

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：55501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15754

研究課題名（和文）シアノバクテリアの糖代謝システム制御および機能性オリゴ糖合成への応用

研究課題名（英文）Regulation of the sugar metabolism in cyanobacteria and application to the synthesis of functional oligosaccharides

研究代表者

町田 峻太郎（MACHIDA, Shuntaro）

宇部工業高等専門学校・物質工学科・助教

研究者番号：40827490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、微細藻類による有用物質生産への関心が高まっている。本研究では、シアノバクテリアの炭素代謝系を改変することで、貯蔵多糖であるグリコーゲンを出発物質とした機能性オリゴ糖ラクト-N-ビオースI（LNB）の合成系の構築を目指した。結果として、LNBの基質となるN-アセチルグルコサミンの高蓄積株作製時の致死毒性を明らかにした。また、ビフィズス菌粗抽出液を用いたLNB合成法の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、微細藻類が合成する脂質やカロテノイドに注目が集まり、それらの代謝に関する知見が多く蓄積されてきたが、機能性オリゴ糖生産を目的とした糖代謝に関する研究報告はほとんどない。本研究は、微細藻類を利用した機能性オリゴ糖合成に必要な、糖代謝系に関する新たな知見の収集を目指すところに学術的意義がある。また、本研究で得られた知見は将来的に、光合成生物による糖1リン酸あるいはアミノ糖を基質とした様々な機能性オリゴ糖を生産するための技術開発に役立つと期待できる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, interest in the production of useful substances by microalgae has increased. In this study, we aimed to construct a synthetic system for the functional oligosaccharide lacto-N-biose I (LNB) using glycogen, a storage polysaccharide, as a starting material by modifying the cyanobacterial carbon metabolism system. As a result, the lethal toxicity of N-acetylglucosamine, the substrate of LNB, during the production of accumulation strains was clarified. In addition, a synthetic method for LNB using bifidobacterial crude extract was successfully established.

研究分野：応用微生物学

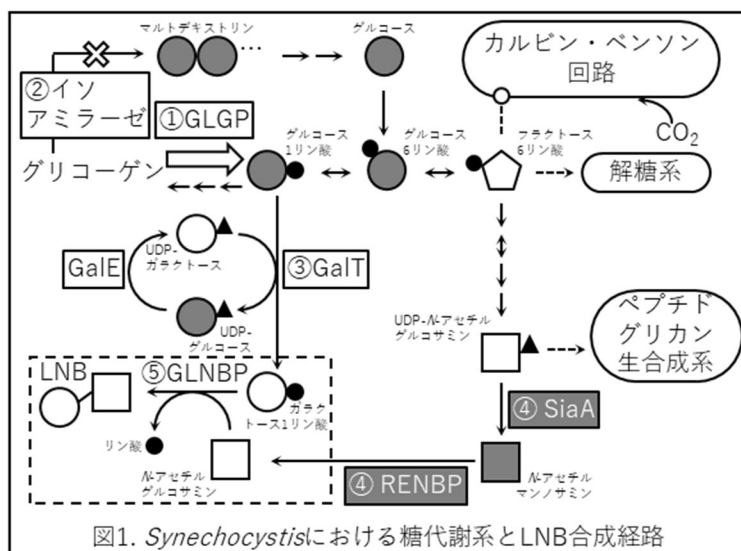
キーワード：ラン藻 微細藻類 有用物質生産 ヒトミルクオリゴ糖 腸内環境

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

化石資源の継続的な利用は、地球温暖化や環境汚染の要因となっている。さらに、世界的な産業の拡大により、化石資源の枯渇が危惧されている。したがって、化石資源を代替するカーボンニュートラルな有用物質生産の技術開発は、持続的社会的構築のために必須である。近年、二酸化炭素を固定する光合成生物により生産されるバイオマスを、代替資源として活用する試みに注目が集まっている。中でも、微細藻類によるバイオマス生産能は極めて高く¹⁾、耕作放棄地や水圏での培養が可能であるため、微細藻類による有用物質生産に対する関心が急速に高まっている。これまで、光合成モデル生物であるシアノバクテリアの炭素代謝系を改変することで、燃料生産を目的とした炭化水素等の合成が試みられてきた。しかし、炭素代謝フローが炭化水素合成だけでなく、貯蔵多糖であるグリコーゲンの合成にも流れてしまうため²⁾、目的とする炭化水素の合成量が制限されてしまうことが課題とされてきた。そこで、細胞内に蓄積されるグリコーゲンを出発物質として利用できれば、効率よく標的化合物を合成できると予想される。

