

博士論文（要約）

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

工藤 恒

# 目次

略語表 .....	4
序章 .....	6
<b>I. 様々なラン藻由来 AAR の比較 .....</b>	<b>11</b>
I-1. 序論 .....	11
I-2. 方法 .....	12
I-3. 結果 .....	16
I-4. 議論 .....	24
図と表 .....	28
 <b>II. この章での研究内容全て削除し、後日公開予定 .....</b>	 <b>.....</b>
II-1. 序論 .....	.....
II-2. 方法 .....	.....
II-3. 結果 .....	.....
II-4. 議論 .....	.....
図と表 .....	.....
 <b>III. 様々なラン藻由来 ADO の比較 .....</b>	 <b>58</b>
III-1. 序論 .....	58
III-2. 方法 .....	59
III-3. 結果 .....	59
III-4. 議論 .....	63
図と表 .....	66

<b>IV. 7421ADO における変異解析</b> .....	78
IV-1. 序論 .....	78
IV-2. 方法 .....	79
IV-3. 結果（IV－3－4 に該当する部分は削除し、後日公開予定） .....	79
IV-4. 議論（IV－4－3 に該当する部分は削除し、後日公開予定） .....	82
図と表 .....	86
 結論と今後の展望（上述した削除事項に該当する部分は削除し、後日公開予定） .	91
参考文献.....	94
謝辞.....	99

# 略語表

AAR	Acyl- (acyl-carrier protein) reductase
ACP	Acyl carrier protein
ADO	Aldehyde deformylating oxygenase
BLAST	Basic local alignment search tool
CoA	Coenzyme A
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
HRP	Horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LPAAT	Lysophosphatidic acid acyltransferase
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidene difluoride
THP	Tris(hydroxypropyl)phosphine
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
Fd	Ferredoxin
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> reductase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
WT	Wild-type
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
PCC	Pasteur culture collection of cyanobacteria
ITC	Isothermal titration calorimetry



## AAR

7942AAR	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 由来 AAR
TeAAR	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1 由来 AAR
9313AAR	<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9313 由来 AAR
MaAAR	<i>Microcystis aeruginosa</i> 由来 AAR
6803AAR	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 由来 AAR
7421AAR	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421 由来 AAR
73102AAR	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 由来 AAR
7336AAR	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7336 由来 AAR
51142AAR	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142 由来 AAR
1986AAR	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> str. CCMP1986 由来 AAR
9917AAR	<i>Synechococcus</i> sp. RS9917 由来 AAR
0205AAR	<i>Synechococcus</i> sp. CB0205 由来 AAR

## ADO

7942ADO	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 由来 ADO
TeADO	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1 由来 ADO
9313ADO	<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9313 由来 ADO
9443ADO	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9443 由来 ADO
6803ADO	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 由来 ADO
7421ADO	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421 由来 ADO
73102ADO	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 由来 ADO
7336ADO	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7336 由来 ADO
7425ADO	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 由来 ADO
PaADO	<i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 126/8 由来 ADO

# 序章

## 1. 藻類によるバイオ燃料生産

現在の世界のエネルギー消費の主流は石油、石炭、天然ガスなどの化石燃料である。しかし、化石燃料は数十年後には枯渇する恐れがあり、さらに温室効果ガスであるCO<sub>2</sub>を排出するため、深刻な環境問題を引き起こす。したがって、化石燃料に代わる新しい代替エネルギーを普及させることが世界的課題となっている。

そこで現在、注目されているのが生物に由来する物質を燃料として用いるバイオ燃料である。化石燃料も元々は過去に生存した生物に由来する燃料であるため、バイオ燃料はそのまま燃料へと利用することが可能である。中でも、植物を利用したバイオ燃料生産はカーボンニュートラルという利点があり、大気中のCO<sub>2</sub>濃度増加を防ぎ、地球温暖化防止につながることを期待される（図1）。

近年、植物の中でも、特に藻類によるバイオ燃料生産が非常に注目されている[1]。高等植物であるトウモロコシやパームなどを利用したバイオ燃料では、食糧生産との競合が問題視されている。一方で、藻類であればその心配はなく、さらにはトウモロコシの700倍のオイル生産効率があるとされている[2]。このため、藻類によるバイオ燃料は、従来のバイオ燃料に比べ生産能力が高い次世代エネルギーである。

上記の理由から、現在、藻類バイオ燃料の研究は盛んに行われている。中でも、緑藻類である *Botryococcus braunii* は、世界最高のオイル生産能力を有する[3]。しかし、オイル生産が高いとされる藻類に共通する点として、増殖速度が遅いという問題がある。このため、遺伝子導入による改善が必要とされているが、形質転換の方法が確立されておらず、バイオ燃料生産への適用は容易ではない。

そこで注目されているのが、シアノバクテリア（ラン藻）を用いたバイオ燃料の生産である[4-7]。ラン藻とは、酸素発生型光合成を行う原核生物であり、葉緑体の起源となった生物である。藻類の中では増殖速度が速く、様々な環境中でも生存することができる[4]。さらに植物のモデル生物として研究者の関心を集めており、多くの種でゲノム情報が決定され[8]、形質転換や培養方法についても確立されている。そのため、ラン藻を利用したバイオ燃料生産の研究が盛んに行われている。

## 2. ラン藻由来アルカン合成関連酵素 -AAR と ADO-

ラン藻は長鎖炭化水素を合成することが知られている[9, 10]。2010 年に Schirmer らによって、その反応はアシル ACP 還元酵素 (Acyl-(acyl carrier protein (ACP)) reductase, AAR) とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (Aldehyde deformylating oxygenase, ADO) の 2 つの酵素によって触媒されることが明らかになった[10]。AAR は脂肪酸合成の中間体である acyl-ACP をアルデヒドへと還元する。また ADO はアルデヒドを主に炭素数 15, 17 のアルカンまたはアルケンに変換する (図 2)。これらは軽油相当の炭化水素であり、ディーゼルノックの起こりにくさを表すセタン価が比較的高い。それゆえ、これらの酵素は化石燃料に代わる新しい燃料を作り出す可能性によって注目を集めている[11]。また、炭化水素を合成できない大腸菌に AAR と ADO を導入すると炭化水素合成を出来るようになることから、AAR と ADO は炭化水素合成において本質的な酵素である。

一方で、これらの酵素は活性が低く、1 回の代謝回転に数分～数 10 分かかると言われている[10, 12]。また、ラン藻の中で合成される炭化水素の量も、乾燥重量の 0.12 % と極めて少量である[13, 14]。このため、大規模的な実用化には AAR と ADO の高活性化が必要である。

AAR と ADO の高活性化を目指すうえで、酵素の機能や構造の解明は非常に重要である。ADO については、すでに X 線結晶構造解析により、構造情報から多くの知見が得られている[15, 16]。そして、構造情報をもとにした変異解析から、ADO の機能発現に重要なアミノ酸残基が同定されつつある[10, 17-21]。しかし、これらの解析の多くは保存部位をターゲットにしているため、非保存部位のアミノ酸残基が ADO の機能発現にもたらす影響についてはほとんど明らかになっていない。一方で、AAR については立体構造が未知であり、機能発現に重要なアミノ酸残基などについて未解明な部分が多い。また、どのラン藻由来の AAR が高い活性を持っているのかも明らかではない。

### 3. 本研究の目的

そこで本研究では、以下の 3 点を目的として研究を行った。

- (1) 様々なラン藻に由来する AAR を比較し、高活性型 AAR を探索する。(第 I 章)
- (3) 様々なラン藻に由来する ADO を比較し、高活性型 ADO を探索する。(第 III 章)
- (4) 第 III 章での ADO の比較結果をもとにして、ADO の活性を決める上で重要なアミノ酸残基を、変異解析によって同定する。(第 IV 章)

本論文では、これら3つの研究ごとに3つの章に分け、それぞれに序論、方法、結果、議論を記載した。最後に、全ての研究を総括した結論と今後の展望を記述した。

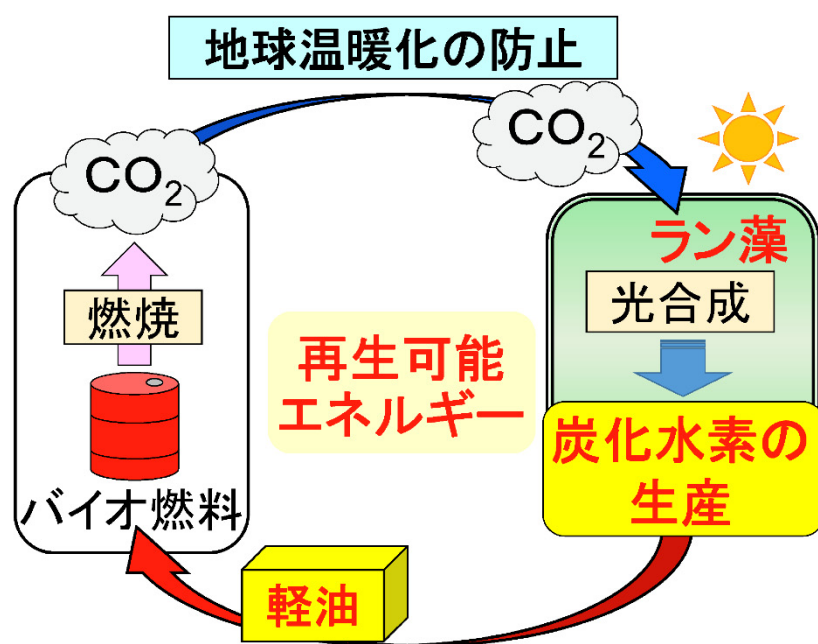


図 1. 藻類を利用したバイオエネルギー生産

ラン藻は、光合成によって大気中の CO<sub>2</sub> を軽油に相当する炭化水素（バイオ燃料）へと変換する。バイオ燃料の燃焼によって、大気中に CO<sub>2</sub> が放出されるが、ラン藻の光合成によって吸収される。このため、大気中の CO<sub>2</sub> 濃度の増加が抑制され地球温暖化防止につながる再生可能エネルギーとして期待される。また、この CO<sub>2</sub> の循環のことをカーボンニュートラルという。

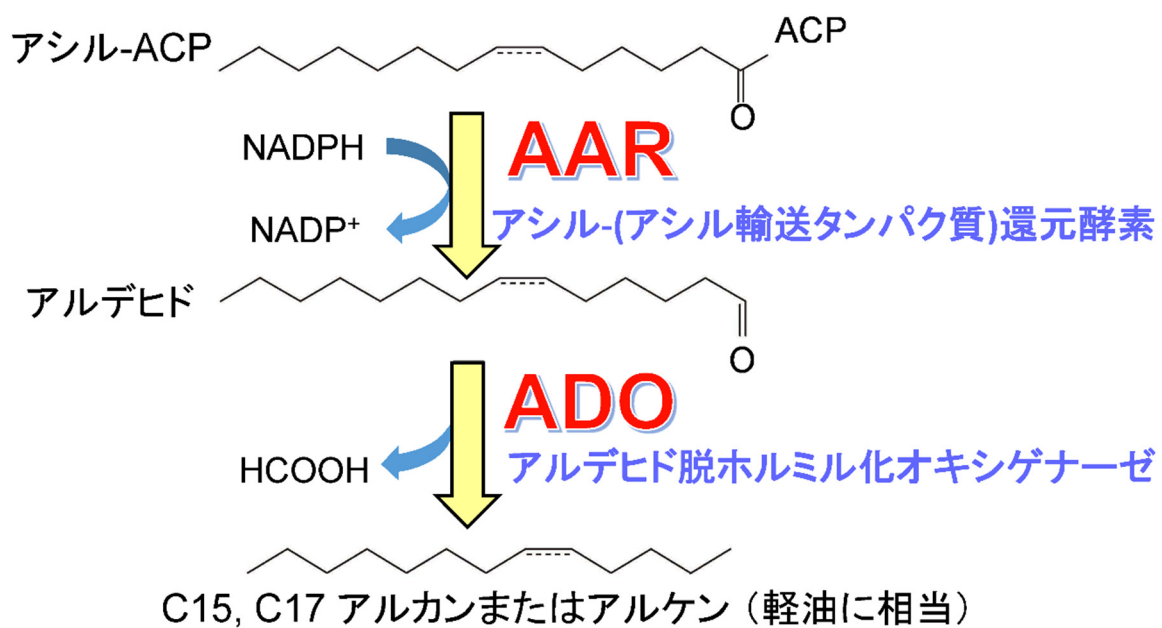


図 2. ラン藻由来アルカン合成関連酵素 AAR, ADO の反応様式

ラン藻は、軽油に相当する炭化水素を合成することが知られている。AAR は脂肪酸合成の中間体である acyl-ACP（もしくは acyl-CoA）をアルデヒドへと還元し、ADO はアルデヒドをアルカンまたはアルケンに変換することが知られている[10]。

# I. 様々なラン藻由来 AAR の比較

## I-1. 序論

ラン藻によるバイオエネルギー生産を高効率化させるためには、酵素 AAR と ADO を高活性化させることが必要である。高活性の酵素を得るための方法としては、様々な生物種に由来する酵素の中から最も高活性のものを探索する方法や、アミノ酸置換変異を導入して高活性化させる方法などがある。後者の変異導入を行う際には、テンプレートとして用いる野生型酵素の活性や可溶性などの特性が最初から高い方が望ましい。そこで本研究では、まず、様々なラン藻に由来する AAR と ADO の酵素活性を比較し、高活性型の AAR と ADO を探索することを目的として研究を行った。本章には高活性型 AAR の探索についての研究を記述し、高活性型 ADO の探索については第 III 章に記述する。

AAR、ADO の酵素活性を評価するためには、タンパク質を高純度精製して *in vitro* で活性測定を行い、 $K_m$ 、 $k_{cat}$  を正確に求めることが理想的である。しかし AAR は凝集しやすく、高濃度で精製することが難しい[12, 22]。また、ADO は、基質である長鎖アルデヒドが水溶液中でミセルを形成してしまい、このミセルからの解離が律速となって正しい活性測定が行えないことが報告されている[23]。そこで、本研究では大腸菌内で酵素 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 と ADO の活性を炭化水素合成量で測定することとした。先行研究により、AAR は大腸菌内の acyl-ACP/CoA を用いてアルデヒドを合成可能であることが報告されている[10]。

所属研究室の先行研究により、大腸菌用の共発現ベクター pETDuet-1 ベクターのマルチクローニングサイト 1 に *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 AAR (7942AAR) の遺伝子を挿入し、マルチクローニングサイト 2 に *Nostoc punctiforme* PCC 73102 由来 ADO (73102ADO) の遺伝子を挿入したプラスミド (pRD と呼ぶ：図 3a) が構築済みであった[17]。これを大腸菌に導入することで、大腸菌が炭化水素を合成し培地中に分泌することが確認されている[17]。炭化水素合成量は、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) で定量することができる。そこで本研究では、この pRD を鋳型として、様々なラン藻に由来する AAR の発現系を構築後、大腸菌内における AAR の活性や可溶性度などを比較評価した[24]。また得られた結果から、AAR の機能発現に重

要なアミノ酸残基を同定するために、変異解析用の変異体候補などを決定した（I-3-6 及び II 章を参照）。

## I-2. 方法

### I-2-1. 大腸菌用の培地

#### (1) 2×YT 液体培地

Bacto-tryptone	8 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	5 g
<hr/>	
total	500 mL

上記を混合後、オートクレーブ（121℃、30 分）し、4℃ で保存した。必要に応じて、抗生物質を次の終濃度で加えた。

アンピシリン（Amp）	50 µg/ml
クロラムフェニコール（Cm）	34 µg/ml

#### (2) 2×YT 寒天培地

Bacto-tryptone	8 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	2.5 g
Bacto-agar	7.5 g
<hr/>	
total	500 mL

1 L ねじ口瓶に、上記を混合してオートクレーブ（121℃、30 分）後、25 枚のプレートを作製した。プレートはパラフィルムを巻いて 4℃ で保存した。必要に応じて、抗生物質を次の終濃度で加えた。

カルベニシリン（Carb）	50 µg/ml
クロラムフェニコール（Cm）	34 µg/ml

#### (3) M9 培地



以下のものを用意した。

① 10×M9 SALTS      オートクレーブ（121℃、30 分）後、室温保存

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	68 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
NaCl	5 g
total	1 L

② MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O      10.16 g / 50 ml

溶解後、0.2 μm フィルターで滅菌し、室温保存。

③ CaCl<sub>2</sub>      0.56 g / 50 ml

溶解後、0.2 μm フィルターで滅菌し、室温保存。

④ 炭素源・窒素源

D(+)-グルコース	3 g
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
total	10 mL

溶解後、0.2 μm フィルターで滅菌した。その後、③ CaCl<sub>2</sub> を 1 ml 混合した。

これらを次のように混合し、M9 培地を作製した。

1×M9 SALTS（①を MilliQ で 10 倍希釈後オートクレーブ）	1 L
④炭素源・窒素源（+0.1 mM CaCl <sub>2</sub> ）	11 ml
②MgCl <sub>2</sub>	1 ml
50 mg/ml Amp	1 ml
34 mg/ml Cm	1 ml

## **I-2-2. AAR, ADO 共発現用プラスミド**

### **(1) プラスミドの概要**

先行研究によって、大腸菌用の共発現ベクター pETDuet-1 ベクターのマルチクローニングサイト 1 と 2 に 7942AAR と 73102ADO の遺伝子を挿入したプラスミド (pRD) が構築済みであった[17] (図 3a)。これらの AAR と ADO は、先行研究で使用されていたものである[10]。また、それらの遺伝子の塩基配列は、大腸菌での発現用に最適

化されている。どちらの遺伝子上流にも T7 プロモーターがあり、ADO 遺伝子の下流に T7 ターミネーターが存在する。

様々な AAR を大腸菌内で発現させるために、pRD の 7942AAR 遺伝子の挿入部位を様々なラン藻由来 AAR の遺伝子（大腸菌での発現用に塩基配列を最適化したもの）に置換したプラスミドを使用した。

## (2) AAR 遺伝子断片の作製

AAR のアミノ酸配列を NCBI のウェブサイトから入手した。この遺伝子を pRD プラスミドのマルチクローニングサイト 1 (*NcoI*–*EcoRI* 間) に挿入するために、両端に制限酵素サイトを挿入した。ただし、AAR の N 末端側では、*NcoI* サイト挿入時のフレームシフトを防ぐために、開始の Met の後に Gly を挿入した (CCATGG+GT)。また、C 末端側にはウェスタンブロッティングで検出するために、Gly-Ser-Ser-Gly アンカーと His×6-tag を付加した。大腸菌内での発現に最適な塩基配列を、DNAWorks サーバー (<https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/>) を用いて設計した。その後、人工遺伝子の合成をユーロフィン株式会社に外注した。

## (3) AAR 遺伝子断片の挿入

合成された AAR 遺伝子断片を、KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いた PCR で増幅し、Fast Gene Gel/PCR extraction kit (日本ジェネティクス) で精製した。これを、同様に増幅した pRD プラスミド (*NcoI*–*EcoRI* 間を欠損したもの) に In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて挿入した。

次に、このプラスミドを用いて大腸菌 JM109 株 (ニッポンジーン) を形質転換し、2×YT 寒天培地 (50 µg/ml Carb を含む) にて 37°C で一晩培養した。Taq DNA ポリメラーゼ (NEB) を用いたコロニー PCR によって、遺伝子断片の挿入されたプラスミドを含むコロニーを確認した。これらのコロニーを 2×YT 培地で培養後、Plasmid Mini kit (日本ジェネティクス) を用いてプラスミドを抽出し、プラスミド全長の塩基配列が正しいことを、シーケンス解析をファスマック株式会社に外注して確認した。

## I-2-3. 活性測定のための大腸菌の培養と GC-MS 測定 (図 3b)

まず、AAR と ADO を共発現させるためのプラスミドを、大腸菌 BL21(DE3)pLysS (BioDynamics) に形質転換させ、2×YT 寒天培地 (50 µg/ml Carb, 34 µg/ml Cm を含む) にて 37°C で一晩培養した。次に、菌体を M9 培地 1 ml の中に入れて一晩、37°C で振とう培養した (前培養)。

大腸菌の本培養は M9F 培地 (M9 培地 250 ml に 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  (モール鉄) を 2.5 ml、1 M IPTG を 0.25 ml 加えたもの) で行った。AAR と ADO タンパク質の発現を誘導するために IPTG を添加してある。また、ADO は活性発現に  $\text{Fe}^{2+}$  イオンが必要なため、モール鉄を添加してある。この M9F 培地を、滅菌済みの試験管に 3.3 ml ずつ加えた。これに前培養液を約 60  $\mu\text{l}$  加えて、菌体量を  $\text{OD}_{600} = 0.1$  に合わせて本培養液を作製した。96 穴ウェルプレートに本培養液を 1 ml ずつ分注後、マキシマイザー (TAITEC) にて 37°C、1300 rpm、16 時間培養した。本培養後に  $\text{OD}_{600}$  を測定した。また、本培養液 1.5 ml を超音波破碎機バイオラプター (コスモバイオ) にて破碎した (氷水中、強度最大、30 sec ON/OFF、10 分間)。菌体破碎液 800  $\mu\text{l}$  を GC-MS 用のガラスバイアルに移し、酢酸エチル 800  $\mu\text{l}$  を加えたのち、Vortex で 10 分間混合し、炭化水素を有機溶媒中に抽出した。これを遠心し (4°C、4500 rpm、15 分)、上層 (有機溶媒層) のみを GC-MS 用のガラスバイアルへと移した。炭化水素量の測定には、GCMS-QP2010 Ultra (島津製作所) を使用した。

#### I-2-4. ウェスタンブロッティング

大腸菌内に存在する AAR タンパク質の量は、ウェスタンブロッティングによって定量した。今回用いた全ての AAR と ADO の C 末端には His-tag がつけてある。このため、anti-His tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングによりタンパク質の定量が可能である。本培養後に超音波破碎した培養液 500  $\mu\text{l}$  を遠心し (4°C、15000 rpm、30 分)、上清と沈殿に分けた。それぞれを別々のサンプルとして、アクリルアミド濃度 12% の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を 100~110 分間行った。

次に、タンパク質を PVDF メンブレン (ポアサイズ 0.2  $\mu\text{m}$ ; Milipore) へと転写した。転写には、転写バッファー (24 mM Tris, 200 mM Glycine, 20% MeOH)、および転写装置 Criterion トランスブロットセル (バイオラッド; 100 V、30 分間) を用いた。転写後のメンブレンを、5% スキムミルクを含んだ PBS 溶液 (8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) 100 ml に移して、室温で 1 時間以上振とうした。

抗体液は、ペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) を繋げた anti-His tag 抗体 (MBL) を、1% スキムミルクを含んだ PBS 溶液あるいは Can Get Signal 溶液 (TOYOBO) で 1/20000 倍に希釈して作製した。希釈した抗体液をメンブレンとともに室温で 60 rpm、30 分間振とう後、0.05% tween 20 を含んだ PBS 100 ml にて室温で 80 rpm、5 分振とうし、洗浄した。この洗浄を 4 回繰り返した。次に、メンブレン上に TMB 溶液 (EzWestBlue (ATTO)) を 5 ml ほど滴下し、室温で発色させた。発色後に

多量の MilliQ にて反応を停止させることで AAR 及び ADO のバンドを検出した。ゲルの撮影とバンドの定量には、Gel Doc EZ システム (BioRad) を用いた。

## I-3. 結果

### I-3-1. 比較する AAR の選択と発現系の構築

様々なラン藻由来 AAR の活性を比較し、高活性型 AAR を探索することとした。まず AAR のアミノ酸配列をもとにラン藻の系統樹を作成し、特徴の異なる 8 種類の AAR を選択した。次に、これらの AAR の発現系を構築後、上記の方法で各種 AAR の酵素活性を測定し比較した。

