や通気および攪拌条件の最適化する手法が有効と考えられる。自然光を用いてシアノバクテリアの培養を行う場合、自然光の光強度や細胞数が増減することで、シアノバクテリアの細胞内代謝が変化し、代謝に必要な CO_2 量や栄養源の量も変わると想定される。もしシアノバクテリアの細胞内代謝モデルが構築できれば、その日の天候から光強度や細胞増殖を予想し、必要量に応じた攪拌や通気、栄養源の添加が可能となる。これは、動力費や栄養源コストを減少させることで、シアノバクテリアの物質生産コストを削減することに繋がると期待される。

また *isiA* の過剰発現による光化学系システムのシステムクラッシュ回避機構は、サーバーがクラッシュを回避する機構に適用できる可能性があると考える。シアノバクテリアなど光合成微生物は、強光条件で増殖阻害を引き起こすが、最も損傷を受けるのは "Photosystem II" であることがわかっている（Aro et al., 1993)。本研究により、*isiA* を過剰発現させると強光条件で素早く"HLCC"を形成し、"Phycobilisome"が吸収した光エネルギーの伝達先を"Photosystem II"から"Photosystem I"へ変更し、"Photosystem II"の損傷を抑制することが示唆された。この機構は、Web サーバーの負荷が高まった際にサーバーがクラッシュを回避する機構に適用できる可能性がある。光化学系における *isiA* の機能のように予め過去の実績から高負荷時に損傷が生じやすいサーバーを特定し、過剰なアクセスが生じた際も損傷しやすいサーバーの処理量を一定に保つよう事前に設定する。この

対策により、Web サーバーのクラッシュを未然に防ぐことで、高負荷時も Web サーバー全体の処理量能力を最大に維持できる可能性があると考える。このように *isiA* の過剰発現のような危機回避機能は、高負荷時における情報システムの機能維持に展開可能であることが示唆された。

本研究が採用した、植え継ぎ培養で獲得された耐性菌と野生株を比較し、ストレス耐性機構を解明する手法は、光阻害以外のストレスにも適用することが可能である。植え継ぎ培養と網羅的分析技術を組み合わせた例として、大腸菌における高温ストレス（Riehle *et al.*, 2003）、エタノールストレス（Horinouchi *et al.*, 2010)や、シアノバクテリアの酸性ストレス（Uchiyama *et al.*, 2015)、アルコールストレス（Matsusako *et al.*, 2017）が報告されている。報告例は微生物を用いた発酵に関わるものが多く、光に関係する条件への適用例は本研究が初めてである。光合成生物は、光強度以外にも光の波長分布や紫外線などにも適応して生育している。赤色光が多い条件、青色光が多い条件あるいは紫外線が多い条件などで長期間培養を行い、それらの環境に適応した菌株を解析することは、各条件に適応する上で重要な遺伝子の発見に貢献する。

強光耐性機構の解明を進める上で、本研究で植え継ぎ培養を用いて獲得された強光耐性株について、遺伝子発現以外の分析手法を用いた解析を加えることも有効である。他の研究室メンバーが実施した分析であるため本博士論文の結果として記載しなかったが、代謝情報工学講座は耐性株についてゲノムシーケンス解析を行い、耐性株と野生株間で *hik26* と *slr1916* の 2 遺伝子に変異が起きていることを発見した。更に野生株に対して耐性株で生じた変異を導入したところ、*hik26* に変異を加えることで、弱光条件および強光条件で耐性株と同等の増殖速度を示すことが明らかとなった。Hik26 は、先行研究から環境変化のセンサータンパク質であるヒスチジンキナーゼであることは分かっていたが、応答する環境は解明されておらず、本解析により強光応答に関わることが初めて明らかとなった。さらに、野生株に *hik26* に変異を加えると強光条件で耐性株と同等の増殖速度を示すが、*isiA* の過剰発現株は耐性株に比べると強光条件での増殖速度が遅いことから、*isiA* の遺伝子発現量増加は *hik26* の変異によって生じることが示唆された。今後、Hik26 の機能や Hik26 が制御する遺伝子発現制御システムが解明されれば、強光耐性に関わる研究が大きく進み、強光条件でのシアノバクテリアの物質生産性が大きく改善することが期待される。

参考文献

Allakhverdiev SI, Murata N. Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta. 2004;1657(1):23-32.

