

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07557

研究課題名(和文) 食用ラン藻スイゼンジノリを用いた細胞外多糖生産分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of exopolysaccharide production in edible cyanobacterium, *Aphanothece sacrum* (Suizenji-Nori)

研究代表者

大城 香 (OHKI, Kaori)

福井県立大学・海洋生物資源学部・名誉教授

研究者番号：90101104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞ラン藻スイゼンジノリ(*Aphanothece sacrum*)は300年以上食用として養殖されてきた本邦固有種で、近年細胞外多糖(EPS)が新規有用バイオ資源として注目されている。本藻のEPS合成分子機構解明を目的に、養殖場から独自に分離したクローン2株を用い(1)増殖とEPS合成の最適条件は20℃、光強度約80 $\mu\text{mol}/\text{平米}\cdot\text{秒}$ である、(2)EPSは5種の主要単糖からなる分子量約10,000 kDaの巨大分子であることを示し、(3)炭素重イオンビーム照射処理によるEPS関連突然変異株作出の試み、(4)全ゲノム塩基配列決定と、EPS合成・細胞外放出関連遺伝子の同定を行った。

研究成果の概要(英文)：Unicellular cyanobacterium *Aphanothece sacrum* (Suizenji-Nori) has been cultured in open-air aqua-farms for more than 300 years as a food source in Japan. At present, the exopolysaccharide (EPS) of *A. sacrum* attracts as a useful bio-resource. To elucidate the molecular mechanisms related to EPS synthesis and export in *A. sacrum*, two clonal strains were isolated from a traditional aqua-farm and used. Results revealed that (1) the optimum conditions for growth and EPS synthesis were at around 20°C and the light intensity of ca. 80 $\mu\text{mole}/\text{sq.m}\cdot\text{sec}$ (12h light/12h dark cycles), (2) purified EPS consisted of five major monosaccharids with a large molecular weight of ca. 10,000 kDa. (3) creation of mutants related to EPS synthesis was tried using heavy ion carbon beam irradiation. (4) the whole genome sequence of the two strains were determined. Analysis of putative genes involved in EPS synthesis and export suggests that the Wzy-dependent pathway is participate in EPS production of *A. sacrum*.

研究分野：植物生理学・藻類学

キーワード：スイゼンジノリ *Aphanothece sacrum* 単細胞ラン藻 細胞外多糖合成 細胞外多糖合成関連遺伝子
全ゲノム解析 exopolysaccharide (EPS)

1. 研究開始当初の背景

ラン藻が合成・細胞外に放出する多糖 (Exopolysaccharide 以下 EPS) は高い保水力・優れた金属吸着能等を有する機能性生物ポリマーで、新規バイオ資源としての利用が期待されている。本研究で用いたスイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*) は、江戸時代から清流を利用した伝統的手法で食用として養殖されてきた我が国固有の淡水性単細胞ラン藻で、EPS はサクラン® の名称で化粧品添加剤などの利用に需要が高まっている。しかし近年環境悪化により屋外で天然の流水を用いた養殖によるスイゼンジノリの生産量は激減し、屋内植物工場によるスイゼンジノリ生産が期待されている。しかし、養殖の基盤となる本藻の生理特性や、EPS の合成・放出の分子メカニズムは不明である。申請者らは本藻の EPS 合成系解明に利用可能なクローン株を伝統的な養殖場で培養されてきたスイゼンジノリから独自に作成し、室内培養系の確立を進めてきた。

2. 研究の目的

現在不明のままのスイゼンジノリの生理特性と EPS 合成・放出の分子メカニズムを明らかにすることを最終目的に、独自に確立したクローン株培養系を用い(1)培地の開発と EPS 合成に関わる生育環境条件の検討、(2)EPS の化学特性の解明、(3)カーボン重イオンビーム (C-HIB) 照射による EPS 関連突然変異体の作出、(4)EPS 合成・放出関連遺伝子の網羅的検出と同定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

