

研究終了報告書

「藍藻バイオフィームにおける硫酸多糖の機能解析」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：前田 海成

1. 研究のねらい

酸素発生型光合成微生物である藍藻(シアノバクテリア)の多くはバイオフィームを形成し、河川、湖沼、温泉、陸上といった様々な環境に生息する。藍藻バイオフィームは藍藻の増殖、ストレス耐性、栄養の保持などの機能に関わると考えられている。また、糸状性藍藻をコアとする砂漠のバイオクラスト(BSCs)のように環境中の他の生物群にとっても栄養源や住処として重要な役割を果たす。そのため、藍藻バイオフィームの構造や機能の解明は生態の理解において極めて重要である。藍藻バイオフィームの主要構成要素の一つはEPSである。そのため、藍藻EPSの機能や合成・制御機構の解明は藍藻バイオフィーム研究の一つの重要な切り口である。藍藻には非常に多様なEPSが存在するが、藍藻に特徴的なEPS群として硫酸多糖がある。硫酸多糖は硫酸基で修飾された多糖であり、バクテリアの中ではほぼ藍藻のみに存在するため、藍藻特異的な重要な機能に関わることが推測される。しかし、培養や形質転換が容易なモデル藍藻種の中に硫酸多糖を明確に合成する種がいなかったため、その機能や合成・制御機構に関する研究はあまり進んでいなかった。そのような状況下で、研究者はモデル藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803(以下 S.6803)のサブストレインの1つ PCC-P 株が新規硫酸多糖シネカンを合成しブルーム様の粘性細胞塊を形成する現象を発見し、その合成と制御に関わる遺伝子群を網羅的に同定した。本研究は、この知見を足がかりとした藍藻硫酸多糖機能の解明を目的とした。そのために、モデル藍藻種の硫酸多糖合成制御系と硫酸多糖機能の解明に関する研究と、環境中に多く存在する硫酸多糖を蓄積する非モデル藍藻を研究する上で必要となる形質転換技術の開発研究を実施した。

藍藻などの光合成微生物の大量培養や、それを用いた物質生産はSDGsや低炭素社会の実現手段として注目されている。また、藍藻硫酸多糖は有用性が期待されている。これらの背景から、本研究期間中に発表したシネカン合成制御機構に関する論文には産学から反響があった。複数の研究者や企業と共同研究を見据えた議論をおこなう中で、シネカン有用性研究の実施には大量のシネカンが必要であることが判明したため、最終年度はシネカン大量生産を目的として藍藻培養系とシネカン回収・精製系の開発研究を実施した。

2. 研究成果

(1) 概要

開始時点の研究計画に基づき、最初の1年半は S.6803 が合成する新規硫酸多糖シネカンに関する研究、S.6803 以外のモデル藍藻における硫酸多糖の解析に関する研究、非モデル藍藻種に使用可能な新規形質転換系の構築に関する研究の3つを実施した。1つ目の内容に関して、まずシネカン合成能が S.6803 のラボストレインごとに異なり、それがシネカン合成遺伝子群の転写レベルの違いに起因することを解明した。この結果と ACT-X 以前の研究内容を合わせて論文化し eLife 誌に発表した。また藍藻研究のモデル生物である S.6803 において世界中で“野生株”として扱われている代表的なラボストレイン間での形質の違いの原因を探索した。2つ目の内容に関して、シネカン合成遺伝子群の情報を元に硫酸多糖合成系をもつと推測されるモデル藍藻2種を選び硫酸多糖の存在を解析したが検出できなかった。S.6803 同様に、研究室で維持されている間に多糖を合成しなくなった可能性がある。本内容に関連して、藍藻バイオフィルム中及び細胞周辺の多糖の検出を目的とした共同研究を同領域の ACT-X 研究者と実施した。3つ目の内容に関して、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas のタンパク質-gRNA 複合体(RNP)を直接藍藻細胞に導入することで、強力な制限修飾系を回避して形質転換することを試みた。しかし RNP は細菌細胞のエレクトロポレーション条件で生じる熱により容易に変性した。また藍藻は低温処理に弱く、エレクトロポレーションによる形質転換効率も自然形質転換と比較して低かった。そこで別の形質転換方法を考案し、特定のモデル藍藻種では形質転換可能であることを明らかにした。現在は特定の非モデル藍藻種にて形質転換可能か検討中である。以上を総括すると、当初期待していた成果は十分には得られなかったが、計画を修正して遂行中である。

一方で、2021 年にシネカン論文を発表したことにより産学から多くの問い合わせを受けた。これをきっかけとして、低炭素社会への貢献も含めてより広い視野で本研究を捉えることができた。また、産学連携によるシネカンや藍藻 EPS 研究計画も複数立ち上がった。しかし、基礎研究ベースの実験規模では応用研究に必要なシネカンサンプル量に対して供給可能量が著しく不足していた。そこで、より効率的なシネカン生産系の開発計画を実施し一定の生産性に至った。