Allorent G, Tokutsu R, Roach T, Peers G, Cardol P, Girard-Bascou J, Seigneurin-Berny D, Petroutsos D, Kuntz M, Breyton C, Franck F, Wollman FA, Niyogi KK, Krieger-Liszkay A, Minagawa J, Finazzi G. A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell. 2013;2:545-557

Anderson JM. Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. Annu. Rev. Plant Physiol. 1986;37:93-136.

Angermayr SA, Paszota M, Hellingwerf KJ. Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. Appl. Environ. Microbiol. 2012;78(19):7098-7106.

Angermayr SA, van der Woude AD, Correddu D, Vreugdenhil A, Verrone V, Hellingwerf KJ. Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803. Biotechnol Biofuels. 2014;7:99.

Aro EM, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochimica et Biophysica Acta. 1993;1143(2):113-134.

Asada K. The water - water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu. Rev. Plant Physiol. 1999;50:601-39.

Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. Nat Biotechnol. 2009;27(12):1177-80.

Atsumi S, Wu TY, Machado IM, Huang WC, Chen PY, Pellegrini M, Liao JC. Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. Mol Syst Biol. 2010;6:449.

Bailey S, Grossman A. Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting.

Photochem Photobiol. 2008;84(6):1410-1420.

Baker NR. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. Annu Rev Plant Biol. 2008;59:89-113.

Bald D, Kruip J, Rogner M. Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems? Photosynth. Res. 1996;49(2):103-18.

Bandarra NM, Pereira PA, Batista I, Vilela MH. Fatty acids, sterols and α-tocopherol in *Isochrysis galbana*. J. Food Lipids. 2003;10(1):25-34.

Bentley FK, Luo H, Dilbeck P, Burnap RL, Eaton-Rye JJ. Effects of inactivating psbM and psbT on photodamage and assembly of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochemistry. 2008;47(44):11637-11646.

Bhaya D, Watanabe N, Ogawa T, Grossman AR. The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999;96(6):3188-3193.

Björkman O. Responses to different quantum flux densities. Physiological Plant Ecology. 1981;12:57-107.

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics. 2003;19(2):185-193.

Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010;14(2):557-577.

Campbell D, Hurry V, Clarke AK, Gustafsson P, Öquist G. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. Microbiol. Mol. Biol. 1998;62(3):667-683.

Chen P, Min Min, Chen Y, Wang L, Li Y, Chen Q, et al. Review of the biological and

engineering aspects of algae to fuels approach. Int J Agric & Biol Eng. 2009;2(4):1.

Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 1973;70(11):3240-3244.

Daddy S, Zhan J, Jantaro S, He C, He Q, Wang Q. A novel high light-inducible carotenoid-binding protein complex in the thylakoid membranes of Synechocystis PCC 6803. Sci Rep. 2015;5 (9480) 10

Demain AL. Microbial biotechnology. Trends Biotechnol. 2000;18(1):26-31.

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science. 1997;278(5338):680-686.

Dolganov N, Grossman AR. A polypeptide with similarity to phycocyanin alpha–subunit phycocyanobilin lyase involved in degradation of phycobilisomes. J Bacteriol. 1999;181(2):610-617.

Ducat DC, Avelar-Rivas JA, Way JC, Silver PA. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity. Appl Environ Microbiol. 2012;78(8):2660-8.

Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. Trends Biotechnol. 2011;29(2):95-103.

El-Sheek MM, Rady AA. Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. Phyton. 1995;35(1):139-151.

Feinleib MEH, Curry GM. The relationship between stimulus intensity and oriented phototactic response (topotaxis) in *Chlamydomonas*. Physiol Plant. 1971;25(3):346-352.

Fong SS, Joyce AR, Palsson BØ. Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states. Genome Res. 2005;15(10):1365-1372.

Gao Z, Zhao H, Li X, Tan X, Lu X. Photosynthetic production of ethanol from carbon

dioxide in genetically engineered cyanobacteria. Energ Environ Sci. 2012;5(12):9857-65.

Grace SC, Logan BA. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. Plant Physiol. 1996;112(4):1631-1640.

Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. Microbiol. Rev. 1993;57(3):725-749.

Guckert JB, Cooksey KE. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (chlorophyta) during high ph-induced cell cycle inhibition. J. Phycol. 1990;26(1):72-79.

Gudmundsson S, Nogales J. Cyanobacteria as photosynthetic biocatalysts: a systems biology perspective. Mol Biosyst. 2015;11(1):60-70.