実験には、屋外養殖場のスイゼンジノリから独自に作出した 2 株 {FPU1 (野生株)、FPU3 (緑色・養殖場で生じた自発的色素突然変異株)} を主に用いた。

(1) 培地の開発と生育環境の検討: 従来ラン藻の培養に用いてきた改変 AQUIL 培地() を基本に、スイゼンジノリ生育に適した培地組成を検討し新規培地を開発した。得られた培地を用い、増殖と EPS 合成に対する光強度と温度の影響を調べた。

スイゼンジノリは細胞塊を形成しながら増殖するため、直線増殖期の細胞塊をテフロンホモジナイザーを用い細胞塊を砕くことで均一な細胞懸濁液を得た。異なった光強度 { (光源昼光色蛍光灯、12 時間明: 12 時間暗周期) 40、80、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ } と温度 (15、20、25、30) のもとで 5 週間培養し、生物生産量 (乾重量増加量) EPS 含量 (凍結乾燥細胞から抽出精製後フェノール硫酸法法を用いて得た乾燥重量当たりの重量%, 参照) を調べた。

(2) EPS の化学特性: EPS 精製法・分子量測定・官能基の検出・ウロン酸含量測定はと同方法を用いた。単糖組成は、酸加水分解・アセチル化産物後 4-アミノ安息香酸エチルエステル修飾した精製 EPS を HPLC で分離し、蛍光法 (励起 306nm、検出 360nm)

により測定した。

(3) C-HIB 照射による EPS 合成関連突然変異体の作出: 本実験には若狭湾エネルギー研究センターの保有する装置 (生物照射コース、高エネルギー) を利用した。細胞塊をホモジナイズしたあと培地に懸濁し超音波処理後ナイロンメッシュ (目合い 10 μm) により細胞塊等を除去したあと遠心により集めハイブリダイゼーションバックに厚さ約 1mm になるように封入し照射に供した。予備実験として異なる線量の X 線または C-HIB 照射後に致死率を測定し、突然変異株誘起に有効とされる 80% 以上の致死率% が得られた線量 (500Gy) の C-HIB 照射を行った。照射後の細胞は培養液で希釈・超音波処理により分散したあとマイクロタイタープレートに分注し、(1) で得た生育至適条件で 2~3 ヶ月培養を行った。EPS 合成変異の可能性のあるコロニーの選抜は実体顕微鏡を用い目視で行った。

(4) 遺伝子解析: ゲノム DNA は細胞をビーズを用いて破砕後、フェノール・クロロフォルムを用いて抽出、RNAase 処理後エタノール沈殿として回収した。全ゲノム塩基配列決定については、次世代シーケンサー PacBio RSII により、FPU1 株と FPU3 株において、それぞれ 857 Mbp と 925 Mbp の塩基配列情報を取得した。取得した塩基配列を Cerela Assembler version 7.0 により *de novo* assembly をおこなった。各 contig の末端領域のアセンブリーについては manual curation により精査した。作製した contig 配列について、遺伝子アノテーションパイプライン MiGAP を用いて遺伝子領域の探索と遺伝子機能注釈をおこなった。Contig 配列の中で、明らかにコンタミした他生物由来の配列と思われる配列は BLAST 解析などによる確認の後、除去した。最終的に、FPU1 株と FPU3 株において、それぞれ 20 本と 95 本の contig 配列が得られた。2 つの株の contig 数の違いはトランスポゾンやマルチコピー遺伝子の個数によるものと考えられる。また EPS 合成関連遺伝子の同定は BLASTN と BLASTP プログラムを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 培地の開発と生育環境の検討

用いた 2 株とも貧栄養的性質を持ち、通常の淡水産微細藻類に用いられるレベルのリン・窒素・鉄・微量金属が生育を著しく阻害した。これらの生理特性に適しかつ組成が簡単で高圧滅菌により沈殿を生じない新規スイゼンジノリ用培地を作成した。

