

研究紹介

産業的に重要なシアノバクテリア *Arthrospira platensis* NIES-39

(通称スピルリナ) のゲノムの多様な特徴：

基礎から応用まで、個々の遺伝子から比較ゲノムまで[§]

¹東京大学 大学院 総合文化研究科

²製品評価技術基盤機構

³ライフサイエンス統合データベースセンター

⁴中央大学 理工学部 生命科学科

⁵筑波大学 生命環境系

⁶駒澤大学 文学部 自然学科

⁷日本医科大学 生物学科

⁸静岡大学 若手グローバル研究リーダー育成拠点 (GRL)

⁹昭和女子大学 大学院 生活機構学専攻

成川 礼^{1*}、藤澤 貴智²、岡本 忍³、得平 茂樹⁴、吉村 英尚¹、鈴木 石根⁵、増田 建¹、持丸 真里⁶、高市 真一⁷、粟井 光一郎⁸、関根 光雄²、矢代 勲²、小保 せいは²、宝田 裕美²、片野 葉子²、小杉 大樹²、谷河 聡²、大森 和子⁹、佐藤 直樹¹、池内 昌彦¹、藤田 信之²、大森 正之⁴

1. はじめに

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物で、分類学上非常に大きなグループを形成している。形態学的に単細胞性/糸状性、分子状窒素の利用能力という観点から窒素固定/非窒素固定など様々に分類される。糸状性シアノバクテリアはさらに、窒素固定をするためのヘテロシストを分化する種としない種とに分けられる。窒素固定能力を持たない糸状性シアノバクテリア *Arthrospira* (通称スピルリナ) は、アフリカの塩湖であるチャド湖から単離され、糸状体が螺旋を巻いた構造をしている (図 1 A)。スピルリナは古くから食され、現在でも健康食品や色素の材料として産業的に生産されている。スピルリナは塩湖から単離されたため、好塩性・好アルカリ性形質を有し¹⁾、高塩・高アルカリ培地で培養することで、滅菌操作などをせずに開放環境でほぼ無菌的に大量培養することが可能である²⁾。また、螺旋形状の糸状体が大量の多糖を細胞外に放出することで、細胞同士が接着し、遠心操作をせずとも細胞の回収が可能である。これらの形質がスピルリナの産業利用を可能にしている

(A)



(B)

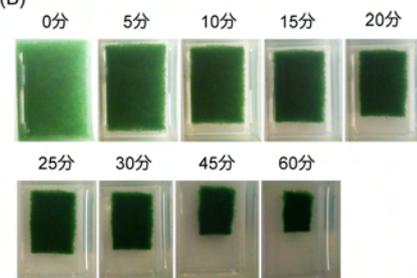


図1 *A. platensis* NIES-39の顕微鏡写真 (A) とcAMP依存的な細胞凝集 (B)

B: 四角い容器 (2.8×2.0×2.0 cm、縦×横×深さ) に入れた高濃度の *A. platensis* に対して cAMP を終濃度 5 μM 添加した後の経時変化。容器の形状依存的に *A. platensis* が凝集していることがわかる。

[§] 第1回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: narikawa@bio.c.u-tokyo.ac.jp

と考えられる。

一方、化石燃料の大量消費による大気CO₂濃度の上昇を軽減するため、再生可能エネルギーの導入が進められ、微細藻類やシアノバクテリアを用いたバイオ燃料やバイオマス生産が脚光を浴びている。有用形質を備えたスピルリナをバイオ燃料生産にも適用していくことが求められる。しかしながら、形質転換の報告例はあるものの、安定で汎用性のある形質転換系の確立には至っておらず、有用物質の生合成系の導入などには現状では適さない³⁾。遺伝的改変を加える代わりに、培養条件を変えることで代謝産物の動態を変化させる試みが報告されているが、そのさらなる改善は困難である⁴⁾。このような現状を打破するためにはゲノム情報は非常に有用である。スピルリナのゲノムを解析することで、新規有用物質の探索が可能となり、スピルリナを用いた光合成によるバイオ燃料・バイオマス生産の基盤情報となることが期待される。

スピルリナは応用的側面からの研究が盛んであり、抗ウイルス作用をもつ細胞外多糖スピランの研究や抗酸化作用を示すフィコシアニンの生産と精製に関する研究などがその代表例として挙げられる^{5,6)}。一方、生理的側面ではサイクリックアデノシン3',5'-リン酸(cAMP)に関する研究が挙げられる。スピルリナは細胞内にcAMPを蓄積するだけでなく、細胞外にもcAMPを放出することが知られている⁷⁾。また、高濃度のcAMPを培地に加えることで、細胞が急速に凝集する現象が報告されている(図1B)⁸⁾。培地に加えたcAMPを細胞が感知してこの反応を引き起こしていると仮定すると、これらの結果は、cAMPがスピルリナにおいて細胞間での情報伝達に関与していることを示唆し、学術的に興味深い現象といえる。

また、これまでに40近くのシアノバクテリアのゲノム解析が行われているが、窒素固定能力をもたない糸状性シアノバクテリアのゲノム解析は全く行われていなかったため、スピルリナのゲノムは糸状体形成のための遺伝子群を探索する点でも有用であることが期待される。このように応用・基礎など様々な側面で有用なスピルリナ *Arthrospira platensis* NIES-39 (*A. platensis*) のゲノムを解読したので⁹⁾、本稿ではその特徴的な性

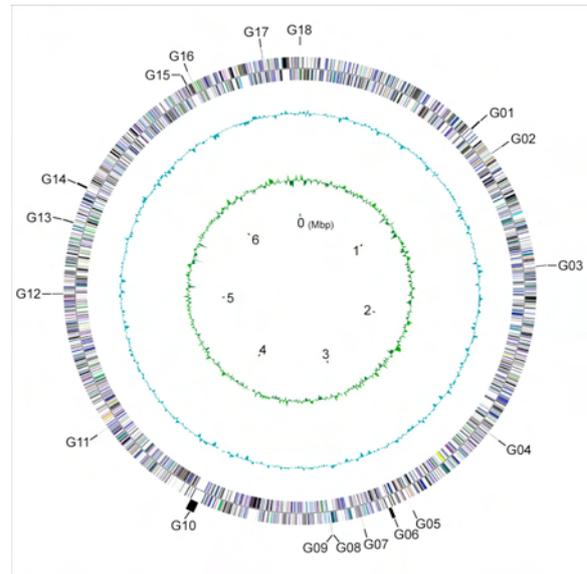


図2 *A. platensis* の環状ゲノムの模式図

最外縁のG01～G18と黒いバー：スーパーコンティグ間のギャップの位置と長さ。外側の環構造：順鎖、逆鎖上の推定タンパク質コード領域。色分けはCOGの機能分類に従った。真中の環構造：G + C含量、内側の環構造：GCスキュー。最内縁の0～6の数字と黒いバー：12時の位置を0 Mbpとしたときの、1 Mbp 毎のゲノムの位置。

