

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05473

研究課題名(和文) 食用ラン藻スピルリナのシュードビタミンB12の栄養欠点の克服

研究課題名(英文) Modification of the pseudovitamin-12 synthesis pathway in cyanobacteria.

研究代表者

谷岡 由梨 (TANIOKA, YURI)

東京農業大学・国際食料情報学部・准教授

研究者番号：30553250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物性食品のビタミンB12(B12)合成能を有するラン藻創出を行うことを目的とした。ラン藻は、ヒトにおいて機能しないシュードB12を合成することが欠点である。スピルリナの形質転換に菌が必要との報告があるため、その株を用い、B12合成に関与する遺伝子を導入したが、B12の確認には至らなかった。今後精製量を増やし、再度検討予定である。さらに、新たな食資源として、実験モデルを用い、B12合成経路変換に必要と考えられる遺伝子を発現させた形質転換株を作成し、B12の同定を行ったが、B12シグナルイオンを検出したものの完全な同定には至らなかった。現在までに、解析に十分な量を得て、再解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2050年には世界人口は93億人に達すると推測され、人口増加に見合った食糧増産が見込めず食料(タンパク質)危機に陥ると危惧されている。対策として、植物性食品や昆虫食などを用いた代替食品が開発されているが、動物性食品を主要な供給源とするビタミンB12(B12)は、必須栄養素であり、植物性食品の代替食品ではB12不足、欠乏状態となることが予想される。本研究は、植物性食品である食用ラン藻スピルリナなどを用い、ラン藻がヒトにおいてビタミンとして機能しないシュードビタミンB12を合成することに着目し、その合成経路をB12合成能に変換し、B12を有する食用ラン藻を作出し、将来の食資源の確保を目指した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to create cyanobacteria with the ability to synthesize vitamin B12 (B12) from plant food sources. A nutritional drawback of cyanobacteria is that they synthesize pseudo-B12, which does not function for humans. Since it was reported that bacteria were required for the transformation of Spirulina, we used the strain and transferred the gene involved in B12 synthesis. We plan to increase the amount of purified B12 in the future and will analyze it again. Furthermore, as a new food resource, an experimental model cyanobacteria transformed a B12 synthesis gene. Although B12 signal ions were detected, I was unable to fully identify it. To date, enough purity content has been obtained for analysis and will be submitted to LCMSMS again.

研究分野：食品科学

キーワード：ビタミンB12 シュードビタミンB12 食用ラン藻

## 1. 研究開始当初の背景

20世紀初めには約15億人であった世界の人口は、現在の約60億から2050年には約93億人に達すると推測されている。しかし、食糧の供給に関して、地球規模での環境悪化(気温上昇や砂漠化など)のため、現在残された耕作地で今以上の収量を得ることは困難であり、急激な人口増加に見合った食糧の増産が見込めない。こうした状況のなか、昆虫食や微細藻類が食糧問題解決の一助になる可能性を秘めているとされ、食糧資源として検討されている。

微細藻類は機能性因子を含むため家畜等の飼料などに利用され、真核生物のクロレラ(生産量2,000 t/year)やドナリエラ(1,200 t/year)、原核生物であるラン藻のスピルリナ(3,000 t/year)、ノストック(600 t/year)が世界規模で大量に生産され、食品・製薬会社に供給されている。ラン藻スピルリナには良質のタンパク質、ビタミン・ミネラルが豊富に含まれ、牛肉や大豆に比べたんぱく質含有量は2倍程度多く含まれる。

ラン藻スピルリナ(*Arthrospira platensis* NIES-39)は、アフリカの塩湖から単離された糸状体のらせん状構造をしている。スピルリナは古くから食され、健康食品や青色色素フィコシアニンの原材料として産業的に生産されている。

ビタミンB<sub>12</sub>(B<sub>12</sub>)は、一部の藻類を除き、動物性食品が主要な供給源である。原核藻類であるラン藻のB<sub>12</sub>は、B<sub>12</sub>の下方配位子がアデニンに置換したシュードB<sub>12</sub>であることが報告され(Watanabe *et al*, *J Agric Food Chem* 1999, 47, 4736-41. Miyamoto *et al*, *J Agric Food Chem* 2006, 54, 9604-07.)、ゲノム情報より生合成経路を有していることが明らかとなった。シュードB<sub>12</sub>は、ヒトにおいてB<sub>12</sub>吸収に関与するB<sub>12</sub>結合タンパク質との結合性が低いため、生理的に不活性である。これが、スピルリナなどのラン藻食品を利用する上で、栄養的欠点になっている。この栄養的欠点を克服することは、スピルリナの食糧資源としての可能性を広げるとともに、食糧問題解決の一助になると考える。

## 2. 研究の目的

食用として最も利用されているスピルリナは、ラン藻モデル生物として広く用いられている*Synechocystis* sp. PCC6803に比べ、制限修飾系を多数有しており、安定的で汎用性のある形質転換系が構築されていない。ラン藻が有するB<sub>12</sub>生合成経路は、嫌氣的と好氣的経路の2種類あり、ラン藻には嫌氣的B<sub>12</sub>生合成経路の大部分が保存されているが、40種近くのラン藻のゲノム解析が行われ、全てのラン藻に下方配位子を合成する遺伝子を除いて、嫌氣的B<sub>12</sub>生合成経路が保持されていた。

本研究では、スピルリナの形質転換が難しいことを踏まえ、実験モデルラン藻およびのシュードB<sub>12</sub>合成経路をB<sub>12</sub>への合成経路に変換し、形質転換株を作出することを目的とした。また、また、当初の研究計画にはなかったが、*Shinorizobium meliloti*のBluBと相同性を有するラン藻(*Fisherella* sp.)を見出した。このラン藻の新規食資源としての可能性を検討した。