(2) 詳細

研究テーマ①, S.6803 由来硫酸多糖シネカンの機能解明

<A. S.6803 のシネカン合成制御機構に関する解析>

前田が同定した S.6803 由来新規硫酸多糖シネカンは、合成を担う遺伝子群が網羅的に同定された初めての例である。一方で合成を制御する機構に関しては未解明の部分が多かった。そこで前田はまず、S.6803 のサブストレイン PCC-P 株がシネカンを合成し GT 株がシネカンを合成しないことに着目して両株におけるシネカン合成遺伝子の転写レベルを調べ、GT 株ではシネカン合成遺伝子がほとんど転写されていないことを明らかにした。S.6803 は長年藍藻研究の代表的なモデル生物として扱われてきたにも関わらずシネカン合成系が未解明であったのは、殆どの研究室が光合成研究に有利な形質を持つ GT 株を使用してきたため



と推測される。この結果と、ACT-X 開始以前のシネカン研究の結果をまとめて 2021 年度に eLife 誌に論文として発表した。さらに、形質の違いのより詳細な原因を調べるために複数のサブストレインを用いて NGS 解析等を実施した。本研究の成果は現在論文化中である。なお、本研究は上長である東京農業大学(以下、東農大)の渡辺智准教授と共同で実施した。

<B. S.6803 バイオフィルムにおけるシネカンの機能に関する解析>

S.6803 のシネカン過剰蓄積株と非蓄積株を用いたアッセイによりシネカンの特定の生理機能への寄与を示唆する結果を得た。現在は、発表したシネカン論文を介して知り合ったケンブリッジ大学の Nuno Miguel Oliveira 博士と共同研究を実施中である。

<C. シネカン糖鎖構造の解析>

シネカンの合成機構と生理的役割の深い理解、およびシネカンの応用研究において、その糖鎖構造を理解することは重要である。本計画では東農大の浦井誠准教授と共同で NMR 等による構造解析を実施したが、シネカンのゲル化性質と低い溶解性などにより、未だ構造を解明できていない。

また間接的な構造決定方法としてシネカン合成に関与する個々の糖転移酵素の基質特異性の解明も試みた。シネカン合成系の5つの非膜貫通性糖転移酵素は全て可溶性発現が難しく、トリガーファクターとの融合タンパク質としてのみ可溶化が可能であった。これらの精製タンパク質を用いた酵素法による間接的なアッセイでは基質特異性を同定できなかったため、今後は SPR 装置を用いた直接的な基質結合親和性の測定を検討する。

<研究テーマ①に関連した成果:基礎研究分野>

- ・ シネカン論文を含む本研究内容に関して、藍藻の運動性・走光性研究の第一人者である独フライブルク大学の Wilde 教授の研究室と英クイーン・メアリー大学の Mullineaux 教授の研究室の合同セミナーと、日本光合成若手の会にて招待講演をおこなった。関連して日独二国間藍藻会議においても口頭発表をおこなった。
- ・ シネカン論文が注目されたことにより、日本ゲノム微生物学会ニュースレターにおいて藍藻の細胞外多糖合成に関する総説を寄稿する機会をいただいた。
- ・ 本研究内容を含むこれまでの仕事が評価され、最終年度である 2022 年に東京工業大学(以下、東工大)に助教として着任することができた。

<研究テーマ①に関連した成果:応用研究分野>

2021 年にシネカン論文を発表したことで、前田と渡辺准教授の藍藻を用いた研究が複数の企業から注目されることになった。シネカン生産者である S.6803 は培養が容易であり、世界中の研究者が物質生産研究を実施しており、増殖も比較的早い。またシネカン合成系の特定の遺伝子改変による生産性向上方法に関して特許出願済みである。2022 年度までに複数の企業と情報交換を含めた議論を開始している。

研究テーマ②, 培養法およびシネカン回収・精製法の改良によるシネカン生産性の向上

2021 年までのシネカン生産性は 50 mL の小スケール培養系を用いて 12 mg / 1L 程度であった。しかも、遠心分離、フィルター濾過、超遠心分離、透析という多段階の回収・精製過程が必要であり、処理可能量が少なく所要時間が長かった。一方で上記の企業との共同研究では 1~100 g というそのままの方法では達成不可能な量を求められた。そこで、培養法



