

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06188

研究課題名(和文) ゲノム科学等の先端技術を活用したノリのプロトプラスト作成法の再興と簡便化

研究課題名(英文) Revival and simplification of seaweed protoplast preparation methods using genomics and other advanced technologies

研究代表者

関 清彦 (Seki, Kiyohiko)

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号：00264151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：海水温上昇等の環境変化への即応手法である海苔新品種の迅速作出法の作出をめざし、ゲノム科学等の先端技術を活用した海苔プロトプラスト作成技術の再興と簡便化に取り組んだ。酵素生産菌のゲノム解析、DFASTによる酵素遺伝子情報の取得、人工遺伝子合成を用いた発現プラスミド作成および組換え酵素発現により、簡便にそして短期間に酵素活性の安定したプロトプラスト作成酵素を取得することが可能になった。海苔プロトプラストを用いたゲノム編集基盤整備を進め、佐賀大学で解析した海苔ゲノム情報をもとに有用な形質を導入した海苔新品種の作出を期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続的な栽培が可能で環境変化に強い海苔新品種作出のための分子育種法の開発が期待されている。しかし海苔育種へのゲノム科学をとり入れた先端技術は確立されておらず、育種学的な分子レベルでの研究は大きく遅れている。ノリプロトプラストを利用できれば、細胞融合による新品種開発につながる他、ゲノム編集に応用可能なDNA/RNA/タンパク質の導入法開発にも道が開かれる。本研究で短期間に酵素活性の安定したプロトプラスト作成酵素を取得することが可能になり、また葉状体再生率の高いプロトプラストを作成できるようになったことは、海苔の分子育種法の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming to create a method for rapid production of new Nori, *Pyropia yezoensis*, varieties that can respond quickly to environmental changes such as rising sea temperatures, we have revived and simplified the technology for producing *Pyropia* protoplasts by utilizing advanced technologies such as genome science. Genome analysis of enzyme-producing bacteria, acquisition of enzyme gene information by DFAST, creation of expression plasmids using artificial gene synthesis, and recombinant enzyme expression have made it possible to obtain protoplast-producing enzymes with stable enzyme activity easily and in a short time. We expect that the genome editing infrastructure using *Pyropia* protoplasts will be developed, and that new Nori varieties with useful traits will be produced based on the *Pyropia* genomic information analyzed at Saga University.

研究分野：応用生物科学

キーワード：スサビノリ プロトプラスト ポルフィラナーゼ キシラナーゼ マンナーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本の食卓を彩る海苔(ノリ)は日本における養殖海藻の代表であり、申請者の所属する佐賀大学の立地する佐賀県は、ノリ生産において全国一位の量と質を誇っている。現在の日本の養殖ノリ品種は、殆どがスサビノリ (*Pyropia yezoensis*) であり、水産分野を中心にこの種についての研究が古くから行われてきた。中でもプロトプラスト研究は、品種の早期供給や新品種作出などの目的から、深く研究されて来た課題の一つであった。しかしながら、現在では、プロトプラストの利用はほとんどされておらず、またごく一部の研究者しかプロトプラスト作成技術を持たない為、その重要技術継承すら危ぶまれているのが現状である。

### 2. 研究の目的

ノリ育種へのゲノム科学をとり入れた先端技術の導入が研究されているが、未だ遺伝子組換え技術は確立されておらず、生物学的および育種学的な分子レベルでの研究は大きく遅れている。この一因として、葉状体と糸状体の異型世代交代を行う複雑な生活環をもつことがあげられる。そこでプロトプラストを利用することを着想し、葉状体から作成したノリのプロトプラストをこれまで以上に安定的に生産することをめざした。

#### (1) ノリのプロトプラスト調製のための酵素の生産。

これまで用いてきた粗抽出液または粗酵素ではなくノリの葉状体に対する選りすぐられたノリ細胞壁多糖類分解細菌を新たに探索し、これら精製酵素を容易に入手可能にする(目標1)。ノリ細胞壁は、細胞間充填多糖であるポルフィランおよび細胞壁構成多糖である $\beta$ -1,4-マンナンと $\beta$ -1,3-キシランからなるため、ポルフィラナーゼ、 $\beta$ -1,4-マンナーゼ、および $\beta$ -1,3-キシラナーゼの取得を目的とした。

