

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02905

研究課題名（和文）低酸素シグナルによる糖異化制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Glycolytic Regulation by Hypoxia Signaling

研究代表者

小山内 崇 (Osanai, Takashi)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：60512316

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000 円

研究成果の概要（和文）：研究は、シアノバクテリアの糖異化制御メカニズムを解明した。主に、低酸素条件下での糖異化遺伝子の転写制御メカニズムに焦点を当てた。シアノバクテリアは複数の嫌気発酵経路を持ち、主に水素、酢酸、乳酸、ジカルボン酸を産生することが知られており、嫌気発酵は、物質生産において重要な培養条件である。本研究では、クエン酸回路の生化学解析や遺伝子発現量改変株の代謝物量解析を通じて、シアノバクテリアの嫌気発酵における多層的な制御機構を明らかにした。さらに、低酸素下での転写制御メカニズムの解析から、cyAbrB2が低酸素シグナルを受容し、SigEの暗嫌気特異的な転写を調節することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、シアノバクテリアにおける糖異化制御メカニズムの解明を行った。シアノバクテリアは光合成による「糖の生産者」でありながらも、嫌気発酵によって糖を有用な化合物に変換する「等の消費者」でもあり、様々な代謝産物を生成する能力を有している。この研究により、シアノバクテリアが嫌気条件下でどのように糖異化を制御するかが明らかになった。さらに、この研究はシアノバクテリアの嫌気発酵における制御メカニズムが多層的であることを示し、生物学的な観点から、微生物の代謝制御が複雑なネットワークによって調節されていることを示した。今後は嫌気発酵を利用したカルボン酸と水素の有用物質生産に展開可能である。

研究成果の概要（英文）：The study elucidated the glycolytic control mechanism in cyanobacteria, with a focus on the transcriptional regulation of glycolytic genes under low-oxygen conditions. Cyanobacteria possess multiple anaerobic fermentation pathways, primarily producing hydrogen, acetate, lactate, and dicarboxylic acids. Anaerobic fermentation is crucial for substance production. Through biochemical analysis of the citric acid cycle and metabolite quantification in genetically modified strains, the study revealed the multi-layered control mechanism of anaerobic fermentation in cyanobacteria. Additionally, transcriptomic analysis under low-oxygen conditions unveiled the role of cyAbrB2 in sensing low-oxygen signals and regulating the anaerobic-specific transcription of SigE.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微細藻類 発酵 水素 カルボン酸 転写

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアは光合成で酸素を発生させるが、暗条件や高密度条件では酸素を消費し、低酸素環境に置かれる。解糖系は呼吸の電子伝達に比べ ATP 獲得効率が低いため、低酸素条件下では糖異化が亢進する。また、解糖系では酸化型の補酵素を消費し還元型補酵素を得るが、低酸素下では電子の受容体である酸素が不足するので嫌気発酵により有機酸や水素を産生し、酸化型補酵素を再生する。

低酸素条件の他に、窒素栄養、光、サーカディアンリズムがシアノバクテリアの糖異化を制御しており、これらは最終的には転写レベルで制御されていることが知られている。研究代表者のこれまでの研究で、糖異化に関連する遺伝子の転写は RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE が担うことを明らかにしてきた。窒素栄養、光、サーカディアンリズムのシグナルは、SigE を介して糖異化関連遺伝子の発現を制御している。一方で低酸素シグナルが糖異化を促進する仕組みについては明らかになっていなかった。

またシアノバクテリアは複数の嫌気発酵経路を持ち、主に水素、酢酸、乳酸、ジカルボン酸を産生する。そのうち酢酸は ATP 獲得反応の結果として、水素、乳酸、ジカルボン酸は電子受容の結果として生じる。糖異化の制御は最終的には転写レベルで制御されるとされるが多層的であり、転写制御、酸化還元バランス、酵素の調節による制御、代謝のネットワークによる制御が関わると予想される。

### 2. 研究の目的

低酸素条件下におけるシアノバクテリアの糖異化制御機構を淡水性単細胞シアノバクテリアのモデル生物 *Synechocystis* sp. PCC6803 (以下シネコシスティス) を用いて明らかにする。研究計画時は特に低酸素下の糖異化遺伝子の転写制御メカニズムの解明を主目的としたが、シアノバクテリアの糖異化制御は多層的であることを考慮し、(a)クエン酸回路の酵素の生化学と代謝の再構成、(b) 遺伝子発現量改変株の嫌気発酵条件下での代謝物量解析、(c) 低酸素下の転写制御メカニズムの解明、の三階層の研究から多層的なシアノバクテリアの糖異化制御機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (a) クエン酸回路の酵素の生化学と代謝の再構成