#### (1) AAR のアミノ酸配列を元にした系統樹

AAR のアミノ酸配列を元にしてラン藻 128 種からなる系統樹を作製した (図 4)。これは 16S rRNA を用いたラン藻の系統樹とほぼ同じであった[25]。これによると、大きく 3 つのグループ (グループ 1, 2, 3) に分類できた。次に、ラン藻 128 種類の生育環境について、それぞれの株を提供している施設 (Pasteur Culture Collection (PCC), National Institution for Environmental Studies (NIES) など) のウェブサイトや文献で調べた[8, 26]。生育環境がはっきりと明記されていない場には、培地が海洋性用のものか、淡水性用のものかどうかで判断することとした。その結果、グループ 1 と 2 に含まれるラン藻の生育環境に違いが見られた。グループ 1 では淡水性のラン藻が多く、グループ 2 では海洋性のラン藻が多いことが分かった。

#### (2) 比較する AAR の選択と発現系の構築

特徴の異なる様々な AAR を比較するために、系統樹中の各グループから、代表的なラン藻に由来する AAR を数種類ずつ選択した。グループ 2 では、まず、海洋に多く存在するラン藻である *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9313 に由来する AAR (9313AAR) を選択した。また、海洋性のラン藻が多いグループ 2 の中で、数少ない淡水性のラン藻である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 に由来する AAR (7942AAR) を選んだ。7942AAR は先行研究でも使用されている AAR である[10, 17, 22, 27]。

次にグループ 1 からは、淡水性のラン藻である *Thermosynechococcus elongatus* BP-1、*Nostoc punctiforme* PCC 73102、*Microcystis aeruginosa*、および *Synechocystis* sp. PCC

6803 に由来する AAR（以下ではそれぞれ、*TeAAR*、73102AAR、*MaAAR*、6803AAR と呼ぶ）の 4 種類を選んだ。*TeAAR* は好熱性ラン藻に由来する AAR であるため[28]、他のラン藻由来 AAR とはタンパク質物性が異なる可能性がある。*MaAAR* は類似の配列が多く存在して系統樹上でクラスタを形成していることから選択した。73102AAR と 6803AAR は、先行研究でも使用されている AAR である[12, 22, 29]。

最後に、グループ 3 からは淡水性の *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 と海洋性の *Synechococcus* sp. PCC 7336 の 2 種類に由来する AAR（それぞれ 7421AAR と 7336AAR）を選んだ。

選択された 8 種類の AAR のアミノ酸配列に対する配列一致度は、53–76%であった（表 1）。また、保存されているアミノ酸部位は、配列全体に偏りなく散らばって存在していた（図 5）。

これら 8 種類の AAR を、ADO とともに大腸菌内で共発現させるためのプラスミドを構築した（詳細は「I-2. 方法」を参照）。AAR と共発現させる ADO は、先行研究において最もアルカン合成量が多かった 73102ADO を用いた[10]。

### I-3-2. 代表的な 8 種類のラン藻由来 AAR の比較

8 種類の AAR・ADO 共発現プラスミドで大腸菌を形質転換し、それぞれを 16 時間培養した後、各培養液中の炭化水素合成量と AAR の活性、可溶性発現量、可溶性度、発現量、及び、基質特異性を調べた。この測定は計 6 回行い（ $n = 6$ ）、平均値と標準誤差を求めた。

#### (1) 炭化水素合成量（図 8a）

GC-MS 測定により、全種類の大腸菌形質転換体で、ペンタデカン（C15:0）、ヘプタデセン（C17:1）、ヘプタデカン（C17:0）の 3 つの炭化水素が検出された（図 6）。炭化水素合成量（上記 3 種類の炭化水素量の合計値）は、7942AAR を発現させた大腸菌で 12mg/L であった。また保持時間 17 分以降でアルデヒドやアルコールのピークが確認されたが、そのピーク強度は炭化水素のピーク強度に比べて非常に低かった（図 7）。特にアルコールはコントロール実験から、低濃度でピークがブロードになってしまった。大腸菌由来の脂肪酸やアミドのピークとも部分的に重なってしまったことから、アルデヒドやアルコールの正確な定量を行うことは困難であった。

I-3-1 で選択した 8 種類の AAR について炭化水素合成量を調べたところ、炭化水素合成量が大きい順に 7942AAR > *TeAAR* > 9313AAR > *MaAAR* > 6803AAR > 7421AAR > 73102AAR > 7336AAR であった（図 8a）。*TeAAR* と 9313AAR は、7942AAR

での炭化水素合成量よりわずかに少ない程度であった。これに対し、7421AAR、73102AAR、7336AAR では、7942AAR での炭化水素合成量の約 1/10 以下であった。

## (2) AAR の可溶性発現量 (図 9a)

AAR の活性と可溶性発現量の両方が炭化水素合成量に影響する。そこでウェスタンブロッティングにより可溶性発現量を調べた結果、*TeAAR* が最大であり、多い順に  $TeAAR > MaAAR > 6803AAR > 7942AAR = 9313AAR > 7421AAR > 73102AAR > 7336AAR$  であった。特に、7421AAR、73102AAR、7336AAR の可溶性 AAR 量は非常に小さく、ウェスタンブロッティングにおけるバンドを呈色する反応時間を長くすることによって、バンドをわずかに確認できた (図 10)。また、73102ADO の発現量については、8 種類のどの AAR を発現させた場合でもほぼ同じであった。

## (3) AAR の酵素活性 (図 8b)

炭化水素合成量を可溶性発現量で割ることによって AAR の酵素活性を算出した。その結果、活性が最も高いのは 7942AAR であり、活性の高い順に  $7942AAR > 9313AAR > 7421AAR > 73102AAR > 7336AAR > TeAAR > MaAAR > 6803AAR$  であった。*TeAAR*、*MaAAR*、6803AAR は可溶性発現量は高かったが活性は低いことがわかった。

## (4) AAR の可溶性度と全発現量 (図 9b, c)

AAR の可溶性度と全発現量については、ウェスタンブロッティングによって調べた。ここで全発現量は上清と沈殿両方で確認された AAR 発現量の合計を示す。また、可溶性度は上清の AAR 量を全発現量で割った値を示す。その結果、可溶性度は全ての AAR で 50 % 以下であった。特に 9313AAR、7421AAR、73102AAR は可溶性度が 20 % 以下であり、これら AAR の 80% 以上は大腸菌内で沈殿していた。しかし 9313AAR は発現量が多かったため、可溶性発現量は 7942AAR とほぼ同じであった。一方、7942AAR、*TeAAR*、*MaAAR* の可溶性度は、AAR の中では比較的高かった。この中で *TeAAR* は発現量も大きかったために、可溶性発現量も非常に大きくなった。

## (5) AAR の基質特異性 (図 8c, d)

AAR と ADO を共発現させた大腸菌では、3 種類の炭化水素が合成されたが (図 6)、これらは AAR が基質として用いた acyl-ACP (もしくは acyl-CoA) が持つ長鎖の炭化水素基の形状 (長さ、および、二重結合の有無) の違いに依存すると考えられる。したがって、AAR と ADO を共発現させた大腸菌で合成される炭化水素種の割合は、

AAR の基質特異性に対応すると考えられる。そこで GC-MS の結果から、合成される 3 種類の炭化水素の割合を算出し、その値を AAR の基質特異性として用いた。ただし、合成される炭化水素種の量比は、大腸菌内に元々存在する様々な acyl-ACP/CoA の量比にも依存しうるため、ここでは様々な AAR 間での比較に焦点をおいて解釈した。

その結果、8 種類中の 6 種類の AAR では C17:1 が最も多く合成されたが、これらの AAR は全て淡水性のラン藻由来であった。AAR が合成するアルデヒドは、ADO によって炭素数が 1 個減った炭化水素に変換されるため、これらの AAR では C18:1 の炭化水素基を持つ oleoyl-ACP/CoA を主な基質としていと考えられる。特に MaAAR と 6803AAR では C15:0 を合成する割合は低く、20 %以下であった。一方で、7942AAR では C15:0 の割合も約 40 %と大きかった。

9313AAR と 7336AAR では、C15:0 を最も多く合成していたが、これらは海洋性のラン藻由来であった。このことは、これら 2 つの AAR では C16:0 の炭化水素基を持つ palmitoyl-ACP/CoA を主な基質として用いていると考えられる。

C17:0 については、どの AAR にとっても C15:0 と C17:1 の合成量に比べると、非常に量が少なかった。一方で、73102AAR では約 25 %と比較的高い値を示した。

### **I-3-3. 発現抑制株を用いた AAR の活性評価**

本研究で用いた AAR の活性評価法では、AAR が合成するアルデヒドを直接検出するのではなく、ADO によってアルデヒドから変換された炭化水素を検出し、活性評価を行なっている。これは、大腸菌内にはアルデヒドをアルコールに変換する酵素が存在しており[10, 30]、アルデヒドの正確な定量が困難なためである。本アッセイ系では ADO の活性が十分に高ければ、AAR が合成するアルデヒドを全て炭化水素に変換でき、AAR の酵素活性を正確に定量できるはずである。しかし AAR の活性が高くなり、ADO が炭化水素に変換できないほど多くのアルデヒドが合成された場合、AAR の活性を正確に定量できなくなるという問題が挙げられる。

そこで、AAR・ADO 共発現プラスミドの AAR 遺伝子上流の T7 プロモーターに変異を導入し、AAR の発現を抑制させ、大腸菌内で合成されるアルデヒド量を減らすことにより、AAR の真の活性を測定することとした。

#### **(1) AAR の発現抑制株の作製**

QuikChange 法によって、AAR の上流にある T7 プロモーター領域 (TAATACGACTCACTATA) に 1 塩基置換変異を導入した。先行研究によって T7 プ

ロモーターに 1 塩基置換を導入した場合のタンパク質発現量の違いが調べられており[31]、その結果を参考にして、発現量が低下すると予測される次の 6 種類の変異体を作製した；-17T>A (T7 プロモーターの終わりの塩基を-1 と数えたとき、17 塩基上流にある T (T7 プロモーターの開始点) を A に置換したことを表す)、-17T>C、-17T>G、-16A>T、-13A>C、-13A>G。

## (2) 7942AAR の発現抑制株による活性測定 (図 11)

上記の T7 プロモーター変異を含んだプラスミド 6 種類を利用して、まず 7942AAR 発現抑制株を作製した。7942AAR は最も活性の高い AAR であった。この 7942AAR の発現抑制株について先と同様の測定を計 5 回行った ( $n = 5$ )。その結果、全ての変異株において野生型よりも可溶性発現量が低下しており、AAR タンパク質の発現抑制が観測された (図 11b)。特に、-17T>A、-17T>G、-13A>C、-13A>G の 4 種類では、可溶性 AAR 量が野生型の 50 %以下に低下していた (平均して 30 %程度)。一方で ADO の可溶性発現量にはほとんど影響は見られなかった (図 11e)。

これらの 4 種類の変異株では、合成される炭化水素の割合 (基質特異性) には変化はなかった (図 11d)。しかし、炭化水素合成量は野生型の 55 %程度になっていた (図 11a)。その結果として、これらの 4 種類の変異株では、野生型よりも活性が 1.8 倍高くなっていた (図 11c)。このことは、野生型の T7 プロモーターを用いた発現系では、7942AAR の活性が高すぎて ADO の活性を上回ったために、AAR の活性を正確には定量できていなかったことを示している。そこで、これら 4 種類の変異株によって得られた活性の平均値を、7942AAR の真の活性とした (図 8b の右端のパネルに示す)。その活性値は、2 番目に高活性である 9313AAR の約 2 倍に相当した。

## (3) 8 種類の AAR 発現抑制株による活性測定 (図 12)

上記の 7942AAR の発現抑制株の実験結果より、7942AAR の真の活性は野生型よりも 1.8 倍高いことがわかった。さらに、他の AAR の活性についても発現を抑制することで活性に影響が見られるかどうかを確認するため、T7 プロモーターに-13A>G の変異を導入した AAR 発現抑制株を作製し、同様の測定をした。その結果、T7 プロモーターに変異を導入する事で、*Te*AAR を除き、炭化水素合成量と可溶性発現量の両方が減少した (図 12a, b)。発現を抑制する前と比べて、AAR 間における炭化水素合成量及び活性の順位に大きな変化は見られなかった (図 12a, c)。しかし 73102AAR、7336AAR はウェスタンブロッティングでの可溶性発現量の解析が困難なほど、発現量が低下してしまい、活性が算出できなかった (図 12b, c)。



発現抑制された 9313AAR は野生型の T7 プロモーターを用いた 7942AAR と比べて、活性が 1.4 倍となり、野生型の T7 プロモーターを用いた時 (0.86 倍) より向上した (図 12c)。さらに、基質特異性も 7942AAR ではほとんど変化が見られなかったのに対して、9313AAR では C15:0 の割合が 75 % となり、野生型の T7 プロモーターを使用したとき (58 %) と比べ増加した (図 12d)。

### I-3-4. 海洋性ラン藻由来 AAR の比較

#### (1) 新たな海洋性ラン藻由来 AAR の選択

AAR の基質特異性の解析結果から、6 種類の淡水性ラン藻由来 AAR では主な基質として oleoyl-ACP/CoA を利用するのに対し、2 種類の海洋性ラン藻由来 AAR では主な基質として palmitoyl-ACP/CoA を利用することが分かった。ただ、海洋性ラン藻由来 AAR は 9313AAR、7336AAR の 2 種類でしか調べていないため、他の海洋性ラン藻由来 AAR の活性や基質特異性についても調べてみることにした。

新たな海洋性ラン藻由来 AAR の候補として *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (51142AAR)、*Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* str. CCMP1986 (1986AAR)、*Synechococcus* sp. RS9917 (9917AAR)、*Synechococcus* sp. CB0205 (0205AAR) の 4 つを選択した。系統樹の中で、51142AAR はグループ 1 (主に淡水性ラン藻由来の AAR が存在) に属しているが、それ以外の AAR はグループ 2 (主に海洋性ラン藻由来の AAR が存在) に属していた (図 4)。また 0205AAR を除く 3 つの AAR はすでに先行研究で用いられていた[10, 27]。これら 4 種類を加えた計 12 種類の AAR 間での配列一致度は 53–82 % であった (表 1)。

#### (2) 海洋性ラン藻由来 AAR の炭化水素合成量、活性、基質特異性 (図 13)

炭化水素合成量は、9313AAR が最も大きく、9917AAR と 0205AAR は 7942AAR と比べて 0.45 倍で等しかった (図 13a)。一方で、51142AAR と 1986AAR では 7336AAR と同程度くらいと非常に低かった。また活性は 9313AAR が最大であった (図 13b)。

基質特異性については 4 種類とも淡水性ラン藻由来である 7942AAR よりも C15:0 の割合が高いため、palmitoyl-ACP/CoA への特異性が大きいことが明らかとなった (図 13c, d)。特に 51142AAR では炭化水素合成量は微量ではあったが、C15:0 のみしか検出されなかった。

#### (3) 海洋性ラン藻由来 AAR の可溶性発現量、可溶性度、全発現量 (図 14)

可溶性発現量は、0205AAR、9917AAR について 7942AAR と比べて 1.6 倍以上と大きかった (図 14a)。一方で 51142AAR、1986AAR ではウェスタンブロットティングでは検出が困難なほど、可溶性発現量が低かった。特に 51142AAR は沈殿に存在する AAR の検出も困難であり、全発現量も非常に低かった (図 14c)。さらに可溶性度は 0205AAR、9917AAR は 7942AAR と同程度の値を示し、AAR 間では高いことがわかった (図 14b)。一方で 1986AAR は上清の AAR のみが検出できなかったため、可溶性度は非常に低いことが示唆された。

### I-3-5. 様々ラン藻由来 AAR 間での相関解析

#### (1) AAR の特性と配列一致度との相関関係 (図 15)

AAR の活性、可溶性、基質特異性を決定しているアミノ酸残基を探索するために、これらの値とアミノ酸配列との対応関係を調べた。具体的には、各測定データと、その結果が最も良かった AAR のアミノ酸配列に対する配列一致度との相関関係を調べた。

最も活性が高かった 7942AAR との配列一致度を横軸にとり、縦軸に活性値をプロットして相関解析を行った結果、相関係数  $r=0.69$  と正の相関を示した (図 15a)。しかし 7942AAR のデータを除くと相関係数  $r=-0.36$  となった。これは、7942AAR の活性が他の AAR よりも突出して高かったために、見かけ上は相関が高くなっただけであり、有意な相関があるとは言えない。同様に、C17:0 の割合と 73102AAR との配列一致度のあいだの相関も高かったが ( $r=0.83$  ; 図 15d)、73102AAR を除くと  $r=0.50$  に減少した。このため、C17:0 の割合と 73102AAR との配列一致度には相関がなかった。また、C15:0 の割合と 9313AAR との配列一致度にも相関は見られなかった ( $r=0.65$  (0.37) ; 図 15b)。これらの結果は、局所的なアミノ酸配列の違いが AAR の活性や C15:0 及び C17:0 を多く合成することに寄与していることを示唆する。

可溶性度と 9917AAR との配列一致度のあいだの相関 ( $r=0.32$  (-0.02) ; 図 15e)、及び、全発現量と *Te*AAR との配列一致度のあいだの相関 ( $r=0.65$  (0.27) ; 図 15f) についても、活性と同様に相関は見られなかった。一方で C17:1 の割合は、*Ma*AAR との配列一致度と相関を示した ( $r=0.70$  (0.65) ; 図 15c)。このことは *Ma*AAR との配列一致度が高ければ高いほど、C17:1 を多く合成する傾向にあることを示唆する。

#### (2) AAR の特性間での相関関係 (表 2)

今回、AAR の比較によって得られた炭化水素合成量、活性、可溶性発現量、可溶性

度、全発現量、及び、基質特異性（C15:0、C17:1、C17:0 の割合）について特性間での相関を調べた。8 種類の特性があるため、合計で 28 通りの組み合わせで相関解析を行った（表 2）。その結果、強い相関 ( $|r| > 0.7$ ) を示したのは、可溶性 AAR と全発現量 ( $r = 0.83$  ; 表 2 の No. 15)、及び、C15:1 の割合と C17:0 の割合 ( $r = -0.96$  ; 表 2 の No. 26) のみであった。

### **I-3-6. AAR の特性を決定するようなアミノ酸残基の探索**

I-3-5-(1) にて AAR の特性と配列一致度との相関関係を調べたところ、C17:1 の割合と *Ma*AAR との配列一致度とのあいだの相関を除いて、相関を示すようなものは見られなかった。これは局所的なアミノ酸配列の違いが AAR の特性に重要であることを示唆している。そこで、それら AAR の特性（特に活性と基質特異性）を決定するのに重要なアミノ酸残基を同定するため、比較データに基づいた AAR の一アミノ酸変異解析を行った。

#### **(1) 6803AAR の変異解析による活性に重要なアミノ酸残基の探索 (図 16)**

本研究より、活性が高かった 7942AAR、9313AAR の間で保存されている一方、他の AAR では異なるアミノ酸残基を AAR のアミノ酸配列のマルチプルアライメントの結果より調べた（図 5）。その結果、以下の 11 個のアミノ酸残基を同定できた（図 5 で赤い四角で示す）。

Arg15、Ser96、Thr102、Thr120、Glu215、Gly257、Cys271、Ala282、Arg286、Ile319、Arg331（全て 7942AAR のアミノ酸残基と残基番号に対応）

最も活性の低い 6803AAR を用いて、高い活性を持つ AAR に保存されていたアミノ酸残基 11 個に対して、一アミノ酸置換変異を導入した。これにより、6803AAR 一アミノ酸置換変異体を 11 個作製し（Q15R、T96S、S102T、V120T、Q215E、A257G、S271C、V282A、I286R、V319I、K331R）、活性測定を行った。もし、変異導入によって 6803AAR の活性が向上した場合、変異導入されたアミノ酸残基は AAR 活性に重要であるということが分かる。その結果、T96S、V282A、I286R の活性は野生型と比べてそれぞれ、4、5、12 倍に向上した（図 16c）。一方で、Q15R、S102T では活性が減少したため、この 2 つは 6803AAR の活性を維持する上で重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

#### **(2) 7942AAR の変異解析による基質特異性に重要なアミノ酸残基の探索 (図 17)**

次に、基質特異性に重要なアミノ酸残基を探索するために、C15:0 の割合が高かった 9313AAR、7336AAR の間で保存されている一方、6 種類の淡水性ラン藻由来 AAR では異なるアミノ酸残基を調べた。その結果、以下の 5 つのアミノ酸残基を同定できた（図 5 で青い三角で示す）。

Val54、Pro208、Gln256、Glu323、Pro336（全て 7942AAR のアミノ酸残基と残基番号に対応）

C15:0 に比べて C17:1 の割合の方が大きかった 7942AAR を用いて、上記のアミノ酸残基 5 個に対して、一アミノ酸置換変異を導入した。7942AAR の一アミノ酸置換変異体を 5 個作製し（V54K、P208S、Q256A、E323D、P336S）、活性測定を行った。その結果、変異を導入しても 7942AAR の基質特異性にはほとんど影響は見られなかった（図 17d）。P336S についてわずかに C15:0 の割合が大きくなった一方、炭化水素合成量及び可溶性発現量が大きく減少した。これらの結果より、AAR の基質特異性を変化させるにはアミノ酸残基一つを変えただけでは不十分であるかもしれないということが示唆された。一方で V54K は活性が野生型に比べて 4.8 倍に向上したが、可溶性発現量が 0.16 倍にまで減少したため、炭化水素合成量は 0.7 倍にとどまった（図 17a-c）。

## I-4. 議論

### I-4-1. AAR の活性と可溶性度

異なる特徴を持ちうる 8 種類の AAR（新たに追加した海洋性ラン藻由来 AAR を含めると計 12 種類）を選択して比較した結果、炭化水素合成量、可溶性発現量、活性、可溶性度、基質特異性が AAR 間で大きく異なることが分かった。

Coursolle *et al.* (2015) では 7942AAR を含んだいくつかの AAR を大腸菌内に導入し、菌体内のアルコール合成量（AAR によって作られたアルデヒドから合成）を測定することで、AAR の活性比較を行った[27]。その結果、7942AAR が最も高活性であることが分かった。しかし、この活性評価では AAR の可溶性発現量での規格化を行ってはいなかった。そのため本研究が初めて、*in vivo* における AAR の可溶性発現量も考慮したうえでの活性評価を行った研究である。その結果、7942AAR は炭化水素合成量と活性が最大であったのに加え、可溶性度も比較的に高いことが分かった。この理由について 7942AAR は淡水性ラン藻由来の AAR であるがグループ 2 に属している（図 4）。そのためアミノ酸配列は他のラン藻由来 AAR とは比較的異なっているため、

7942AAR の高い活性はこのラン藻に特有のものであるかもしれない。*Synechococcus elongatus* PCC 7942 は淡水性で桿状の単細胞性ラン藻であり、さまざまな環境ストレスに対する応答機構を持つことが知られている[32, 33]。炭化水素合成量が高い理由はまだ不明であるが、もしかすると、ストレス応答機構と関連している可能性もある。

AAR の可溶性発現量と全発現量は、*TeAAR* が最大であった。これは、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 が好熱性のラン藻であり[28]、*TeAAR* は高い熱安定性を持つためと考えられる。一方で *TeAAR* の活性は低かった。活性測定の際に大腸菌の培養温度が 37°C であったが、一般的に好熱性バクテリア由来の酵素の至適温度は高く、25–37°C だと活性が低下することが知られている[34, 35]。このため、*TeAAR* についてはより高温の温度で活性測定を行った方が、活性が増加すると考えられる。