グリコーゲンホスホリラーゼにより、グリコーゲンから生成されるグルコース 1 リン酸、あるいはこれから変換可能なガラクトース 1 リン酸は、オリゴ糖合成の基質として利用可能である。近年、ヒトの腸内環境と健康の関係に対する関心が高まっており、いくつかのオリゴ糖が機能性食品として利用されている。LNB ホスホリラーゼ (GLNBP) を利用して合成できるラクト-N-ピオース I (以下 LNB、図 1 点線枠内) は、ビフィズス菌の選択的な増殖作用が認められており、ヒトの健康維持に役立つことが期待されている³⁾⁴⁾。



2. 研究の目的

これまで、微細藻類を利用した機能性オリゴ糖の合成に関する報告はない。本研究の目的は光合成モデル生物であるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis*) を宿主とした機能性オリゴ糖の生産可能性を検証することである。また、その合成に必要な糖 1 リン酸やアミノ糖の蓄積による微細藻類の生育や光合成などの生理機能への影響を評価することを目指した。

3. 研究の方法

(1) *Synechocystis* の代謝改変による LNB の合成

微細藻類の貯蔵多糖であるグリコーゲンを出発物質とし、糖 1 リン酸およびアミノ糖への変換を介して、機能性オリゴ糖 LNB を細胞内で合成させる代謝系として図 1 の経路を考えた。本研究では、*Synechocystis* を材料とし、以下の ~ の方法を検討した。

内在性グリコーゲンホスホリラーゼ (GLGP) の過剰発現によるグリコーゲンのグルコース 1 リン酸への分解反応強化

イソアミラーゼ遺伝子破壊によるグルコース 1 リン酸合成への炭素代謝フローの強化

外来性 *galT* 遺伝子の異種発現によるグルコース 1 リン酸のガラクトース 1 リン酸への変換

異性化/加水分解酵素 (SiaA) とエピメラーゼ (RENBP) による UDP-N-アセチルグルコサミンの N-アセチルグルコサミンへの変換

GLNBP によるガラクトース 1 リン酸と N-アセチルグルコサミンからの LNB の合成

(2) ビフィズス菌粗抽出液を用いた LNB 合成法の確立

本実験で、合成することを目指す機能性オリゴ糖 LNB は、その合成にかかわるビフィズス菌由来の遺伝子組換え酵素を用い、スクロースおよび N-アセチルグルコサミンを出発原料として、*in vitro* で合成できる。しかしながら、*Synechocystis* で合成させる場合、細胞中の様々な妨害因子による合成阻害が予想される。そこで、シアノバクテリアにおける LNB 生産性を効率的に評価するため、ビフィズス菌の粗抽出液を用いた、より簡便な LNB の調製方法の確立を行った。