質をトピック毎に紹介する。

2. *A. platensis* のゲノム構造

A. platensis のゲノム配列は、製品評価技術基盤機構(NITE)のチームを中心に、ホールゲノムショットガン法により解読された。約1.5、5、40 kbpのインサートを持つ3種のライブラリーを構築し、各断片の両端の塩基配列を決定することで、約11倍ゲノムカバレッジに相当する計92,878のランダム配列を得、最終的に18個のスーパーコンティグにアセンブルした。これらのスーパーコンティグの方向と順序をオブティカルマッピング法¹⁾により決定した(図2)。残された18個のギャップ配列を埋めるためにプライマーウォーキングやトランスポゾンを経た配列決定によるギャップクローリングも試みたが、現状これ以上の改善はできていない。配列が未決定のギャップの全長は約95 kbと見積もられた。これらのギャップの両端の多くは、リピート配列のクラスターかファージ様配列で途切れており、その先もリピート配列が続き、コー

¹⁾ ガラス上に伸長して固定したDNAを制限酵素で切断後、蛍光顕微鏡下でそれぞれの断片の長さを測定し制限酵素地図を作成する。これをゲノム塩基配列からコンピューターによって作製された制限酵素地図と比較することで、スーパーコンティグの方向と順序の決定、ギャップ長の大まかな見積もりが可能となる。

ディング領域をあまり含まないことが期待された。18本のスーパーコンティグの全長は6,692,865 bp (GC含量は44.3%)であり、ギャップ配列を加えると*A. platensis* のゲノムは約6.8 Mb からなる一本の環状DNAであると推定された(図2)。なお、プラスミドは存在しなかった。他の多くのシアノバクテリア同様、GCスキューによってはDNA複製開始点の予測はできなかった。解読したゲノム配列中には、6630個のタンパク質をコードする遺伝子が予測された。2セットのrRNA遺伝子と20のtRNA種に相当する40のtRNA遺伝子を含む49のRNA遺伝子が予測された。6630個のタンパク質をコードする遺伝子のうち、5157個(78%)はデータベース上の何らかの遺伝子と相同であるのに対し、1473個(22%)は全く相同性のない遺伝子であった。マニュアルキュレーションにより、2539個(38%)の遺伝子は生物学的役割にアサインすることができた。なお、*A. platensis* では、各遺伝子を”NIES39_”を先頭に18個のスーパーコンティグを示すアルファベット(A~R)と5桁の番号で表す(例NIES39_A07840)。

3. 比較ゲノム解析による糸状体特異的遺伝子の探索

A. platensis は前述したように、窒素固定をしない糸状性シアノバクテリアとしてゲノム解析された初めての種であるため、比較ゲノム解析から糸状体形成や窒素固定に特異的な遺伝子を抽出するためのレファレンスとして利用出来るゲノムとして位置づけることができる。そこで、ゲノム解析が完了している39種のシアノバクテリア(*A. platensis*を含む)を以下の6つのグループに分類した; I: 単細胞性非窒素固定シアノバクテリア、II: 単細胞性窒素固定シアノバクテリア、III: 単細胞(温度条件によって糸状化)非窒素固定シアノバクテリア(*Synechococcus* sp. PCC 7002)、IV: 糸状性非窒素固定シアノバクテリア(*A. platensis*)、V: 糸状性窒素固定ヘテロシスト非形成シアノバクテリア、VI: 糸状性窒素固定ヘテロシスト形成シアノバクテリア。*Synechococcus* sp. PCC 7002は温度条件により、単細胞

が糸状化することが知られており(D. Bryant、私信)、単細胞性と糸状性の中間種として位置づけた。このように分類し、比較ゲノムツールであるCyanoClustを用いて¹⁰⁾、それぞれの分類特異的な遺伝子群を抽出した(表1)。全てのシアノバクテリアに共通の遺伝子クラスターを694個検出した。これらはハウスキープング遺伝子、光合成関連遺伝子、シアノバクテリア固有の生理現象に関わる遺伝子であると示唆される。*A. platensis* にのみ特異的な遺伝子クラスターを1066個検出したが、これらは*A. platensis*に固有の形質に関与しているかもしれない。ヘテロシスト形成シアノバクテリアに特異的な遺伝子クラスターを223個、窒素固定シアノバクテリアに特異的な遺伝子クラスターを8個それぞれ抽出した。前者には *patN* や *hetP*、後者には *nif* 遺伝子群がそれぞれ含まれていた¹¹⁾。

29個の遺伝子クラスター(これらのクラスターに含まれる *A. platensis* の遺伝子数は31個)が糸状性シアノバクテリア特異的に抽出された(表2)。それらの中には、既に *Anabaena* sp. PCC 7120 において糸状体形成に関わると報告されている *fraC* や *fraG* が含まれていた^{12,13)}。単細胞と糸状体の中間的な種であると考えられる *Synechococcus* sp. PCC 7002 と糸状性シアノバクテリアに保存されているクラスターが7個(*A. platensis*の遺伝子数も7個)存在し、これらも糸状体形成に関わる可能性が高い(表2)。これらの遺伝子群の中には、ヘテロシスト形成に関わる遺伝子群(*hetF*、*hetR*、*patU*)も含まれていた¹¹⁾。*A. platensis* がヘテロシストを形成しないにも関わらず、これらの遺伝子群が *A. platensis* にも存在するという事は、糸状体形成からヘテロシスト形成に至る分化過程が連続的に制御され、*A. platensis* の糸状体形成が単なる細胞分裂の異常による結果ではなく、細胞分化のための

表1 CyanoClustを用いた比較ゲノム解析のまとめ

	生理学的プロファイリング				
	全てに共通	<i>A. platensis</i> 特異的	ヘテロシスト 特異的	窒素固定 特異的	糸状体 特異的
グループI(単細胞・非窒素固定)	0	X	X	X	X
グループII(単細胞・窒素固定)	0	X	X	0	X
グループIII(単細胞/糸状体・非窒素固定)	0	X	X	X	X/O
グループIV(糸状体・非窒素固定)	0	0	X	X	0
グループV(糸状体・窒素固定・ヘテロシスト非形成)	0	X	X	0	0
グループVI(糸状体・窒素固定・ヘテロシスト形成)	0	X	0	0	0
クラスター数	694	1066	223	8	29/7
<i>A. platensis</i> の遺伝子数	938	2056	0	0	31/7

