

〈一般研究課題〉 遺伝子工学を利用した食環境改善に寄与する
有用バクテリアの創製
助成研究者 名城大学 景山 伯春



遺伝子工学を利用した食環境改善に寄与する 有用バクテリアの創製

景山 伯春
(名城大学)

Metabolic engineering of glycinebetaine in
nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC7120,
for improvement of cultivated fields.

Hakuto Kageyama
(Meijo University)

Abstract :

Nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* strains play an important role in the nitrogen cycle in tropical paddy fields although they are salt sensitive. Therefore improvement of salt tolerance of *Anabaena* cells by genetic engineering is an interesting subject. In some cyanobacteria, it is known that glycinebetaine has a function in the osmotic protection of the cells to live in severe environments including sea water. It has been reported that a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* was able to synthesize glycinebetaine as a compatible solute from glycine via two-step methylation reaction pathway. Here, the genes encoding glycine-sarcosine and dimethylglycine methyltransferases (*ApGSMT-DMT*) from *Aphanothece halophytica* were expressed in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. The *ApGSMT-DMT* expressing *Anabaena* cells were capable to synthesize glycinebetaine without addition of any substance. The accumulation level of glycinebetaine in *Anabaena* cells increased upon the increase of salinity. The transformed cells exhibited a better growth and more tolerance to salinity than the control cells. As it is expected that nitrogen-fixing cyanobacteria will be applied as biofertilizer, salt tolerant *Anabaena* transformant may have important scientific information for future sustainable agriculture.

1. 緒言

窒素固定型シアノバクテリアは、熱帯地域の水田に広く分布しており、生態系における炭素循環および窒素循環に大きく貢献している [1]。これらの *Nostoc* や *Anabaena* 属のようなシアノバクテリア株は、光合成によって得られたエネルギーを利用して大気中の窒素を固定することから [2, 3]、生物肥料(緑肥)として機能することができる。しかしながら、これらのシアノバクテリア株は、塩感受性である場合が多く、塩濃度の高い土壌においては利用不可能となる。従って、*Anabaena* 属に対する塩ストレス耐性付加の試みは大変意義深いものと考えられる。

シアノバクテリアは世界中の様々な環境に分布しており、中には非常に塩濃度の高い条件下で生息している種が存在する。名城大学のグループは以前、死海から単離された *Aphanothece halophytica* において、浸透圧適合溶質として細胞内に蓄積されるグリシンベタイン(以下、ベタイン)が 3 段階のメチル基転移反応 (glycine → sarcosine → dimethylglycine → betaine) によりグリシンから合成されることを見出した [4]。これらの反応を触媒する酵素として、2 つのメチル基転移酵素 ApGSMT (glycine/sarcosine N-methyltransferase) および ApDMT (dimethylglycine N-methyltransferase) が同定されている。本研究においては、これらのメチル基転移酵素を *Anabaena* 属のモデル種である *Anabaena* sp. PCC7120 細胞内で発現させ、ベタインの細胞内蓄積に伴う塩ストレス耐性の付加を試みた。

2. 材料と方法

2.1. 使用株と生育条件

Anabaena sp. PCC7120 は、30℃、連続明条件下 (70 μ E/m²/s)において BG-11 培地中で振とう培養した。形質転換株については、培地中に抗生物質ネオマイシンを終濃度 25 μ g/ml で加えた。生育状態は、波長 730 nm の吸光度でモニターした。

2.2. 接合法による *Anabaena* sp. PCC7120 の形質転換

メチル基転移酵素発現プラスミドは、シアノバクテリアおよび大腸菌細胞内で複製可能なシャトルベクター pRL488 [5] を基に作製した。ApGSMT-DMT オペロンの遺伝子コード領域および ApGSMT 遺伝子上流 300 bp を含む塩基配列を、PCR 法によって増幅させ、pRL488 へ導入した(図 1)。このプラスミドを、大腸菌 HB101 株 (pRL623 プラスミド保持株) および大腸菌 J53 株 (RP4 プラスミド保持株) を用いた接合法により *Anabaena* sp. PCC7120 株へ形質転換した。ネオマイシンを含む寒天培地上でコロニーを選択し、PCR 法によって、目的プラスミドが導入されたか否かを確認した。

