

令和元年6月14日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07467

研究課題名(和文) 光合成原核生物シアノバクテリアにおける植物型多糖生産の機構解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism for production of plant-type polysaccharide in photosynthetic prokaryotes cyanobacteria

研究代表者

鈴木 英治 (Suzuki, Eiji)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60211984

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)：本研究では各種培養環境におけるシアノバクテリアの生育、貯蔵多糖(グリコーゲン、澱粉)、遺伝子発現の消長を調べた。多糖合成能欠損株の解析から、非至適温度での生育には貯蔵多糖の蓄積が必須であることが明らかとなった。塩ストレス条件では種による塩耐性の程度に応じて異なる適合溶質(グルコシルグリセロール、トレハロース)を産生することが分かった。非窒素固定種は窒素欠乏条件で生育阻害の症状を示し、貯蔵多糖量は窒素栄養源添加時より著しく増大した。これに対し窒素固定種の貯蔵多糖は明期の蓄積と暗期での分解を反復した。非窒素固定種では栄養欠乏条件において無機栄養取込、同化初期段階を担う遺伝子の発現が増大した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解析したシアノバクテリアの一部の種は植物型澱粉を生産する希少な原核生物である。本研究ではより一般的なグリコーゲン(原始的な貯蔵多糖)生産種と澱粉生産性シアノバクテリア種の代謝特性を比較することにより、澱粉蓄積の生理的意義、ならびに澱粉合成機構の進化に関する重要な知見を得ることができた。また原核生物の特徴として細胞小器官を持たないなど代謝機構は簡素であり、温度、塩濃度、栄養欠乏など外環境の変化に対してより強靱な耐性を備え、柔軟な応答を示すことが明らかとなった。これら植物型澱粉生産性シアノバクテリアの特性を活用し、これまでにない構造物性を有する新規澱粉素材の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Growth rates, polysaccharides (glycogen or starch), and gene expression in cyanobacteria were determined under various environmental conditions. Accumulation of polysaccharide was found to be essential to the growth at non-optimal temperatures, as indicated through analyses using mutants defective in the glycogen synthesis. Under salt stress, different compatible solutes (glucosylglycerol or trehalose) were produced, depending on the degree of salt tolerance of the cyanobacterial species. Under nitrogen deficiency, a non-nitrogen fixing cyanobacterium exhibited growth inhibition, and the reserve polysaccharide was increased to much higher levels than in nitrogen replete conditions. In contrast, the polysaccharide in a nitrogen-fixing cyanobacterium showed diurnal accumulation and nocturnal degradation periodically. In the non-nitrogen fixing species exposed to nutrient deficiencies, transcripts for the genes responsible for inorganic nutrient uptake and assimilation were increased.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 シアノバクテリア 貯蔵多糖 澱粉 アミロペクチン グリコーゲン 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

澱粉は植物のみが生産する貯蔵多糖である。シアノバクテリアの多くは貯蔵多糖としてグリコーゲンを蓄積するが、ごく一部の種では、澱粉の主成分であるアミロペクチンと類似した不溶性の分岐多糖を生産することが見出されている (Suzuki ら 2013)。シアノバクテリアは酸素発生型光合成を営む原核生物であり、植物の葉緑体の起源と考えられている微生物群である。原始的な細胞構造、代謝機構を持ちながら、その一部がなぜそしてどのように進化型ともいえる、澱粉様の貯蔵多糖を生産するのか、その意義と仕組みを解明したいという思いが、本研究を開始した発端である。

また、澱粉などの貯蔵多糖は集積物質とも位置づけられてきたが、近年、代謝科学の進展により多糖蓄積の生理学的意義が改めて注目されつつあった。

### 2. 研究の目的

以下に示す環境条件におけるシアノバクテリアの生育と多糖蓄積、およびこれに関わる遺伝子の発現を解析し、貯蔵多糖代謝の生理的意義を明らかにすることを目的とした。

- (1) 低温、および高温における生育と多糖蓄積との相関を明らかにする。
- (2) 塩ストレス時の生育および適合溶質の生産を解析する。
- (3) 窒素栄養源欠乏条件下の明暗周期培養において、窒素固定性および非窒素固定性シアノバクテリアの生育、多糖代謝を比較する。
- (4) 多糖代謝が影響を受ける栄養欠乏条件下での網羅的解析により遺伝子発現の様態を明らかにする。
- (5) ゲノム編集法を利用して、澱粉生産性シアノバクテリアの遺伝子改変技術を開発する。