Guerrero F, Carbonell V, Cossu M, Correddu D, Jones PR. Ethylene synthesis and regulated expression of recombinant protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. PLoS One. 2012;7(11):50470.

Gunasekera TS, Csonka LN, Paliy O. Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. J Bacteriol. 2008;190(10):3712-3720.

Hanelt D. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. Mar. Biol. 1998;131(2):361-369.

Havaux M, Guedeney G, Hagemann M, Yeremenko N, Matthijs HC, Jeanjean R. The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress. FEBS Lett. 2005;579(11):2289-93.

Helling RB, Vargas CN, Adams J. Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment. Genetics. 1987;116(3):349-358.

Herring CD, Raghunathan A, Honisch C, Patel T, Applebee MK, Joyce AR, Albert TJ,

Blattner FR, van den Boom D, Cantor CR, Palsson BØ. Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. Nat Genet. 2006;38(12):1406-1412.

Hihara Y, Kamei A, Kanehisa M, Kaplan A, Ikeuchi M. DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. Plant Cell. 2001;13(4):793-806.

Hihara Y, Sonoike K, Ikeuchi M. A novel gene, *pmgA*, specifically regulates photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to high light. Plant Physiol. 1998;117(4):1205-1216.

Hihara Y, Sonoike K, Kanehisa M, Ikeuchi M. DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J Bacteriol. 2003;185(5):1719-1725.

Hirasawa T, Yoshikawa K, Nakakura Y, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S. Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. J Biotechnol. 2007;131(1):34-44.

Horinouchi T, Tamaoka K, Furusawa C, Ono N, Suzuki S, Hirasawa T, Yomo T, Shimizu H. Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. BMC Genomics. 2010;11(1):579.

Huang L, McCluskey MP, Ni H, LaRossa RA. Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. J Bacteriol. 2002;184(24):6845-6858.

Ikeda M, Ohnishi J, Hayashi M, Mitsuhashi S. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. J Ind Microbiol Biotechnol. 2006;33(7):610-615.

Ikeda M. Amino acid production processes. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2003;79:1-35.

Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in Chlorella strains calorific values when

grown in low nitrogen medium. Enzyme Microb. Technol. 2000;27(8):631-635.

Imamura S, Asayama, M, Takahashi H, Tanaka K, Takahashi H, Shirai M. Antagonistic dark/light-induced SigB/SigD, group 2 sigma factors, expression through redox potential and their roles in cyanobacteria. FEBS Lett. 2003;554(3):357-362.

Inaba M, Suzuki I, Szalontai B, Kanesaki Y, Los DA, Hayashi H, Murata N. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*. J Biol Chem. 2003;278(14):12191-8.

International Renewable Energy Agency. 2017. DOUBLING BIOENERGY USE ESSENTIAL FOR GLOBAL SUSTAINABILITY. Abu Dhabi, United Arab Emirates: International Renewable Energy Agency. https://www.irena.org/-/media/Files/IRENA/Agency/Topics/Climate-Change/IRENA_Doubling_bioenergy_use_2017.pdf.

Ivanov AG, Sane PV, Hurry V, Oquist G, Huner NP. Photosystem II reaction centre quenching: mechanisms and physiological role. Photosynth. Res. 2008;98(1-3):565-574.

Jarboe LR, Grabar TB, Yomano LP, Shanmugan KT, Ingram LO. Development of ethanologenic bacteria. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2007;108:237-261.

Jokiel PL, York RH Jr. Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. Limnal Oceanogr. 1984;29(1):192-199.

Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauß N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 A resolution. Nature. 2001;411(6840):909-917.

Kaïmaïraïnen J, Huokko T, Kreula S, Jones PR, Aro EM, Kallio P. Pyridine nucleotide transhydrogenase PntAB is essential for optimal growth and photosynthetic integrity under low-light mixotrophic conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. New Phytol. 2017;214(1):194-204.

Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N,

Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res. 1996;3(3):109-36.

Kanesaki Y, Suzuki I, Allakhverdiev SI, Mikami K, Murata N. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochem Biophys Res Commun. 2002;290(1):339-48.

Keren N, Berg A, van Kan PJ, Levanon H, Ohad I. Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997;94(4):1579-1584.

Kirilovsky D. Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. Photosynth Res. 2007;93(1-3):7–16.

Kok B. On the inhibition of photosynthesis by intense light. Biochimica et Biophysica Acta. 1956;21(2):234-244.