表2 糸状性シアノバクテリア特異的な遺伝子クラスター

グループIV, V, VI特異的クラスター		
クラスター数	遺伝子ID	アノテーション
4981	NIES39_A00790	hypothetical protein
5158	NIES39_A00800	filament integrity protein (<i>fraC</i>)
4909	NIES39_A01310	NUDIX hydrolase
3571	NIES39_A03140	hypothetical protein
4548	NIES39_A04850	hypothetical protein
3571	NIES39_C00130	hypothetical protein
4852	NIES39_C00870	hypothetical protein
2616	NIES39_D00070	hypothetical protein
4736	NIES39_D00920	hypothetical protein
4710	NIES39_E01660	nuclease (SNase-like)
4588	NIES39_E02590	serine/threonine protein kinase
4667	NIES39_F00600	probable glycosyl transferase
4881	NIES39_K02770	hypothetical protein
4277	NIES39_K02780	hypothetical protein
4548	NIES39_L02410	hypothetical protein
4747	NIES39_L03440	hypothetical protein
2616	NIES39_L06030	hypothetical protein
5149	NIES39_L06180	hypothetical protein
5020	NIES39_M00320	hypothetical protein
4731	NIES39_M02510	DUF6 transmembrane protein (<i>sepJ, fraG</i>)
5143	NIES39_N00400	hypothetical protein (<i>patU</i>)
2616	NIES39_N00410	hypothetical protein
5032	NIES39_N00980	hypothetical protein
4826	NIES39_O03720	hypothetical protein
5058	NIES39_O03830	hypothetical protein
5102	NIES39_O03850	hypothetical protein
4991	NIES39_O04240	hypothetical protein
4590	NIES39_O06790	Alpha/beta hydrolase fold
4996	NIES39_Q00570	hypothetical protein
5045	NIES39_Q00580	hypothetical protein
4607	NIES39_R00660	hypothetical protein
グループIII, IV, V, VI特異的クラスター		
クラスター数	遺伝子ID	アノテーション
4298	NIES39_C02810	hypothetical protein
4333	NIES39_C03480	heterocyst differentiation protein (<i>hetR</i>)
4276	NIES39_D04070	hypothetical protein
4505	NIES39_J00800	hypothetical protein
3819	NIES39_J02400	heterocyst differentiation protein (<i>hetF</i>)
4311	NIES39_O06320	hypothetical protein
4255	NIES39_Q02800	hypothetical protein

*ピンクでハイライトした遺伝子群はシンテニーとして保存されている

重要なステップであることを示唆している。これらの遺伝子クラスターのいくつかはゲノム上で遺伝子の並び (シンテニー) としても保存されており、糸状体形成において協調的に働いている可能性が示唆された。多くの遺伝子は機能未知遺伝子であり、これらの遺伝子群の機能解析により糸状体形成の分子機構の解明が期待される。

4. 転移因子

原核生物では、トランスポザゼをコードする挿入配列 (IS) などの転移因子以外に、イントロンやファージ様配列など様々な転移因子が知られ、ゲノム構造の可塑性に大きく寄与している。*A. platensis* では

特にイントロンとファージ様配列についてユニークな特徴が見出された。グループIIイントロンは逆転写酵素をコードする領域があり、転移能を持つイントロンである。約150個のグループIIイントロンが *A. platensis* ゲノム中に見出され、うち71個は逆転写酵素をコードしていた。さらに88配列がグループIIイントロンの活性領域を保持していた。この数は他のシアノバクテリアに比べて圧倒的に多く (*Thermosynechococcus* には27個のグループIIイントロン、*Trichodesmium* には28個のグループIIイントロン活性領域)、グループIIイントロンが *A. platensis* ゲノム中で高度に転移・増殖した結果であると示唆される。

グループIイントロンは自身のイントロンを切り出し、エクソンを連結することで成熟RNAを作るリボザイムとして知られている。*A. platensis* のゲノム中に、生育に必須の酵素であるクラスIリボヌクレオチドリダクターゼ (RNR) をコードする遺伝子のコード領域に二つのグループIイントロンの挿入が検出された (図3A)。各々のイントロン中で挿入直後に終止コドンが存在するため、これらのイントロンは翻訳制御因子として働いている可能性が示唆される。グループIイントロンがタンパク質のコード領域内に検出されることは非常に稀で、シアノバクテリア *Nostoc punctiforme* ATCC 29413 のクラスII RNR に挿入されている例が報告されているのみである¹⁴⁾。RNRはそれぞれ全く相同性がない3つのクラス (クラスI、クラスII、クラスIII) に分類される。クラスI、II、III RNRはそれぞれ非ヘム鉄中心、5'-デオキシアデノシルコバラミン、S-アデノシルメチオニンと鉄硫黄クラスターにより生成されたフリーラジカルを用いて反応を触媒している。配列の異なるクラスIとクラスIIそれぞれのRNR遺伝子へのグループIイントロンの挿入が検出され、また、他のシアノバクテリアのクラスI・クラスII RNR遺伝子においても、グループIIイントロンやタンパク質レベルで切り出されるインテインが高頻度で挿入されていることから⁹⁾、RNRの配列を標的としているのではなく、RNRが触媒する反応経路を標的として、転移因子のホットスポットとなっていることが示唆される。面白いことに、クラスI RNR とクラスII RNR はシアノバクテリアにおいてほぼ相補的に存在している。図3Bに16S RNA配列を基にしたシアノバクテリアの系統樹に対して、クラスI、II、III RNRの分布を示した。この図から、クラスIとクラスIIが系統的