AAR は ADO と結合することによって、疎水性度の高い長鎖のアルデヒドを効率的に受け渡していることが報告されている[12]。このため、炭化水素合成は AAR と ADO の相互作用にも左右されるので、どのラン藻由来 AAR と ADO を組み合わせるべきか考慮することは重要である。一般的には、同じラン藻由来 AAR と ADO を用いたほうが異なるラン藻由来の AAR と ADO を用いるよりもアルデヒドを受け渡す効率がよい可能性が高いといえる。しかし、本研究では 12 種類の AAR 全てで 73102ADO との共発現を行ったが、73102AAR と 73102ADO を共発現させた大腸菌での炭化水素合成量は低く、73102AAR の活性も低かった。この理由について AAR における ADO 結合部位が AAR 間ではよく保存されているせいなのかもしれない。あるいは保存されてはならず、73102AAR と 73102ADO との結合が他の AAR と比べて強く、離れにくいせいなのかもしれない。ただどちらにせよ、本研究において 7942AAR と 9313AAR の酵素活性が高いことは明白であるといえる。

さらに 6803AAR の変異解析から、活性に重要なアミノ酸残基として Ser96、Ala282、Arg286 を同定することに成功した (図 16)。このうち、Ala282 と Arg286 はほとんど保存されていないため、これらの部位への変異は 6803AAR 以外の活性が低い AAR の活性向上にもつながる可能性がある。

## **I-4-2. AAR の基質特異性**

本研究より、基質特異性は AAR 間で異なっていた。9313AAR、7336AAR、51142AAR、1986AAR、0205AAR では C15:0 の割合が大きかったため、hexadecanal (C16:0 のアルデヒド) を多く合成することが分かった (図 13)。また、9917AAR は 7942AAR より hexadecanal を多く合成した。このため、これら 6 種類の海洋性ラン藻由来 AAR では palmitoyl-ACP/CoA への基質親和性が高いことが示唆された。一方でその他 6 種類

の淡水性ラン藻由来 AAR では C17:1 の割合が大きかったことから（図 8）、oleoyl-ACP/CoA への基質親和性が高いことが示唆された。この AAR の基質特異性の違いは、AAR と ADO を利用した炭化水素合成において炭素鎖の長さを自由に調節することによって、用途に応じた燃料の作り分けに応用できるかもしれない。

興味深いことに、より短い基質 palmitoyl-ACP/CoA への親和性の高い AAR が海洋性ラン藻由来であったのに対して、より長い基質 oleoyl-ACP/CoA への親和性の高い AAR は全て淡水性のラン藻であった。したがって、AAR の基質特異性は生育環境に依存する可能性が示唆された。AAR の系統樹解析より、淡水性ラン藻由来 AAR の多くはグループ 1 に属しているのに対して、海洋性ラン藻由来 AAR の多くはグループ 2 に属していた（図 4）。このため AAR の基質特異性と由来となるラン藻種の生息地が明確に分かれていることは、AAR の基質特異性が海洋性と淡水性それぞれの間でよく保存されているためであると推測される。

7942AAR は淡水性ラン藻由来であるにもかかわらず、海洋性ラン藻由来 AAR が多いグループ 2 に属していた。この理由について、7942AAR では C15:0 と C17:1 の割合がともに高かったことから、淡水性ラン藻由来と海洋性ラン藻由来 AAR のちょうど中間に位置しているのかもしれない。

海洋性と淡水性ラン藻では合成されるアルカンの炭素鎖の長さが異なり、海洋性ラン藻では C15:0 が多く、淡水性ラン藻では C17:0 が多いことが報告されている[36]。この研究では、海洋性と淡水性のラン藻でそれぞれの培地を入れ替えて培養しても合成されるアルカンの炭素鎖に影響は見られなかったことから、環境中の成分が原因でないことが示唆された。さらに、脂肪酸組成についても海洋性ラン藻では炭素数 16（C16）の脂肪酸が多く、一方で淡水性ラン藻では炭素数 18（C18）の脂肪酸が多いことが示された。AAR の基質は脂肪酸合成の中間体である acyl-ACP であることから、この論文の著者らは、海洋性と淡水性のラン藻で合成されるアルカンの炭素鎖数の違いは、脂肪酸合成経路の違いであると主張している。一方で、本研究の結果は海洋性と淡水性のラン藻で合成されるアルカンの炭素鎖数の違いは、AAR の基質特異性の違いが原因であるという新たな可能性を示唆している。

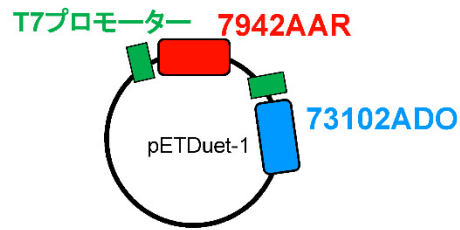
逆に海洋性（淡水性）ラン藻では短い（長い）炭素鎖を持つ基質が多く存在しているために、AAR の機能がそれらに適応したのかもしれない。進化の過程を考えると、海洋性環境から淡水性環境に適応するために、AAR の基質特異性はより長い基質を利用できるように変化したと考えられる。これに関連する例として、lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) の基質特異性の変化が挙げられる。LPAAT はガラクト脂質（ラン藻や葉緑体の細胞膜の主成分）の *sn*-2 の位置に脂肪酸を付加させる酵素であ

る[37]。ラン藻由来の LPAAT は C16 の脂肪酸に対して基質親和性を示すのに対して、真核藻類由来で小胞体に局在する LPAAT は C18 の脂肪酸に対して基質親和性を示すことが知られている[38]。これは LPAAT の基質特異性がラン藻から真核藻類へと進化する過程で変化したためだと考えられる。したがって、AAR についても LPAAT と似たような基質特異性の変化が起こった可能性が考えられる。

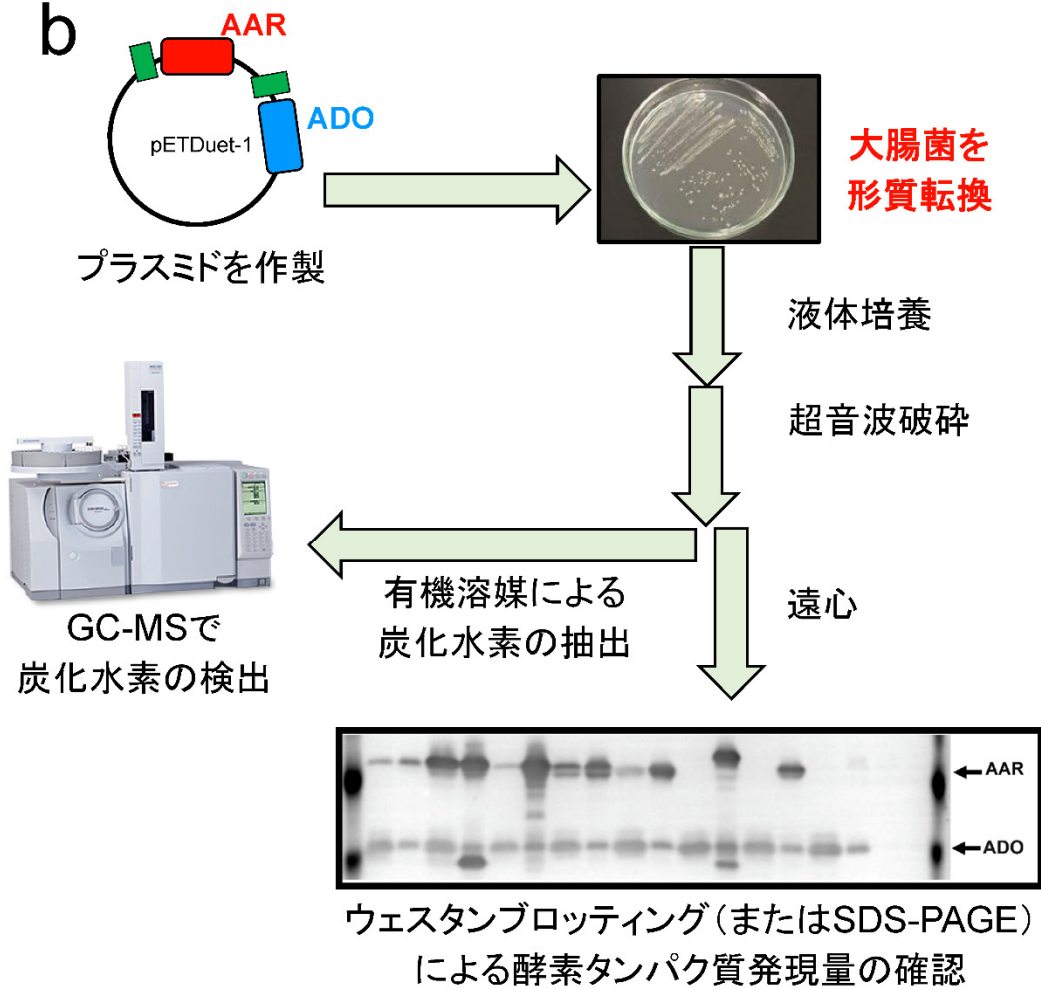
### **I-4-3. AAR の更なる高性能化へ向けて**

本研究では、様々なラン藻由来の AAR 活性を比較した結果、7942AAR が最も高活性であることを明らかにした。この AAR をラン藻に導入することにより、ラン藻による炭化水素合成量を増大できることが期待される。さらに、7942AAR に変異を導入して活性や可溶性発現量を増大させることができれば、ラン藻内でのさらなる炭化水素合成量の増大に寄与しうる。所属研究室では現在、この 7942AAR をテンプレートにして、進化分子工学的手法を用いた経験的なタンパク質設計法により、AAR の高活性変異体の探索も進められている。また、AAR の立体構造解析や次章で紹介する変異解析から AAR の機能発現に重要なアミノ酸残基などを同定できれば、それらの知見に基づいて、AAR の高活性変異体を合理的に設計できることが期待される。

a



b





### 図 3. コンストラクトの模式図と本実験の流れ

- (a) 先行研究にて作製されたコンストラクト pRD の模式図である。pETDuet-1 ベクターのマルチクローニングサイト 1 に 7942AAR を入れ、サイト 2 に 73102ADO を導入している。AAR と ADO の上流それぞれに、T7 プロモーターが存在する。
- (b) 本実験手法についての簡略図。

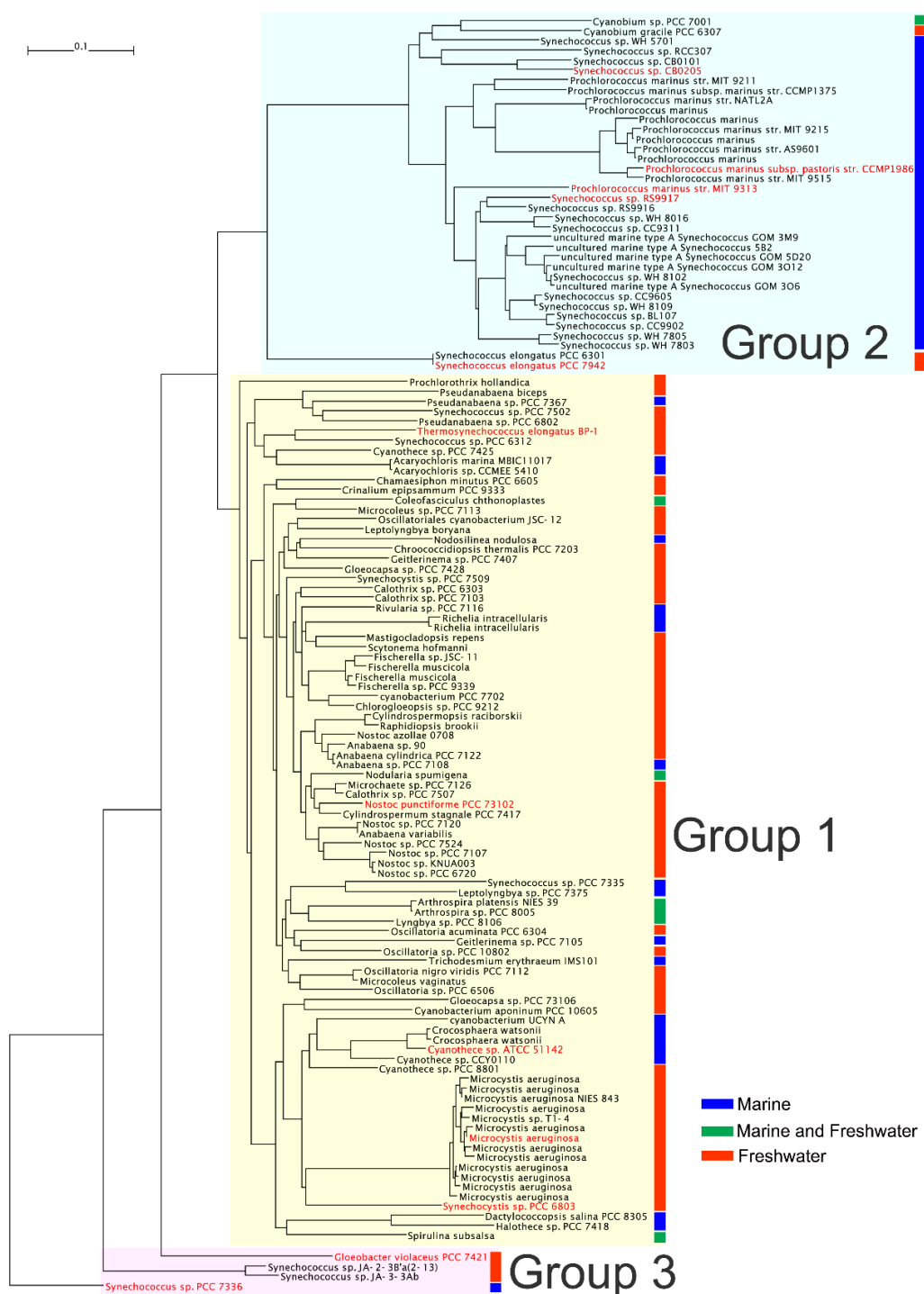


図 4. AAR の系統樹

AAR のアミノ酸配列をもとに、128 種類のラン藻由来 AAR からなる系統樹を作製した。大きく 3 つのグループに分かれ、グループ 1 では淡水性ラン藻（赤いバーで示す）が多く、グループ 2 では海洋性ラン藻（青いバーで示す）が多いことが分かる。今回、測定用のサンプルに選んだラン藻は赤字で示す。

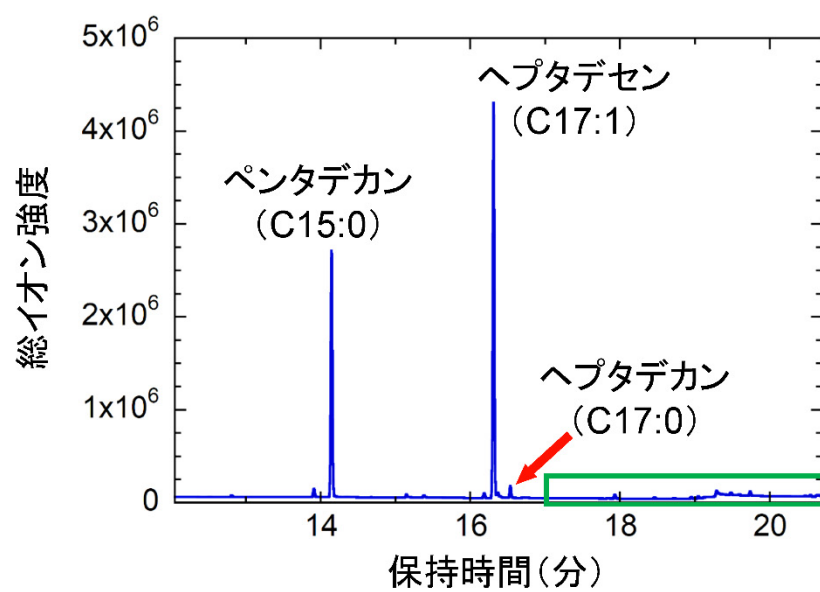
表 1. 様々なランソ薬由来 AAR 間でのアミノ酸配列一致度 (%)

	Group	7942 AAR	<i>Te</i> AAR	9313 AAR	<i>Ma</i> AAR	6803 AAR	7421 AAR	73102 AAR	7336 AAR	51142 AAR	1986 AAR	9917 AAR	0205 AAR
7942AAR	2	–	70	63	68	68	65	70	61	67	61	63	62
<i>Te</i> AAR	1	70	–	59	73	71	67	76	63	72	58	59	58
9313AAR	2	63	59	–	57	60	56	62	53	60	73	82	72
<i>Ma</i> AAR	1	68	73	57	–	76	63	72	63	77	59	59	57
6803AAR	1	68	71	60	76	–	62	74	62	78	59	60	59
7421AAR	3	65	67	56	63	62	–	67	66	60	55	57	56
73102AAR	1	70	76	62	72	74	67	–	66	75	59	62	59
7336AAR	3	61	63	53	63	62	66	66	–	60	54	54	53
51142AAR	1	67	72	60	77	78	60	75	60	–	60	60	58
1986AAR	2	61	58	73	59	59	55	59	54	60	–	77	67
9917AAR	2	63	59	82	59	60	57	62	54	60	77	–	73
0205AAR	2	62	58	72	57	59	56	59	53	58	67	73	–



## 図 5. 様々なラン藻由来 AAR のアミノ酸配列の比較

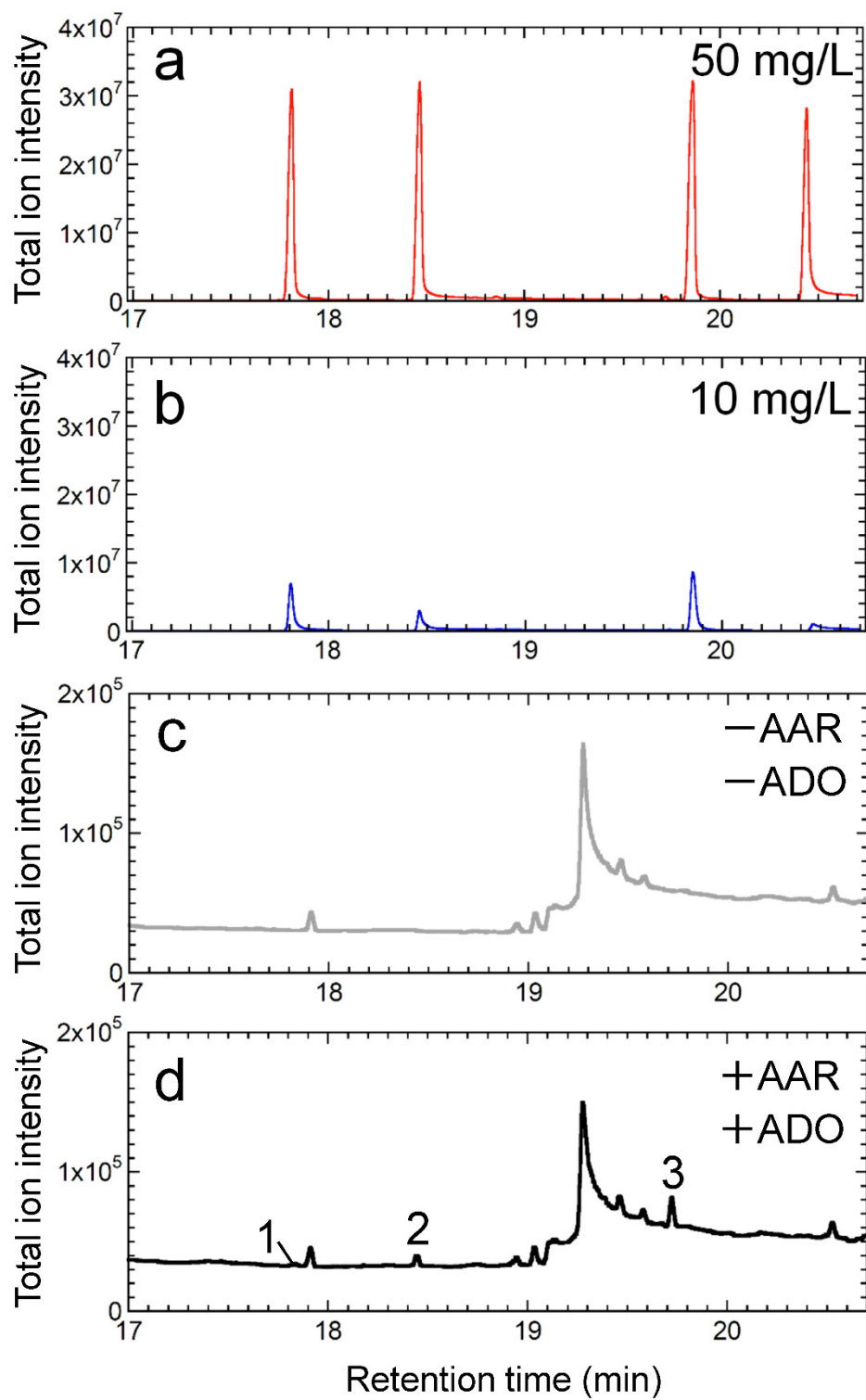
12 種類の AAR について Clustal X でマルチプル配列アライメントを行った[39]。配列データの上に記されている\*は完全に保存されている部位で、:と.は一部で保存されている部位を表す。赤い四角は、1-3-6-(1) で 6803AAR に変異を導入したアミノ酸部位を示す。青い三角は、1-3-6-(2) で 7942AAR に変異を導入したアミノ酸部位を示す。



## 図 6. GC-MS で検出された炭化水素のピークの様子

GC-MS によって検出されたピークの生データを示す。横軸の保持時間は検出される炭化水素種ごとに一定であり、縦軸は検出されたピークの強度を表す。このサンプルは、pRD である。ペンタデカン (C15:0)、ヘプタデセン (C17:1)、ヘプタデカン (C17:0) の 3 つの炭化水素のピークが見られた。また、緑の四角で囲った部分の拡大図を図 7d にて示す。