Komenda J, Tichy M, Prásil O, Knoppová J, Kuviková S, deVries R, Nixon PJ. The exposed N-terminal tail of the D1 subunit is required for rapid D1 degradation during photosystem II repair in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Cell. 2007;19(9):2839-2854.

Kopecna J, Komenda J, Bucinska L, Sobotka R. Long-term acclimation of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 to high light is accompanied by an enhanced production of chlorophyll that is preferentially channeled to trimeric photosystem I. Plant Physiol. 2012; 160:2239-2250.

Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiol. 2004;21(4):377-397.

Kurian D, Jansèn T, Mäenpää P. Proteomic analysis of heterotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Proteomics. 2006;6(5):1483-94.

Laudenbach DE, Straus NA. Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced

gene similar to psbC. J Bacteriol. 1988;170(11):5018-26.

Lenski RE, Bennett AF. Evolutionary response of escherichia coli to thermal stress. Am Nat. 1993;142:S47-64.

Li H, Sherman LA. Characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and deltanbl mutants under nitrogen–deficient conditions. Arch Microbiol. 2002;178(4):256-266.

Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. Metab Eng. 2010;12(1):70-9.

Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. Nat Genet. 1999;21:20-24.

MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes. J. Struct. Biol. 1998;124(2-3):311-334.

Masson-Delmotte V., Zhai P., Pörtner H.-O., Roberts D., Skea J., Shukla P.R., Pirani A., Moufouma-Okia W., Péan C., Pidcock R., Connors S., Matthews J.B.R., Chen Y., Zhou X., Gomis M.I., Lonnoy E., Maycock T., Tignor M., Waterfield T. Summary for Policymakers. In: Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development,and efforts to eradicate poverty. IPCC, 2018

Matsusako T, Toya Y, Yoshikawa K, Shimizu H. Identification of alcohol stress tolerance genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by using adaptive laboratory evolution. Biotechnology for Biofuels. 2017;10:307.

Melis A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. Plant Science. 2009;177(4):272-280.

Miyao M, Ikeuchi M, Yamamoto N, Ono T. Specific degradation of the D1 protein of photosystem II by treatment with hydrogen peroxide indarkness: implications for the mechanism of degradation of the D1 protein under illumination. Biochemistry.

1995;34(31):10019-10026.

Monton MR, Soga T. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. J Chromatogr A. 2007;1168(1-2):237-246.

Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing. Trends Food Sci.& Technol. 1998;9(5):204-210.

Munekage Y, Takeda S, Endo T, Jahns P, Hashimoto T, Shikanai T. Cytochrome *b(6)f* mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in *Arabidopsis*. Plant J. 2001;28(3):351-359.

Murakami A, Fujita Y. Regulation of photosystem stoichiometry in the photosynthetic system of the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714 in response to light-intensity. Plant Cell Physiol. 1991;32(2):223-230.

Muramatsu M, Hihara Y. Acclimation to high–light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. J Plant Res. 2012;125(1):11-39.

Murata N, Allakhverdiev SI, Nishiyama Y. The mechanism of photoinhibition *in vivo*: Re-evaluation of the roles of catalase, α-tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. Biochim. Biophys. Acta. 2012;1817(8):1127-1133.

Nakajima Y, Ueda R. Improvement of microalgal photosynthetic productivity by reducing the content of light harvesting pigment. J. Appl. Phycol. 1999;11:195.

Nakamura K, Hihara Y. Photonfluxdensity-dependentgeneexpression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is regulated by a small, redox-responsive, LuxR- type regulator. J. Biol. Chem. 2006;281(48):36758-36766.

National Research Council. 2012. Sustainable Development of Algal Biofuels in the United States. Washington, DC: The National Academies Press. https://doi.org/10.17226/13437.

Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. Physiol. Plant.

2011;142(1):35-46.

Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Yamamoto H, Hayashi H, Murata N. Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochemistry. 2004;43(35):11321-11330.

Nishiyama Y, Yamamoto H, Allakhverdiev SI, Inaba M, Yokota A, Murata N. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. EMBO J. 2001;20(20):5587-5594.

Nixon PJ, Barker M, Boehm M, de Vries R, Komenda J. FtsH–mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. J Exp Bot. 2005;56(411):357-363.

Niyogi KK. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999;50:333-359.

Ogawa Y, Nitta A, Uchiyama H, Imamura T, Shimoi H, Ito K. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerantmutant of sake yeast. J. Biosci.Bioeng. 2000;90(3):313-320.