#### (2) 葉状体再生可能なプロトプラストの調製。

新たに取得した精製酵素を用いて、プロトプラストが再生しやすい程度に分解できる酵素配合条件を決定し、再現可能なプロトプラスト化プロトコルを確立する(目標2)。また、「完全なプロトプラストを作成すると再生が不十分であり、細胞外粘質が残るようなプロトプラストであれば発芽・再生しやすい」という事実に基づき、細胞壁等の細胞外多糖の分解が、適度に行われたプロトプラストの調製プロトコルの確立も目的とした。

特に、目標1に関しては、「ゲノム解析技術」と「ピキア酵母によるタンパク質生産技術」という二つの先端技術を積極的に活用する。これらに技術開発により、ノリのプロトプラスト作成技術の復興・簡便化・高度化を図る。

### 3. 研究の方法

#### (1) ノリ細胞壁多糖類分解微生物の探索

優れたノリ細胞壁多糖類分解酵素を探索するために、まず分解酵素生産菌を取得するためノリ資化性微生物を探索した。微生物は、養殖ノリ産地である有明海の泥土から探索した。生ノリ(葉状体)あるいは乾ノリを唯一の炭素源として含む人工海水培地、あるいは合成最少培地により、ノリ細胞壁分解性微生物を濃縮培養した。濃縮培養した微生物群をノリ含有固形培地に植菌して、多糖類分解能を示すハローを形成するコロニーを選抜した。分離選抜した微生物の培養液を用いて、ノリプロトプラスト化効率の高い微生物を最終選抜した。

#### (2) ゲノム解析と酵素遺伝子の推定

次世代シーケンサーを活用して、選抜されたノリ細胞壁多糖類分解微生物の完全ゲノム配列を決定した(ゲノムリード社;国内)。DFASTを用いた注釈付け、BLASTを用いたホモロジー検索により酵素遺伝子情報を取得した。また、AlphaFoldにより構造予測した。

#### (3) 組換え酵素の生産

ポルフィラナーゼ、 $\beta$ -1,4-マンナーゼ、および $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris*、及びブレビバチルスを用いた発現系にそれぞれ最適化して遺伝子合成した。ピキア酵母では、pPICz $\alpha$  ベクターの $\alpha$  ファクター下流に最適化した酵素を連結した酵素発現ベクターを人工合成した。またブレビバチルス発現ベクターは、*In vivo* Cloning法を用いて構築した。

ピキア酵母では、メタノール誘導発現にて、ブレビバチルスについては、酵素生産培地(TMNm)にて分泌生産させた。

#### (4) プロトプラスト作成の最適化実験

ノリ葉状体を、2%パパイニンにより処理後、ポルフィラナーゼ、 $\beta$ -1,4-マンナーゼ、 $\beta$ -1,3-

キシラナーゼを用い細胞壁を溶解した。細胞壁溶解酵素液 10 mL 中に、各酵素が 1 unit、0.5 M マンニトールを含む 20 mM HEPES 緩衝液 (pH7.5) で調製し、120 分作用させ、プロトプラストを調製した。また、(ポルフィラナーゼ、マンナーゼ、キシラナーゼ) の unit 数を (3 unit, 3 unit, 3 unit)、(3 unit, 1 unit, 1unit) で 60 分作用させ、プロトプラストを調製し比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ノリ細胞壁多糖類分解微生物の探索

プロトプラスト作成に必要なノリ細胞壁多糖類分解酵素の生産菌を、養殖ノリ産地である有明海泥土から、ノリ細胞壁抽出物を炭素源とした培地で生育させ、多糖類分解能を有する細菌が多数得られた。特に顕著な分解能を有する 5 株を単離した。