増殖に適した温度は 20、光強度は FPU1 株では 80、FPU3 株では $\geq 120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ で、最大生育速度 0.38d^{-1} は現在までに養殖場や室内培養で報告されている値の約 2 倍と速かった。また至適条件における EPS 含量は乾燥重量の約 55% で (図 1)、養殖スイゼンジノリと同等以上であった()。本研究で得られた結果をもとに、新規スイゼンジノリ

植物工場の構築を試みている。

(2)EPS の化学特性：分子量は FPU1 株と FPU3 株で 2.0 と 0.7×10^4 kDa で、カルボン酸と硫酸基を官能基として持ち約 16% のウロン酸を含んでいた。EPS 単糖組成を表 1 に示した。以上の化学特性は、養殖スイゼンジノリ()と同じで、室内培養で合成された EPS を屋外養殖スイゼンジノリ同様に利用可能であることが明らかになった。

(3)突然変異体作出：線量 500Gy の C-HIB 照射により約 10^7 個のコロニーを得た。マイクロタイタープレート底面に形成されたコロニーの大部分は、細胞間隙が多量に存在する無職透明の EPS によって広がり、細胞密度が低く明色を呈したが、一部で細胞密度が高い濃色のコロニーが観察され(図 2) 濃色コロニーは EPS の合成・放出量が少なくなった突然変異体の可能性が考えられた。現在濃色のコロニーの培養継続中で、今後野生株と比較ゲノム解析を実施する予定である。

(4)に述べるように、スイゼンジノリでは EPS 合成・放出関連遺伝子の分子機構研究の進んでいるグラム陰性菌と異なり EPS 合成に関する遺伝子がオペロンを形成せずゲノム上に散在している。そのため突然変異作出に遺伝子ノックアウトの手法を用いることは困難が予測され、本研究で用いたような突然変異誘起処理後に表現型を指標にスクリーニングを行う手法が有効と考えられた。

(4)ゲノム解析：従来遺伝子解析に耐えうる品質の核酸を分離するのが困難とされてきた EPS を多量に生産する生物であるスイゼンジノリの核酸抽出法を検討し、DNA、mRNA の抽出効率・安定度ともに凍結破砕法が最も適していることを明らかにした。FPU1 株と FPU3 株のドラフトゲノム情報を取得し、それぞれ 20 本と 95 本の contig 配列として完成できた。予想される全ゲノムサイズは FPU1 株が 4.493 Mbp、FPU1 株が 4.485 Mbp であった。MiGAP を用いて遺伝子コード情報の探索と相同検索を行った結果、現在までに確認できた両株の藻遺伝子数はそれぞれ 4399、4371 塩基である。これはスイゼンジノリの正確な高精度ドラフトゲノム情報を解読できた初の事例である。得られたゲノム配列情報は DDBJ に登録を完了し公開準備に入っている。ゲノム情報から EPS 生産に関わる遺伝子群を検索し、従来シアノバクテリアで EPS 合成・放出への関与が予測されている 2 経路(Wzy 系と ABC-dependent 系)に含まれるタンパク質をコードする遺伝子とコピー数を同定した(表)。Wzy 系タンパク質をコードする遺伝子は検出されたが、ABC-dependent 系で β -Kdo-transferase をコードする *kpsC*, *kpsS* は見いだせなかったことから、本藻では Wzy 系が関与している可能性が示唆された。EPS 関連遺伝子は多くのグラム陰性細菌と異なりオペロンを形成せず、ゲノム上に散在していた。

ドラフトゲノム配列情報から推定された遺伝子コード情報領域情報を用い、RNA-seq 解析用の塩基配列リスト等を整備した。次世代シーケンサーMiSeqを用いた RNA-seq 解析により FPU1 株と FPU3 株の全遺伝子の発現変動比較に成功したが、統計的繰り返しサンプル間での再現性に問題があった。遺伝子発現プロファイルから、通常培養条件での細胞集団の生育状態の違いが想定した以上に大きいことを示す結果であった。この点については、さらに均一な培養条件のもとでの追試が必要と思われた。