Ohkawa H, Price GD, Badger MR, Ogawa T. Mutation of *ndh* genes leads to inhibition of CO_2 uptake rather than HCO3- uptake in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J Bacteriol. 2000;182(9):2591-2596.

Ohnishi N, Allakhverdiev SI, Takahashi S, Higashi S, Watanabe M, Nishiyama Y, Murata N. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. Biochemistry. 2005;44(23):8494-8499.

Pollari M, Ruotsalainen V, Rantamäki S, Tyystjärvi E, Tyystjärvi T. Simultaneous inactivation of sigma factors B and D interferes with light acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J. Bacteriol. 2009;191(12):3992-4001.

Pribil M, Pesaresi P, Hertle A, Barbato R, Leister D. Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. PLoS Biol. 2010;8(1):1000288.

Riehle MM, Bennett AF, Lenski RE, Long AD. Evolutionary changes in heat-inducible gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperature. Physiol Genomics. 2003;14(1):47-58.

Rivals I, Personnaz L, Taing L, Potier MC. Enrichment or depletion of a GO category within aclass of genes: which test? Bioinformatics. 2007;23(4):401-407.

Rowlands RT. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. Enzyme Microb.Technol. 1984;6(1):3-10.

Ruban AV, Berera R, Ilioaia C, van Stokkum IH, Kennis JT, Pascal AA, van Amerongen H, Robert B, Horton P, van Grondelle R. Identification of a mechanism of photoprotective energy dissi- pation in higher plants. Nature. 2007;450(7169):575-578.

Sato N, Hagio M, Wada H, Tsuzuki AM. Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. Biochem. Soc. Trans. 2000;28(6):912-914.

Satyanarayana KG, Mariano AB, Vargas JVC. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. Int J Energ Res. 2011;35(4):291-311.

Schneider D, Volkmer T, Rögner M. PetG and PetN, but not PetL, are essential subunits of the cytochrome *b6f* complex from *Synechocystis* PCC 6803. Res Microbiol. 2007;158(1):45-50.

Seki A, Hanaoka M, Akimoto, Y, Masuda S, Iwasaki H, Tanaka K. Induction of a group 2 sigma factor, RPOD3, by high light and the underlying mechanism in *Synechococcus elongates* PCC 7942. J. Biol. Chem. 2007;282(51):36887-36894.

Shapiguzov A, Ingelsson B, Samol I, Andres C, Kessler F, Rochaix JD, Vener AV, Goldschmidt-Clermont M. The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(10):4782-7.

Sharma K Naveen, Rao AK, Stal J. Lucas, Cyanobacteria: An Economic Perspective. John Wiley & Sons, 2014

Shobayashi M, Ukena E, Fujii T, Iefuji H. Genome-wide expression profile of sake brewing yeast under shaking and static conditions. Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71(2):323-335.

Singh AK, Elvitigala T, Bhattacharyya-Pakrasi M, Aurora R, Ghosh B, Pakrasi HB. Integration of carbon and nitrogen metabolism with energy production is crucial to light acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis*. Plant Physiol. 2008;148(1):467-478.

Singh AK, Sherman LA. Reflections on the function of IsiA, acyanobacterial stress-inducible, Chl-binding protein. Photosynth. Res. 2007;93:17-25.

Song D, Fu J, Shi D. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. Chin J Biotechnol. 2008;24(3):341-348.

Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. Science. 2007;315(5813):801-4.

Sterky F, Lundeberg J. Sequence analysis of genes and genomes. J Biotechnol. 2000;76(1):1-31.

Suzuki I, Kanesaki Y, Mikami K, Kanehisa M, Murata N. Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. Mol Microbiol. 2001;40(1):235-244.

Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. Nat Commun. 2014;5:5792.

Taylor M, Tuffin M, Burton S, Eley K, Cowan D. Microbial responses to solvent and alcohol stress. Biotechnol J. 2008;3(11):1388-1397.

Telfer A. Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre. Photochem. Photobiol. Sci. 2005;4(12):950-956.

Tu CJ, Shrager J, Burnap RL, Postier BL, Grossman AR. Consequences of a deletion in *dspA* on transcript accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. J Bacteriol. 2004;186(12):3889-3902.

Uchiyama J, Kanesaki Y, Iwata N, Asakura R, Funamizu K, Tasaki R, Agatsuma M, Tahara H, Matsuhashi A, Yoshikawa H, Ogawa S, Ohta H. Genomic analysis of parallel-evolved cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under acid stress. Photosynth Res. 2015;125(1-2):243-54.

van Waasbergen LG, Dolganov N, Grossman AR. nblS, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongates* PCC 7942. J. Bacteriol. 2002;184(9):2481-2490.