4. 研究成果

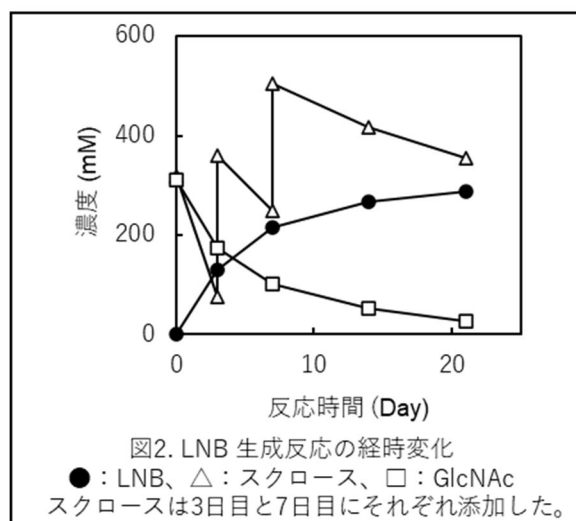
(1) *Synechocystis* の代謝改変による LNB の合成

まず、外来遺伝子を挿入するためのニュートラルサイト *slr2031* の遺伝子領域のクローニングを行った。また、UDP-*N*-アセチルグルコサミンを *N*-アセチルグルコサミンへと変換する *Rhodobacter capsulatus* 由来の *siaA* 遺伝子のコドン使用頻度を最適化したものを人工合成し、その上流に、*P_{opc}* プロモーターを、下流に *Trbc* ターミネーターを付加した。作製したプラスミドコンストラクトを *Synechocystis* に導入した。得られた遺伝子組換え候補株の解析を行ったが、*siaA* 遺伝子が導入されている株はなく、*N*-アセチルグルコサミンを細胞内で蓄積する目的の遺伝子組換え体は得られなかった。UDP-*N*-アセチルグルコサミンはペプチドグリカン合成に必要なため、*siaA* 遺伝子の導入は致命的な細胞毒性を引き起こす可能性が考えられる。同様に、外来性 *galT* 遺伝子の導入を試みたが、目的の遺伝子組換え体は得られなかった。この原因として、グリコーゲンを解糖系やカルビン・ベンソン回路で使用できるフラクトース 6 リン酸ではなく、ガラクトース 1 リン酸へと変換することで細胞死を引き起こしていると考えられる。これら目的の遺伝子組換え体を得るには各遺伝子の発現量調整や、別の代謝経路を利用した合成系の検討、あるいは、培地への糖 1 リン酸あるいはアミノ糖の添加による、細胞内への直接供給の可能性も検討する必要がある。

また、研究開始当初の方法の代替案として、細胞内で合成した多糖を抽出し、細胞外で機能性オリゴ糖を合成する系を確立するため、*sl10822* 遺伝子破壊によるグリコーゲン高蓄積株の作製を行った。*Synechocystis* の total DNA をテンプレートに *sl10822* 遺伝子を PCR 増幅し、その配列中にエリスロマイシン耐性遺伝子を組み込み、*sl10822* 遺伝子破壊用プラスミドを作製した。このプラスミドを自然形質転換により *Synechocystis* に導入し、目的の遺伝子破壊株の作製に成功した。

(2) ビフィズス菌粗抽出液を用いた LNB 合成法の確立

ビフィズス菌粗抽出液をブタ膵臓由来の酵素パンクレアチンで処理することで LNB 合成反応妨害因子を除去・抑制し、スクロースおよび *N*-アセチルグルコサミンを出発原料として LNB を合成できるプロトコルの確立に成功した。また、反応中間体であるグルコース 1 リン酸が粗抽出液に含まれるグリコーゲンホスホリラーゼにより副反応に流れて消費されてしまっている可能性が示唆された。そこで、グリコーゲンホスホリラーゼの反応基質となるマルトオリゴ糖をグルコアミラーゼにより消化する方法を考案した。この方法で LNB を合成した結果、従来方法と比べて、LNB 生産性を 1.8 倍向上させることに成功した。最適化した方法で 100 mL の反応液中で 288 mM の LNB を合成することに成功した (図 2)。



研究期間全体を通じ、次の3つの成果が得られた。I: *Synechocystis* *N*-アセチルグルコサミンおよび、ガラクトース 1 リン酸高蓄積株作製の際の致死毒性の解明、II: *Synechocystis* *sl10822* 破壊株の作製、III: ビフィズス菌粗抽出液を用いた LNB 合成法の確立。今後はこれら成果のうち II および III を組み合わせ、*Synechocystis* が合成したグリコーゲンを原料とした LNB 合成系の確立を検討する予定である。本研究成果により、シアノバクテリアの糖代謝システムを制御し、細胞内外での機能性オリゴ糖の生産可能性を検証することができた。

< 引用文献 >

- 1) Chisti, *Biotechnol. Adv.*, (2007) 25, 294-306
- 2) Kudoh *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, (2014) 118, 20-28
- 3) Nishimoto *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2007) 71, 2101-2104
- 4) Kiyohara *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2009) 73, 1175-1179

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Machida Shuntaro, Saito Katsuichi, Nishimoto Mamoru, Kitaoka Motomitsu	4. 巻 69
2. 論文標題 Production of Lacto-N-biose I Using Crude Extracts of Bifidobacterial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 15 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.jag-2021_0012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inada Takashi, Machida Shuntaro, Awai Koichiro, Suzuki Iwane	4. 巻 53
2. 論文標題 Production of hydroxy fatty acids and its effects on photosynthesis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102155 ~ 102155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2020.102155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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 町田峻太郎、齋藤勝一、西本完、北岡本光
2. 発表標題 ビフィズス菌抽出液を用いた非遺伝子組換え酵素によるラクト-N-ビオースIの生産
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 酵素含有組成物の製造方法	発明者 西本完, 北岡本光, 町田峻太郎, 齋藤勝一, 清水金忠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2021-159014	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------