本研究で得られた知見は、EPS の新規バイオ素材資源としての利用研究を促進させると考える。江戸時代から伝統的に行われてきたスイゼンジノリ養殖は、環境悪化だけでなく熊本地震(2016 年)、北九州豪雨(2017 年)により壊滅的な被害を受け衰頹・消滅も危惧され、熊本・福岡県では保全活動が行われている。本研究はこれらの活動に有用情報をもたらす社会的インパクト性を持つと考える。

<引用文献>

Ohki K, Quyen TL, Yoshikawa Y, Kanesaki Y, Okajima M, Kaneko T, Hang T. J Appl Phycol. 26, 2014, 265-272

Okajima MK, Kaneko D, Mitsumata T, Kabeji T, Watabave J. Macromol, 41, 2008, 4061-4064.

表1 EPSの糖組成

株	Glc	Xyl	Rha	Gal	Man	Fuc
	(mol %)					
FPU1	22.0	34.5	31.1	4.7	2.9	4.8
FPU3	42.8	16.9	28.5	4.1	3.0	4.8

Glc:グルコース; Xyl:キシロース; Rha:ラムノース; Gal:ガラクトース; Man:マンノース; Fuc:フコース

表2 EPS合成・放出関連遺伝子とコピー数

Wzy系 遺伝子	株名		ABC系 遺伝子	株名	
	FPU1	FPU3		FPU1	FPU3
<i>wzx</i>	1	1	<i>kpsC</i>	nf	nf
<i>wzy</i>	2	2	<i>kpsD</i>	1	1
<i>wzz</i>	2	2	<i>kpsE</i>	nf	nf
<i>wza</i>	1	1	<i>kpsF</i>	1	1
<i>wzb</i>	1	1	<i>kpsM</i>	4	4
<i>waaL</i>	1	1	<i>kpsS</i>	nf	nf
<i>wzc</i>	2	2	<i>kpsT</i>	3	3
			<i>kpsU</i>	1	1

nf;見つからない

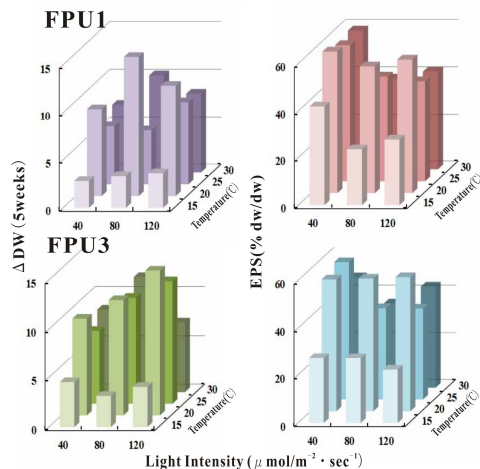


図1 光強度と温度がスイゼンジノリの生物生産量とEPS含量に及ぼす影響：FPU1（上）およびFPU3（株）を光強度40,80,120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ と15,20,25,30の組み合わせで5週間培養し、生物生産量（左：乾燥重量増加）とEPS含量（右：乾燥重量比）を測定した。

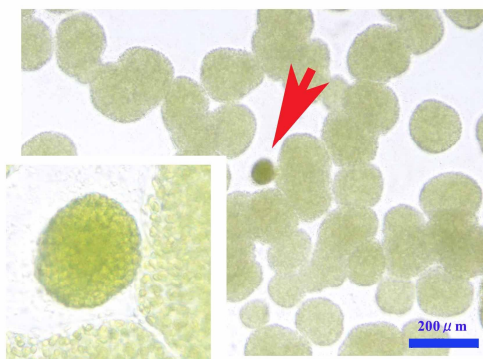


図2 炭素重イオンビーム照射処理により出現したEPS合成変異可能コロニー。実態顕微鏡で観察した処理細胞のコロニー。細胞間隙が狭くなった濃色コロニーが観察された（矢印）。挿入図は拡大像。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計15件)

Ohki K, Kanesaki Y, Suzuki N, Okajima M, Tatsuo K, Yoshikawa S. Physiological properties and genetic analysis related to exopolysaccharide (EPS) production in the fresh-water unicellular cyanobacterium *Aphanothece sacrum* (Suizenji Nori). *J Gene Appl Microbiol* (査読有), 2018,印刷中.