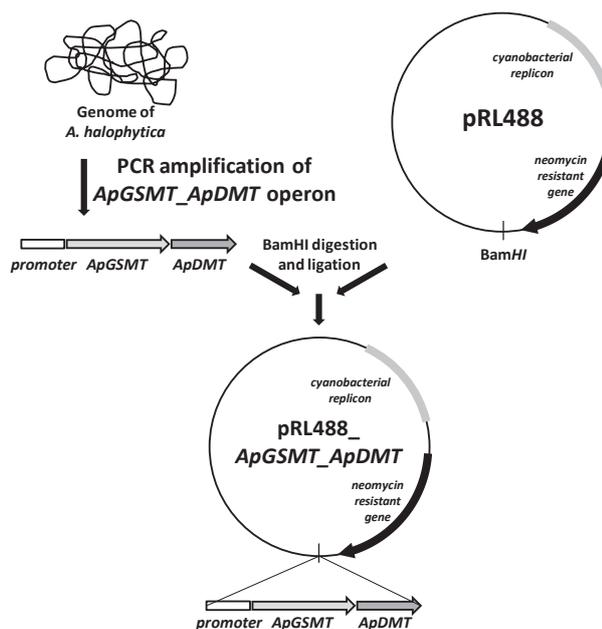


図1 Construction of expression vector

2.3. ベタイン含量の測定

細胞内に蓄積されたベタインは、KI-I₂ 法によって抽出し、TOF-MS を用いて定量した [6]。内部標準物質としては、d₁₁-ベタインを用いた [6]。

3. 結果

3.1. メチル基転移酵素の導入による *Anabaena* sp. PCC7120 株の塩ストレス耐性向上

はじめに、*ApGSMT-DMT* を導入した形質転換株と、pRL488(空ベクター)を導入したコントロール株を BG-11 培地中で生育させ、波長 730 nm における吸光度(OD₇₃₀)でモニターしたところ、両株間において成育速度に差異は認められなかった。続いて、これらの株を NaCl (終濃度 120 mM) を含む BG-11 培地中で生育させたところ、測定開始から 7 日経過時点において *ApGSMT-DMT* 形質転換株の細胞数がコントロール株と比較して有為に多いことが確認できた(図 2)。この結果は、*ApGSMT-DMT* 形質転換株に塩ストレス耐性が付加されていることを示しており、導入した *ApGSMT-DMT* 遺伝子が正常に働き、ベタインを合成していることを示唆するものであった。しかしながら、160 mM 以上の NaCl 濃度中で生育した際には、形質転換株とコントロール株は同様に生育が著しく悪化し、成育速度に差異は確認できなかった。このように、今回作製した *ApGSMT-DMT* 形質転換株に付加された塩ストレス耐性の表現型は限定的であり、160 mM 以上の NaCl 濃度条件下においては明確な塩ストレス耐性付加が確認できなかった。

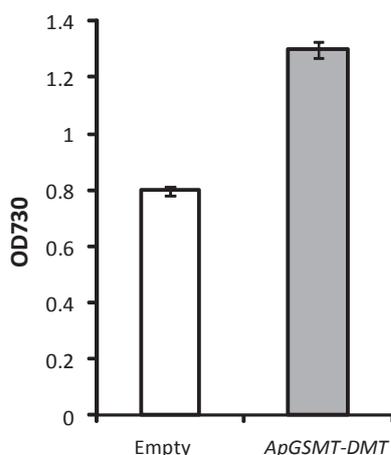


図2 OD₇₃₀ values of *Anabaena* transformant under salt stress

3.2. 形質転換株細胞中のベタイン含量

続いて、*ApGSMT-DMT* 形質転換株の細胞中に蓄積されたベタイン量を定量した。BG-11 培地中で生育させた *ApGSMT-DMT* 形質転換株およびコントロール株を、終濃度 140 mM の NaCl を含む BG-11 培地に移し、7 日経過後の細胞中のベタイン含量を測定したところ、コントロール株細胞からはベタインが検出されなかったが、*ApGSMT-DMT* 形質転換株細胞中からは約 40 nmol/gFW のベタインが検出された(図 3)。このことから、*ApGSMT-DMT* 形質転換株細胞において、導入した *ApGSMT-DMT* 遺伝子が発現し、*ApGSMT* 蛋白質および *ApDMT* 蛋白質が触媒するメチル基転移反応によってグリシンからベタインが合成されていることが示された。細胞内にベタインが蓄積し、浸透圧適合溶質として機能することで前述した塩ストレス耐性が付加されたと考えられる。