およびシネカン回収・精製法の改良を実施した。詳細は伏せるが 2022 年度時点で約 50 mg / 1L の生産性に到達している。

研究テーマ③, S.6803 以外のモデル藍藻における硫酸多糖合成系の解明

シネカン合成系の遺伝子情報を元に、硫酸多糖の合成系と推定される遺伝子群を持つモデル藍藻として *Nostoc* sp. HK-01 と *Synechococcus* sp. PCC 7002 を見出したが、硫酸多糖の蓄積は観察されなかった。S.6803 同様にモデル藍藻は硫酸多糖合成能を喪失している、もしくは研究室環境では合成しないといった可能性が考えられる。

顕微観察において硫酸多糖を検出する主流の方法であるアルシアンブルー染色法は、非特異的吸着の可能性がありだけでなく、アルシアンブルー分子を核として硫酸多糖が凝集することにより藍藻バイオフィルムの性状も著しく変化してしまう。そこで藍藻バイオフィルムの性状を維持しつつ多糖を特異的に検出する方法に関する ACT-X 内共同研究を実施し一定の成果を得た。

研究テーマ④, 非モデル藍藻種に適用可能な新規形質転換系の構築

藍藻硫酸多糖の機能解明には環境中でバイオフィルムを形成する非モデル藍藻の研究が必須だが、現時点では形質転換が困難であり、その主要因は制限修飾系と考えられている。本研究ではまずゲノム編集技術である CRISPR-Cas のタンパク質-gRNA 複合体(RNP)を直接藍藻細胞に導入することで制限修飾系を回避することを試みた。しかし RNP は細菌細胞のエレクトロポレーション条件で生じる熱により容易に変性した。また藍藻は低温処理に弱く、エレクトロポレーションによる形質転換効率も自然形質転換と比較して低かった。そこで別の形質転換方法を考案し、特定のモデル藍藻種では形質転換可能であることを明らかにした。現在は特定の非モデル藍藻種にて形質転換可能か検討中である。

3. 今後の展開

本 ACT-X 研究を進める中で産学の様々な方々と知り合い議論する機会を得たことにより、この先目指したい研究の全体像が構築された(図2)。これは、EPS が関わる藍藻生態の理解のために背景にある分子メカニズムを解明すること、分子メカニズム研究で得られた知見を藍藻 EPS 応用研究に活用しその過程で得られた技術を基礎研究にも活用すること、産業需要に基づいて藍藻バイオフィルムから有用 EPS を探索しそれを生物資源として活用すること、の3つを循環させるものである。これは産学官や研究分野を横断した壮大な理想像ではあるが、取り組む価値があると考えられる。この研究像に基づいて本研究の今後の展開について以下に述べる。

本研究で S.6803 のシネカン合成制御機構の解明には進展があったが、特に合成の制御

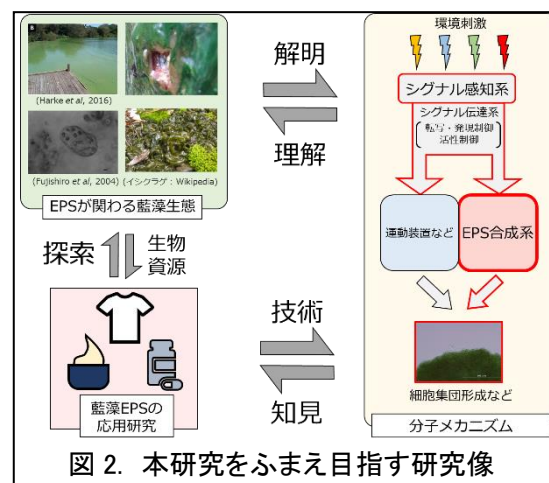


図2. 本研究をふまえ目指す研究像

機構やシネカン糖鎖構造に関しては未解明であるため、今後5年内の研究で解明を目指す。一方で、S.6803は研究室環境に適応する過程で形質等が著しく変化していることが本研究で再確認され、また原生地は既に喪失したため、分子メカニズム研究のモデルとしては最適だが生態理解のモデルとしては不適といえる。本研究で硫酸多糖合成遺伝子を持つことが推測された他のモデル藍藻2種を解析しても硫酸多糖を観察できなかったことから、今後は環境中や系統保存施設由来の非モデル藍藻種に研究対象を広げる必要性がある。今後数年をかけて硫酸多糖を生産する藍藻種のスクリーニングを実施する予定である。また、その検出方法の開発も継続する。非モデル藍藻種で遺伝学的研究を実施するために必要な形質転換法の確立は本研究期間内には達成できなかったが、今後の藍藻研究の発展に必ず必要になる技術であるため、現在研究中である手法を含め研究を継続する。