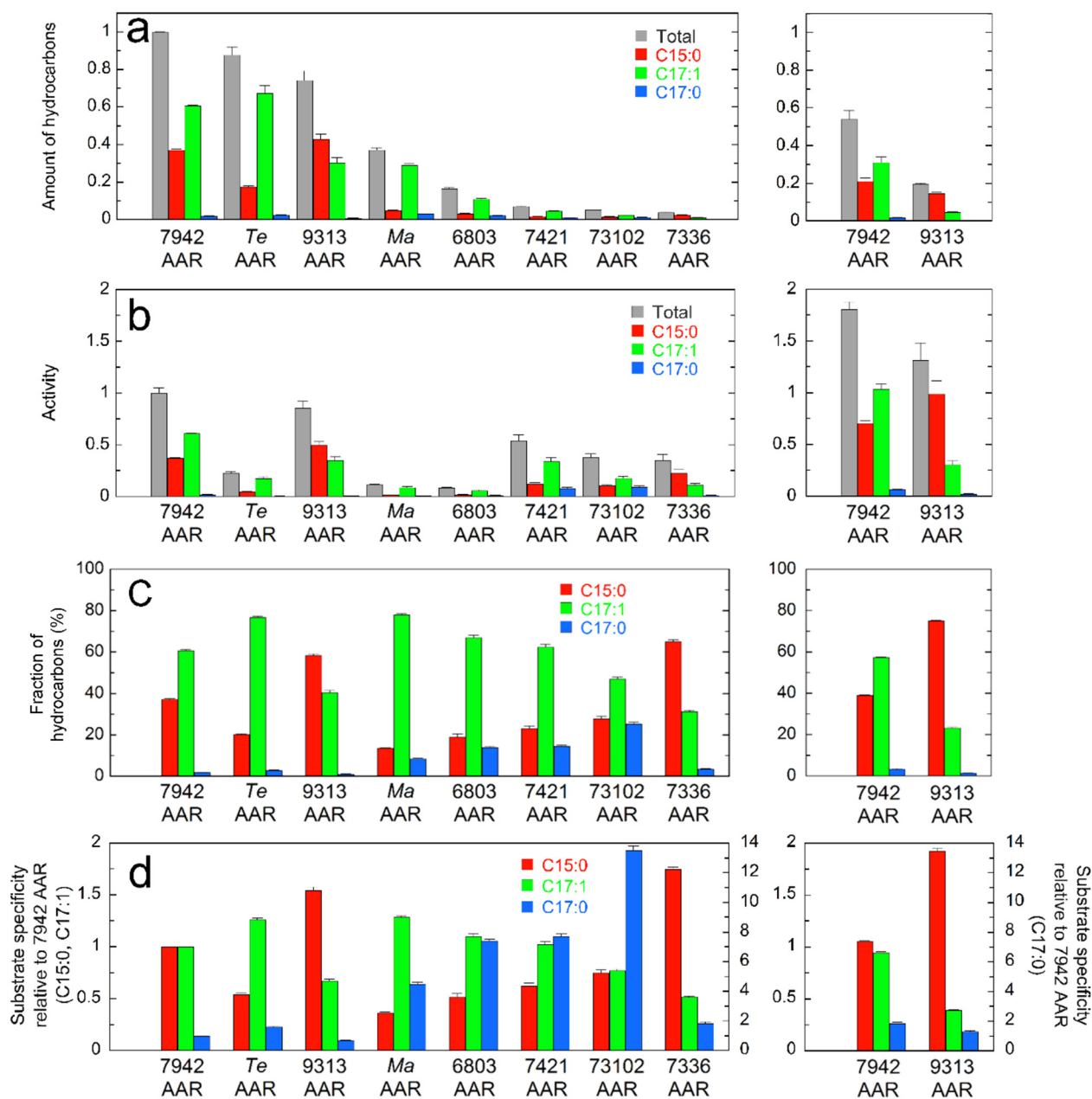






## 図 7. GC-MS におけるアルデヒド、アルコールのピークの様子

GC-MS によって検出されたピークの生データを示す。横軸の保持時間は検出される炭化水素種ごとに一定であり、縦軸は検出されたピークの強度を表す。(a, b) アルデヒド及びアルコールのコントロール実験結果を示す。左から、ヘキサデカナール (C16:0 のアルデヒド)、ヘキサデカノール (C16:0 のアルコール)、オクタデカナール (C18:0 のアルデヒド)、オクタデカノール (C18:0 のアルコール) のピークを示す。a では各サンプル濃度が 50 mg/L、b では 10 mg/L であった。(c, d) 大腸菌サンプルを用いたデータを示す。c では AAR と ADO を発現していないサンプルで、d では 7942AAR・73102ADO を共発現させたサンプル (pRD) である。1 のピークがヘキサデカナールで、2 のピークがヘキサデカノールで、3 のピークがオクタデカナールを示す。c, d において共通してみられるピークの大部分は、大腸菌由来の脂肪酸やアミドであった。



## 図 8. 様々なラン藻由来 AAR の比較（炭化水素合成量、活性、基質特異性）

8 種類のラン藻由来 AAR における炭化水素合成量、活性、基質特異性を比較した結果。測定は 6 回行った。(a) 縦軸は炭化水素合成量を表す。灰色のバーは、3 つの炭化水素合成量の合計（以下、炭化水素合成量とする）。(b) 縦軸は AAR 活性を示す。炭化水素合成量を可溶性発現量（図 9a）で割ることで算出。(c, d) 縦軸は合成された炭化水素種の割合を表し、AAR の基質特異性を意味する。

(c) を除くすべてのグラフにおいて、7942AAR の値を 1 として規格化した。また、一番右は AAR の発現量を抑制した 7942AAR、9313AAR における結果を示す。

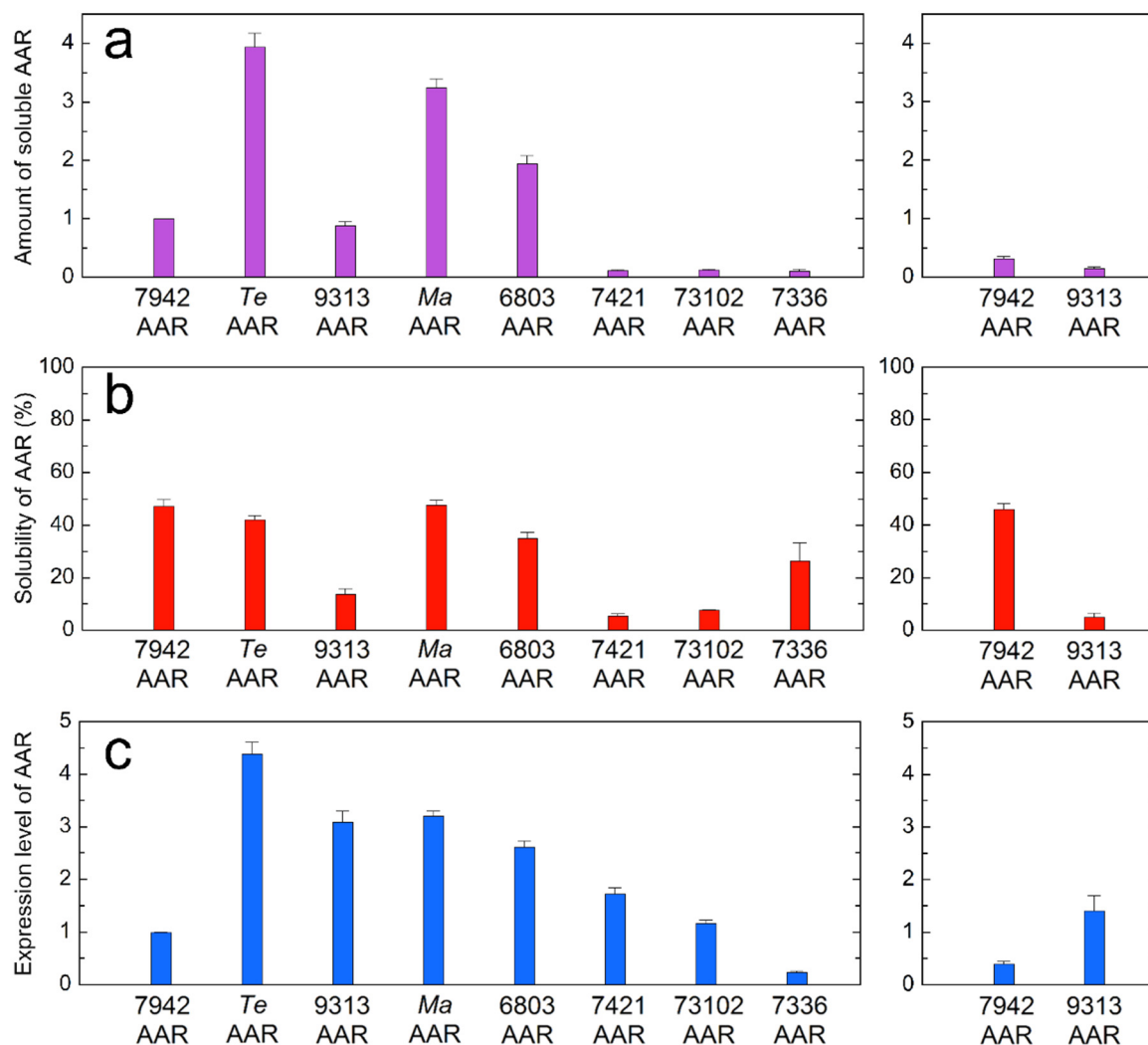


図 9. 様々なラン藻由来 AAR の比較（可溶性発現量、可溶性度、全発現量）

8 種類のラン藻由来 AAR における可溶性発現量、可溶性度、全発現量を比較した結果。ウェスタンブロッティングの結果からそれぞれ定量した。また、測定は 6 回行った。(a) 縦軸は上清のバンドの量（可溶性発現量とする）を表す。(b) 縦軸は AAR の可溶性度を示す。可溶性度は上清のバンドを上清と沈殿のバンドの合計（全発現量とする）で割った値とした。(c) 縦軸は AAR の全発現量を表す。

(a), (c) のグラフでは 7942AAR の値を 1 として規格化した。一番右は AAR の発現量を抑制した 7942AAR、9313AAR における結果を示す。

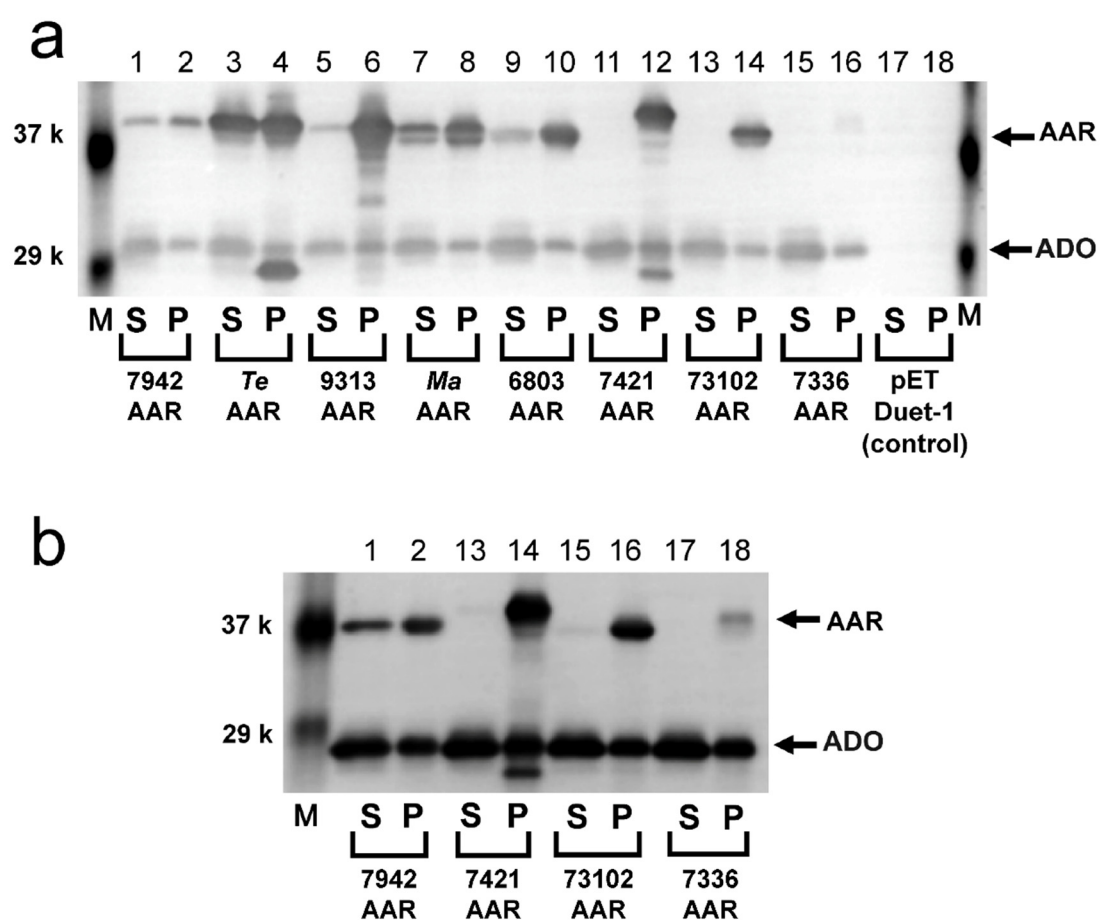
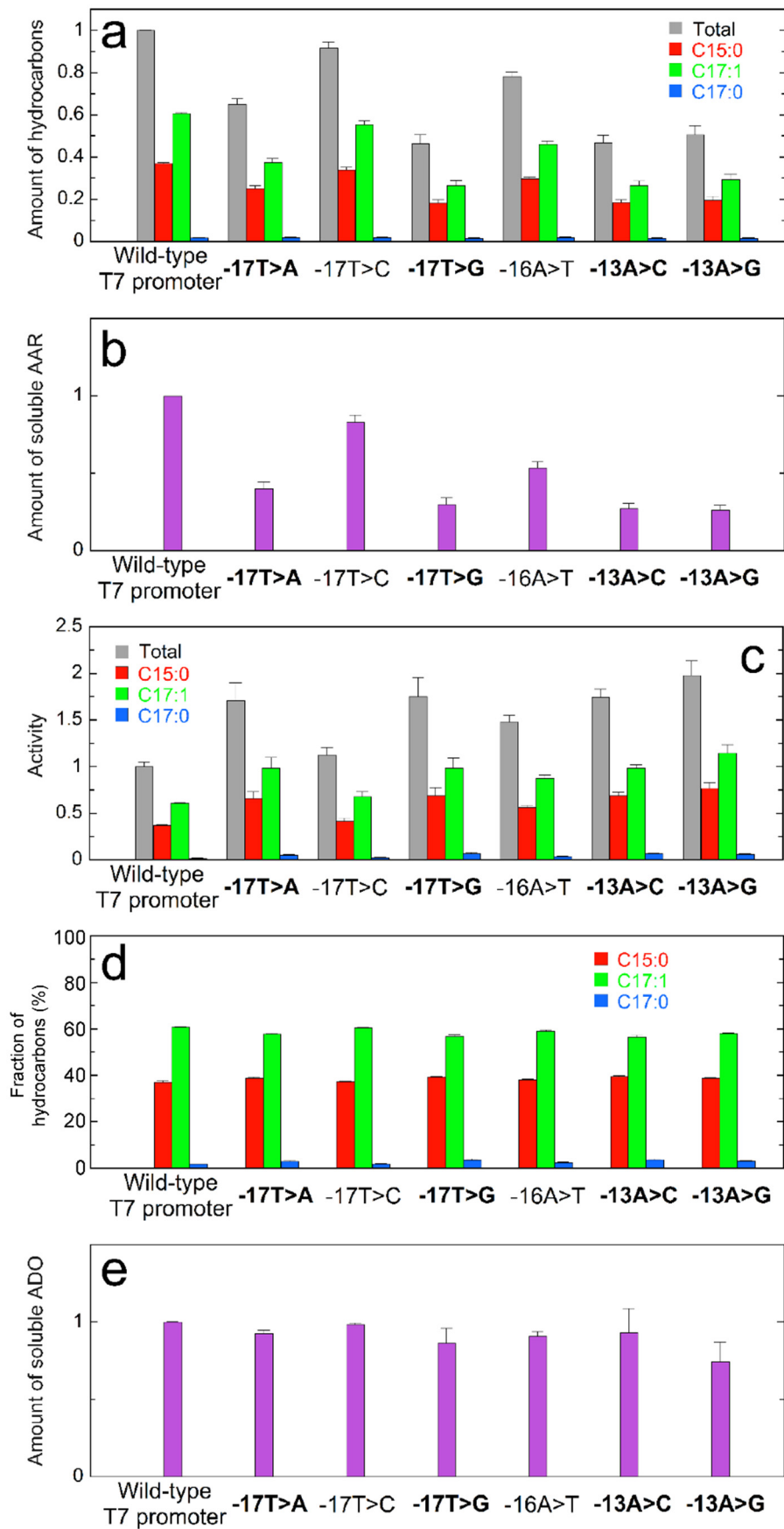


図 10. 様々なラン藻由来 AAR のウェスタンブロッティングの結果

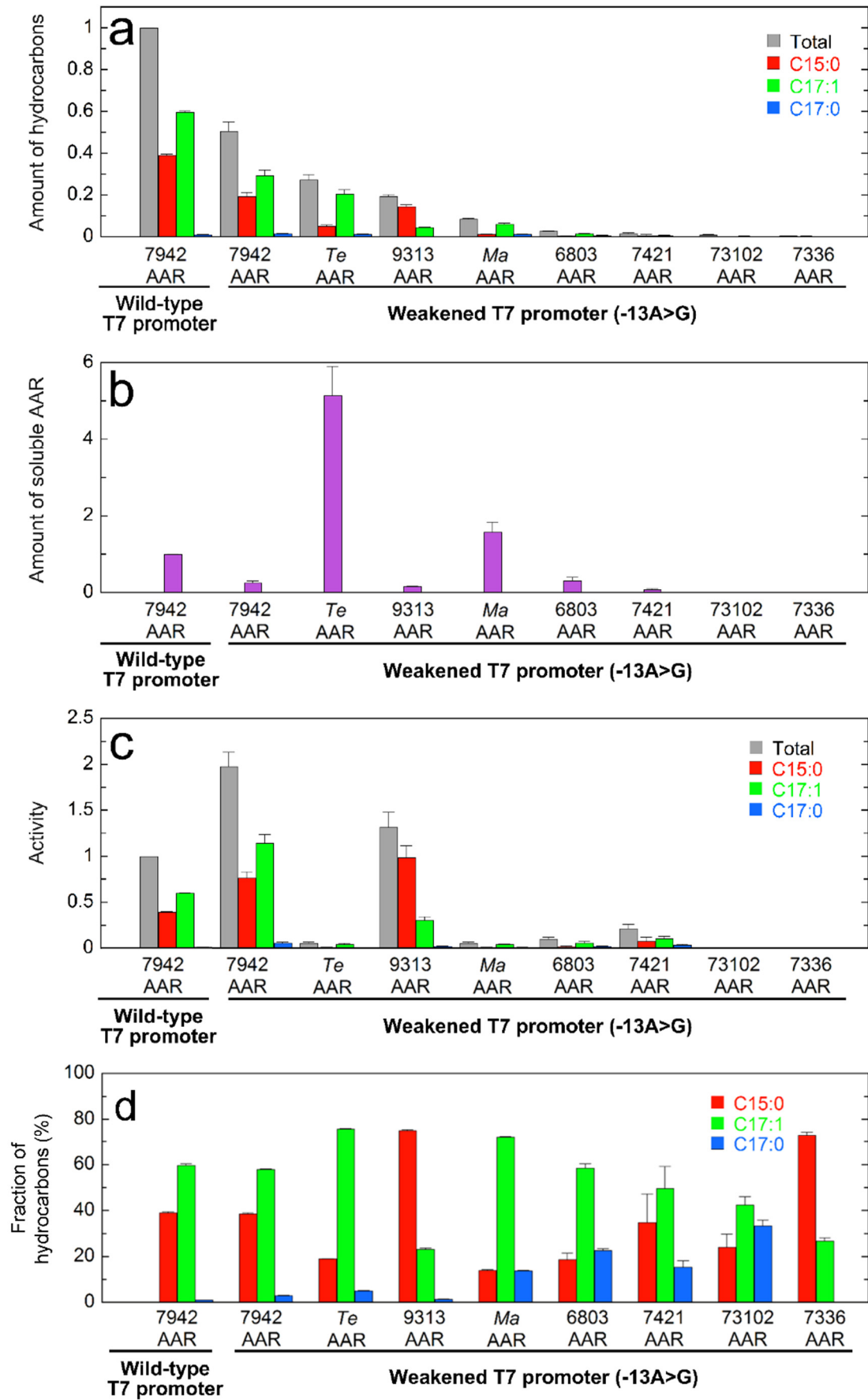
73102ADO と 8 種類の AAR をそれぞれ導入した大腸菌について、破碎後に遠心することで上清 (S) と沈殿 (P) に分けた。それぞれのサンプルは 10  $\mu$ l 分流した。AAR、AD のバンドは黒い矢印で示している。空ベクターである pETDuet-1 は、Control と一緒に流した。(a) バンドの検出反応を短時間 (約 2 分)で行ったときの結果。7421AAR、73102AAR、7336AAR の上清のバンドは検出限界を超えており、確認できなかった。(b) バンドの検出反応を長時間 (約 10 分) 行なったときの結果。各 AAR の上清のバンドが非常に薄い、検出できた。検出された各レーンのバンドを定量した結果は図 9 に示した。



## 図 11. 7942AAR の発現抑制株における比較

7942AAR の上流にある T7 プロモーターに一塩基変異を導入し、AAR の発現量を抑制した株を作製した。6 種類の発現抑制株に対して、炭化水素合成量、可溶性発現量、活性そして基質特異性を比較した。野生型 T7 プロモーターとは変異が導入されていないものを示し、(d) のグラフを除いて、この値を 1 として規格化した。変異株の表記について、-17T>A の場合、T7 プロモーターの終わりを-1 として、上流側に数えて 17 番目にある T を A に置換したことを示す。測定は 5 回行った。(a) 縦軸は炭化水素合成量を表す。(b) 縦軸は AAR の可溶性発現量を示す。この可溶性発現量が 50 %以下に低下した発現抑制株を太字で示す。(c) 縦軸は AAR の活性を表す。(d) 縦軸は、合成された炭化水素種の割合を表す。これは、AAR の基質特異性を意味する。(e) 73102ADO の可溶性発現量を示す。

また詳細については、図 8、9 と同様である。

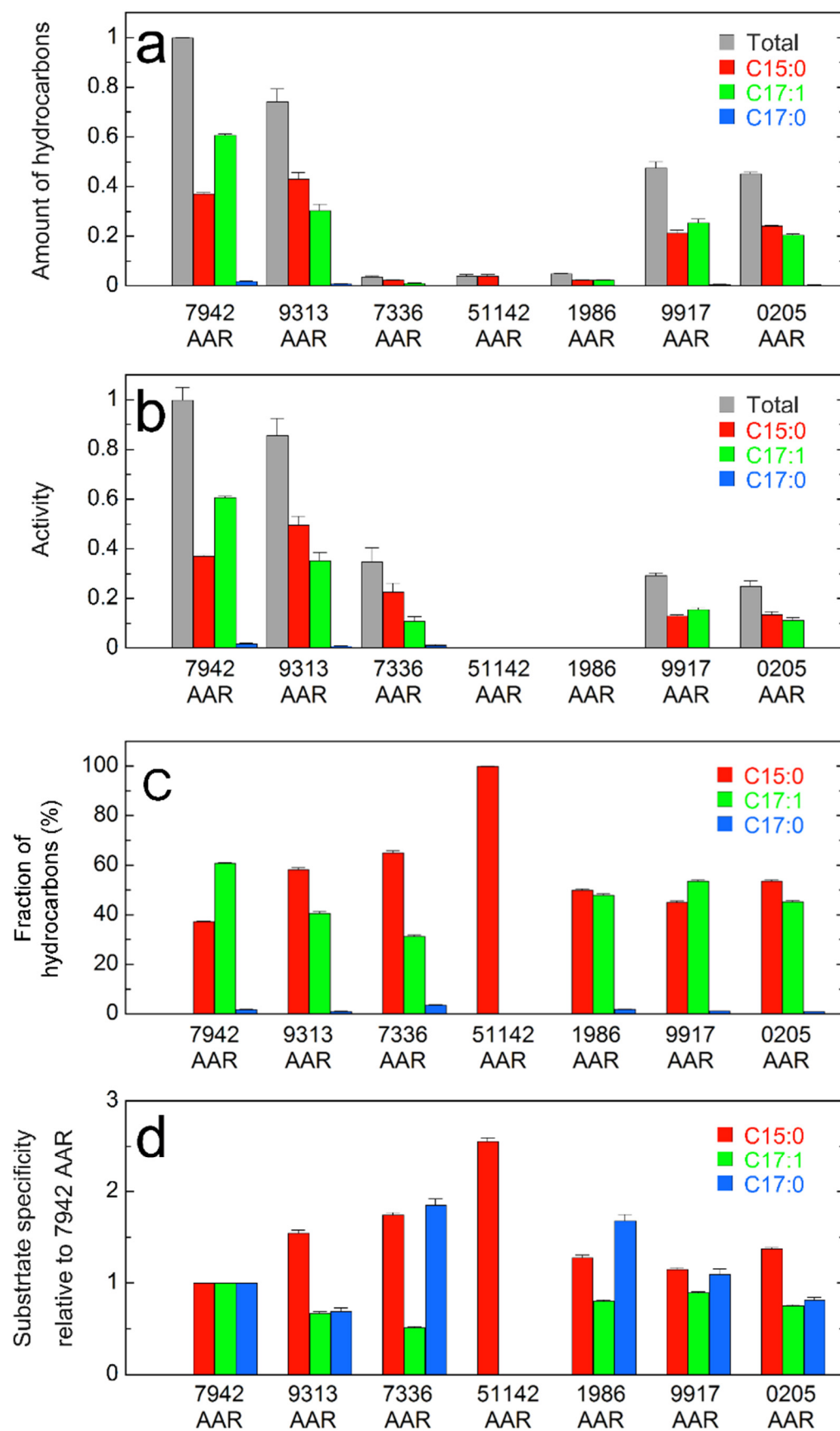




## 図 12. 発現抑制された様々なラン藻由来 AAR 間での比較

AAR のすぐ上流にある T7 プロモーターに-13A>G を変異導入し、それぞれの AAR の発現を抑制した株で比較を行った結果。測定は 3 回ずつ行った。(a) 縦軸は炭化水素合成量を表す。(b) 縦軸は AAR の可溶性発現量を示す。(c) 縦軸は AAR の活性を表す。(d) 縦軸は、合成された炭化水素種の割合を表す。これは、AAR の基質特異性を意味する。