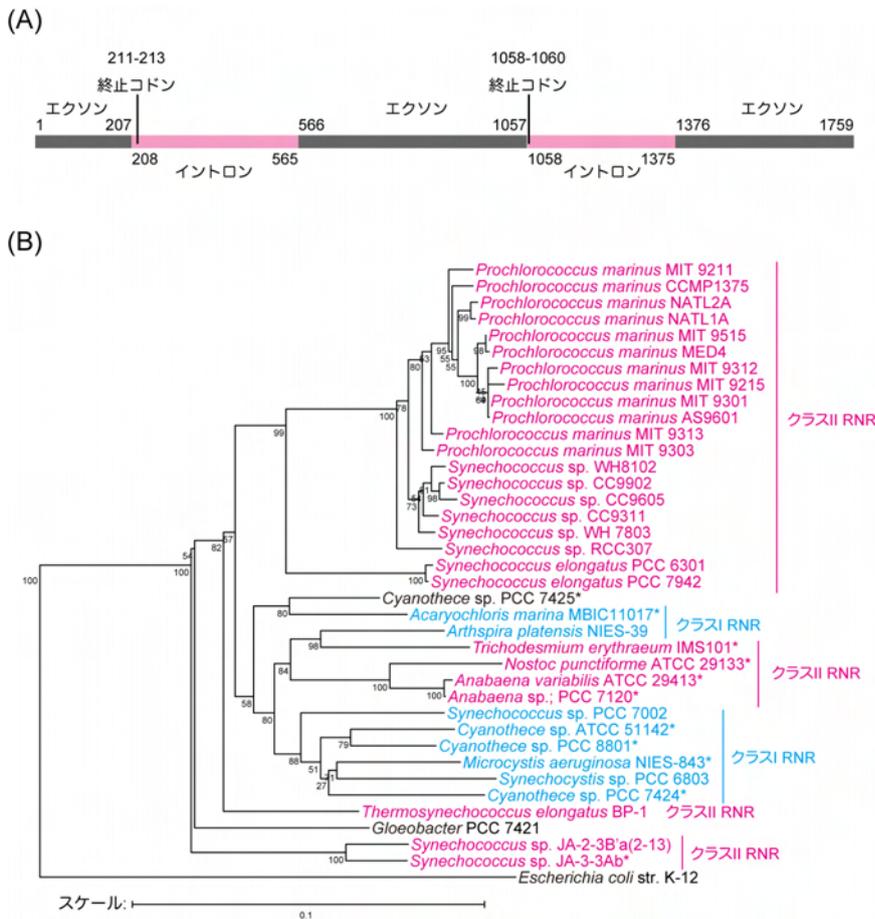


図3 クラスI RNRへのグループIイントロンの挿入 (A) と、クラスI, II RNRのシアノバクテリアにおける分布 (B)

A: クラスI RNRのコード領域は、2つのイントロン (ピンク) によって3つのエクソンに分断されている。数字は、推定開始コドンを中心とする塩基番号。イントロンが除去されると361個のアミノ酸残基から成るRNRタンパク質が翻訳される。B: 16S RNA遺伝子の系統樹に対して、RNRの分布を示した。水色でハイライトした種がクラスI RNRを、ピンクでハイライトした種がクラスII RNRをそれぞれ持ち、*を付けた種はクラスIII RNRを持つ。

にモザイク状に分布していることが分かる。クラスII RNRがより深い枝で分岐した種において広く保存されているため、祖先シアノバクテリアはクラスII RNRを持ち、進化の過程でクラスI RNRを獲得した種が出現した、ということが示唆される。クラスIII RNRは嫌気性酵素として知られ、嫌気環境での生育が示唆される窒素固定シアノバクテリアに主に存在する。また、*Gloeobacter* はクラスI, II, IIIいずれのRNRも検出されないため、全く新規のRNRの存在が期待される。

A. platensis のゲノム中の少なくとも18箇所において、12.5~25.5 kb のファージ様配列が存在した。これらの配列はそれぞれ多様化しているものの、ファージ感染関連遺伝子やダイレクトリピートを作る小さな保存遺伝子などで構成され、ゲノム中の少なくとも295 kbの領域に相当していた。近縁種 *A. maxima* のドラフ

ト配列との比較から、ファージ様配列を介したゲノム再構成も見出されている。ISのトランスポザーゼに関しては、139個検出され、これは他のシアノバクテリアと同程度である。計612 kbがイントロン、ファージ様配列、ISやそれ以外の様々なリピート配列に相当し、他のシアノバクテリアと比べて非常に多いことが明らかとなった。このリピート配列の豊富さがギャップクローリングを困難にしたと推測される。

5. 情報伝達系

5.1. cAMP情報伝達系

cAMPはシアノバクテリアにおいて種々の情報を伝達するセカンドメッセンジャーとして働くことが知られている¹⁵⁾。*A. platensis* ゲノム中には22個のcAMP合成酵素 (アデニル酸シクラーゼ) をコードする遺伝子が存在し、これまでにゲノムが決定されたシ

アノバクテリアで最も多かった (図4)。最も近縁である *Trichodesmium* においてすら、13個しかアデニル酸シクラーゼ遺伝子は存在していなかった。中でも、膜貫通領域を持つアデニル酸シクラーゼが多く (10個)、細胞外の多くの環境情報を伝達するためにcAMPが多用されていることが示唆された。前述したように、*A. platensis* は細胞外にcAMPを放出し、外から加えたcAMPにより急速な細胞凝集を示すことが知られている⁸⁾。このような現象にこれらの膜貫通型アデニル酸シクラーゼが関わっていることが期待される。一方で、アデニル酸シクラーゼによって合成されるcAMPを結合する可能性が高いcNMP結合ドメインも計14個検出された (データ未提示)。中でも、N末端側にATP:ADPアンチポータードメインを有し、C末端側にcNMP結合ドメインを有するユニークなドメ