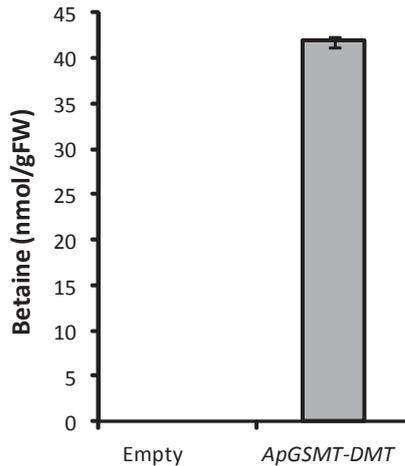


図3 Betaine contents of *Anabaena* transformant under salt stress

4. 考察

本研究では、耐塩性シアノバクテリア *A. halophytica* のベタイン合成遺伝子を *Anabaena* sp. PCC7120 に導入することで、塩ストレス耐性を向上させることに成功した。実際に、*ApGSMT-DMT* 形質転換株細胞中にベタインが蓄積しており、導入した遺伝子が機能していることも確認した。また、NaCl 濃度の上昇により、*ApGSMT-DMT* 形質転換株においてベタインの細胞内含量が上昇することも明らかになった。しかしながら、塩ストレス耐性は向上したものの、その効果は限定的であり、160 mM 以上の NaCl 濃度条件下では効果が見られなかった。これらの結果は、本研究年度に原著論文 [7] として詳細が印刷済みである。名城大学のグループは、以前 *ApGSMT-DMT* を淡水性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 (以下、*Synechococcus*) に導入することで、この株を海水中でも生育可能にすることに成功しているが [8]、本研究結果では海水程度の塩濃度 (約 500 mM NaCl) における塩ストレス耐性は付加されていなかった。*Synechococcus* の場合、*ApGSMT-DMT* を導入することで、100 mM NaCl 条件下で細胞内に 700 nmol/gFW のベタインを蓄積しており [8]、本研究で得られた *Anabaena* sp. PCC7120 の場合と比較して 10 倍以上蓄積量が多かった。さらに、この *Synechococcus* 形質転換株は、500 mM NaCl 条件下では約 1300 nmol/gFW のベタインを蓄積した [8]。このように、細胞内のベタイン蓄積量の差が、塩ストレス耐性の度合いの差につながっていると考えられる。また、ごく最近になって、インドのバラナスヒンズー大学の研究グループから、*Anabaena doliolum* を用いて同様の解析を行った報告がなされた [9]。この報告では、*Anabaena doliolum* に *ApGSMT-DMT* を導入する際に、ルシフェラーゼ遺伝子のプロモーターに ORF 領域を連結している。この形質転換株は、500 mM の NaCl 存在下で生育可能であり、蓄積したベタイン量も約 30 倍多かった。我々の研究との最も大きな違いは、*ApGSMT-DMT* をドライブするプロモーターである。我々は、*A. halophytica* 中のネイティブプロモーターを使用しており、このプロモーター配列が *Anabaena* sp. PCC7120 細胞内では満足に機能しなかった可能性がある。従って、*Anabaena* sp. PCC7120 細胞内で *ApGSMT-DMT* を強発現させる為、*Anabaena* sp. PCC7120 細胞内で強く発現可能なプロモーターを用いることで、細胞内のベタイン含量増加に伴う塩ストレス耐性のさらなる向上が期待できる。

参考文献

1. Chaurasia AK, and Apte SK (2009) Overexpression of the *groESL* operon enhances the heat and salinity stress tolerance of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120. *Appl Environ Microbiol* 75:6008-6012
2. Flores E, and Herrero A (2010) Negative regulation of expression of the nitrate assimilation *nirA* operon in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J Bacteriol* 192:2769-2778
3. Mitschke J, Vioque A, Haas F, Hess WR, Muro-Pastor AM (2011) Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc Nat Acad Sci USA* 108:20130-20135
4. Waditee R, Tanaka Y, Aoki K, Hibino T, Takano J, Takabe T, and Takabe T (2003) Isolation and functional characterization of N-methyltransferases that characterize betaine synthesis from glycine in a halotolerant photosynthetic organism *Aphanothece halophytica*. *J Biol Chem* 278:4932-4942
5. Elhai J (1993) Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *FEMS Microbiol Lett* 114:179-184
6. Hibino T, Waditee R, Araki E, Ishikawa H, Aoki K, Tanaka Y, and Takabe T (2002) Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *J Biol Chem* 277:41352-41360
7. Waditee-Sirisattha R, Singh M, Kageyama H, Sittipol D, Rai AK, and Takabe T (2012) *Anabaena* sp. PCC 7120 transformed with glycine methylation genes from *Aphanothece halophytica* synthesized glycine betaine showing increased tolerance to salt. *Arch Microbiol* 194:909-14
8. Waditee R, Bhuiyan MNH, Rai V, Aoki K, Tanaka Y, Hibino T, Suzuki S, Takano J, Jagendorf AT, Takabe T, and Takabe T (2005) Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc Nat Acad Sci USA* 102:1318-1323
9. Singh M, Sharma NK, Prasad SB, Yadav SS, Narayan G, and Rai AK (2013) Freshwater cyanobacterium *Anabaena doliolum* transformed with *ApGSMT-DMT* exhibited enhanced salt tolerance and protection to nitrogenase activity, but changed its behavior to halophily. *Microbiol* 159:641-648