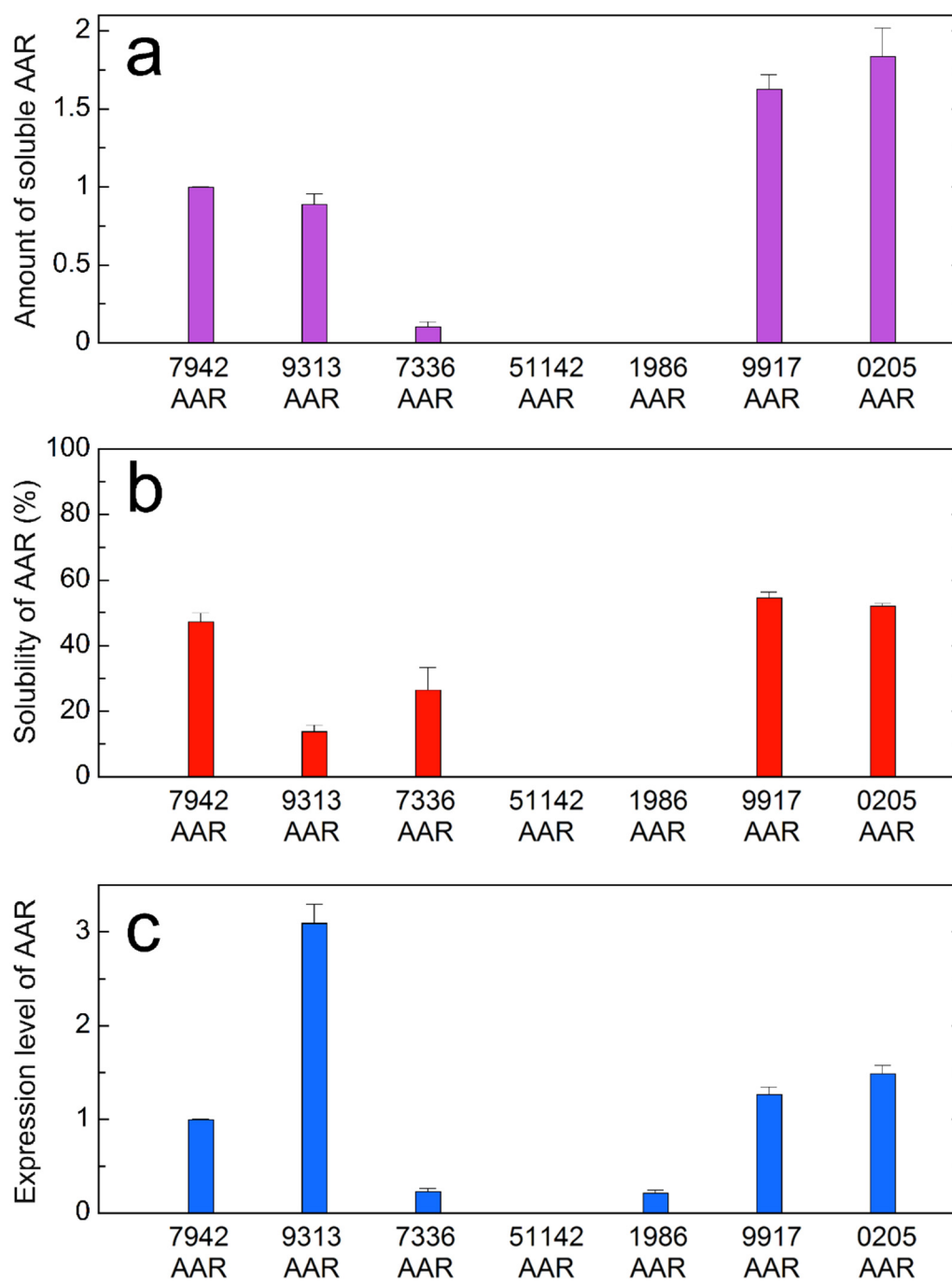
(d) を除いて、野生型 T7 プロモーターで発現された 7942AAR (一番左) の測定値を 1 として、規格した。また詳細については、図 8、9 と同様である。



### 図 13. 海洋性ラン藻由来 AAR の比較（炭化水素合成量、活性、基質特異性）

測定は 3 回ずつ行った。(a) 縦軸は炭化水素合成量を表す。(b) 縦軸は活性を表す。51142AAR、1986AAR は上清のバンドが検出できなかったため、可溶性発現量が算出できなかった。このため、活性の算出もできなかった。(c, d) 縦軸は、合成された炭化水素種の割合を表す。これは、AAR の基質特異性を意味する。

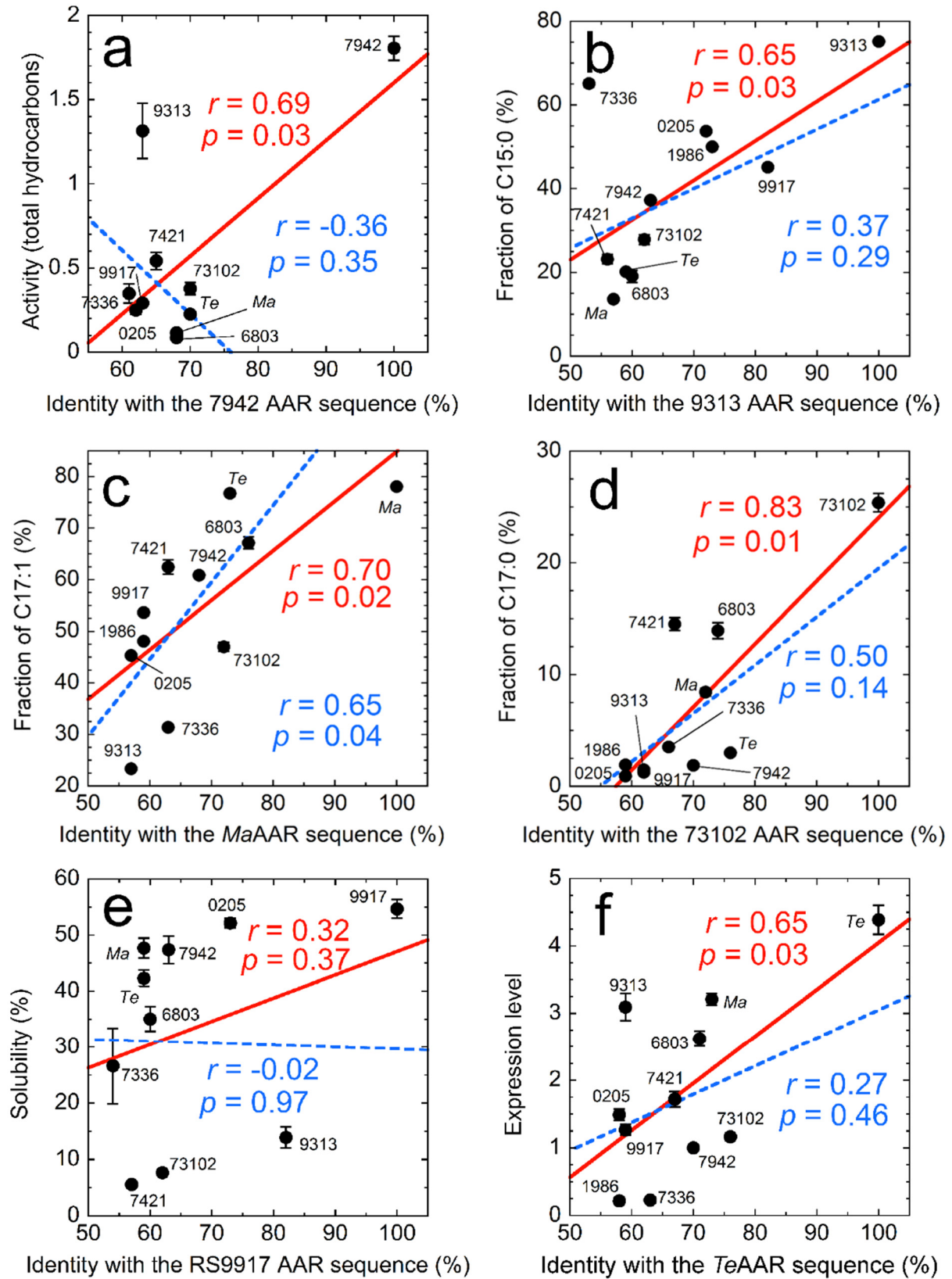
(c) を除き、7942AAR の値を 1 として規格した。また、7942AAR は淡水性ラン藻由来 AAR だが、今回は比較のために載せた。また詳細については、図 8 と同様である。



#### 図 14. 海洋性ラン藻由来 AAR の比較（可溶性発現量、可溶性度、全発現量）

測定は 3 回ずつ行った。(a) 縦軸は可溶性発現量を表す。(b) 縦軸は可溶性度を表す。(c) 縦軸は全発現量を表す。

(b)を除き、7942AAR の値を 1 として規格した。また、7942AAR は淡水性ラン藻由来 AAR だが、今回は比較のために載せた。また詳細については、図 9 と同様である。



## 図 15. 測定結果と各 AAR のアミノ酸配列一致度との相関関係

(a) 12 種類の AAR における測定結果において、活性を縦軸に、7942AAR のアミノ酸配列との一致度を横軸にプロットした。(b, c, d) C15:0 の割合 (b)、C17:1 の割合 (c)、C17:0 の割合 (d) を縦軸に、9313AAR、*Ma*AAR、73102AAR のアミノ酸配列との一致度を横軸にそれぞれプロットした。(e, f) AAR の可溶性度 (e)、全発現量 (f) を縦軸に、9917AAR、*Te*AAR のアミノ酸配列との一致度を横軸にそれぞれプロットした。

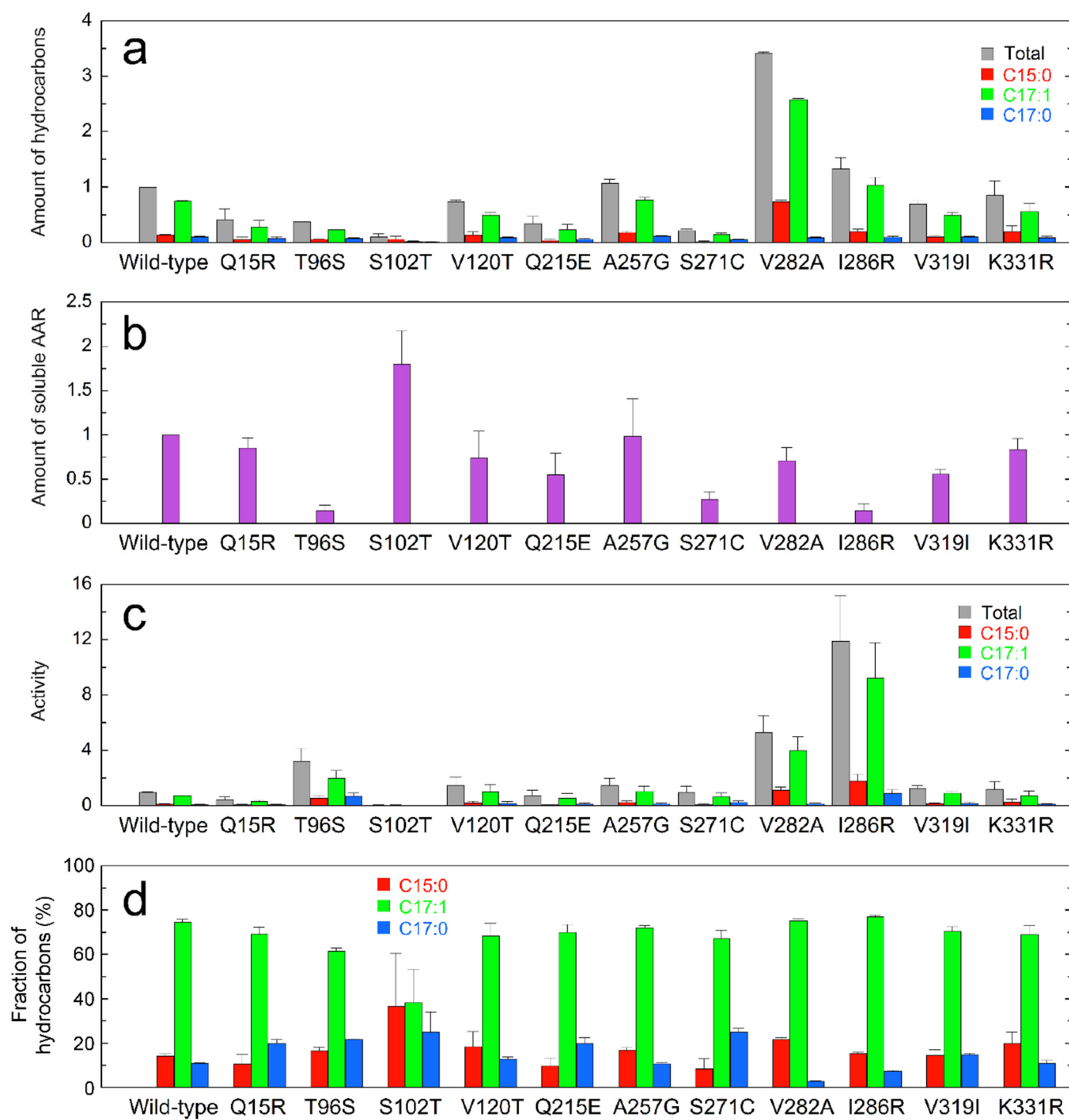
プロットを線形近似することで相関係数  $r$  と  $p$  値を算出した。AAR 全てのデータを用いて算出した結果を赤色（及び赤色の実線）で示し、高い測定値を示した AAR のデータを 1 点除いて計算した結果を青色（及び青色の点線）で示す。また、各 AAR との配列一致度については表 1 を参照。

表 2. AAR の特性間における相関関係

No	Parameter 1	Parameter 2	Correlation coefficient	
			<i>r</i>	<i>P</i>
1	Amount of hydrocarbons	AAR activity	0.60	0.07
2	Amount of hydrocarbons	Amount of soluble AAR	0.56	0.06
3	Amount of hydrocarbons	Solubility of AAR	0.53	0.09
4	Amount of hydrocarbons	Expression level of AAR	0.55	0.06
5	Amount of hydrocarbons	Fraction of C15:0	−0.14	0.67
6	Amount of hydrocarbons	Fraction of C17:1	0.29	0.36
7	Amount of hydrocarbons	Fraction of C17:0	−0.40	0.20
8	AAR activity	Amount of soluble AAR	−0.37	0.30
9	AAR activity	Solubility of AAR	−0.14	0.71
10	AAR activity	Expression level of AAR	−0.18	0.62
11	AAR activity	Fraction of C15:0	0.42	0.23
12	AAR activity	Fraction of C17:1	−0.38	0.28
13	AAR activity	Fraction of C17:0	−0.25	0.48
14	Amount of soluble AAR	Solubility of AAR	0.68	0.02
15	Amount of soluble AAR	Expression level of AAR	0.83	0.01
16	Amount of soluble AAR	Fraction of C15:0	−0.54	0.07
17	Amount of soluble AAR	Fraction of C17:1	0.67	0.02
18	Amount of soluble AAR	Fraction of C17:0	−0.14	0.67
19	Solubility of AAR	Expression level of AAR	0.27	0.42
20	Solubility of AAR	Fraction of C15:0	−0.14	0.69
21	Solubility of AAR	Fraction of C17:1	0.35	0.28
22	Solubility of AAR	Fraction of C17:0	−0.43	0.19
23	Expression level of AAR	Fraction of C15:0	−0.54	0.07
24	Expression level of AAR	Fraction of C17:1	0.60	0.04
25	Expression level of AAR	Fraction of C17:0	0.08	0.80
26	Fraction of C15:0	Fraction of C17:1	−0.96	0.01
27	Fraction of C15:0	Fraction of C17:0	−0.58	0.05
28	Fraction of C17:1	Fraction of C17:0	0.33	0.29



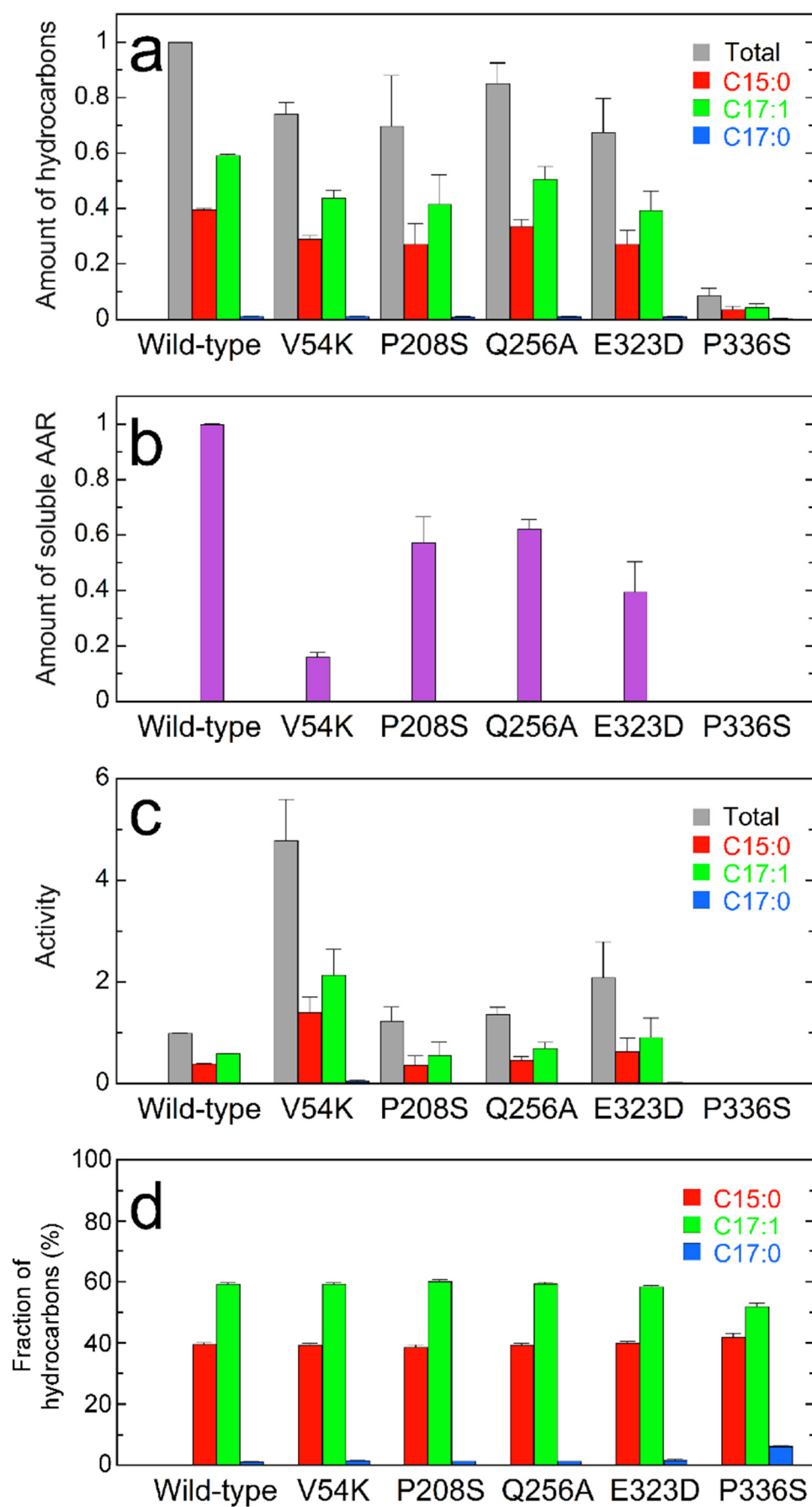
\*本章で比較した計 12 種類の AAR の測定結果を使用。活性については、算出できなかった 51142AAR、1986AAR のデータは省いて算出。



## 図 16. 6803AAR 変異体の測定結果

測定は 3 回ずつ行った。(a) 縦軸は炭化水素合成量を表す。(b) 縦軸は可溶性発現量を表す。(c) 縦軸は活性を表す。(d) 縦軸は、合成された炭化水素種の割合を表す。これは、AAR の基質特異性を意味する。

(d)を除き、野生型の値を 1 として規格化した。また詳細については、図 8、9 と同様である。



## 図 17. 7942AAR 変異体の測定結果

測定は 3 回ずつ行った。(a) 縦軸は炭化水素合成量を表す。(b) 縦軸は可溶性発現量を表す。(c) 縦軸は活性を表す。(d) 縦軸は、合成された炭化水素種の割合を表す。これは、AAR の基質特異性を意味する。

(d)を除き、野生型の値を 1 として規格した。また詳細については、図 8、9 と同様である。

# III. 様々なラン藻由来 ADO の比較

## III-1. 序論

ラン藻は、AAR と ADO という 2 つの酵素を用いた 2 段階反応によってアルカンを合成する[10]。しかし AAR と ADO の酵素活性は非常に低いため、ラン藻内でのアルカン合成をバイオエネルギー生産に実用化するためには、これらの酵素を高活性化させることが必要である。

Schirmer *et al.* (2010)では、AAR と ADO を大腸菌内で共発現させてアルカンを合成させた際、様々なラン藻に由来する ADO が合成する炭化水素量を GC-MS で測定して比較した。その結果、73102ADO を用いたときに炭化水素合成量が最大であったと報告している[10]。しかし、その実験では酵素 ADO の発現量を定量していなかったため、炭化水素合成量を ADO の可溶性発現量で割り算して、酵素活性を算出することができおらず、ADO の正確な活性値は明らかではなかった。したがって、73102ADO が本当に最も高活性なのかどうかも未解明である。ほかにも、*in vivo* で ADO の活性を比較している研究例はいくつか存在するが、どれも炭化水素合成量をそのまま酵素活性として評価しており、酵素 ADO の発現量については考慮されていない[27, 40-43]。

