

論文の内容の要旨

論文題目

ラン藻由来アルカン合成関連酵素の機能発現に 重要なアミノ酸残基の同定

氏名

工藤 恒

【背景及び目的】

藻類であるラン藻はアルカンを合成することが知られている。この反応は、アシル-(アシル輸送タンパク質)還元酵素 (AAR) とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (ADO) という 2 つの酵素によって行われる。AAR はアシル-ACP をアルデヒドへと還元し、これを ADO が炭素数 15、17 の軽油に相当するアルカンまたはアルケン (炭化水素) に変換する。AAR、ADO を大腸菌に導入すると、炭化水素を合成出来るようになることから、この 2 つの酵素は炭化水素合成にとって本質的な酵素である。

しかし、AAR、ADO の酵素活性は非常に低いため、バイオ燃料生産への応用には高活性化が必要とされる。さらに AAR の立体構造は未知である。一方で ADO については立体構造が決定されているが、機能発現の詳細は未解明である。このため、AAR、ADO の機能発現に重要なアミノ酸残基 (特に非保存部位) についてはいまだ未解明な部分が多い。

そこで本研究では、以下の 4 つを目的として、実験を行った (I-IV 章)。

<I 章> 様々なラン藻由来の AAR を比較し、高活性型 AAR を探索する。

<II 章> この章での研究内容は全て削除し、後日公開予定

<III 章> 様々なラン藻由来の ADO を比較し、高活性型 ADO を探索する。

<IV 章> ADO の活性を決める上で重要なアミノ酸残基を同定する。

【結果及び考察】

<I 章> 様々なラン藻由来 AAR の比較

大腸菌内で AAR と ADO を共発現させ、AAR によって合成されたアルデヒドを ADO によって炭化水素に変換することにより、AAR、ADO の活性を評価できる系を確立した。この活性評価法を用いて、12 種類のラン藻に由来する AAR を比較した結果、最も活性が高かったのが *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来の AAR (7942AAR) であった。興味深いことに、海洋性ラン藻由来の AAR では palmitoyl-ACP (炭素数 16) を主な基質としている一方、淡水性ラン藻由来の AAR では oleoyl-ACP (炭素数 18) を主な基質としていた。このため、AAR の基質特異性がラン藻の生育環境に依存していることが新たに示唆された。

<II 章> この章での研究内容は全て削除し、後日公開予定

<III 章> 様々なラン藻由来 ADO の比較

10 種類のラン藻に由来する ADO について比較した結果、最も活性が高かったのが *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 ADO (7942ADO) であった。一方で AAR とは異なり、ADO 間での基質特異性に大きな違いは見られなかった。

<IV 章> ADO の活性に重要なアミノ酸残基の同定 (7421ADO の変異解析)

7942ADO と *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 由来 ADO (7421ADO) の間では、炭化水素合成量、可溶性発現量、活性が大きく異なることが明らかとなった。そこで、7421ADO (低活性型、可溶性発現量高い) のアミノ酸配列を、7942ADO (高活性型、可溶性発現量低い) のアミノ酸配列に近づけるようなアミノ酸変異を導入した。7421ADO 変異体 40 個のうち、22 個で活性が増大し

たことから、ADO 活性に重要なアミノ酸残基の同定に成功した。また相関解析より、ADO では活性と可溶性度のトレードオフが見られた。

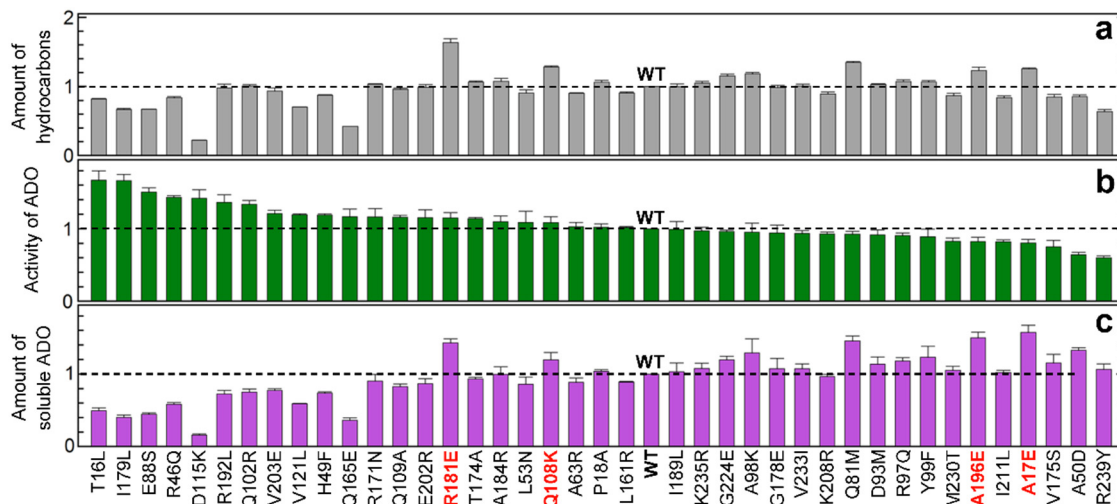


図. 7421ADO 一アミノ酸変異解析の結果

炭化水素合成量 (a)、活性 (b)、可溶性発現量 (c) の結果をそれぞれ示す。赤色で示した変異体は炭化水素合成量が大きく増加したものを示す。

【結論】

本研究より、高活性型 AAR (7942AAR)、ADO (7942ADO) を見出した。AAR、ADO の一アミノ酸変異解析によって、活性と可溶性発現量に重要なアミノ酸残基（非保存部位）の同定に成功した。さらに組み合わせ変異の結果から、活性と可溶性発現量の片方（あるいは両方）を増大させ、炭化水素合成量の向上に成功した。今後、本研究で得られた高機能化 AAR、ADO をラン藻に導入することで、カーボンニュートラルなアルカンの大量生産を目指していく。