

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32682

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21294

研究課題名（和文）新しい代謝地図 細胞内に非酵素的な炭素代謝は存在するか？

研究課題名（英文）A New Metabolic Map: Does Non-enzymatic Carbon Metabolism Exist Within Cells

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） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：シネコシステイスのクエン酸回路において、pHによって方向性が変わることが示唆され、通常の生物とは異なる代謝経路が存在することが分かった。リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性が弱いことから、クエン酸回路は通常通りに働かない可能性が示唆された。マリックエンザイムがリンゴ酸代謝に関与し、活性が高いことが明らかになり、マリックエンザイム遺伝子の欠損によってリンゴ酸の蓄積が増加することが確認された。また、シアニディオシゾンメローラにおいても、酵素特性が明らかにされ、シアノバクテリアとは異なる高い酵素活性が示された。このように、微細藻類の一次代謝でも、異なる特性や独自の経路が存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シネコシステイスのクエン酸回路を中心に、複数の酵素を用いたin vitroの代謝再構成の実験が有効であることを示した。また、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの生化学解析結果をもとに、シネコシステイスのクエン酸回路の特殊性を明らかにして、新しい代謝経路を発見した。この経路は、シネコシステイスのみならず、シアノバクテリア一般の経路であることも生化学的に示しており、代謝における高い保存性のある成果を得ることができた。また、真核微細藻類であるシアニディオシゾンメローラなどの酵素特性と比較すると、同じ微細藻類でも性質が異なることがわかった。このように、光合成生物の炭素代謝において、新しい視点を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In vitro metabolic reconstruction studies have suggested that the citric acid cycle in cyanobacteria undergoes directional changes primarily influenced by pH (Ito et al., 2021, Plant J). This discovery implies that the citric acid cycle in cyanobacteria operates differently from typical organisms. Biochemical analyses revealed that the oxidation reaction activity of malate dehydrogenase is extremely weak. Further investigation of enzymes involved in malate metabolism showed that malic enzyme, which converts malate to pyruvate, exhibits significantly higher activity than malate dehydrogenase (Katayama et al., 2022, mBio). These results clearly indicate that the citric acid cycle in cyanobacteria is a specialized pathway (Katayama et al., 2022, mBio). These findings highlight the unique characteristics and individuality of organisms, even in their typical primary metabolism within microalgae.

研究分野：生化学

キーワード：クエン酸回路 シアノバクテリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では、細胞内の代謝に非酵素的な反応が存在することを明らかにすることを目的とした。従来、細胞内の代謝は酵素によってのみ進行するものと考えられていたが、我々の研究によってそれには異なる側面が存在することが示唆されていた。具体的には、光合成を行うシアノバクテリアの中心代謝においては、多くの酵素が同定され、酵素反応を基盤とする代謝地図が構築されてきた。しかし、我々は代謝工学の研究を進める過程で、酵素反応だけでは説明できない現象が観察されてきた。例えば、酢酸などの比較的単純な炭素化合物でも、酵素を破壊してもなお大量に生成されることが明らかになっていた。これらのことから従来では考えられない代謝反応経路が考えられた。

### 2. 研究の目的

このような背景を踏まえ、我々は細胞内で非酵素的な反応が起こっている可能性に着目し、本研究でその存在を検証することとしました。具体的には、シアノバクテリアのピルビン酸代謝とクエン酸回路という中心的な代謝経路において、非酵素的な反応が存在すると仮定し、その証拠を見つけ出すことを目指した。これを出発点としてシアノバクテリアの新しい代謝反応経路を見出すことを目指した。シアノバクテリアは、二酸化炭素を固定し、また、遺伝子改変なども容易であることから、基礎と応用の両面で多く研究されている。我々は、シアノバクテリアの遺伝子改変や酵素の生化学解析を行っており、その中で、従属栄養生物とは異なる炭素代謝酵素を有していることが明らかになってきた。

数年以上にわたる酵素生化学解析から、酵素の特性が異なることから、代謝経路についても独自性を有するのではないかとこの着想を得て、本申請に至った。そこで、本研究では、シアノバクテリアをはじめとする微細藻類の炭素代謝において、新しい代謝経路を発見することを目的として研究をおこなった。