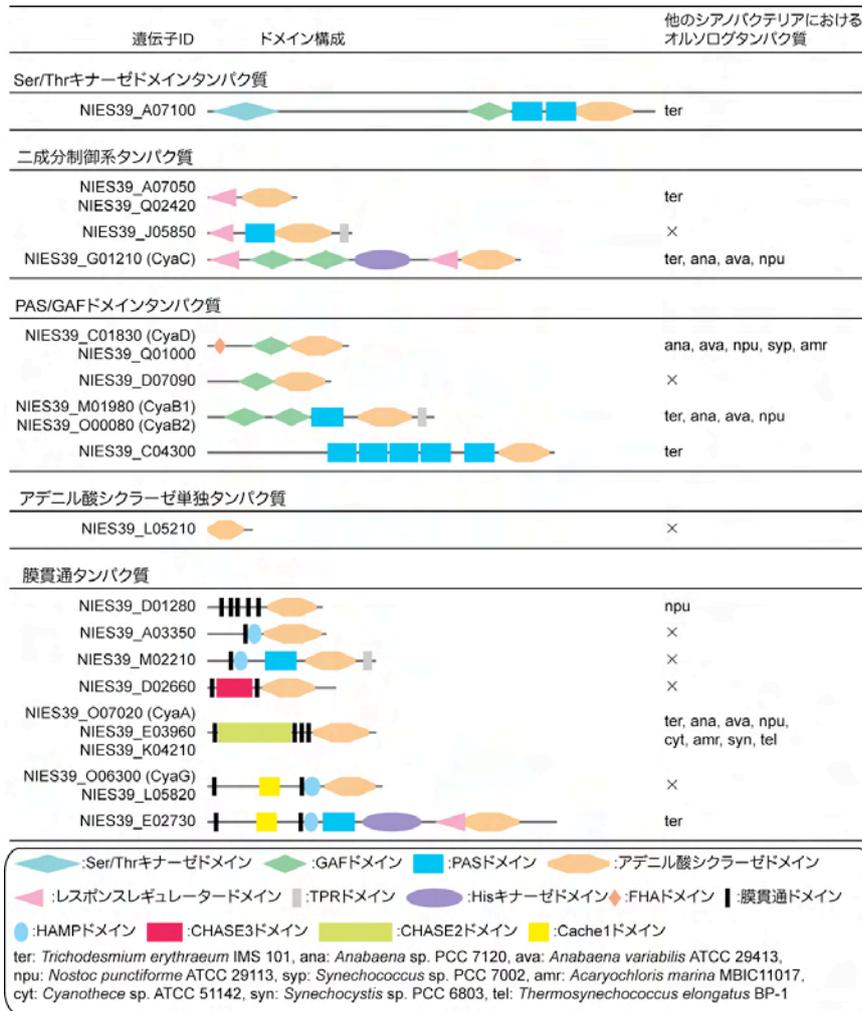


図4 *A. platensis* に見つかった22種のアデニル酸シクラーゼのドメイン構成

イン構成の遺伝子 (NIES39_A00950) が見出された。cAMP依存的な凝集に対して、細胞内ADPの減少と細胞内ATPの増加が伴うことが報告されているので、この遺伝子の関与が示唆される¹⁶⁾。

5.2. 二成分制御系

二成分制御系として84個のヒスチジンキナーゼ遺伝子が検出され、うち33個はレスポンスレギュレーターも持つハイブリッド型であった。また、レスポンスレギュレーター遺伝子は65個検出された。他の多くのシアノバクテリアには存在するリン酸センサー *sphS* 遺伝子が、*A. platensis* には存在しなかった。*SphS* を制御する *SphU* をコードする遺伝子も同様に存在しないが、レスポンスレギュレーター *sphR* やそのターゲット遺伝子である *phoA* や *pts* は存在することから、リン酸感知のために *A. platensis* 独自の制御機構の存在が示唆される¹⁷⁾。

5.3. 転写因子

A. platensis のゲノム中には、7つのシグマ因子が検出された。生育に必須である主要シグマ因子 SigA、3つのグループ2シグマ (SigB、SigC、SigD)、2つのグループ3シグマ (SigF、SigG) に対応する遺伝子がそれぞれ見出された¹⁸⁾。それ以外に、これまでに知られているクレードに属さない新規のグループ3シグマが1つ検出された。*A. platensis* のゲノム中に転写制御因子が66個検出された。この数はゲノムサイズに比して、淡水性を含む非海洋性シアノバクテリアの中では非常に少なく、海洋性シアノバクテリアの数と同程度であり、*A. platensis* が塩湖から単離されたことと関連しているのかもしれない。

5.4. PAS/GAFドメイン

PAS (Per/Arnt/Sim)、GAF (cGMP-binding/Adenylate cyclase/FhlA) ドメインスーパーファミリーは、それぞれアミノ酸配列は多様化しているが立体構造は高度に保存されているスーパーファミリーである。光やレドックスなどの環境センサーを多く含み、シアノバクテリアに特に豊富に存在することが知られている^{19,20)}。*A. platensis* においても、131個のPASドメインと58個のGAFドメインが検出された。これらのPASドメインの中には、6つのフラビン結合型ドメインが存在し、うち3つは光応答性ドメインに保存されたシステイン残基を有する。また、ヘム結合型も1つ存在する。GAFドメインに関しては、cAMP結合型GAFドメインがCyaB1、CyaB2 オルソログに2つずつ (計4個) 見出された。*Anabaena* のCyaB1タンパク質において、生成物であるcAMPによって自己活性化する制御機構が知られているため、同様な生成物フィードバック機構の存在が示唆される²¹⁾。一方、開

環テトラピロール結合型 GAF ドメインは 18 個検出された。フィトクロム型である Cph1 や AphA のオルソログは検出されず、バクテリオフィトクロム型である AphB や AphC オルソログは検出された。また、青色光/緑色光吸収 TePixJ 型シアノバクテリオクロム GAF ドメインが 6 個、赤色光/緑色光吸収 AnPixJ 型シアノバクテリオクロム GAF ドメインが 2 個検出された²²⁾。