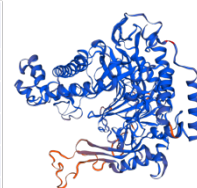
ノリ細胞壁成分分解菌の単離  
(左) ノリ細胞壁抽出物の分解  
(右) マンナン及び寒天の分解

##### (2) ゲノム解析と酵素遺伝子の推定

5 株についてゲノム解析した結果、Brevibacterium N1 株はキシロシダーゼが含まれる糖質加水分解酵素ファミリー GH2, GH3, GH39 の酵素遺伝子およびキシラナーゼを含む GH8 の酵素遺伝子を有していた。また、Vibrio F1 株が GH2, GH3 およびキシラナーゼを含む GH11 遺伝子を、Vibrio T2 株が GH2 およびポルフィラナーゼが含まれる GH50 遺伝子を有した。

分離株	GH2 (Xyl)	GH3 (Xyl)	GH8 (Xyl)	GH11 (Xyl)	GH39 (Xyl)	GH50 (Agr)
F1	+	+		+		
T1						
T2	+					+
R1						
N1	+	+	+		+	

酵素生産菌ゲノムに含まれるノリ細胞壁構成多糖の分解酵素ファミリー(GH)遺伝子



T-2 アガラーゼの立体構造

単離 5 株について、ノリの細胞壁主要多糖である、ポルフィラン、 $\beta$ -1,4-マンナン、 $\beta$ -1,3-キシランの分解酵素生産性を調べた。ポルフィラナーゼの基質としてポルフィランと構造が類似している寒天を、 $\beta$ -1,4-マンナーゼおよび  $\beta$ -1,3-キシラ

ナーゼの基質として、緑藻ミル、海ぶどうからそれぞれ  $\beta$ -1,4-マンナン、 $\beta$ -1,3-キシランを主成分とする抽出物を調製した。F1 株は、寒天、マンナン、キシランを、T2 株で、マンナン、キシランを強く分解したが、他の 3 株では、顕著な分解は認められなかった。3 株において、ノリ細胞壁抽出物を分解した理由については不明であるが、F1, T2 株ではゲノム解析データとノリ細胞壁構成多糖の分解活性は概ね合致した。類似の構造を有する酵素については、ゲノム解析により精製、構造解析を必要とせず、短期間に同定することが可能となったが、類似構造が報告されていない酵素に関しては適応できず、精製、構造解析が必要であると考えられた。

分離株	ノリ抽出物	Man	Xyl	Agar
F1	+	+	+	+
T1	+	-	-	-
T2	+	-	+	+
R1	+	-	-	-
N1	+	-	-	-
N2	+	+	+	+
K1	+	NT	NT	+

##### (3) 組換え酵素の生産

###### ・メタノール資化性酵母による発現

(キトサナーゼの発現) 糸状菌の細胞壁成分であるキチン質を分解する酵素について、メタノール誘導発現により、培養上清中に組換え酵素を分泌発現させたところ活性のある組換え酵素を高生産できた。組換え酵素は、糖鎖の付加のため分子量が大きくなっていたが、酵素の特異性等化学的性質に差異はなかった。

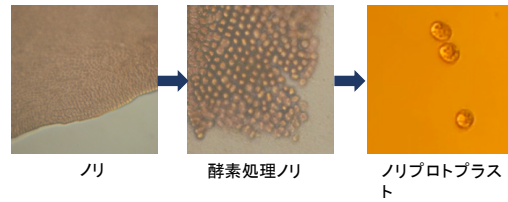
(キシラナーゼ、マンナーゼ、ポルフィラナーゼの発現) メタノール誘導発現により、培養上清中への組換えタンパク質生産は効率よく分泌生産された。キシラナーゼ遺伝子、マンナーゼ遺伝子、ポルフィラナーゼ遺伝子発現の結果、それぞれ培養液 1 L あたり 400 mg、1500 mg、450 mg という高生産を示したが、糖鎖の付加のため分子量が大きくなっており、酵素活性を示さなかった。真菌由来の組換えキトサナーゼは、ピキア酵母で活性のある酵素を高生産できたことから、ピキア酵母に最適化した酵素遺伝子でも細菌由来の酵素は、ピキア発現により活性を示さないことがあると考え、発現宿主としてブレヴィバチルスを用いた。