発酵産物のうち、ジカルボン酸は分枝型クエン酸回路の還元反応部分により産生されるので、クエン酸回路の酵素について知見を蓄積するため、生化学解析を行った。また、代謝の試験管内再構成を行い、糖異化の中間産物であるホスホエノールピルビン酸(PEP)を基質とした分枝型クエン酸回路の代謝経路の分岐点の反応を 3 酵素で試験管内再構成した。

#### (b) 遺伝子発現量改変株の嫌気発酵条件下での代謝物量

リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(mdh)の遺伝子を過剰発現させたシネコシスティスを作製し、嫌気条件下で産生される乳酸、酢酸、ジカルボン酸の定量を行った。

また、上記を拡張し、他の発酵遺伝子についても発現量改変株を作製し、嫌気条件下で発酵させたときのグリコーゲン消費量、補酵素の酸化還元比(NADH/NAD<sup>+</sup>)、産生される水素、乳酸、酢酸、ジカルボン酸の定量を行った。

#### (c) 低酸素下の転写制御メカニズム

暗嫌気条件下でのタイムコースのトランスクリプトーム解析を行い、低酸素条件下で発酵遺伝子を含む糖異化関連遺伝子の発現変化を調べた。

糖異化関連遺伝子の転写を担う RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE について、明好気条件下での ChIP-seq によるゲノムワイド局在解析を行った。次に、SigE 制御下だが暗嫌気条件下でのみ転写される水素発酵遺伝子(*hox*)に着目し、SigE とともに *hox* を制御するグローバル転写因子 cyAbrB2 について、破壊株の暗嫌気条件下のトランスクリプトームと好気条件下と暗嫌気条件下で ChIP-seq によるゲノムワイド局在解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (a) クエン酸回路の酵素の生化学と代謝の再構成

再構成された系は還元方向と酸化方向の調節を、生体内の pH や基質量の変化の範囲内で行うことができた。すなわち、代謝経路のネットワークによって、反応環境に応じた糖異化の制御を実証できた(Ito et al. 2021)

マリックエンザイム(ME)およびリンゴ酸でヒドロゲナーゼ(MDH)の生化学解析と *in vivo* 解析により、明好気条件下では ME が働き、NADP<sup>+</sup>を用いてリンゴ酸をピルビン酸に酸化する一方、多くの生物でクエン酸回路の構成酵素である MDH は、還元方向の反応を特異的に触媒することが明らかになった。MDH の反応方向の特異性および NADH を補酵素とすることから、MDH が低酸素条件下でジカルボン酸生産による発酵を促進しうることが示唆された。また、明らかになった ME の性質から、補酵素に NADP<sup>+</sup>を用いるラン藻特異的なクエン酸回路を提唱した。(Katayama et al. 2022)

##### (b) 遺伝子発現量改変株の嫌気発酵条件下での代謝物量

MDH をコードする *citH* 遺伝子の過剰発現株では、暗嫌気条件下でジカルボン酸の生産量が上昇し、乳酸や酢酸の生産量が低下することがわかった。(Iijima et al. 2021)さらに、*citH* 過剰発現株や酢酸発酵遺伝子(*ack*)の破壊株では嫌気条件下での NADH/NAD<sup>+</sup>比が酸化側に傾き、水素や有機酸の生産量のバランスが変化することがわかった。(Akiyama and Osanai 2024)

これらの結果により、遺伝子改変による発酵関連遺伝子の転写量変化がグリコーゲン消費量や発酵経路のバランスを変化させることから、生理的条件下でも転写が糖異化と発酵を制御する可能性が示唆された。

##### (c) 低酸素下の転写制御メカニズム

暗嫌気条件下でのタイムコースのトランスクリプトーム解析から、水素発酵遺伝子(*hox*)は暗嫌気条件移行後一過的に発現上昇し、ジカルボン酸生産の鍵酵素のリンゴ酸脱水素酵素(*mdh/citH*)は恒常的な発現上昇を示した。(b)の遺伝子発現了解変化部の解析と併せて、ラン藻は実際に発酵遺伝子の転写制御による発酵経路の調節を行うことが示された。

糖異化関連遺伝子の転写を担うシグマ因子 SigE およびハウスキーピング遺伝子の転写を担う主要シグマ因子 SigA それぞれについて、明好気条件下で ChIP-seq による局在解析を行った。SigA と SigE の結合サイトはどちらも遺伝子の転写開始付近で、両者は共通のものが多かった。一方、SigE 依存に転写される糖異化関連遺伝子のプロモーターには、SigE のみが局在し、SigA の局在は見られなかった。ゲノムワイド解析から、SigE 依存に転写されるプロモータのシグマ因子結合サイトのコンセンサス配列を導出した。水素発酵遺伝子(*hox*)は SigE 依存に転写されることが知られているものの、好気条件下では SigE のプロモータ領域の結合は見られなかった。(Kariyazono and Osanai 2022)