そこで本研究では、第 I 章で AAR の酵素活性を定量したのと同じ方法を用いて今度は ADO の活性を評価した。そして様々なラン藻由来 ADO の活性を比較し、最も高活性な ADO を探索した。また得られた結果から、ADO の機能発現に重要なアミノ酸残基を同定するための変異解析で用いる変異体候補などを決定した (IV 章を参照)。

ADO の酵素活性を *in vitro* で測定する場合、基質である長鎖アルデヒドが水溶液中でミセルを形成してしまい、ミセルからの解離が律速となって正しい活性測定が行えないことが報告されている[23]。そこで、本研究では大腸菌内で酵素 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、ADO の活性を測定することとした。AAR は ADO と結合して複合体を形成することが報告されており[12]、これによって AAR が合成した長鎖アルデヒドがミセルを形成せずに、効率的に ADO に受け渡され、正確な活性測定が可能になると期待される。

## III-2. 方法

基本的な実験方法は、I-2 での方法と同様である（図 3b）。AAR・ADO 共発現用プラスミドの構築は、次のようにして行った。

先行研究によって構築済みであった pRD の 73102ADO 遺伝子の部位を様々なラン藻由来 ADO 遺伝子（大腸菌での発現用に塩基配列を最適化したもの）に置換したプラスミドを、次のようにして構築した。

まず、様々な ADO のアミノ酸配列を NCBI のウェブサイトから入手した。この遺伝子を pRD プラスミドのマルチクローニングサイト 2（*NdeI*–*AvrII* 間）に挿入するために、両端に制限酵素サイトを挿入した。C 末端側にはウェスタンブロッティングで検出するために、Gly-Ser-Ser-Gly アンカーと His×6-tag を付加した。大腸菌内での発現に最適な塩基配列を、DNAWorks サーバー (<https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/>) を用いて設計した。その後、人工遺伝子の合成をユーロフィン株式会社に外注した。設計された ADO 遺伝子には使用頻度の少ないレアコドンなどは含まないように設計した。また、Espresso サーバーで確認すると、どの ADO も大腸菌内で発現すると予測された。合成された ADO 遺伝子断片を、KOD-Plus-Neo（TOYOBO）を用いた PCR で増幅し、Fast Gene Gel/PCR extraction kit（日本ジェネティクス）で精製した。これを、同様に増幅した pRD プラスミド（*NdeI*–*AvrII* 間を欠損したもの）に In-Fusion HD Cloning Kit（Clontech）を用いて挿入した。さらに、I-2 に記載した方法でプラスミドの増幅、精製、塩基配列の確認を行った。

## III-3. 結果

### III-3-1. 比較する ADO の選択と発現系の構築

#### (1) ADO のアミノ酸配列を元にした系統樹（図 26）

ADO のアミノ酸配列を元にして、ラン藻 134 種類を由来とする ADO の系統樹を作製した。その結果、AAR の系統樹と同様に、3 つのグループに分かれた。グループ 1 は淡水性ラン藻由来 ADO が多く、グループ 2 では海洋性ラン藻由来 ADO が多く含まれていた。ただ *Synechococcus elongatus* PCC 7942 については、AAR の系統樹では

グループ 2 に属していたが、ADO の系統樹ではグループ 1 に属した。これは *Synechococcus elongatus* PCC 7942 が系統的にちょうど淡水性と海洋性ラン藻の中間に位置しているためだと考えられる。

## (2) 比較する ADO の選択と発現系の構築

本研究で用いる ADO として、AAR の活性比較のときに用いたのと同じラン藻 8 種類に由来する ADO を選んだ (73102ADO、7421ADO、7942ADO、9313ADO、*Te*ADO、6803ADO、7336ADO、*Microcystis aeruginosa* PCC 9443 由来 ADO (9443ADO))。さらに、先行研究より活性が高いといわれる *Cyanothece* sp. PCC 7425 由来 ADO (7425ADO) と *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 126/8 由来 ADO (*Pa*ADO) の 2 つを加えた[11, 27]。これら計 10 個の ADO のアミノ酸配列は互いに 57–80% の配列一致度であった (表 3)。また、保存されているアミノ酸部位は、配列全体に偏りなく散らばって存在していた (図 27)。

これら 10 種類の ADO について、AAR とともに大腸菌内で共発現させるためのプラスミドを構築した (詳細は「III-2. 方法」を参照)。ADO と共発現させる AAR は、第 I 章の実験において最も高活性だった 7942AAR を使用した。

本研究では、AAR と ADO を大腸菌内で共発現させ、AAR が合成するアルデヒドを基質として ADO が合成する炭化水素の量を定量し、ADO 活性を測定した。この方法で ADO 活性を正確に定量するためには、AAR、ADO による 2 段階反応において ADO の反応が律速段階となる必要がある。第 I 章の結果から、野生型の T7 プロモーターを用いた pRD プラスミドによる実験では、ADO による触媒反応が律速段階であったため、このアッセイ系を用いて ADO の酵素活性を定量可能である。

## III-3-2. 大腸菌を用いた様々なラン藻由来 ADO の比較

10 種類の AAR・ADO 共発現プラスミドで大腸菌を形質転換し、それぞれを 16 時間培養後に、各培養液中の炭化水素合成量、大腸菌内の ADO の可溶性発現量、活性、基質特異性、可溶性度、及び、全発現量を調べた。この測定は計 8 回行い ( $n = 8$ )、平均値と標準誤差を求めた。

### (1) 炭化水素合成量 (図 28a)

GC-MS の測定結果より、AAR の時と同様に、全種類の大腸菌形質転換体で、3 種類の炭化水素 (C15:0、C17:1、C17:0) が検出された。炭化水素合成量 (3 種類の炭化水素量の合計値) は、*Te*ADO を発現させた大腸菌で最大であり、合成量が大きい順に



$TeADO > 7421ADO = 73102ADO > 7425ADO > 9313ADO > 7942ADO > 9443ADO > PaADO > 6803ADO > 7336ADO$  であった。 $TeADO$  は、2 番目に大きな  $7421ADO$  や  $73102ADO$  より 1 割ほど大きく、 $6803ADO$ 、 $7336ADO$  での炭化水素合成量からは約 5 倍大きかった。

## (2) ADO の可溶性発現量 (図 29a、30)

炭化水素合成量は ADO の活性と可溶性発現量の両方によって左右される。ADO の可溶性発現量についてウェスタンブロッティングによって調べた結果、 $7421ADO$  が他の ADO に比べて非常に高いことが分かった。次に可溶性発現量が多い順に  $7421ADO > TeADO > 7336ADO > 73102ADO > 7425ADO > 9443ADO > 9313ADO > PaADO > 6803ADO > 7942ADO$  であった。特に  $6803ADO$  や  $7942ADO$  は  $7421ADO$  と比べて発現量は約 1 % と非常に低かった。

またウェスタンブロッティングの結果より、 $7942AAR$  の可溶性発現量にばらつきが見られた (pRD における  $7942AAR$  の可溶性発現量を 100 % としたとき、80–175 % ほどのばらつきであった ; 図 30)。しかし、ADO 活性に影響はないと考えられる。第 I 章の結果より、pRD における  $7942AAR$  の可溶性発現量が 1/3 (33 %) に低下すると、炭化水素合成量は 1/2 にまで低下した (図 11)。このため、 $7942AAR$  の可溶性発現量が 80% 以上の時、最低でも  $73102ADO$  における炭化水素合成量の 1.2 倍までは、炭化水素合成に必要な基質であるアルデヒドが供給されていると考えられる。本実験において、炭化水素合成量が最大であった  $TeADO$  で  $73102ADO$  に比べて 1.1 倍であったため、ADO 活性を測定する上で、アルデヒドの供給は十分であると考えられる。

## (3) ADO の酵素活性 (図 28b)

炭化水素合成量を可溶性発現量で割ることによって ADO の活性を算出した。その結果 ADO 間で活性は大きく異なっていた。 $7942ADO$  の活性が最大であり、大きい順に  $7942ADO > 6803ADO > 9313ADO > 73102ADO > PaADO > 7425ADO > 9443ADO > TeADO > 7421ADO > 7336ADO$  であった。 $7942ADO$ 、 $6803ADO$  は可溶性発現量が非常に低い、活性は高かった。逆に  $TeADO$ 、 $7421ADO$ 、 $7336ADO$  は可溶性発現量が高い、活性は非常に低かった。

## (4) ADO の可溶性度、全発現量 (図 29b, c)

ウェスタンブロッティングによって、ADO の可溶性度及び全発現量についても調べた。可溶性度についてはどの ADO においても 70 % 以上であり、AAR (全て 50 %

以下) と比べて高かった (図 29b)。特に *Te*ADO については 88 %で最大であったが、この理由として好熱性のラン藻由来 ADO であり、熱安定性の高いタンパク質であるためだと考えられる。一方で 7421ADO については 70 %で最低であったが、これは非常に発現量が高く (図 29c)、ミスフォールディングが起こりやすかったためだと考えられる。

#### (5) ADO の基質特異性 (図 28c, d)

合成される炭化水素種の割合は、10 種類の ADO 全てにおいて C17:1 が大きかった (図 28c)。このため、どの ADO についても炭素数 18 (C18) のアルデヒドに対して高い基質特異性を示した。特に 9443ADO と 6803ADO は C17:1 の割合が 70 %と、他の ADO よりも大きかった。一方で *Te*ADO と 9313ADO では C15:0 の割合が 40 %以上で、他の ADO よりも C15:0 を合成する割合が高かった。C17:0 については AAR の時と同様に、どの ADO についても微量にしか合成されていなかったが、9313ADO では 73102ADO に比べて C17:0 の割合が 2.5 倍大きかった (図 28d)。

### III-3-3. 様々なラン藻由来 ADO 間での相関解析

#### (1) ADO の特性と配列一致度のあいだの相関 (図 31)

AAR の時と同様に、活性、基質特異性、可溶性などを決定しているアミノ酸残基を特定するため、これらの値とアミノ酸配列との対応関係を調べた。具体的には、活性などの値が最も高かった ADO との配列一致度を横軸にとり、縦軸にその値をプロットして相関解析を行った。

その結果、ADO の特性と配列類似性とのあいだに相関は見られなかった。一見すると高い相関があるように見えるものもあったが、突出した 1 つのデータ点を除去するだけで相関係数  $r$  が大幅に減少したことから、有意な相関はないと言えた。この結果は、ADO の特性が局所的なアミノ酸配列の違いによって決定されていることを示唆している。本実験で比較した ADO 間において酵素活性は大きく異なっていたが、この活性の差は ADO の非保存部位のうち、限られたアミノ酸残基のみによって左右されていると考えられる。

#### (2) ADO の特性間での相関 (図 32)

10 種類の ADO の比較によって得られた炭化水素合成量、活性、可溶性発現量、可溶性度、全発現量とのあいだでの相関関係を調べた。その結果、強い相関 ( $|r| > 0.7$ )

を示したのは、可溶性発現量と全発現量、可溶性発現量と可溶性度、可溶性度と全発現量の3つであった（それぞれ  $r = 0.99$ 、 $-0.74$ 、 $-0.76$ ；図 32h, i, j）。しかし、どれも 7421ADO のデータが突出していたため、7421ADO のデータを除いても高い相関を示したのは可溶性発現量と全発現量のみであった（ $r = 0.99$ ；図 32h）。

## III – 4. 議論

10 種類の ADO を比較した結果、特に炭化水素合成量、可溶性発現量（あるいは全発現量）、活性において ADO 間で大きく異なっていた。

### III – 4 – 1. ADO の活性と可溶性度

本研究では、7942AAR と様々なラン藻由来 ADO を大腸菌内で共発現させ、炭化水素を合成させた。そして、炭化水素合成量を可溶性発現量によって割ることで、ADO の酵素活性を算出した。その結果、酵素活性は 7942ADO が最大であった（図 28）。ただ可溶性発現量が低かったため、炭化水素合成量は今回比較した ADO の中でちょうど中間くらいに位置する量であった（図 28、29）。

7421ADO、TeADO では活性は低い一方、可溶性発現量が高かったため、炭化水素合成量は大きかった。特に 7421ADO の可溶性発現量は非常に高かったため、活性が最低であっても、炭化水素合成量は大きかった。また TeADO では TeAAR のときと同様の結果を示したため、もしかすると 37℃ よりも高い培養温度で実験を行うと活性が向上する可能性が考えられる。そして、73102ADO では炭化水素合成量が高いことは報告されていたが[10, 42, 44]、これが高い酵素活性のせいではなく、活性と可溶性発現量の両方が中程度であることに起因していることを本実験で初めて明らかにした。

また ADO の活性と配列一致度とのあいだには相関は見られなかったことから（図 31）、ADO 間での活性の程度には局所的なアミノ酸配列の違いが寄与していることが示唆された。このため次章で紹介するが、7421ADO（活性が低い）のアミノ酸配列を 7942ADO（活性が高い）のアミノ酸配列に近づけるような一アミノ酸変異を行い解析することによって、活性に重要なアミノ酸残基を特定できることが期待される。

### III-4-2. ADO の基質特異性

基質特異性については、どの ADO も C17:1 の割合のほうが C15:0 よりも大きかった (図 28c, d)。しかし *Te*ADO と 9313ADO では他の ADO に比べると、C15:0 の割合が増加していた。これは 7942ADO よりも 9313ADO のほうが、基質を結合させるためにタンパク質分子内に存在する空間 (キャビティー) が狭いために、より短い基質を好むのかもしれない。

このことを確認するため、7942ADO と 9313ADO の X 線結晶構造は既知であり (9313ADO 構造の PDB ID は 2OC5, 4TW3 など[15, 20] ; 7942ADO 構造の PDB ID は 4RC8 など[16])、キャビティーの大きさを PDB 構造から計算するサーバーである POCASA (<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/>) を用いて計算した結果、9313ADO と 7942ADO が持つキャビティーの体積はそれぞれ 160 Å<sup>3</sup> と 170 Å<sup>3</sup> であり、9313ADO の方が分子内の空間が狭かった。したがって、ADO の基質特異性はその立体構造から理解することができると考えられる。ADO の立体構造を見ながら、基質結合部位のサイズを改変させるようなアミノ酸置換を合理的に設計することにより、ADO の基質特異性を変換可能なことを示唆している[19-21]。

AAR では、海洋性ラン藻由来の 9313AAR と 7336AAR が短い炭素鎖の基質に高い親和性を示していた (図 8, 13)。しかし 9313ADO は短い炭素鎖の基質 (主に C16) にも高い親和性を示したのに対し、7336ADO は長い炭素鎖の基質 (主に C18) に高い親和性を示した。それゆえ ADO では海洋性と淡水性間で系統的にはアミノ酸配列の違いが見られたが、基質特異性については海洋性と淡水性とのあいだで違いは見られなかった。

### III-4-3. AAR と ADO の相互作用

I-4-1 でも述べたとおり、AAR と ADO が複合体を形成することが知られている[12]。また AAR は 37°C の条件下で、ADO 存在下の場合、ADO 非存在下の場合と比べて活性が増大し、生成物であるアルデヒドの合成量が増加することが報告されている[12]。37°C の場合、AAR の可溶性度は低い (50 % 以下 ; 図 9b)、ADO の可溶性度は高い (70 % 以上 ; 図 29b) という本研究の結果を合わせて考えると、AAR は ADO と複合体を作ることによって可溶性が増大し、その結果として AAR 活性が増大したのではないかと考えられる。

AAR の活性を比較した実験では、73102ADO と 73102AAR を共発現させたペアよりも、73102ADO と 7942AAR のペアの方が炭化水素合成量と活性が大きかった (図

8)。一方で 7942AAR に対しては、活性は 7942ADO が最も高かったが、炭化水素合成量は *Te*ADO が最大だった (図 28)。したがって、必ずしも同じ種由来の AAR と ADO のペアが炭化水素合成量を最大にするペアではないということが示唆された。AAR と ADO の相互作用は両酵素間の基質の受け渡しの効率に大きく関与するため、今後、結合の強さを ITC などを用いて定量的に測定していくことは重要である。

### **III-4-4. ADO の更なる高機能化へ向けて**

本研究では、ラン藻 10 種類に由来する ADO の活性を比較した結果、7942ADO が最も高活性であることや、7421ADO、*Te*ADO の可溶性発現量と炭化水素合成量が大きいことなどを明らかにした (図 28、29)。

今後は、進化分子工学的手法による経験的なタンパク質設計や、立体構造に基づく合理的なタンパク質設計により、高活性であった 7942ADO の可溶性発現量を増大させたり、活性が中程度であった 73102ADO (炭化水素合成量は大きい) などを高活性化していくことが重要である。ADO については立体構造も既知であり、また次章で紹介する 7421ADO の変異解析によって ADO の機能発現に重要なアミノ酸残基がいくつか明らかになったため、今後は合理的なタンパク質設計法による ADO の高機能化が期待される。

ラン藻による炭化水素生産を実用化する際に重要とされるのは、実際に合成される炭化水素の量である。今回、活性が最大であった 7942ADO は可溶性発現量が低かったために炭化水素合成量はあまり高くなかった。一方で低活性ではあったが可溶性発現量が比較的大きかった *Te*ADO は炭化水素合成量が最大であった。また、7421ADO は非常に低活性ではあるが、可溶性発現量が非常に多かったために、炭化水素合成量も多くなった。したがって、今後、細胞内での炭化水素合成量を最大化させるためには、酵素活性だけでなく、可溶性度と発現量も同時に最適化させることが必要かもしれない。

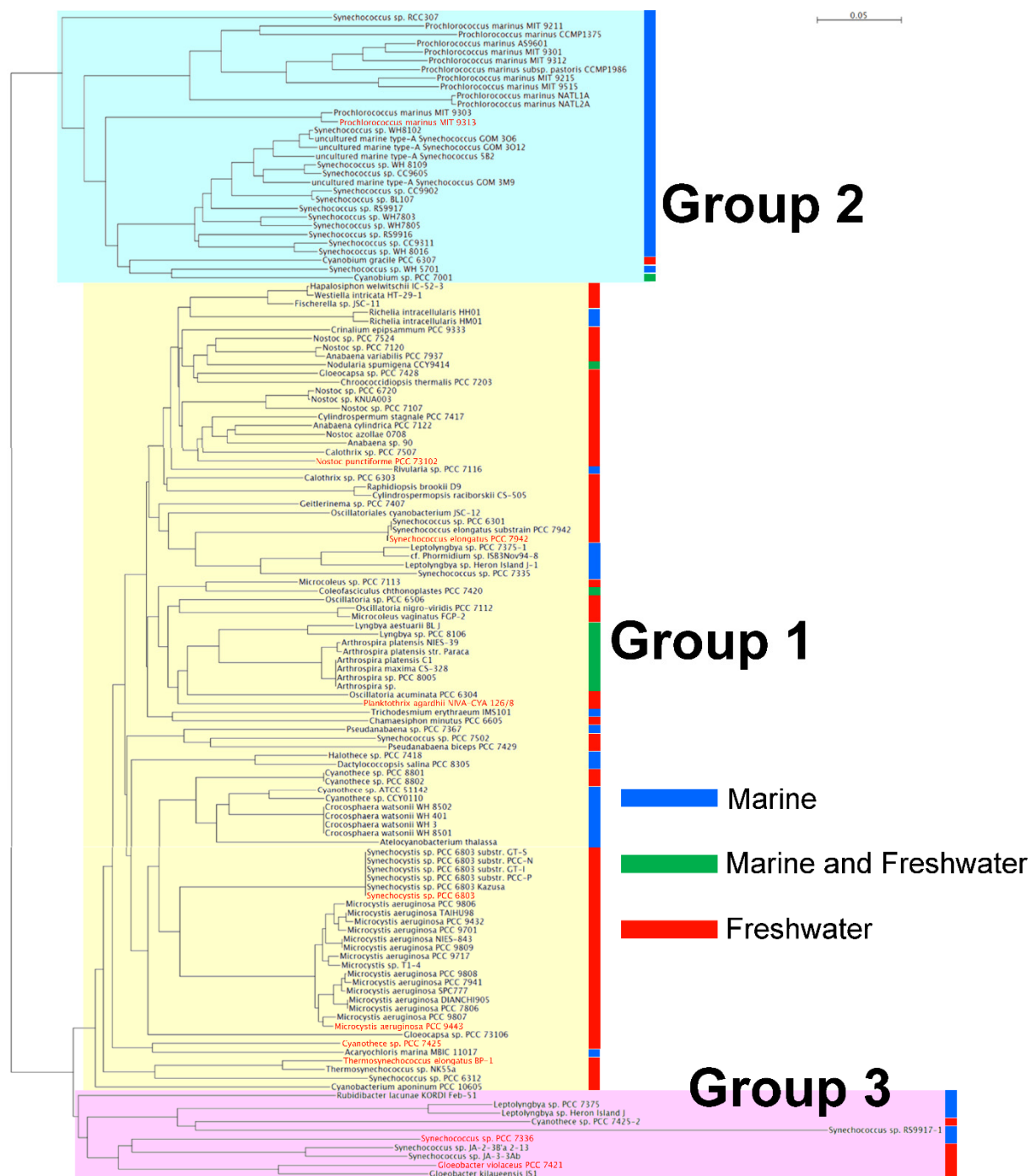


図 26. ADO の系統樹

ADO のアミノ酸配列をもとに、134 種類のラン藻由来 ADO からなる系統樹を作製した。大きく 3 つのグループに分かれ、グループ 1 では淡水性ラン藻（赤いバーで示す）が多く、グループ 2 では海洋性ラン藻（青いバーで示す）が多いことが分かる。また今回、測定用のサンプルに選んだラン藻は赤字で示す。

表 3. 様々なランソ薬由来 ADO 間でのアミノ酸配列一致度 (%)

	Group	7942	6803	9313	73102	<i>Pa</i>	7425	9443	<i>Te</i>	7421	7336
	ADO	ADO	ADO	ADO	ADO	ADO	ADO	ADO	ADO	ADO	ADO
7942ADO	1	–	72	60	73	77	71	75	70	63	65
6803ADO	1	72	–	68	75	73	73	80	74	65	63
9313ADO	2	60	68	–	62	64	66	65	65	57	57
73102ADO	1	73	75	62	–	78	72	79	76	63	67
<i>Pa</i> ADO	1	77	73	64	78	–	75	75	70	64	64
7425ADO	1	71	73	66	72	75	–	73	73	66	65
9443ADO	1	75	80	65	79	75	73	–	73	65	64
<i>Te</i> ADO	1	70	74	65	76	70	73	73	–	64	62
7421ADO	3	63	65	57	63	64	66	65	64	–	66
7336ADO	3	65	63	57	67	64	65	64	62	66	–