###### ・細菌ブレヴィバチルスによる分泌発現

(キシラナーゼ、マンナーゼ、ポルフィラナーゼの発現) 細菌ブレヴィバチルス分泌発現系を用い、菌体外生産を試みたところ、組換え酵素の高生産に成功した。キシラナーゼ、マンナーゼ、ポルフィラナーゼの生産量は、それぞれ培養液 1 L あたり 200 mg、1400 mg、250 mg を示した。今回用いた Vibrio 由来の酵素の発現では、ブレヴィバチルス発現系で活性のある組換え酵素を高生産させることができた。酵素生産菌のゲノム解析、DFAST による酵素遺伝子情報の取得、人工遺伝子合成を用いた発現プラスミド作成および組換え酵素発現により、簡便にそして短期間に酵素活性の安定したプロトプラスト作成酵素を取得することが可能になった。

#### (4) プロトプラスト作成の最適化実験

ノリ葉状体を、2%パパイインにより処理後、ポルフィラナーゼ、 $\beta$ -1,4-マンナーゼ、 $\beta$ -1,3-キシラナーゼを用いて細胞壁を溶解した。細胞壁溶解酵素液 10 mL 中に、各酵素が 1 unit、0.5 M マンニトールを含む 20 mM HEPES 緩衝液 (pH7.5) で調製し、120 分作用させたところ、プロトプラスト形成が確認された。また、細胞間充填多糖であるポルフィランの分解酵素添加量を上昇させることにより細胞の分離時間が短くなり、細胞壁構成多糖である  $\beta$ -1,4-マンナーゼおよび  $\beta$ -



プロトプラスト調製

1,3-キシラナーゼの添加量を増やすことにより、プロトプラスト形成効率が上昇した。各酵素を 3 unit ずつ添加したところ 60 分でプロトプラストが形成した。また、ポルフィラナーゼ、マンナーゼ、キシラナーゼの活性を 3 unit, 1 unit, 1 unit とし、60 分反応させたところ、図、プロトプラスト調製に示すように、完全なプロトプラストの他に 7~8 割程度の形のいびつな、スフェロプラスト状のプロトプラストが観察された。

完全なプロトプラストを作成すると再生が不十分であり、細胞外粘質が残るようなプロトプラストであれば、発芽・再生しやすく、そのようなプロトプラストを調製することが可能になった。一方、スサビノリの株の安定保存のために、ノリ葉状体表面で影響を及ぼす微生物を排除することを当初目的としていたが、プロトプラスト再生において無菌状態で培養すると異常な細胞に分化することから、プロトプラストを正常に再生するためには、共生細菌との共培養が必要であった。

ノリプロトプラストの利用により、細胞融合による新品種開発につながる他、ゲノム編集に応用可能な DNA/RNA/タンパク質の導入法開発にも道が開かれる。本研究で短期間に酵素活性の安定したプロトプラスト作成酵素を取得することが可能になり、また葉状体再生率の高いプロトプラストを作成できるようになったことは、海苔の分子育種法の開発に貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野口晴菜, 関 清彦, 甲斐美鈴, 中野友香, 宮崎 厚, 小林元太
2. 発表標題 Mucor ambiguus由来エキソ-キトビオハイドロラーゼの発現と酵素化学的性質
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019 年度 西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱 洋一郎 (Hama Yoichiro) (00243999)	佐賀大学・農学部・教授  (17201)	
研究分担者	永野 幸生 (Nagano Yukio) (00263038)	佐賀大学・総合分析実験センター・准教授  (17201)	
研究分担者	川村 嘉応 (Kawamura Yoshio) (30601603)	佐賀大学・農学部・招へい教授  (17201)	
研究分担者	後藤 正利 (Goto Masatoshi) (90274521)	佐賀大学・農学部・教授  (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------