Tajima N, Kanesaki Y, Sato S, Yoshikawa H, Maruyama F, Kurokawa K, Ohta H, Nishizawa T, Asayama M, Sato N. Complete genome sequence of the nonheterocystous cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. ABRG5-3. *Genome Announc* (査読有) 6, 2018,

e01608-17.

DOI:10.1099/mic.0.000577

Shimura Y, Hirose Y, Misawa N, Wakazuki S, Fujisawa T, Nakamura Y, Kanesaki Y, Yamaguchi H, Kawachi M. Complete genome sequence of a coastal cyanobacterium *Synechococcus* strain NIES-970. *Genome Announc* (査読有), 5, 2018, e00139-17.

DOI: 10.1128/genomeA.00139-17

Kobayashi I, Watanabe S, Kanesaki Y, Shimada T, Yoshikawa H, Tanaka K. Conserved two-component Hik34-Rrel module directly activates heat-stress inducible transcription of major chaperone and other genes in *Synechococcus elongates* PCC7942. *Molecular Microbiol.* (査読有), 104, 2017, 260-277.

DOI: 10.1111/mmi.13624

Fujisawa T, Narikawa R, Maeda S, Watanabe S, Kanesaki Y, Kobayashi K, Nomata J, Hanaoka M, Watanabe M, Ehirs S, Suzuki E, Awai K, Nakamura Y. CyanoBase: A large-scale update on its 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* (査読有), 45, 2017, 551-554.

DOI: 10.1093/nar/gkw1131

Ohbayashi R, Yamamoto J, Watanabe S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Miyagishima SY, Yoshikawa H. Variety of DNA replication activity among cyanobacteria correlates with distinct respiration activity in the dark. *Plant Cell Physiol.* (査読有) 28, 2017, 279-286.

DOI: 10.1093/pcp/pcw186

Hang T, Nago DV, Matsukawa M, Kaneko T, Ohki K, Yoshikawa S. Heavy metal biosorption from aqueous solutions by alga inhabiting rice paddies in Vietnam. *Environ Chem Eng* (査読有) 4, 2016, 2529-2536.

DOI: 10.1016/j.jece.2016.04.038

Yamada K, Yoshikawa Y, Ohki K, Ichinomiya M, Kuwata A, Motomura T, Nagasato C. Ultrastructural analysis of siliceous cell wall regeneration in *Triparma laevis* NIES-2565 (Palmiales, Stramenopiles). *Phycologia* (査読有) 55,2016, 602-609.

<https://doi.org/10.2216/16-32.1>

Hirose Y, Fujisawa T, Ohtsubo Y, Misawa N, Wakazuki S, Shimura Y, Nakamura Y, Kawachi M, Yoshikawa H, Eki T, Kanesaki Y. Complete genome sequence of Cyanobacterium *Leptolyngya* sp. NIES-3755. *Genome Announc*, (査読有) 2016, e00090-16. DOI: 10.1128.genomeA.00090-16

Hirose Y, Fujisawa T, Ohtsubo Y, Katayama M, Misawa N, Wakazuki S, Shimura Y, Nakamura Y, Kawachi M, Yoshikawa H, Edi T, Kanesaki Y. Complete genome sequence of

cyanobacterium *Fischerella* sp. NIES-3754, providing thermoresistant optogenetic tools. J Biotechnol. (査読有) 220, 2016, 45-46.

DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.01.011

Nishijima Y, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Ogawa T, Sonoike K, Nishiyama Y, Hihara Y. Analysis of spontaneous suppressor mutants from the photomixotrophically grown pmgA-disrupted mutant in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Photosynth Res. (査読有) 126, 2016, 462-475.