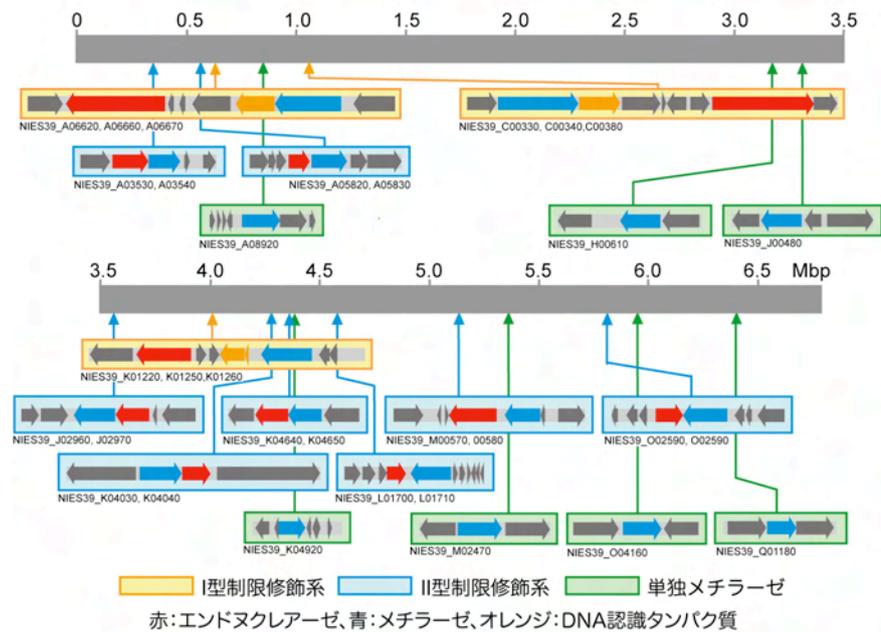


図5 ゲノム上における制限修飾系の位置と種類

5.5. 走化性制御系

A. platensis は滑走運動を行うことが古くから知られ、運動様式について詳細に調べられてきたものの、その運動制御についての知見はほとんどなかった。*A. platensis* ゲノム中に 8 つの走化性制御シグナル伝達タンパク質 (MCP; methyl-accepting chemotaxis protein) をコードする遺伝子が検出され、これらは何らかの走化性センサーとして機能することが示唆される。他の多くのシアノバクテリアでは光受容体型 MCP が存在するが、*A. platensis* では、光受容体型 MCP は検出されていない。3 つの MCP 遺伝子は、他の走化性制御因子である *cheY*、*cheA*、*cheW* などの *che* 遺伝子群とクラスターを形成していた (NIES39_A07840-NIES39_A07910、NIES39_E01010-NIES39_E01070、NIES39_H00230-NIES39_H00290)。他のシアノバクテリアの走化性遺伝子クラスターで高度に保存されている *patA* 遺伝子が二つの遺伝子クラスター (NIES39_A07840-NIES39_A07910、NIES39_H00230-NIES39_H00290) には存在していなかった。これらのクラスターには *Synechocystis* などの遺伝子クラスターには存在しない他の *che* 遺伝子群 (*cheR*、*cheB*、*cheC*) が存在していた。大腸菌において、CheR と CheB はそれぞれ MCP タンパク質のメチル化と脱メチル化を行い、鞭毛制御における一種の分子記憶として働くことが知られている。一方、CheC は CheY の脱リン酸化に作用することが知られている。これらの存在は、*A. platensis* において高感度な走化性制御システムが構築されていること

を示唆する。

6. ゲノム防御系

6.1. 制限修飾系

A. platensis ゲノム中に 3 つの I 型制限修飾系、8 つの II 型制限修飾系、7 つの単独で存在するメチラーゼが検出された (図5)。I 型制限酵素は特異的な認識部位で DNA に結合し、認識部位から様々な距離 (400~7000 bp) で二本鎖 DNA を切断する。一方、II 型制限酵素はパリンδροームを認識して特定の位置で切断し、切断点は認識部位内かそのごく近傍に限定されている。これらの数は他のシアノバクテリアと比べて非常に多く、これまでに形質転換系が確立できていない原因の一つであると考えられる。3 つの I 型制限修飾系は、中国のグループによって報告された *A. platensis* の I 型制限修飾系と一致した²³⁾。I 型制限修飾系はメチラーゼ、DNA 認識タンパク質、DNA 切断酵素をコードする 3 つの遺伝子 (*hsdMSR*) で構成されているが、2 つの I 型制限修飾系において、HsdM と HsdR はアミノ酸配列で 98% 以上保存されているのに対し、HsdS はモザイク状に保存されていた (図6)。HsdS は二つの DNA 認識ドメインがタンデムに並び、N 末、中央、C 末にそれぞれリンカー領域が存在する。NIES39_A06660 と ABB51216 (中国のグループが報告した HsdS) との保存性を調べると、N 末側の DNA 認識ドメインと中央のリンカー領域と C 末のリンカー領

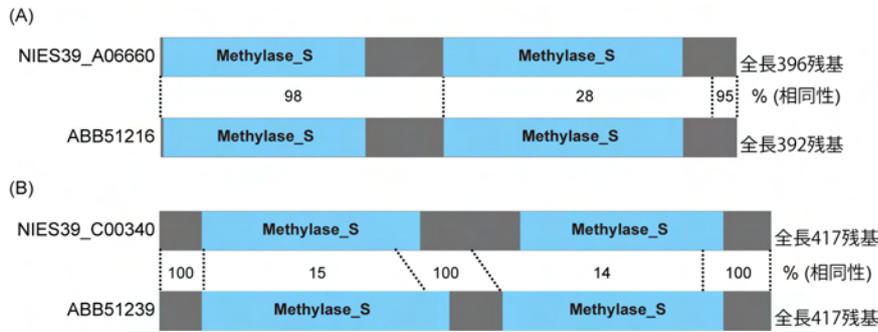


図6 *HsdS* 遺伝子の多様性
水色：Methyase_Sドメイン（DNA認識ドメイン）、灰色：リンカー領域。

域は高度に保存されているが、C末側のDNA認識ドメインは有意に保存性が低かった（28%）（図6A）。一方、NIES39_C00340とABB51239（中国のグループが報告した*HsdS*）との保存性を調べると、N末、中央、C末のリンカー領域は高度に保存されているが、2つのDNA認識ドメインはともに保存性が非常に低かった（15%、14%）（図6B）。他のバクテリアでは*hsdS* がドメインシャフリングによってI型制限酵素の新たな認識部位を獲得したという報告があり、*A. platensis* でも同様の機構で²⁴⁾、1回あるいは2回の相同組み換えによりモザイク状に保存された*hsdS* が生じたと示唆される。このようにDNA認識系を多様化させることにより、外来DNAへの防御系を発達させてきたと考えられる。一方、8つのII型制限修飾系のうちの4つは中国のグループが報告したものと一致するが、残り4つは新規な制限修飾系であった。今回決定したゲノム配列の制限修飾系を基に形質転換系を確立していくことが重要であろう。

6.2. CRISPRシステム

CRISPR配列は一定のスペースを隔ててクラスター化されたリピート配列である。近年、多くのバクテリアやアーキアにおいて、CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats）配列がCasタンパク質と協調して、RNAiと同様の原理でファージに対する防御系として働いていることが分かってきた²⁵⁾。*A. platensis*にもCRISPR配列が3つ検出され、ゲノム上Casタンパク質の近くに存在していた。CRISPR1は34-43塩基の非リピート配列を間に置いて、35塩基のほぼ完全なリピート配列が17個並んでいる。CRISPR2は37-49塩基の非リピート配列を間に置いて、36塩基のほぼ完全なリピート配列が29個並び、

CRISPR3は32-41塩基の非リピート配列を間に置いて、35塩基のほぼ完全なリピート配列が23個並んでいた。

7. スピルラン合成系

*A. platensis*は細胞外にスピルランと呼ばれる硫酸多糖を蓄積することが知られている⁵⁾。スピルランは抗ウイルス作用など様々な生理活性が報

告されている。スピルランはラムノースを主成分とした硫酸多糖で、カルシウムを結合している。*A. platensis*ゲノム中には他のシアノバクテリアとよく保存されたラムノース合成系に加えて、異なった反応で合成すると示唆されるもう一つのラムノース合成系が存在していた。興味深いことに、二つめのラムノース合成系は大きな遺伝子クラスター（NIES39_C03080-C03190）を形成し、その中には、メチルトランスフェラーゼ遺伝子なども含まれていた。スピルランのラムノースの一部はメチル化していることが知られているため、この遺伝子クラスターがスピルラン合成に関与している可能性が示唆される。