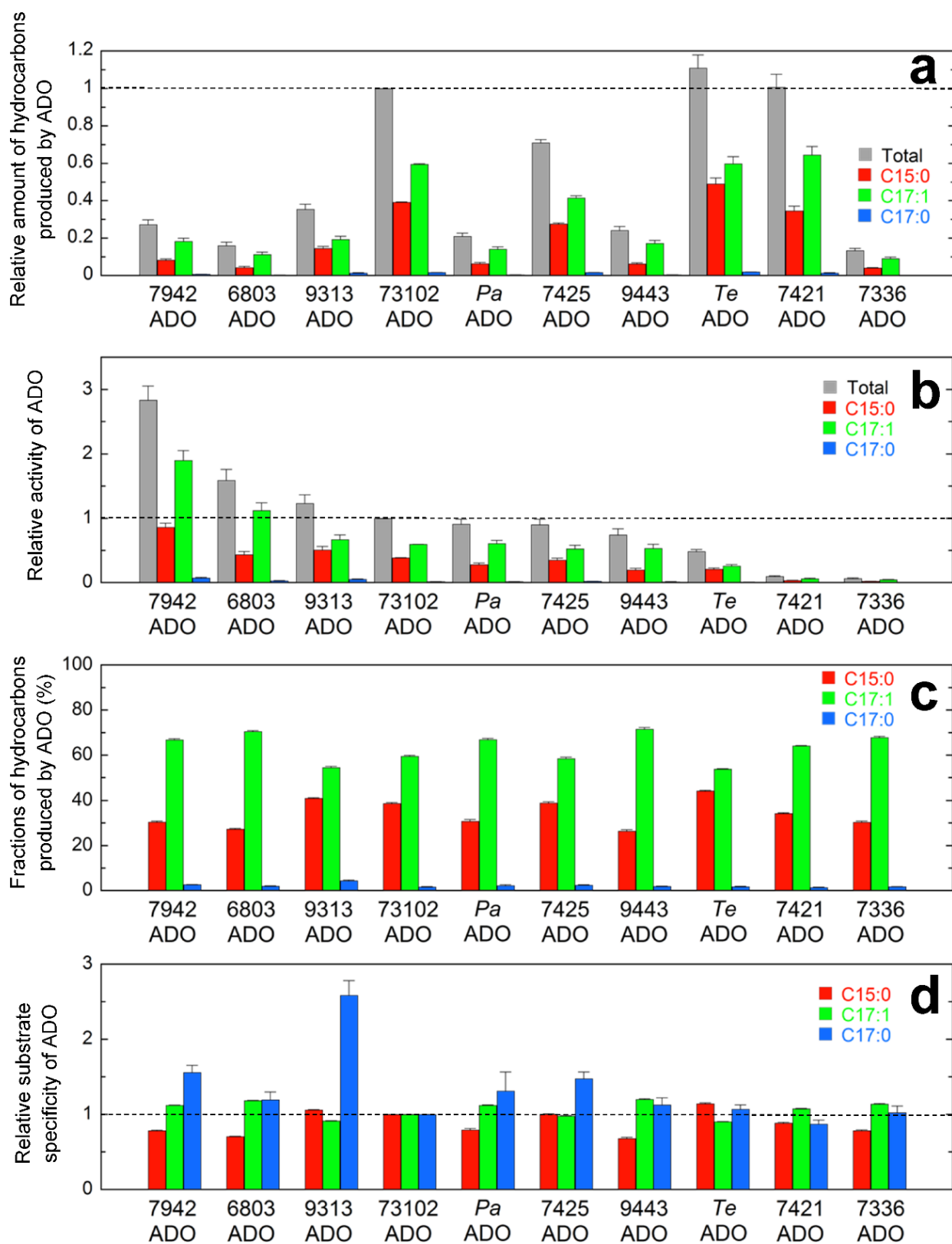






## 図 27. 様々なラン藻由来 ADO のアミノ酸配列の比較

10 種類の ADO について Clustal X でマルチプル配列アライメントを行った[39]。配列データの上に記されている\*は完全に保存されている部位で、:と.は一部で保存されている部位を表す。また、下のアミノ酸残基番号は 9313ADO に対応している。さらに、赤い四角は IV 章での 7421ADO 変異体を作製したときの変異部位を示す。



## 図 28. 様々なラン藻由来 ADO の比較（炭化水素合成量、活性、基質特異性）

10 種類のラン藻由来 ADO における炭化水素合成量、活性、基質特異性を比較した結果。測定は 8 回行った。(a) 縦軸は炭化水素合成量を表す。(b) 縦軸は ADO 活性を示す。炭化水素合成量を ADO の可溶性発現量（図 29a）で割ることで算出。(c, d) 縦軸は合成された炭化水素種の割合を表し、ADO の基質特異性を意味する。

(c) を除くすべてのグラフで、73102ADO の値を 1 として規格化した。詳細は図 8 と同様である。

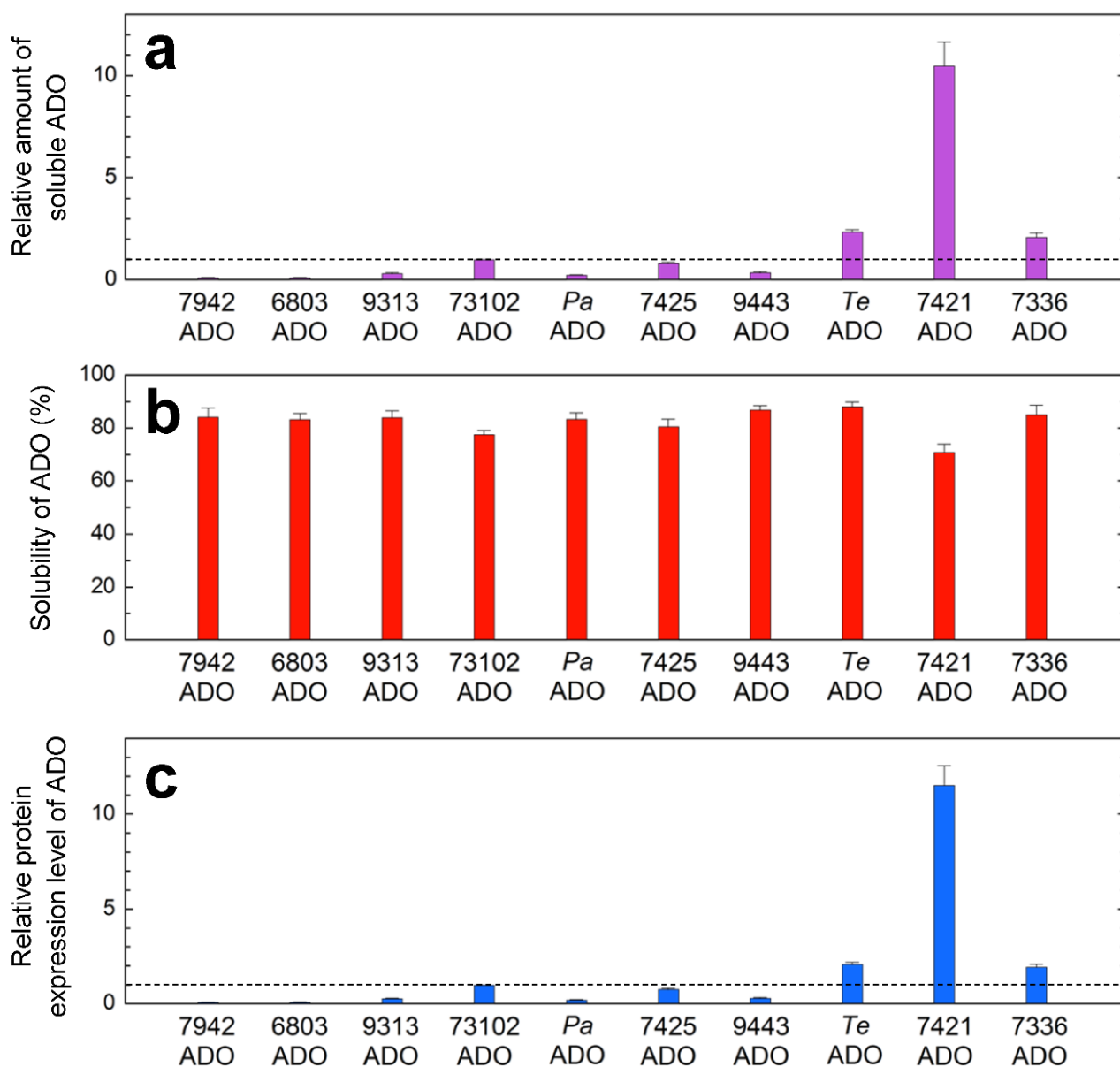


図 29. 様々なラン藻由来 ADO の比較（可溶性発現量、可溶性度、全発現量）

10 種類のラン藻由来 ADO における可溶性発現量、可溶性度、全発現量を比較した結果。測定は 8 回行った。(a) 縦軸は ADO の可溶性発現量を表す。(b) 縦軸は ADO の可溶性度を示す。(c) 縦軸は ADO の全発現量を表す。

(a)、(c)では 73102ADO の値を 1 として規格化した。詳細は図 9 と同様である。

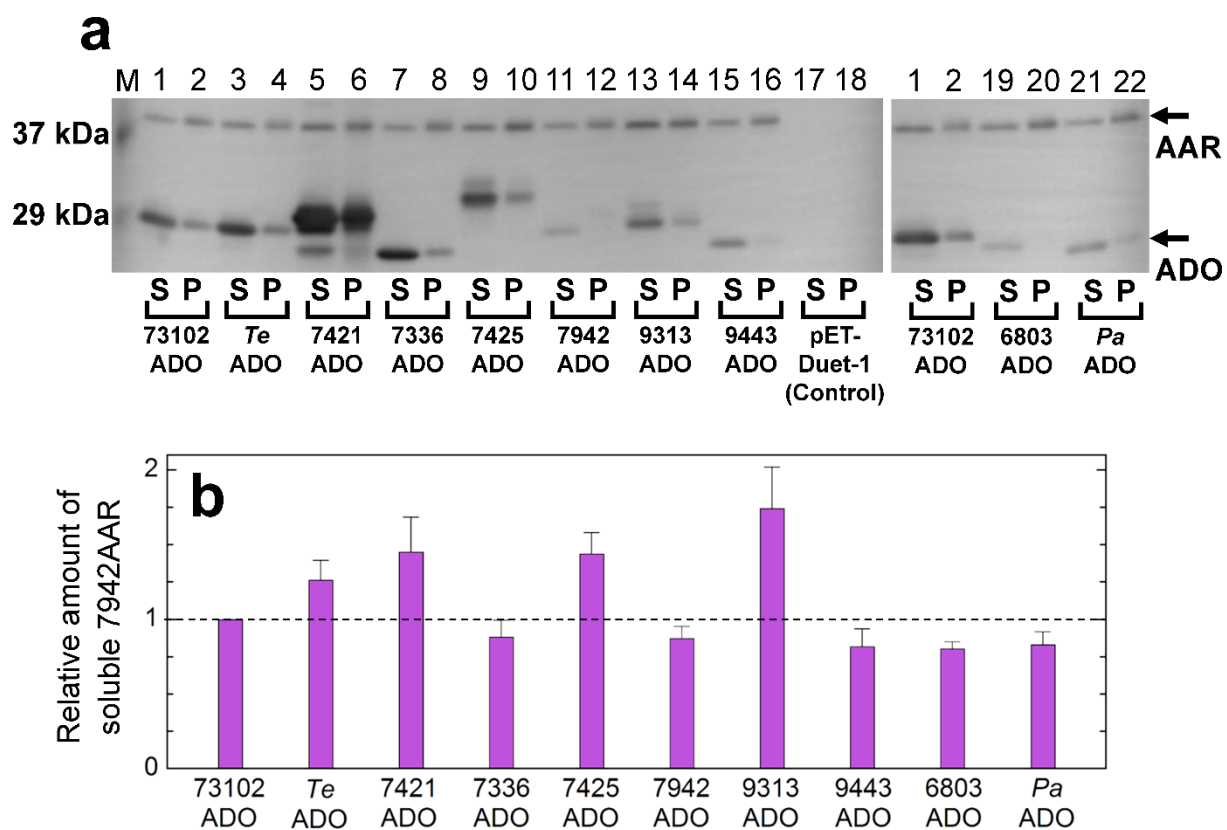
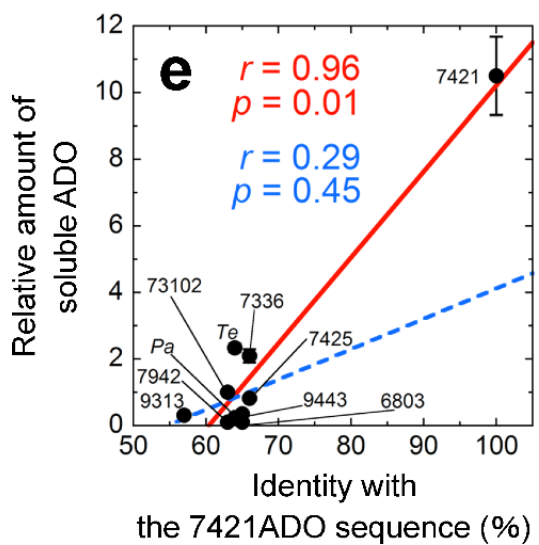
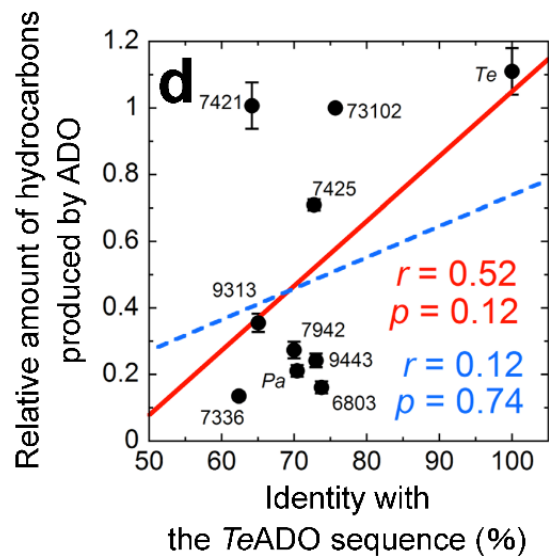
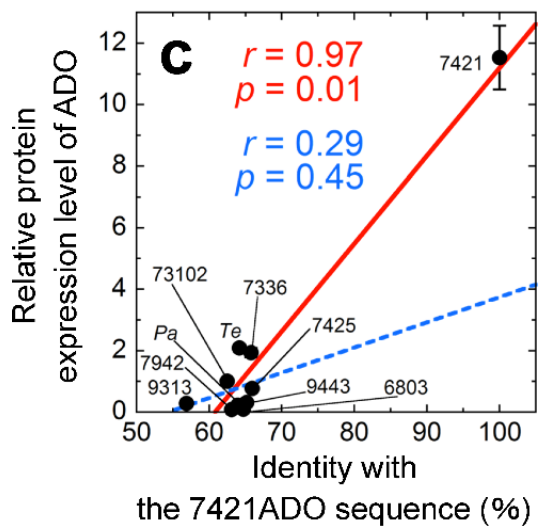
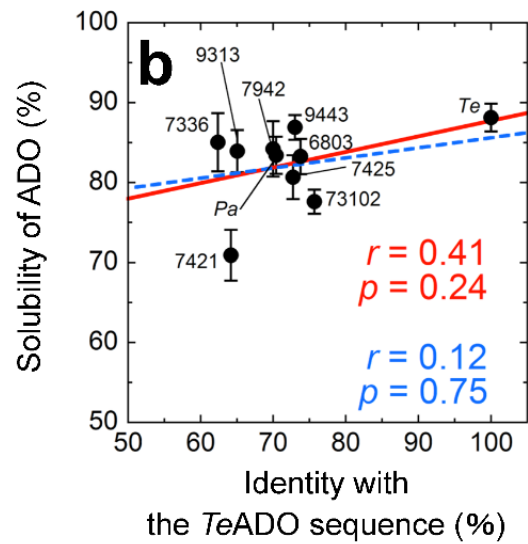
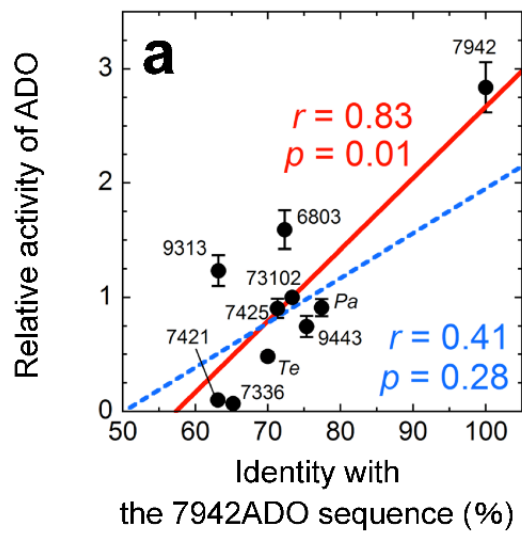


図 30. 様々なラン藻由来 ADO のウェスタンブロッティングの結果

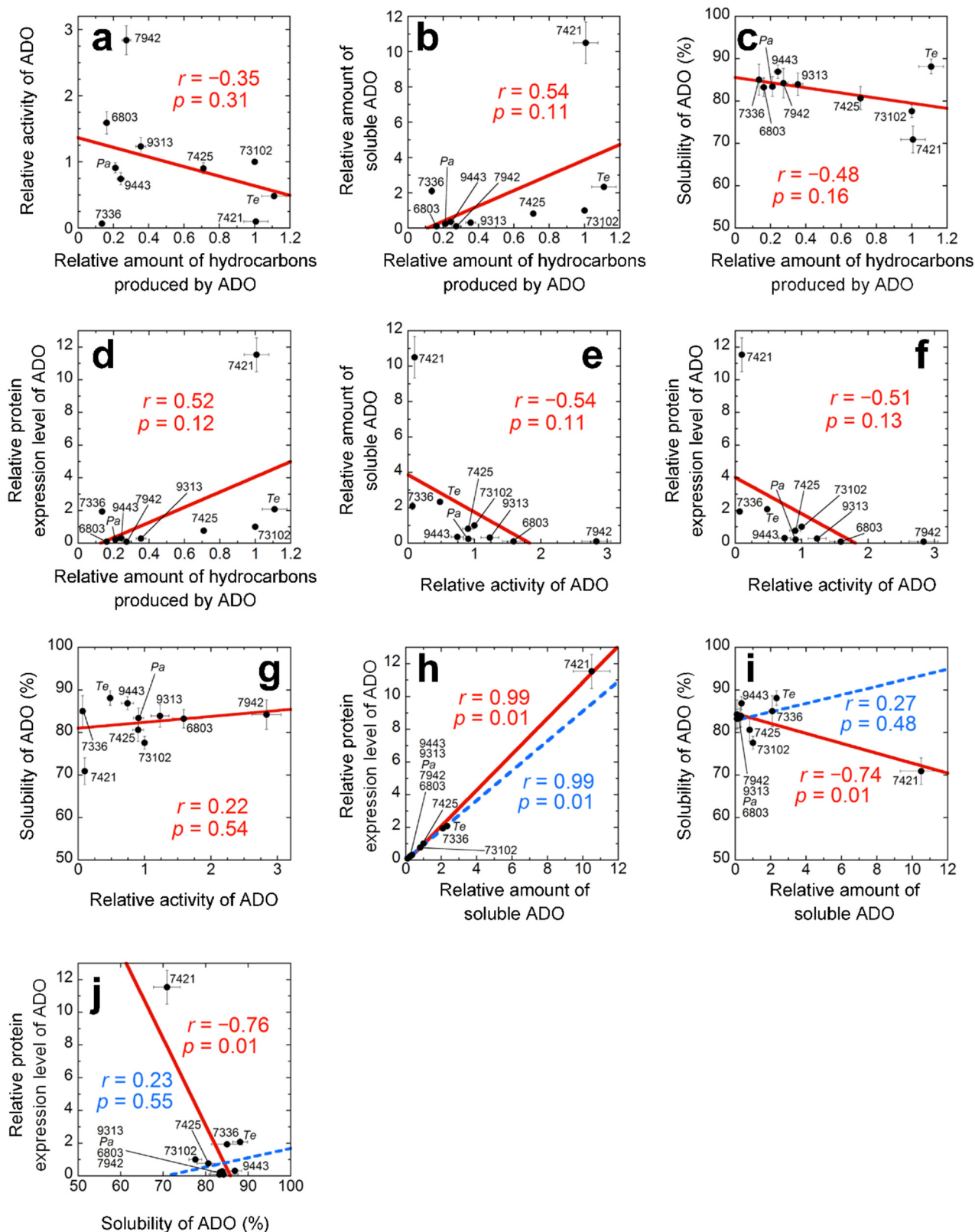
(a) 7942AAR と 10 種類の ADO をそれぞれ導入した大腸菌について、破碎後に遠心することで上清 (S) と沈殿 (P) に分けて泳動した。検出された各レーンの ADO のバンドを定量した結果は図 29 に示した。(b) AAR の可溶性発現量の結果。73102ADO の測定値を 1 として規格化した。測定は 8 回行った。



### 図 31. 測定結果と各 ADO のアミノ酸配列一致度との相関関係

(a) 10 種類の ADO での測定結果において、活性を縦軸に、7942ADO のアミノ酸配列との一致度を横軸にプロットした。(b, c) ADO の可溶性度 (b)、全発現量 (c) を縦軸に、TeADO、7421ADO のアミノ酸配列との一致度を横軸にそれぞれプロットした。(d) ADO の炭化水素合成量を縦軸に、TeADO のアミノ酸配列との一致度を横軸にプロットした。(e) ADO の可溶性発現量を縦軸に、7421ADO のアミノ酸配列との一致度を横軸にプロットした。

プロットを線形近似することで相関係数  $r$  と  $p$  値を算出した。ADO 全てのデータを用いて算出した結果を赤色（及び赤色の実線）で示し、高い測定値を示した ADO のデータを 1 点除いて計算した結果を青色（及び青色の点線）で示す。また、各 ADO との配列一致度については表 3 を参照。





### 図 32. ADO の特性間における相関関係

(a-j) 10 種類の ADO における炭化水素合成量、活性、可溶性発現量、可溶性度、全発現量とのあいだの相関関係について調べた。各図において、プロットを線形近似することで相関係数  $r$  を求めた（赤色で示す）。

(h)、(i)、(j) については、7421ADO のデータ点を除いて相関を計算した結果を青色で示す。

# IV. 7421ADO における変異解析

## IV-1. 序論

### IV-1-1. 7421ADO の特性

III 章で様々なラン藻由来 ADO を比較した結果、7942ADO と 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分かった。活性は 7942ADO が最大であったが、炭化水素合成量、可溶性発現量は 7421ADO のほうが 7942ADO よりも高かった。特に 7421ADO の可溶性発現量は他に比較した ADO と比べても、非常に高かった一方、活性は非常に低かったため、炭化水素合成量は *Te*ADO に次ぐ 2 番目であった。そこで、7421ADO の可溶性発現量を維持しつつ、活性を少しでも増加させることができれば、炭化水素合成量の大幅な向上が期待できる。

### IV-1-2. 目的

III 章の結果より、ADO 間での酵素活性は大きく異なっていることが分かった (図 28)。この活性の差は ADO の非保存部位におけるアミノ酸残基によって決定されると考えられる。また、III-3-3-(1) より、活性と ADO 間での配列一致度との間に相関はみられなかったため (図 31a)、局所的なアミノ酸残基の違いが活性の差に起因していることが示唆された。また、ADO の構造情報をもとにした変異解析から、ADO の機能発現に重要なアミノ酸残基が同定されつつある[10, 17-21]。しかし、これらの解析の多くは保存部位をターゲットにしているため、非保存部位のアミノ酸残基が ADO の機能発現にもたらす影響についてはほとんど明らかになっていない。そこで ADO の酵素活性に重要な非保存部位を同定することを目的として、活性の低い 7421ADO のアミノ酸配列を活性の高い 7942ADO のアミノ酸配列に近づけるような一アミノ酸置換変異を導入した。もし 7421ADO の活性が向上すれば、その変異部位は ADO の酵素活性にとって重要なアミノ酸残基であると考えられる。

## IV-2. 方法

### IV-2-1. 変異体の作製

様々なラン藻由来 ADO を比較したときに、7942AAR と 7421ADO の 2 つの遺伝子を含んだ共発現プラスミドを作製した。このプラスミドを鋳型として、KOD-Plus-Neo を用いた QuikChange 法にて 7421ADO の一アミノ酸置換変異体の発現系を作製した。アミノ酸置換用のプライマーは、QuikChange Primer Design (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) (Agilent Technologies 社) を利用してデザインした。得られた DNA で大腸菌 JM109 を形質転換し、液体培養後、FastGene Plasmid Mini Kit によりプラスミドを精製した。DNA シーケンスはファスマック社に外注し、正しく変異が導入されたことを確認した。