DOI: 10.1007/s11120-015-0143-8

Nakajima N, Ohki K, Kamiya M. Defence mechanisms of sargassacean species against the epiphytic red alga *Neosiphonia harveyi*. J Phycol (査読有) 51, 2015, 695-705.

DOI: 10.1111.j@y.12311

Hirose Y, Fujiwasa T, Ohtsubo Y, Katayama M, Misawa N, Wakazuki S, Shimura Y, Nakamura Y, Kawachi M, Yoshikawa H, Eda T, Kanesaki Y. Complete genome sequence of cyanobacterium *Nostoc* sp. NIES-3756, a potentially useful strain for phytochrome-based bioengineering. J. Biotechnol. (査読有) 218, 2015, 51-52.

DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.12.002

Ohbayashi R, Watanabe S, Ehira S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H. Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution. ISME J. 査読有, 10, 2015, 1113-1121,

DOI: 10.1038/ismej.2015.194

Watanabe S, Ohbayashi R, Kanesaki Y, Saito N, Chibazakura T, Soga T, Yoshikawa H. Intensive DNA replication and metabolism during the lag phase in Cyanobacteria. PLoS One (査読有) 10, 2016, e0136800.

DOI: 10.1371/journal.pone.0136800

〔学会発表〕(計9件)

兼崎友、桶山智恵美、宮澤和己、渡辺智 長期高温培養によるシアノバクテリア新規高温適応株の取得、NGS現場の会、2017年。

兼崎友、桶山智恵美、宮澤和己、渡辺智、吉川博文 シアノバクテリアにおける高温適応進化実験の試み、環境微生物系学会合同大会、2017年

兼崎友、横山智恵美、小澤敬吾、宮澤和己、渡辺智、吉川博文、シアノバクテリアにおける新規高温耐性株の取得とリシーケンス解析、日本農芸化学会、2017年

大城香、鈴木謙之、兼崎友、吉川伸哉 スイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*) の細胞外多糖形成と関連遺伝子の解析、日本植物学会、2016年

大城香、鈴木謙之、兼崎友、岡島麻衣子、金子達男、吉川伸哉 スイゼンジノリ分離株

を用いた室内培養と細胞外多糖生産、日本水産学会中部支部会、2016年

鈴木謙之、一宮達男、岡島麻衣子、金子達男、吉川伸哉、大城香 スイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*) 分離株の増殖特性と細胞外多糖生産能の解析、日本藻類学会、2016年

Ohki K、Suzuki N、Yoshikawa S、Okajima M、Kaneko T. Growth and exopolysaccharide synthesis of edible freshwater cyanobacterium *Aphanothece sacrum* (Suizenji Nori). International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes (国際会議)、2015年

大城香、鈴木謙之、牧しづか、吉川伸哉、岡島麻衣子、金子達男 単細胞ラン藻スイゼンジノリの分離株を用いた成長特性と多糖生産の検討、日本植物学会、2015年

Kanesaki Y、Ohbayashi R、Watanabe S、Yoshikawa H. Identification of the associated genes for substrain-specific phenotypes of a cyanobacterium, *Synechococcus elongates* PCC7942. International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes (国際会議)、2015年

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: スイゼンジノリのクローン単藻株を用いた室内閉鎖培養系

発明者: 大城香・吉川伸哉

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2105-159304

出願年月日: 平成26年8月12日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大城香 (OHKI, Kaori)

福井県立大学海洋生物資源学部・名誉教授

研究者番号: 90101104

(2) 研究分担者

兼崎友 (KANESAKI, Yu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・特任助教

研究者番号: 70380293

(3) 連携研究者

吉川伸哉 (YOSHIKAWA, Sinya)

福井県立大学海洋生物資源学部・准教授

研究者番号: 20405070

(4) 研究協力者

金子達男 (KANEKO, Tatsuo)

北陸先端技術大学院大学・環境エネルギー領域・教授

高城啓一 (TAKAGI, Keiichi)

若狭湾エネルギー研究センター・生物資源研
究室・室長