8. トランスポーター

*A. platensis*のゲノム中には180以上のトランスポーターをコードする遺伝子が検出された。*A. platensis*の高アルカリ耐性は培地中のナトリウムを除去することにより失われる。また、細胞の光合成活性は高アルカリ（pH10.5）性でも高く保たれるが、単離チラコイドでの光合成活性は高アルカリ性で顕著に阻害されることが報告されている²⁶⁾。つまり、*A. platensis*では光合成などの生理活性がアルカリ耐性になっているのではなく、細胞外のナトリウムを利用した細胞内ホメオスタシス機構がアルカリ耐性に寄与しているといえる。これらのことから、*A. platensis*の好アルカリ性形質には、Na⁺/H⁺アンチポーターの関与が強く示唆されている。*Aphanothece halophytica*などの好塩性シアノバクテリアにおいて、高アルカリ下での高塩耐性に関わると考えられるNa⁺/H⁺アンチポーター（NapA）のオルソログ（NIES39_C00590）が*A. platensis*のゲノム中にも存在し、この遺伝子が*A. platensis*においても好塩・好アルカリ性形質に関与している可能性が示唆さ

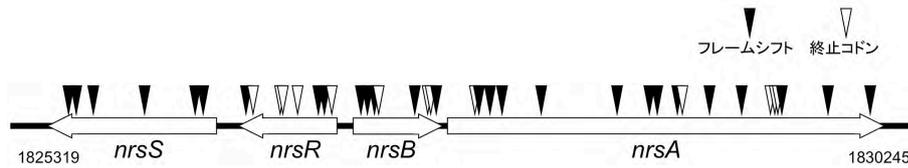


図7 *A. platensis* の典型的な偽遺伝子クラスター *nrsS/R/B/A* 領域における変異の位置と種類

れる²⁷⁾。

高アルカリ条件下で光合成を行うには、細胞質に HCO_3^- を蓄積する必要があると考えられる。細胞質において CO_2 から HCO_3^- に変換する NDH-1 は高親和性型 (NdhF3-D3-CupA-CupS) と低親和性型 (NdhF4-D4-CupB) の二種類知られているが、共に *A. platensis* ゲノムに存在していた。さらに、 HCO_3^- トランスポーターをコードする *bicA*, *sbtA* もそれぞれ存在し、*bicA* は *A. platensis* ゲノムにおいて、タンデムに2コピーに重複していた。一方、ABC 型の HCO_3^- トランスポーターである CmpA-B-C-D に対応する遺伝子群は相同性検索からは同定できていない。

9. 偽遺伝子クラスター

A. platensis のゲノム中には多くの偽遺伝子が存在し、それらの多くは複数の変異が検出され、偶発的に単発の変異で偽遺伝子化したものではないことが示唆された。中でも、ニッケル排出トランスポーターとその二成分制御系をコードする *nrsS/R/B/A* 遺伝子クラスターには、27 個のフレームシフト変異と 13 個の終止コドン変異が蓄積していた (図7)²⁸⁾。これらの変異は近縁種である *A. maxima* には検出されないことから、*A. platensis* NIES-39 株において、特異的にこれらの遺伝子群に変異が蓄積したと考えられる。新たなニッケルトランスポーターの獲得や、NIES-39 株の特異的な生育環境などによる変異が示唆されるが、NIES-39 株のニッケル耐性を調べることで、その遺伝的要因の解明が期待される。

10. その他の遺伝子群

反応中心、シトクロム *b6/f*、ATP 合成酵素、NAD(P) H デヒドロゲナーゼなど光合成系のほとんどの遺伝子は他のシアノバクテリア同様存在していたが、プラストシアニンやチトクロム *cM* などのチラコイドのルーメンに存在すべき電子伝達タンパク質は検出されていない。テトラピロール合成、カロチノイド合成、脂質合成などに関わる遺伝子群もほぼ他のシアノバクテリア

同様存在している。嫌気型 Mg プロトポルフィリン IX モノメチルエステル環化酵素や β -カロチンケトラーゼ (CrtW or CrtO) は検出されなかつ

た。しかしながら、ケトラーゼによって合成される 3-ヒドロキシエキネノンと結合したオレンジカロテノイドタンパク質の結晶構造が近縁種である *A. maxima* において報告されているため、新規のケトラーゼの存在が期待される²⁹⁾。運動関連の遺伝子としては、IV 型ピリ遺伝子群が同定された。近年、*Nostoc punctiforme* において IV 型ピリが滑走運動に関与することが報告されているため、*A. platensis* においても IV 型ピリが滑走運動に寄与しているかもしれない。また、*Phormidium* において滑走運動に必要な S レイヤータンパク質であるオシリンに相同なタンパク質も検出された。このタンパク質はヘモリシン様カルシウム結合ドメインを有し、海洋性 *Synechococcus* における遊泳運動に関わる SwmA とも相同性を示す。また、他のシアノバクテリアに比べて、ヘモリシン様カルシウム結合ドメインをコードする遺伝子が *A. platensis* ゲノム中に非常に豊富に存在し、細胞表層の構造が複雑化していることが推測された。*A. platensis* ゲノム中には既知の様々な毒素産生遺伝子は全く検出されず、食用としての安全性が確認された。

11. おわりに

A. platensis は最初に述べたように、基礎から応用まで様々な面で有用なシアノバクテリアであるが、形質転換系が確立していないために、これ以上の研究進捗がなかなか望めない状況であった。本研究により *A. platensis* ゲノムの全体像が理解でき、制限修飾系遺伝子群も同定できた。より発現しているメチラーゼをクローニングし、プラスミドをメチル化するなどの研究戦略により、形質転換系確立への道筋が開けるかもしれない。また、糸状体特異的遺伝子群、cAMP シグナル伝達系、スピラン合成系、 Na^+/H^+ アンチポーターなど *A. platensis* が持つ特異な形質に対応すると予測される遺伝子群が多数同定された。これらの遺伝子群の機能解析やバイオ燃料生産のための遺伝子導入なども将来的に期待できる。その重要性ゆえに、世界の様々な研究グループにより *Arthrospira* のゲノム解析が

行われていたが、原著論文としての報告には至っていなかった。おそらくリピート配列の豊富さが我々だけでなく他の研究グループにおいてもボトルネックになっていたのだろう。結果として、我々が世界に先立ち *Arthrospira* のゲノム構造を報告できたことは非常に喜ばしいことである。今後の形質転換や遺伝子の機能解析についても是非日本の研究グループが先鞭を切つて素晴らしい成果を報告していくことを期待して、本稿を終わりにしたい。