### 3. 研究の方法

- (1) *Synechococcus elongatus* PCC 7942、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Anabaena* sp. PCC 7120 の各野生株、および PCC 7942 のグリコーゲン合成能欠損株 (ADP-グルコースピロホスホリラーゼ、グリコーゲン合成酵素欠損株) について 15 (低温)、30 (常温)、40 (高温) での液体培養を行い、生育の指標として吸光度 (OD<sub>730</sub>) 変化を測定した。また経時的に採取した試料についてメタノール抽出処理を行い、酵素法 (グルコアミラーゼ/ヘキソキナーゼ/G6P 脱水素酵素法) によりグリコーゲン蓄積量を定量した。
- (2) NaCl を含む無機塩類培地で澱粉生産性の 2 株、*Cyanobacterium aponinum* PCC 10605 株および *Cyanothece* sp. PCC 8802 株を培養した後、メタノールによる抽出を行い、沈殿に回収された貯蔵多糖、および上清に抽出された適合溶質をそれぞれ酵素分解し、生成したグルコースを分光学的に定量した。適合溶質については併せて質量分析による同定を行った。
- (3) 非窒素固定性の PCC 10605 株、および窒素固定性 PCC 8802 株について窒素栄養 (硝酸塩) 添加、非添加条件での明暗 (12 h/12 h) 液体培養を 144 時間 (6 日間) 行った。明暗切り替え時に培養の一部を採取し、断りのない限り上記と同様の方法で細胞密度、クロロフィル *a* 量 (メタノール抽出法)、多糖量を測定した。
- (4) PCC 10605 株を用いて硝酸塩 (17.6 mM → 0 mM) および二酸化炭素 (50,000 ppm → 80 ppm) 欠乏条件 (0、2、6、24 時間) の細胞 (75 mL 培養) からフェノール抽出、塩化セシウム密度勾配遠心法により全 RNA を調製し、MiSeq (Illumina 社) を用いて RNA-Seq 法による転写プロファイリングを行った。
- (5) *Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 遺伝子を広域宿主プラスミド pRL271 にクローン化した。PAM 配列に隣接した標的配列は PCR を用いて単離し、sgRNA の鋳型となるように上記プラスミドに組み込んだ。PCC 10605 株を受容菌として大腸菌との接合法による形質転換を行った。

### 4. 研究成果

- (1) *Synechococcus* PCC 7942、*Synechocystis* PCC 6803 両株の 15 °C での生育速度は 30 °C と比較して顕著に低下した。*Anabaena* PCC 7120 株は 15 °C および 30 °C で同等の生育を示した。15 °C でのグリコーゲン蓄積量はいずれの野生株においても 30 °C の値を上回った。40 °C における PCC 7942 株の生育、およびグリコーゲン蓄積量は 30 °C と比較して減退したが、数日後に適応症状が認められた。PCC 6803、PCC 7120 株の 40 °C での生育は 30 °C と同等であり、グリコーゲン蓄積量は 40 °C で促進された。PCC 7942 グリコーゲン合成能欠損株は、15 °C、および 40 °C いずれでもほとんど生育しなかった。このことから非至適温度における生育には貯蔵多糖の蓄積が必須であることが明らかとなった。
- (2) *Cyanobacterium* PCC 10605 株の生育速度は淡水 (NaCl 非添加) 条件および 0.5 M NaCl 条件で同等であり、1.0 M NaCl 条件で低下した。澱粉生産量は高塩濃度条件で減少し、一方、 $\alpha$ -グルコシド化合物が NaCl 添加条件でのみメタノール可溶性画分に検出された。質量分析により後者の化合物はグルコシルグリセロールと同定された。*Cyanothece* PCC 8802 株の生育は 0.1 M NaCl により阻害され、本株の塩耐性は低いことが明らかとなった。NaCl 添加条件で本株の澱粉生産は促進され、トレハロースの合成が誘導された。以上の結果から、これら 2 種のシアノバクテリアにおいては適合溶質の生合成機構の違い