藍藻由来硫酸多糖は有用性が期待されている生体高分子であり、シネカンは合成・制御遺伝子群が網羅的に解明されている唯一の系である。そこで、今後のシネカンの応用研究展開として、産学官で連携して藍藻大量培養系およびシネカン大量生産系の構築とシネカン有用性の解明を目指したい。これは藍藻 EPS 産業のモデルケースとしても位置付けられ、藍藻による EPS 生産が CO₂ 削減に足る量と産業化に足る高付加価値性を兼ね備えた産業になりえるかを実証する意味合いも持つ。一方で本項目に関する研究内容は単にシネカンの増産や性質解明をおこなうだけでなく、シネカン合成メカニズムやシネカン生理機能のさらなる理解に繋がる形で実施したい。

4. 自己評価

<研究目的の達成状況>

本研究開始時に予定していた研究目的の達成状況は不十分である。これは挑戦的な内容であったこと、就職活動等の研究外活動にかかる時間を見誤ったこと、研究計画を分散させすぎたことが要因として考えられる。しかしながら、シネカン論文を発表した他、臨機応変に計画を変えたことで、現在論文化が進行中の内容も含めていくつかの成果が得られた。また、研究期間中に生じた産学連携の機会をうまく活用することで、藍藻バイオフィルムの基礎研究成果を活かした応用研究を展開するという目的は達成することができた。

<研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)>

基本的には前田が研究を実施しつつ、上長にあたる渡部智准教授やその学生と一部協力する体制であった。東工大に助教として着任後も東農大との共同研究関係は継続している。期間全体として体制は適切であったと考えているが、最終年度は技術員を雇用するという選択肢もあったかもしれない。また、産学連携の誘致においては東農大と東工大の URA と十分に協力できたと考えている。第三年次までの研究費は全て有効活用された。

<研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果>

本項目は当初の想定以上の成果が得られた。特に、産学での協業、あるいは協業を見据えた関係を複数立ち上げることができた。シネカンの合成制御遺伝子群が網羅的に解明されていること、そして生産ホストである S.6803 の扱いやすさが本研究成果の強みである。また本研究期間中の成果と議論から、藍藻 EPS 産業が低炭素社会実現に貢献するという可能性も認識した。これは今後の研究でより詳細に検討したい。

<その他:ACT-Xの活用>

これまで前田は主に藍藻研究者コミュニティ、特に光合成に関係する狭いコミュニティに所属していた。本 ACT-X において、非常に幅広い年齢、身分、分野の研究者と知り合えたことは非常に良い刺激となった。その影響により、最終年度時点で同領域内の若手研究者と専門分野を跨いだ共同研究を2件開始することができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. **Kaisei Maeda**, Yukiko Okuda, Gen Enomoto, Satoru Watanabe, Masahiko Ikeuchi. Biosynthesis of a sulfated exopolysaccharide, synechan, and bloom formation in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *eLife*, 2021, 10:e66538.

本研究では淡水性モデル藍藻 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 のサブストレイン PCC-P 株特異的なブルーム様の藍藻バイオフィルム形成現象を発見し、これを手がかりとして新規硫酸多糖シネカンとその合成制御遺伝子群を網羅的に解明した。また合成制御機構の一部も解明し、その改変によるシネカン生産性の向上も達成した。一般的に用いられるサブストレイン GT 株は、シネカン合成系遺伝子群の転写レベルが著しく低いことが原因でシネカンを生産しないことも明らかとなった。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<学会発表>

- ・ **Kaisei Maeda**, Yukiko Okuda, Gen Enomoto, Satoru Watanabe, Masahiko Ikeuchi. Biosynthesis of a sulfated exopolysaccharide, synechan, and bloom formation in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803., The binational workshop “Green Aquatic Biology: Ecology meets synthetic biology”, Online (Zoom), 2022/3/3-5.
- ・ 前田海成、最近の藍藻細胞外多糖研究と そこから見えるモデル藍藻の注意点、日本光合成学会若手の会、東京、2022/5/19

<紹介論文(Insight)>

- ・ Conrad W Mullineaux and Annegret Wilde, Bacterial Blooms: The social life of cyanobacteria. *eLife Insight*, 2021, 10: e70327.

<著作物>

- ・ 前田 海成、“微生物学分野の研究動向-シアノバクテリアの細胞外多糖合成系について-”、日本ゲノム微生物学会ニュースレター 第24号、p2-5、2021.

<プレスリリース>

- ・ 「光合成微生物シアノバクテリアにおける硫酸多糖の合成・調節系を解明(東京農業大学



HP)」、「東京農大と東大、光合成微生物シアノバクテリアにおける硫酸多糖の合成・調節系を解明(日本経済新聞電子版)」、「農大ら、光合成生物の硫酸多糖の合成・調節を解明(株式会社オプトロニクス社 オプトロニクスオンライン)」、2021/6/16