Received November 16, 2010, Accepted November 26, 2010, Published December 31, 2010

参考文献

1. Belkin, S., and Boussiba, S. (1991) Resistance of *Spirulina platensis* to ammonia at high pH values. *Plant Cell Physiol.* 32, 953-958.
2. 小俣達男、藤田祐一、前田真一 (2010) 光合成微生物は資源・エネルギー分野で人類に貢献できるか？—生産性を規定する諸要因の分析—, 光合成研究 20, 65-71.
3. Kawata, Y., Yano, S., Kojima, H., and Toyomizu, M. (2004) Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp PCC9438) with Tn5 transposase-transposon DNA-cation liposome complex. *Mar. Biotechnol.* 6, 355-363.
4. Carrieri, D., Momot, D., Brasg, I. A., Ananyev, G., Lenz, O., Bryant, D. A., and Dismukes, G. C. (2010) Boosting autofermentation rates and product yields with sodium stress cycling: application to production of renewable fuels by cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6455-6462.
5. Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., and Kojima, I. (1996) Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* 59, 83-87.
6. Eriksen, N. T. (2008) Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1-14.
7. Sakamoto, T., Murata, N., and Ohmori, M. (1991) The concentration of cyclic-AMP and adenylate-cyclase activity in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 32, 581-584.
8. Ohmori, K., Hirose, M., and Ohmori, M. (1993) An increase in the intracellular concentration of cAMP triggers formation of an algal mat by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 34, 169-171.
9. Fujisawa, T., Narikawa, R., Okamoto, S., Ehira, S., Yoshimura, H., Suzuki, I., Masuda, T., Mochimaru, M., Takaichi, S., Awai, K., Sekine, M., Horikawa, H., Yashiro, I., Omata, S., Takarada, H., Katano, Y., Kosugi, H., Tanikawa, S., Ohmori, K., Sato, N., Ikeuchi, M., Fujita, N., and Ohmori, M. (2010) Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res.* 17, 85-103.
10. Sasaki, N. V., and Sato, N. (2010) CyanoClust: comparative genome resources of cyanobacteria and plastids. *Database* 2010, bap025.
11. Kumar, K., Mella-Herrera, R. A., and Golden, J. W. (2010) Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000315.
12. Nayar, A. S., Yamaura, H., Rajagopalan, R., Risser, D. D., and Callahan, S. M. (2007) *FraG* is necessary for filament integrity and heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiol.* 153, 601-607.
13. Bauer, C. C., Buikema, W. J., Black, K., and Haselkorn, R. (1995) A short-filament mutant of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 that fragments in nitrogen-deficient medium. *J. Bacteriol.* 177, 1520-1526.
14. Meng, Q., Zhang, Y., and Liu, X. Q. (2007) Rare group I intron with insertion sequence element in a bacterial ribonucleotide reductase gene. *J. Bacteriol.* 189, 2150-2154.
15. Ohmori, M., and Okamoto, S. (2004) Photoresponsive cAMP signal transduction in cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 503-511.
16. Ohmori, K., and Ohmori, M. (2002) cAMP stimulates Na⁺-dependent ATP formation in the alkaliphilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Microb. Environ.* 17, 144-147.
17. Suzuki, S., Ferjani, A., Suzuki, I., and Murata, N. (2004) The *SphS-SphR* two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* 279, 13234-13240.
18. Osanai, T., Ikeuchi, M., and Tanaka, K. (2008) Group 2 sigma factors in cyanobacteria. *Physiol. Plant.* 133, 490-506.
19. Ohmori, M., Ikeuchi, M., Sato, N., Wolk, P., Kaneko, T., Ogawa, T., Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okamoto, S., Yoshimura, H., Katoh, H., Fujisawa, T., Ehira, S., Kamei, A., Yoshihara, S., Narikawa, R., and Tabata, S. (2001) Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 8, 271-284.
20. Ashby, M. K., and Houmard, J. (2006) Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 472-509.
21. Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J. U. and Schultz, J. E. (2002) A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.* 21, 3672-3680.

22. Ikeuchi, M., and Ishizuka, T. (2008) Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1159-1167.
23. Zhao, F., Zhang, X., Liang, C., Wu, J., Bao, Q., and Qin, S. (2006) Genome-wide analysis of restriction-modification system in unicellular and filamentous cyanobacteria. *Physiol. Genomics* 24, 181-190.
24. O'Sullivan, D., Twomey, D. P., Coffey, A., Hill, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2000) Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 36, 866-875.
25. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712.
26. Pogoryelov, D., Sudhir, P. R., Kovacs, L., Gombos, Z., Brown, I., and Garab, G. (2003) Sodium dependency of the photosynthetic electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Bioenerg. Biomemb.* 35, 427-437.
27. Laloknam, S., Tanaka, K., Buaboocha, T., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y., and Takabe, T. (2006) Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a betaine transporter active at alkaline pH and high salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6018-6026.
28. Lopez-Maury, L., Garcia-Dominguez, M., Florencio, F. J., and Reyes, J. C. (2002) A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 43, 247-256.
29. Kerfeld, C. A., Sawaya, M. R., Brahmandam, V., Cascio, D., Ho, K. K., Trevithick-Sutton, C. C., Krogmann, D. W., and Yeates, T. O. (2003) The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein. *Structure* 11, 55-65.

Various Genomic Aspects of an Economically Important Cyanobacterium,
Arthrospira (Spirulina) platensis NIES-39:
from basic science to applied science, from individual genes to comparative genomics

Rei Narikawa^{1*}, Takatomo Fujisawa², Shinobu Okamoto³, Shigeki Ehira⁴, Hidehisa Yoshimura¹, Iwane Suzuki⁵, Tatsuru Masuda¹, Mari Mochimaru⁶, Shinichi Takaichi⁷, Koichiro Awai⁸, Mitsuo Sekine², Hiroshi Horikawa², Isao Yashiro², Seiha Omata², Hiromi Takarada², Yoko Katano², Hiroki Kosugi², Satoshi Tanikawa², Kazuko Ohmori⁹, Naoki Sato¹, Masahiko Ikeuchi¹, Nobuyuki Fujita², Masayuki Ohmori⁴

¹Department of Life Sciences (Biology), The University of Tokyo

²Bioresource Information Center, Department of Biotechnology,
National Institute of Technology and Evaluation (NITE)

³Database Center for Life Science, Research Organization of Information and Systems

⁴Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, Chuo University

⁵Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

⁶Natural Science Faculty, Komazawa University

⁷Biological Laboratory, Nippon Medical School

⁸Division of Global Research Leaders, Shizuoka University

⁹Department of Life Sciences, Showa Women's University