- を反映して澱粉代謝の挙動が異なるものと考えられた。
- (3) 硝酸塩添加条件では PCC 10605、PCC 8802 両株ともクロロフィル *a* 量、貯蔵多糖量が経時的に増加した。クロロフィル *a* 量と多糖量は負の相関（トレードオフ）関係にあることが示唆された。窒素欠乏条件で PCC 10605 株のクロロフィル *a* 量は漸減し、一方、貯蔵多糖量は硝酸塩添加時より著しく高い値まで増大した。これに対し同条件で PCC 8802 株の貯蔵多糖は明期での蓄積と暗期での分解を反復し、また速度は低いながらクロロフィル *a* の蓄積が見られた。PCC 10605 株では窒素固定能を欠き貯蔵栄養を有効に利用はできないものの、多糖の構造物性は維持しているものと考えられた。
  - (4) PCC 10605 株において、窒素栄養源である硝酸塩欠乏時にはシアン酸輸送体およびシアン脱離酵素 (*cynABDS*)、二酸化炭素欠乏時には炭酸水素イオン輸送体 (*sbtA*)、二酸化炭素輸送体 (*ndh-1<sub>3</sub>*)、炭酸脱水酵素 (*icfA*) 各遺伝子の発現レベルが増大した。本株では硝酸/亜硝酸/炭酸水素イオン輸送体 (*nrtABCD/cmpABCD*) ホモログは 1 コピーしか見出されず、その転写産物量はいずれの欠乏条件でも漸減した。以上の結果から無機栄養取込、同化初期段階に関わる特定の遺伝子発現が促進されることが示唆された。多糖代謝遺伝子の発現レベルに大きな変動は見られず、多糖蓄積量の増大には転写産物量以外の制御が関与している可能性が考えられた。
  - (5) 澱粉生産性シアノバクテリアへの遺伝子変異導入を目指して、広域宿主プラスミド骨格に CRISPR-Cas9 を組み込んだ PCC 10605 株 ADP-グルコースピロホスホリラーゼ（貯蔵多糖合成のキー酵素）遺伝子破壊用のコンストラクトを用いて大腸菌との接合法による PCC 10605 株の形質転換を実施した。生育したコロニーを培養し、遺伝子型の解析を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Suzuki E, Suzuki R (2016) Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes. *Cell Mol Life Sci* 73(14): 2643–2660.  
DOI: 10.1007/s00018-016-2243-9 査読有

Kadouche D, Ducatez M, Cenci U, Tirtiaux C, Suzuki E, Nakamura Y, Putaux J-L, Terrasson AD, Diaz-Troya S, Florencio FJ, Arias MC, Striebeck A, Palcic M, Ball SG, Colleoni C (2016) Characterization of function of the *glgA2* glycogen/starch synthase in *Cyanobacterium* sp. CLg1 highlights convergent evolution of glycogen metabolism into starch granule aggregation. *Plant Physiol* 171(3): 1879–1892.  
DOI: 10.1104/pp.16.00049 査読有

Fujisawa T, Narikawa R, Maeda S, Watanabe S, Kanesaki Y, Kobayashi K, Nomata J, Hanaoka M, Watanabe M, Ehira S, Suzuki E, Awai K, Nakamura Y (2016) CyanoBase: a large-scale update on its 20th anniversary. *Nucleic Acids Res* 45(D1): D551–D554.  
DOI: 10.1093/nar/gkw1131 査読有

Hayashi M, Suzuki R, Colleoni C, Ball SG, Fujita N, Suzuki E (2017) Bound substrate in the structure of cyanobacterial branching enzyme supports a new mechanistic model. *J Biol Chem* 292(13): 5465–5475.  
DOI: 10.1074/jbc.M116.755629 査読有

鈴木龍一郎、林真里、黒木みほ、木村友亮、佐々木柁秀、藤田直子、鈴木英治 (2017) 貯蔵多糖特性の異なるシアノバクテリア由来枝作り酵素の構造と機能、*応用糖質科学*、7(2): 84–90.  
DOI: 10.5458/bag.7.2\_84 査読有

Araki M, Okano K, Ohta S, Suzuki E, Fujibayashi M, Miyata N (2018) Characteristics of harmful algal blooms during a low water temperature season in Lake Hachiro. *J Water Environ Technol* 16(4): 175–183  
DOI: 10.2965/jwet.17-058 査読有

〔学会発表〕(計 34 件)

二宮有佳梨、鈴木英治、澱粉生産性シアノバクテリアにおける貯蔵多糖生産効率の促進条件の検討、第 8 回日本応用糖質科学会東北支部会岩手地区講演会、2016 年 7 月 16 日（岩手大学盛岡市）

後藤光寛、齊藤健太、鈴木龍一郎、鈴木英治、シアノバクテリアのグリコーゲン代謝に関わ

る複数の枝切り酵素の機能解析、日本応用糖質科学会平成 28 年度大会（第 65 回）、2016 年 9 月 14 日（福山大学 福山市）

鈴木龍一郎、木村友亮、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、藤田直子、鈴木英治、新規特性を有する枝切り酵素の構造機能解析、日本応用糖質科学会平成 28 年度大会（第 65 回）、2016 年 9 月 14 日（福山大学 福山市）