Wang B, Wang J, Zhang W, Meldrum DR. Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. Front Microbiol. 2012;3:344.

Wang Q Hall CL, Al-Adami MZ, He Q. IsiA is required for the formation of photosystem I supercomplexes and for efficient state transition in *Synechocystis* PCC 6803. PLoS One. 2010;5(5):10432.

Wilde A, Härtel H, Hübschmann T, Hoffmann P, Shestakov SV, Börner T. Inactivation of a *Synechocystis* sp strain PCC 6803 gene with homology to conserved chloroplast open reading frame 184 increases the photosystem II-to-photosystem I ratio. Plant Cell. 1995;7(5):649-658.

Yamori W. Photosynthetic response to fluctuating environments and photoprotective strategies under abiotic stress. J Plant Res. 2016;129:379-395.

Yoshikawa K, Hirasawa T, Shimizu H. Effect of malic enzyme on ethanol production by Synechocystis sp. PCC 6803. J Biosci Bioeng. 2015;119(1):82-84

Yomano LP, York SW, Ingram LO. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. J Ind Microbiol Biotechnol. 1998;20(2):132-138.

Zion Market Research. 2017. Biofuels Market Analysis by Type (Bioethanol, Biodiesel), and by Form (Solid, Liquid, and Gaseous) - Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, and Forecast, 2016 – 2022. Maharashtra, India: Zion Market Research. https://www.zionmarketresearch.com/report/biofuels-market.

Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauß N, Saenger W, Orth P. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 A resolution. Nature. 2001;409(6821):739-743.

藤原伸介・跡見晴幸、2015 年、環境ストレスに対する微生物応答と適応機構 生物工学会誌 第 93 巻 第 8 号、公益社団法人日本生物工学会

松本光史、2016 年、微細藻類によるグリーンオイル生産技術の実用化に向けて 化学と生物 第 54 巻 第 3 号、公益社団法人日本農芸化学会

三室　守、2003 年、日本藻類学会創立 50 周年記念出版 21 世紀初頭の藻学の現況、日本藻類学会

横山伸也・他、2008 年、アジアバイオマスハンドブック-バイオマス利活用の手引き、一般社団法人日本エネルギー学会

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大阪大学工学部応用自然科学科 4 回生から大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の博士前期課程および博士後期課程まで、長年研究の場を与えて下さり、終始温かく御指導御助言を賜りました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座、清水浩教授に心より御礼申し上げます。博士論文審査委員として、有益な御指導、御助言を頂きました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の松田秀雄教授、若宮直紀教授、松田史生教授、前田太郎教授に心より感謝申し上げます。博士論文や投稿論文の執筆にあたり、幅広い知識で有益な御助言を頂いた代謝情報工学講座の戸谷吉博准教授に、心より感謝申し上げます。研究テーマの立案から実験手法に至るまで、基礎から詳細に指導して下さった積水化学工業株式会社の吉川勝徳博士（元代謝情報工学講座助教）に深く感謝いたします。培養から解析手法まで的確な御助言を下さった東京大学の古澤力教授（元代謝情報工学講座准教授）ならびに東京工業大学の平沢敬准教授（元代謝情報工学講座助教）に心より感謝申し上げます。本研究に使用した *Synechocystis* sp. PCC 6803 を快くご提供下さった崇城大学生物生命学部応用微生物工学科松岡正佳教授に心より感謝申し上げます。理化学研究所細胞生産研究チームの白井智量副チームリーダーには、実験技術から私事に至るまで、親身に相談に乗って頂き、厚く御礼申し上げます。網羅的遺伝子発現解析において、適切なご助言をいただいた理化学研究所鈴木真吾博士、堀之内貴明博士に厚く御礼申し上げます。当時代謝情報工学講座に所属していた仲嶋翼博士には、シアノバクテリアの培養を初めとする研究方法について基礎から詳細にご指導いただき、心より感謝申し上げます。また数々の面でお世話になりました代謝情報工学講座のみなさまに感謝いたします。博士後期課程での取り組みについて様々な援助を頂いた日鉄エンジニアリング株式会社の若村修氏、西猛氏、木内崇文博士に深く感謝いたします。最後に、これまでの学生生活のあらゆる面で親身に支えて頂いた両親と妻に深く感謝いたします。