### 3. 研究の方法

*Syn.6803* のシュード B<sub>12</sub> 合成経路をゲノムデータベースで確認したところ、*Syn.6803* は B<sub>12</sub> 下方配位子塩基 (5,6-DMB) を合成する BluB 酵素が欠損していることがわかった。シュード B<sub>12</sub> を合成する要因の一つにこの BluB 酵素の欠損があると考え、*Syn.6803* にすでに活性が報告されている *Shinorhizobium melilotii*(*S.mel*) の *bluB* 遺伝子を導入することで B<sub>12</sub> の合成を試みた。

*S.mel* BluB 合成遺伝子からプライマーを用い *S.mel* BluB を増幅し、ベクターPVZ にインフュージョンクローニングを行った。完成したプラスミドにはラン藻発現プロモーター *rrnB* の上流に *S.mel bluB* の配列が組み込まれた。*S.mel bluB*/PVZ は 11,027bp の長さで、カナマイシン (Km) に対する耐性を持っている。

完成したプラスミドを *Syn.6803* に組み込み、1L の BG-11 培地 (km10 $\mu$ g/ml) で 25 $\mu$ E、110 $\mu$ E ~ 165 $\mu$ E で空気を常に送り込みながら液体培養をした。培養後、10ml をタンパク質抽出用に別回収し、そのほかを藻体と培地に分けて回収し凍結乾燥させそれぞれのコリノイド化合物測定用サンプルとした。ウェスタンブロットティングで酵素のタンパク質としての発現を確認し、コリノイド化合物量の測定と LCMSMS での定性で合成量と B<sub>12</sub> 合成に変換できたかを確認した。

上述の実験結果から、BluB 酵素より先の酵素も B<sub>12</sub> 合成に重要である可能性が分かったため、BluB 酵素だけでなく、5,6-DMB から -リバゾール 5 リン酸を合成する酵素遺伝子を導入し、B<sub>12</sub> 合成に変換できないかを検討した。導入する酵素遺伝子は、

*Methanocaldococcus jannaschii* の CobT 酵素で、CobT 酵素はその解列の違いで、活性させる下方配位子塩基が異なるという特性があることが先行研究で分かっている。

PEX-K-4J2-MJ\_1598 合成遺伝子から M.J CobT を増幅し、ベクターPS46ST にインフュージョンクローニングを行った。完成したプラスミドには *ptrc* と *rrnB*-TT の間に M.J *cobT* の配列が組み込まれた。プラスミド M.J *cobT* は 7622bp の長さで、スペクチノマイシン (spec) に対する耐性を持っている。完成したプラスミドを BluB 酵素が組み込まれた *Syn6803* に組み込み、1L の BG-11 培地 (km10 $\mu$ g/ml、spec40 $\mu$ g/ml) で 25 $\mu$ E、110 $\mu$ E ~ 165 $\mu$ E で空気を常に送り込みながら液体培養をした。培養後の操作は最初と同様に行った。

### 4. 研究成果

ウェスタンブロットティングにより、導入した *bluB* 遺伝子がタンパク質として発現していることを確認した。さらに、合成したコリノイド化合物量は空ベクターを導入したコントロールと比較して、1/3 に減少し、その UV スペクトルは標準 B<sub>12</sub> と一致したことからコリノイド化合物であることを確認した。しかし、BluB / *S. PCC6803* が合成するコリノイド化合物の HPLC クロマトグラムピーク保持時間は、標準 B<sub>12</sub> と一致せず、シュード B<sub>12</sub> を合成することが報告されているスピルリナのコリノイド化合物精製物とピーク保持時間が一致した。また、下方配位子塩基の生成も確認することはできなかった。以上の結果から、*S. PCC6803* に *bluB* 遺伝子を導入したが、下方配位子塩基の生成や真の B<sub>12</sub> の合成には至らなかった。次に、*bluB* 遺伝子と *cobT* 遺伝子のタンパク質発現を確認した。コリノイド化合物の合成量は、BluB 酵素単体の発現より CobT 酵素を共発現させることで合成量は増加傾向を示した。これは、組み込んだ CobT 酵素がシュード B<sub>12</sub> の下方配位子塩基であるアデニンも活性化するためだと推察した。LCMSMS により、共発現株における B<sub>12</sub> の

シグナルイオンは確認できたが完全な同定には至らなかった。

2022 年にスピルリナにおける菌との共存による新たな形質転換法が発表された。本研究でも本法を用いて、形質転換等を行い、LCMSMS により、B12 合成能を確認する予定である。

BluB と相同性を有する配列がある *Fischerella* sp. の主要なコリノイドを同定したところ、シュード B12 であったことから、*Fischerella* sp. の有する BluB は B12 合成に関与していない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小磯 香織、今村 優香、前田 海成、渡辺 智、横井 彩子、山内 淳、古庄 律、谷岡 由梨
2. 発表標題 藍藻 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 GT-In のシュードB12 合成経路の変換
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会、広島・オンライン開催
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小磯香織、小関喬平、美藤友博、藪田行哲、山内淳、古庄律、渡邊文雄、谷岡由梨
2. 発表標題 ビタミンB12下方配位子塩基合成酵素ホモログを有するラン藻 <i>Fischerella</i> sp. NIES-3754のビタミンB12の特徴
3. 学会等名 ビタミン学会第75回大会 2023年6月18日 宮城・仙台市開催
4. 発表年 2023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
---------	---------