鈴木龍一郎、林真里、黒木みほ、木村友亮、佐々木柁秀、藤田直子、鈴木英治、貯蔵多糖特性の異なるシアノバクテリア由来枝切り酵素および枝切り酵素の構造と機能、日本応用糖質科学会平成 28 年度大会（第 65 回）、2016 年 9 月 16 日（福山大学 福山市）

後藤光寛、齊藤健太、鈴木龍一郎、鈴木英治、*Synechocystis* PCC 6803 のグリコーゲン代謝における枝切り酵素の機能解析、日本植物学会第 80 回大会、2016 年 9 月 16 日（沖縄コンベンションセンター 宜野湾市）

後藤光寛、齊藤健太、鈴木龍一郎、鈴木英治、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 グリコーゲン枝切り酵素多重変異株の特性、東北植物学会第 6 回大会（宮城大会）、2016 年 12 月 10 日（東北大学 仙台市）

二宮有佳梨、鈴木英治、Expression analysis of an ABC transporter in *Cyanobacterium aponinum* PCC 10605、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 17 日（鹿児島大学 鹿児島市）

船渡 結、鈴木英治、Effect of low-temperature stress on the glycogen accumulation in cyanobacteria、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 17 日（鹿児島大学 鹿児島市）

木村友亮、鈴木龍一郎、佐々木柁秀、Colleoni C、Ball SG、藤田直子、鈴木英治、新規特性を有するシアノバクテリア由来枝切り酵素の構造機能解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 18 日（京都女子大学 京都市）

鈴木英治、鈴木龍一郎、微生物目線の澱粉科学、秋田応用生命科学研究会（招待講演）、2017 年 5 月 19 日（秋田県総合食品研究センター 秋田市）

鈴木英治、ユーグレナとシアノバクテリアの CCM 研究とその後、第 19 回マリンバイオテクノロジー学会（招待講演）、2017 年 6 月 3 日（東北大学 仙台市）

鈴木英治、鈴木龍一郎、光合成微生物の貯蔵多糖代謝～ゲノム情報を基盤とした生理・進化、および構造生物学～、第 4 回平成 29 年秋田県立大学部局間研究交流フォーラム、2017 年 6 月 5 日（文化交流館カダーレ 由利本荘市）

佐々木柁秀、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、鈴木龍一郎、藤田直子、鈴木英治、シアノバクテリア由来枝切り酵素アイソザイム 3 種の特性解析、日本応用糖質科学会 平成 29 年度大会（第 66 回）、2017 年 9 月 6 日（日本大学生物資源科学部 藤沢市）

鈴木龍一郎、木村友亮、佐々木柁秀、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、藤田直子、鈴木英治、シアノバクテリア由来枝切り酵素の構造機能解析、日本応用糖質科学会 平成 29 年度大会（第 66 回）、2017 年 9 月 6 日（日本大学生物資源科学部 藤沢市）

船渡 結、鈴木英治、非至適温度で生育するシアノバクテリアにおけるグリコーゲン蓄積の意義、日本応用糖質科学会 平成 29 年度大会（第 66 回）、2017 年 9 月 6 日（日本大学生物資源科学部 藤沢市）

船渡 結、鈴木英治、異なる温度環境におけるシアノバクテリアの生育およびグリコーゲン代謝、日本植物学会第 81 回大会、2017 年 9 月 8 日（東京理科大学 野田市）

佐々木柁秀、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、鈴木龍一郎、藤田直子、鈴木英治、澱粉生産性 *Cyanothece* sp. PCC 8802 における 3 種の枝切り酵素アイソザイムの特性解析、日本植物学会第 81 回大会、2017 年 9 月 9 日（東京理科大学 野田市）

鈴木龍一郎、木村友亮、佐々木柁秀、Christophe Colleoni、Steven Ball、藤田直子、鈴木英治、澱粉生産性 *Cyanobacterium* sp. CLg1 株由来枝切り酵素の構造機能解析、日本植物学会第 81 回大会、2017 年 9 月 9 日（東京理科大学 野田市）

二宮有佳梨、鈴木英治、シアノバクテリアにおける ABC 輸送体遺伝子の発現解析、日本植物学会第 81 回大会、2017 年 9 月 9 日（東京理科大学 野田市）