### 3. 研究の方法

本研究では、主にシアノバクテリアの中で最も使われているシネコシスティス (*Synechocystis* sp. PCC 6803) を主材料にした。シネコシスティスの酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼやマリックエンザイム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼなどの生化学解析を行なった。酵素については、大腸菌で組換えタンパク質としては発現して精製し、*in vitro* での活性測定をおこなった。さらに、酵素を複数組み合わせる *in vitro* での代謝の再構成実験を本研究の特徴として研究を進めた。

また、適宜、遺伝子改変株を作製し、*in vivo* での代謝反応についても考察した。また、シアノバクテリアに加えて、真核微細藻類であるシアニディオシゾンメローラなどの酵素の生化学解析なども行い、比較を行なった。*In vivo* での解析では、高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーなどを中心としたメタボローム解析を取り入れた。また、光学顕微鏡や電子顕微鏡による細胞観察も適宜おこなった。

### 4. 研究成果

*In vitro* の代謝再構成では、シネコシスティスのクエン酸回路が、主に pH によって方向性が変わることが示唆された (Ito et al. 2021 Plant J)。これを端緒として、シネコシスティスのクエン酸回路では、代謝経路が通常の生物とは異なることが示唆された。生化学解析を行ったところ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの酸化反応の活性が極めて弱いことから、シネコシスティスのクエン酸回路は通常通りに回らないことが示唆された。このため、リンゴ酸の代謝を行う酵素を調べたところ、リンゴ酸からピルビン酸を作る酵素であるマリックエンザイムが、リンゴ酸デヒドロゲナーゼよりもはるかに活性が高いことがわかった (Katayama et al. 2022 mBio)。これを裏付けるように、マリックエンザイム遺伝子を欠損させると、シネコシスティス細胞内にリンゴ酸を蓄積するのに対し、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を欠損させてもリンゴ酸は蓄積しな

かった。このことから、シネコシスティスのクエン酸回路は、マリックエンザイムが働く特殊なクエン酸回路であることを明らかにした (Katayama et al. 2022 mBio)。

このほかにも、シアニディオシゾンメローラの酵素特性を明らかにし、シアノバクテリアとは真逆で、極めて酵素活性が高いことを明らかにした (Nishii et al. 2023 Plant Mol Biol)。このように、同じ微細藻類の典型的な一次代謝であっても、イメージとは全く異なり、生物によって独自性を有することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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, Iwazumi Kaori, Suzuki Hiromi, Osanai Takashi, Ito Shoki	4. 巻 13
2. 論文標題 Malic Enzyme, not Malate Dehydrogenase, Mainly Oxidizes Malate That Originates from the Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0218722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.02187-22	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 Murakami Miyabi, Osanai Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Biochemical Properties of $\alpha$ -Amylase from Red Algae and Improvement of Its Thermostability through Immobilization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 36195 ~ 36205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c03315	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 Nishii M, Ito S, Katayama N, Osanai T.	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
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 Shoki, Iwazumi Kaori, Sukigara Haruna, Osanai Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Fumarase From <i>Cyanidioschyzon merolae</i> Stably Shows High Catalytic Activity for Fumarate Hydration Under High Temperature Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 2190-2190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.560894	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 Yoshida Chihiro, Murakami Miyabi, Niwa Anna, Takeya Masahiro, Osanai Takashi	4. 巻 131
2. 論文標題 Efficient extraction and preservation of thermotolerant phycocyanins from red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 161 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.09.021	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 Yoshioka Kazumasa, Suzuki Kengo, Osanai Takashi	4. 巻 51
2. 論文標題 Effect of pH on metabolite excretion and cell morphology of <i>Euglena gracilis</i> under dark, anaerobic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102084 ~ 102084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2020.102084	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 2020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.jmben.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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Osanai
2. 発表標題 Organic acid excretion from cyanobacteria during fermentation
3. 学会等名 International on-line Workshop Programme "Genetic modification tools in cyanobacteria and microalgae" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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