そこで、*hox* が代替シグマ因子 SigE 依存かつ暗嫌気条件下でのみ転写されるメカニズムの解明

を、SigE 及び転写因子 cyAbrB2 の暗嫌気条件下での ChIP-seq による局在解析により行った。結果、明好気条件下では cyAbrB2 は *hox* プロモータ領域に結合して SigE の結合を阻害するが、暗嫌気条件下では cyAbrB2 の局在が変化し、*hox* プロモータに SigE が結合し転写されることがわかった。また、ゲノムワイド解析から cyAbrB2 はラン藻の核様体結合タンパク質(NAPs)であると結論した(Kariyazono & Osanai 2024)。先行研究で cyAbrB2 は翻訳後修飾を受けることが知られており、cyAbrB2 が低酸素シグナルを受容することで SigE の暗嫌気特異的な転写が達成されることが推測された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Katayama Noriaki, Osanai Takashi	4. 巻 114
2. 論文標題 Arginine inhibits the arginine biosynthesis rate-limiting enzyme and leads to the accumulation of intracellular aspartate in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-024-01416-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamane Miyo, Iwazumi Kaori, Osanai* Takashi	4. 巻 0
2. 論文標題 Immobilization of fumarase from thermophilic eukaryotic red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> on ceramic carrier	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2024.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akiyama Minoru, Osanai Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Regulation of organic acid and hydrogen production by NADH/NAD <sup>+</sup> ratio in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1332449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1332449	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 Ito Shoki, Watanabe Atsuko, Osanai Takashi	4. 巻 194
2. 論文標題 Regulation of L-aspartate oxidase contributes to NADP <sup>+</sup> biosynthesis in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 945 ~ 957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiad580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yu, Shimamoto Kosuke, Toyokawa Chihana, Suzuki Kengo, Osanai Takashi	4. 巻 107
2. 論文標題 Gravity sedimentation of eukaryotic algae <i>Euglena gracilis</i> accelerated by ethanol cultivation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 3021 ~ 3032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-023-12476-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Shoki, Hakamada Takumi, Ogino Tatsumi, Osanai Takashi	4. 巻 105
2. 論文標題 Reconstitution of oxaloacetate metabolism in the tricarboxylic acid cycle in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803: discovery of important factors that directly affect the conversion of oxaloacetate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iijima Hiroko, Watanabe Atsuko, Sukigara Haruna, Iwazumi Kaori, Shirai Tomokazu, Kondo Akihiko, Osanai Takashi	4. 巻 65
2. 論文標題 Four-carbon dicarboxylic acid production through the reductive branch of the open cyanobacterial tricarboxylic acid cycle in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 88 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jymben.2021.03.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishii Maki, Ito Shoki, Katayama Noriaki, Osanai Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Biochemical elucidation of citrate accumulation in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 via kinetic analysis of aconitase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17131-17131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96432-2	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 Ito S, Hakamada T, Ogino T, Osanai T.	4. 巻 105
2. 論文標題 Reconstitution of oxaloacetate metabolism in the tricarboxylic acid cycle in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803: discovery of important factors that directly affect the conversion of oxaloacetate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1449-1458.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15120.	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 Iijima Hiroko, Watanabe Atsuko, Sukigara Haruna, Iwazumi Kaori, Shirai Tomokazu, Kondo Akihiko, Osanai Takashi	4. 巻 65
2. 論文標題 Four-carbon dicarboxylic acid production through the reductive branch of the open cyanobacterial tricarboxylic acid cycle in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 88 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jymben.2021.03.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kariyazono Ryo, Osanai Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 CyAbrB2 is a nucleoid-associated protein in <i>Synechocystis</i> controlling hydrogenase expression during fermentation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP94245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.94245.1	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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小山内崇
2. 発表標題 ラン藻の独特な炭素代謝経路と代謝工学
3. 学会等名 第5回 東京理科大学総合研究院合成生物学研究部門シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小山内崇
2. 発表標題 微細藻類による有用物質生産とバイオベンチャーの起業
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ryo Kariyazono, Shoki Ito, Takashi Osanai	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 254
3. 書名 Cyanobacterial Physiology	

〔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	久堀 徹  (Hisabori Toru)  (40181094)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授   (12608)	

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