鈴木龍一郎、林 真里、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、藤田直子、鈴木英治、澱粉枝作り酵素の構造生物学、2017 年度 日本農芸化学会 東北支部 若手の会、2017 年 11 月 3 日（ホテルサンルーラル大潟 大潟村）

②① 二宮有佳梨、鈴木英治、澱粉生産性シアノバクテリアを用いた栄養欠乏条件下での遺伝子の発現解析、藍藻の分子生物学 2017、2017 年 12 月 1 日（かずさアカデミアホール 木更津市）

②② 鈴木龍一郎、木村友亮、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、藤田直子、鈴木英治、澱粉枝切り酵素の触媒特性を決定する構造的要因、藍藻の分子生物学 2017、2017 年 12 月 1 日（かずさアカデミアホール 木更津市）

②③ 船渡 結、鈴木英治、グリコーゲン合成能欠損株の温度感受性、藍藻の分子生物学 2017、2017 年 12 月 1 日（かずさアカデミアホール 木更津市）

②④ 船渡 結、鈴木英治、至適温度外でのシアノバクテリアの生育にはグリコーゲン蓄積が必須である、東北植物学会第 7 回大会（岩手大会）、2017 年 12 月 9 日（岩手大学 盛岡市）

②⑤ 吉村 仁、鈴木龍一郎、藤田直子、鈴木英治、シアノバクテリアにおけるイネ澱粉合成酵素 (SS) および 枝作り酵素 (BE) の共発現、東北植物学会第 7 回大会（岩手大会）、2017 年 12 月 9 日（岩手大学 盛岡市）

②⑥ Akinori Nagaki、Koji Noge、Eiji Suzuki、Growth and carbohydrate metabolism of starch-producing cyanobacteria under salt stress、第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月 30 日（札幌コンベンションセンター 札幌市）

②⑦ Akinori Nagaki、Koji Noge、Eiji Suzuki、Salt tolerance and metabolic correlation between reserve polysaccharide and compatible solutes in the starch-producing cyanobacteria、16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes、2018 年 8 月 8 日（プリティッシュコロンビア大学 カナダ）

②⑧ 長岐亮紀、野下浩二、鈴木英治、澱粉生産性シアノバクテリアにおける塩耐性と炭水化物代謝の多様性、日本応用糖質科学会平成 30 年度大会（第 67 回）、2018 年 9 月 10 日（秋田県立大学 秋田市）

②⑨ 鈴木龍一郎、黒木みほ、松浦祐貴、林 真里、藤田直子、鈴木英治、貯蔵多糖特性の異なるシアノバクテリア由来枝作り酵素の特性、日本応用糖質科学会平成 30 年度大会（第 67 回）、2018 年 9 月 10 日（秋田県立大学 秋田市）

③⑩ Yousra El Mannai、出戸涼太、鈴木龍一郎、藤田直子、鈴木英治、シアノバクテリア由来枝作り酵素と分岐構造の異なる多糖との結合解析、日本応用糖質科学会平成 30 年度大会（第 67 回）、2018 年 9 月 10 日（秋田県立大学 秋田市）

③⑪ 佐々木 柁秀、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、鈴木龍一郎、藤田直子、鈴木英治、新規特性を有するシアノバクテリア由来枝切り酵素アイソザイム 3 種の基質特異性、日本応用糖質科学会平成 30 年度大会（第 67 回）、2018 年 9 月 10 日（秋田県立大学 秋田市）

③⑫ 二宮有佳梨、鈴木英治、澱粉生産性 *Cyanobacterium* sp. PCC 10605 株のグローバル転写解析、日本植物学会第 82 回大会、2018 年 9 月 15 日（広島国際会議場 広島市）

③⑬ 二宮有佳梨、鈴木英治、RNA-Seq 法による *Cyanobacterium aponinum* PCC 10605 株のトランスクリプトーム解析、東北植物学会第 8 回大会（青森大会）、2018 年 12 月 8 日（弘前大学 弘前市）

③⑭ Eiji Suzuki、Comparative analysis of starch metabolism in diazotrophic and nondiazotrophic cyanobacteria、第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年 3 月 13 日（名古屋大学 名古屋市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況（計 1 件）

名称：コンクリート製人工礁  
発明者：石井昭浩、桜田良治、鈴木英治、栗本康司  
種類：特許  
番号：特許第 6 5 1 6 7 1 1 号  
取得年：平成 31 年  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.dbp.akita-pu.ac.jp/~plant-physiol/naiyou3.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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、研究者個人に帰属されます。