### IV-2-2. 7421ADO 変異体の特性解析

7421ADO 変異体の炭化水素合成量、活性、基質特異性、可溶性発現量、可溶性度、全発現量について、今までと同様の方法を用いて測定した (図 3b)。7421ADO 野生型もしくは変異体を 7942AAR と共発現させるためのプラスミドを、大腸菌 BL21(DE3)pLysS に導入し、IPTG を添加した M9F 培地で 37℃、16 時間培養した。超音波破碎後、培養液中の有機溶媒で炭化水素を抽出し、GC-MS で定量した。また、培養液の遠心上清と沈殿について SDS-PAGE 後に CBB 染色を行い、可溶性画分と不溶性画分にある ADO タンパク質の量を定量した。

## IV-3. 結果

### IV-3-1. 変異部位の選択と変異体の作製

7421ADO と 7942ADO の配列一致度は 63 % であり (表 3)、7421ADO の全長は 235 残基である。このため、7942ADO に近づくような 7421ADO の一アミノ酸置換体は 87 個ほど作製することができる。このうち、7421ADO と 7336ADO (活性が最も低かった ADO) に共通するアミノ酸残基は除いた。残った候補 60 箇所のうち 40 箇所について、7421ADO に一アミノ酸置換変異を導入した (変異部位は図 27 において赤い四

角で示す)。こうして、7421ADO 一アミノ酸変異体を 40 個作製し、今までと同様に活性測定を行った。

## **IV-3-2. 7421ADO 一アミノ酸置換変異体の特性解析**

40 種類の 7942AAR・7421ADO 変異体共発現プラスミドで大腸菌を形質転換し、それぞれを 37℃、16 時間培養後に、各培養液中の炭化水素合成量、大腸菌内の ADO の活性、基質特異性、可溶性発現量、可溶性度、全発現量を調べた。

### **(1) ADO 変異体の炭化水素合成量と可溶性発現量 (図 33a, d)**

7421ADO 野生型に比べて、炭化水素合成量が増加した変異体は全部で 17 個であった (図 33a)。その中で、炭化水素合成量が 1.2 倍以上増加した変異体は、合成量が多い順に R181E > Q81M > Q108K > A17E > A196E の 5 つであった。特に R181E の炭化水素合成量は野生型に比べて、1.6 倍にまで向上していた。また上記 5 つの変異体全てで可溶性発現量が増加しており、R181E、Q108K については活性もそれぞれ 1.15 倍、1.08 倍と少しだけ増加した (図 33d, b)。また A17E、A196E での活性は野生型に比べて 80 % であるが、可溶性発現量は 1.4 倍以上まで増加していた。特に A17E の可溶性発現量は 1.6 倍にまで増加しており、最大であった。

### **(2) ADO 変異体の活性と可溶性発現量 (図 33b, d)**

炭化水素合成量を可溶性発現量で割ることによって、ADO の活性を算出した。本実験では ADO 活性に重要な非保存部位を同定することを目的として、7421ADO に変異を導入したが、約 40 個の変異体のうち 22 個で野生型と比べ活性が増加した (図 33b)。このうち、(活性が高い順に) T16L > I179L > E88S > R46Q > D115K の 5 つの変異体では活性が 1.4 倍以上に増加した。次に、(活性が高い順に) R192L > Q102R > V203E > V121L > H49F > Q165E の 6 つの変異体では活性が 1.17 倍以上に増加した。しかしこれら 11 個の変異体は活性が向上したが、可溶性発現量、炭化水素合成量は低下した (図 33a, d)。一方で活性が向上した 22 個の変異体中、残り 11 個の変異体における可溶性発現量は野生型の 85 % 以上は保持されていた。

活性が減少した変異体は 18 個であったが、これらの可溶性発現量は野生型に比べて、増加あるいは変わらなかった (図 33d)。この中で活性が野生型の 80 % 以上を維持していた 15 個の変異体のうち、K208R を除く 14 個の変異体では可溶性発現量は増加した。一方で V175S、A50D、R239Y の 3 つの変異体では活性は 80 % 以下にまで低下した (図 33b)。

### (3) ADO 変異体の基質特異性 (図 33c)

7421ADO の基質特異性は変異を導入してもほとんど変化せず、C17:1 を多く合成していた。活性の高かった上から 11 個の変異体では、C15:0 の割合が少し減少した。この結果は III 章にて比較した ADO の基質特異性はすべて変わらず、C17:1 の割合が大きかったという結果と一致した。

### (4) ADO 変異体の可溶性度と全発現量 (図 33e, f)

活性が大きく (野生型と比べて 1.17 倍以上) 向上した 7421ADO 変異体 10 個のうち、T16L を除いた 9 個では可溶性度が減少した (図 33e)。一方で、活性が最大であった T16L の可溶性度は野生型レベル (70 %) を維持していたが、全発現量が野生型の 0.5 倍と大きく低下した (図 33f)。

全発現量は、(高い順に) R181E > Q81M > A17E > A196E > A50D > A98K > Q108K の 7 つの変異体では 1.5 倍以上に増加した。特に R181E、Q81M では野生型に比べて 2 倍以上も増加していた。可溶性度が低い (どちらも 50 %以下であった) にも関わらず可溶性発現量が高いのは、発現量が大きく増大したためだと考えられる。

## IV-3-3. 各種特性間の相関解析

40 個の 7421ADO 変異体について、炭化水素合成量、酵素活性、基質特異性、可溶性発現量、可溶性度、全発現量が得られた。これら ADO の特性のうち、変異による影響がほとんど見られなかった基質特異性を除く、5 つの特性間での相関を調べた。

### (1) 炭化水素合成量と可溶性発現量、活性の相関 (図 34a, b)

炭化水素合成量は ADO の活性と可溶性発現量の両方によって左右される。炭化水素合成量と可溶性発現量のあいだには高い正の相関が見られた ( $r=0.80$ ; 図 34a)。一方で、炭化水素合成量と活性のあいだには相関は見られなかった ( $r=-0.30$ ; 図 34b)。

### (2) 炭化水素合成量と可溶性度、全発現量の相関 (図 34c, d)

炭化水素合成量と可溶性度のあいだには相関は見られなかった ( $r=0.26$ ; 図 34c の赤色)。また R181E、Q81M では発現量が高いために可溶性度をきちんと評価できていない可能性があった。そこで R181E、Q81M のデータ点を除いて解析をしてみたところ、相関係数は増加したがそれでも相関は見られなかった ( $r = 0.46$ ; 図 34c の青

色)。一方で、炭化水素合成量と全発現量とのあいだには可溶性発現量の時と同様に、正の相関が見られた ( $r = 0.73$  ; 図 34d)。

### (3) 可溶性発現量、可溶性度、全発現量の相関 (図 34e, f, g)

可溶性発現量は、可溶性度と全発現量の両方の値によって決まる。可溶性発現量と全発現量とのあいだには正の相関が見られた ( $r = 0.73$  ; 図 34e)。また可溶性発現量と可溶性度のあいだにおいては、全てのデータを用いた場合には相関が見られなかったが ( $r = 0.47$  ; 図 34f の赤色)、R181E、Q81M の可溶性度のデータを除いたところ相関が増大し、正の相関が見られた ( $r = 0.60$  ; 図 34f の青色)。一方で、可溶性度と全発現量のあいだには明確な相関は見られなかった ( $r = -0.21$  (R181E、Q81M を除いた場合の  $r = -0.09$ ) ; 図 34g)。

### (4) 活性と可溶性発現量、全発現量、可溶性度の相関 (図 34h, i, j)

活性と可溶性発現量、可溶性度とのあいだには、負の相関が見られた ( $r = -0.78$  ; 図 34h、 $r = -0.61$  ( $-0.63$ ) ; 図 34i)。このため、ADO では活性と可溶性度のトレードオフが存在することが示唆された。一方で、活性と全発現量のあいだでは相関は見られなかった ( $r = -0.34$  ; 図 34j)。

## IV – 4. 議論

### IV – 4 – 1. アミノ酸変異体の特性

本研究では、7421ADO を 7942ADO のアミノ酸配列に近づけるようなアミノ置換変異体を 40 種類作製し、測定した。その結果、7421ADO の炭化水素合成量、可溶性発現量、活性が大きく変化した変異体を得られた (図 33)。

7421ADO のアミノ酸変異解析から、22 個の変異体で酵素活性が野生型よりも向上した。しかし、これらの変異体の多くでは可溶性度が低下し、可溶性発現量が減少したため、炭化水素合成量も減少した。また活性と可溶性度のあいだで負の相関が見られたことから (図 34)、ADO では活性と可溶性度のトレードオフが存在することが示唆された。酵素では一般的に活性と構造安定性 (可溶性度) とのあいだにはトレードオフの関係があることが知られており、酵素活性が高いほど揺らぎが大きくなるために凝集しやすくなり、可溶性度が低下する傾向にある[45, 46]。ただし、活性が最大

であった T16L の可溶性度は野生型とほとんど同じだったが、全発現量は大きく低下していた (図 33)。その理由は不明である。

一方で、炭化水素合成量を向上させるような 5 つの変異 (R181E、Q81M、Q108K、A17E、A196E) の同定にも成功した (図 33)。これらの変異では全発現量が向上し、可溶性発現量が大きく増加していた。これは炭化水素合成量と可溶性発現量、全発現量のあいだに正の強い相関が見られたことからいえる (図 34)。また、上記 5 つの変異体のうち、R181E と Q108K では野生型に比べて活性の向上が見られた (図 33b)。残りの 3 つの変異体の活性についても野生型の 80 %以上の値を有していた。この結果より、炭化水素合成量の向上には可溶性発現量と活性の両方を向上させること (または、活性か可溶性発現量のどちらかを野生型レベルで維持しつつ、もう片方を増大させること) が効果的であるといえる。

今回の変異解析では、ADO の基質特異性を変化させるような変異体は見つからなかった (図 33c)。先行研究では、ADO の基質結合部位及びその周辺に変異を導入し、基質特異性を変化させる研究がいくつか報告されている[19-21]。これらのほとんどは保存部位への変異導入であるため、非保存部位への変異導入によって基質特異性を変化させることは難しいかもしれない。しかし、これら ADO の基質特異性を変化させるような保存部位への変異導入と本実験で同定された ADO 活性を向上させるような変異を組み合わせることによって、活性と基質特異性の両方を制御できることが期待される。

## **IV-4-2. ADO 構造へのマッピング**

ADO は AAR と異なり、すでに立体構造が明らかとなっている[15, 16, 18, 20, 47]。そこで立体構造的観点から、今回の変異解析の結果について議論する。ただし、9313ADO、7942ADO、6803ADO の構造は明らかとなっているが[15, 16, 18, 20]、7421ADO の構造は未解明である。このため、ホモロジーモデリングにより立体構造を予測するサーバー I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) を用いて 7421ADO の立体構造を予測した[48, 49]。この予測構造上に、野生型よりも活性が向上した変異部位 22 箇所 (図 37 の赤色で示したアミノ酸残基)、活性が 80 %以下に低下した変異部位 3 箇所 (図 37 の青色で示したアミノ酸残基)、また可溶性発現量が 1.5 以上に増加した変異部位 3 箇所 (図 37 の緑色で示したアミノ酸残基) をマッピングした。その結果、これらの変異部位のほとんどは大きく分けて次の 3 つの領域に分かれていた (図 37)。

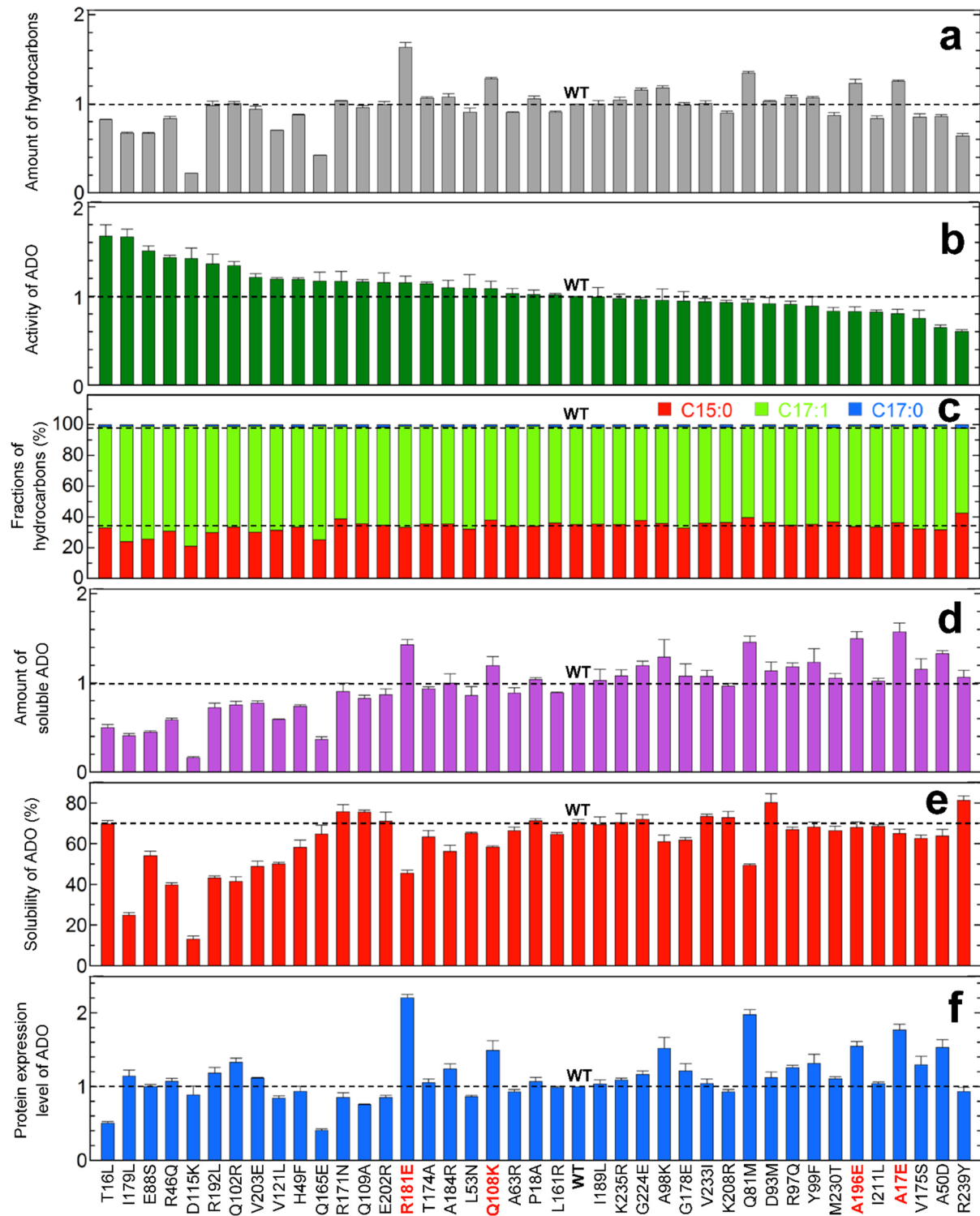
領域 I は Arg46、His49、Ala50、Leu53、Ala63、Asn108 を含んでおり、全て酵素活性に影響を与える変異部位であった。この領域 I は ADO の活性中心にプロトンを供給する供給路 (Glu47、Asn51、Glu108、Glu123 からなる ; 図 37 の水色で示したアミノ酸残基) の近傍であった[15]。また Arg46 は ADO の活性中心である鉄結合部位 (図 37 のオレンジで示したアミノ酸残基) に非常に近かった。これらの理由により、変異導入によって ADO 活性に影響が見られたと考えられる。

領域 II は Ter16、Ala17、Pro18、Gln102、Leu161、Arg192、Ala196、Glu202、Val203 を含んでおり、Ala17、Ala196 を除き酵素活性を向上させる変異部位であった。この領域 II は基質結合部位 (図 37 の黄色で示したアミノ酸残基) を含み、基質の入り口及び生成物の出口に近いとされている[15]。この領域に含まれる部位への変異導入は基質であるアルデヒドの取り込み、及び合成された炭化水素の排出に影響を与えることで、ADO 活性を向上させたと考えられる。この結果は領域 II に含まれる Trp191 を Arg に置換して、基質の進入を阻害しているトリプトファン残基を除くと活性が向上したという先行研究と一致する[18]。また、A17E、A196E では可溶性発現量が大きく増加したが、これらは表面に露出している疎水性残基を親水性残基に置換したことで ADO の構造安定性が増大したためだと考えられる。可溶性発現量が増大した残りの変異部位 Gln81 は 3 つの領域に属していないが、ちょうど基質結合部位の近くに存在した。そのため、Q81M 変異によって親水性残基から疎水性残基に置換することで、疎水性の基質であるアルデヒドとの相互作用が増加し、ADO の構造安定性が増大したと考えられる。

領域 III では、Gln109、Asp115、Val121、Gln165、Arg171、Ter174、Val175、Ile179、Arg181、Ala184、Arg239 と多くの変異部位を含んでおり、全て酵素活性に影響を与える変異部位であった。この領域 III は基質結合部位や活性中心から離れている一方、 $\alpha$ -ヘリックス間のちょうどターンの部分に位置していた。ヘリックスあるいはストランド間のターン部分はヒンジのように動くことによって、酵素のダイナミクス (特に大きくてゆっくりした動き) に重要とされている[50, 51]。このため、領域 III への変異導入は、ADO の基質の受け渡しに伴う開閉運動 (特にゆっくりした動き) に影響を与えることで、活性に影響を及ぼしたのかもしれない。また、73102ADO において A161E 変異 (7421ADO では V173E に相当) を導入することによって、高温条件下 (47°C) での ADO 活性を向上できることが最近報告されている[35]。さらに、領域 III には含まれてはいないが Glu88 もちょうど  $\alpha$ -ヘリックス間のターン部分に位置しており、同様に ADO のダイナミクスに影響を与えることで活性に影響を及ぼしたと考えられる。



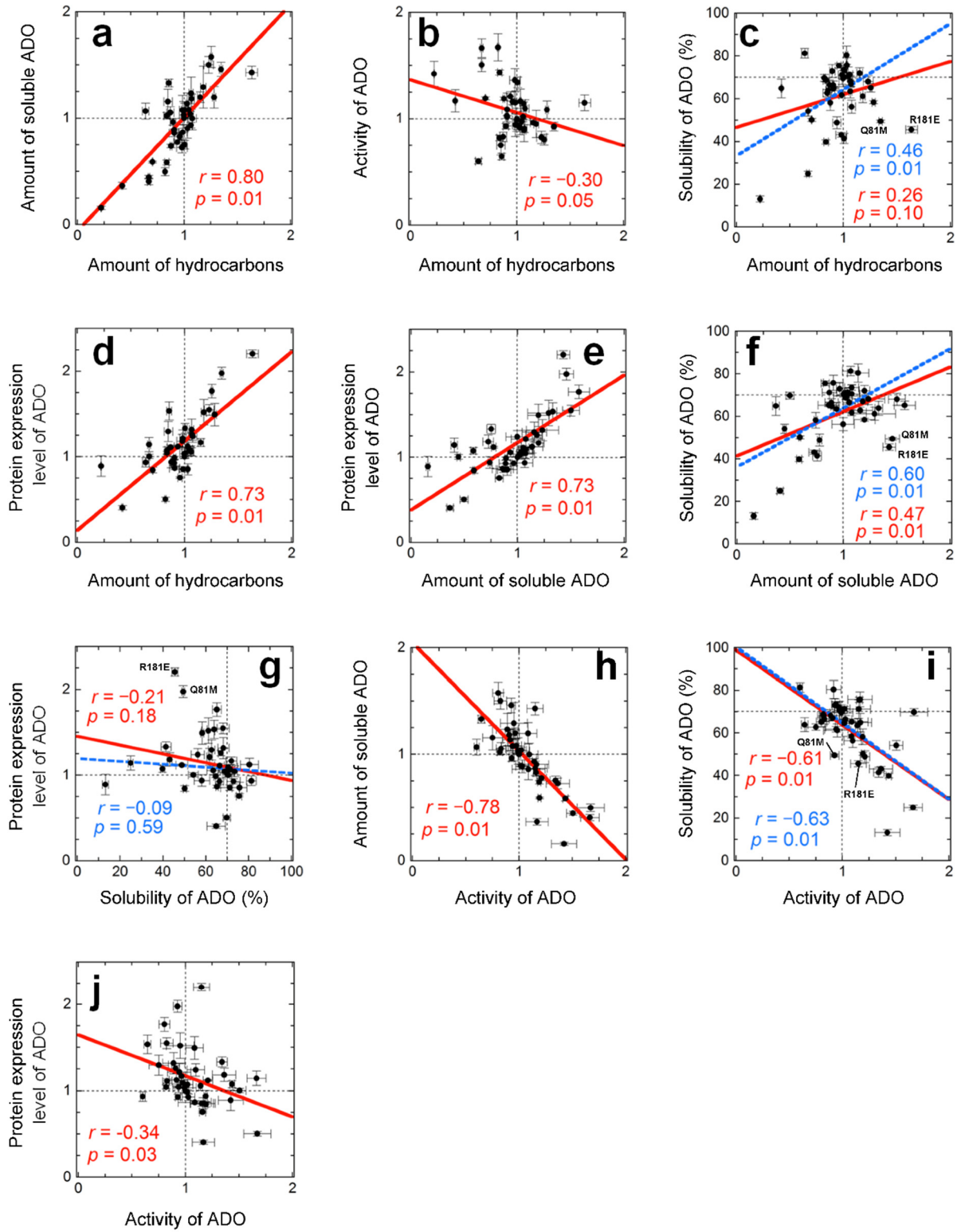
上記以外に、ADO 活性に影響を与える例として、Fd/FNR/NADPH といった還元システムや AAR と ADO との相互作用が挙げられる[12, 52, 53]。しかし、これらの相互作用部位の詳細については明らかでない。今後、Fd/FNR/NADPH や AAR と ADO 変異体との結合を等温滴定型熱量計 (ITC) などによって定量的に評価し、相互作用部位を同定することが必要である。



### 図 33. 7421ADO ーアミノ酸変異解析の測定結果

7421ADO ーアミノ酸変異体を 40 個作製し、炭化水素合成量、活性、基質特異性、可溶性発現量、可溶性度、全発現量を調べた。この測定は 3 回行った。(a) 縦軸は各炭化水素合成量の合計を表す（以下、炭化水素合成量とする）。(b) 縦軸は ADO の活性を表す。(c) 縦軸は合成される炭化水素種の割合を表す。これは 7421ADO 変異体の基質特異性を意味する。(d) 縦軸は ADO の可溶性発現量を表す。(e) 縦軸は ADO の可溶性度を表す。(f) 縦軸は ADO の全発現量を表す。

すべての図で活性が高い変異体順に並べた。(c)、(e) を除いて野生型 (WT) の測定値を 1 として、規格化した。また詳細については、図 8、9 と同様である。



### 図 34. 7421ADO ーアミノ酸変異体における特性間での相関関係

(a-j) 7421ADO ーアミノ酸変異体 40 種類における炭化水素合成量、活性、可溶性発現量、可溶性度、全発現量とのあいだの相関関係について調べた。各図において、プロットを線形近似することで相関係数  $r$  を求めた（赤色で示す）。黒の点線は野生型の測定値を示す。

(c, f, g, i) 可溶性度が含まれる相関について調べる場合に限り、R181E、Q81M のデータを省いたときの相関も計算した（青色で示す）。

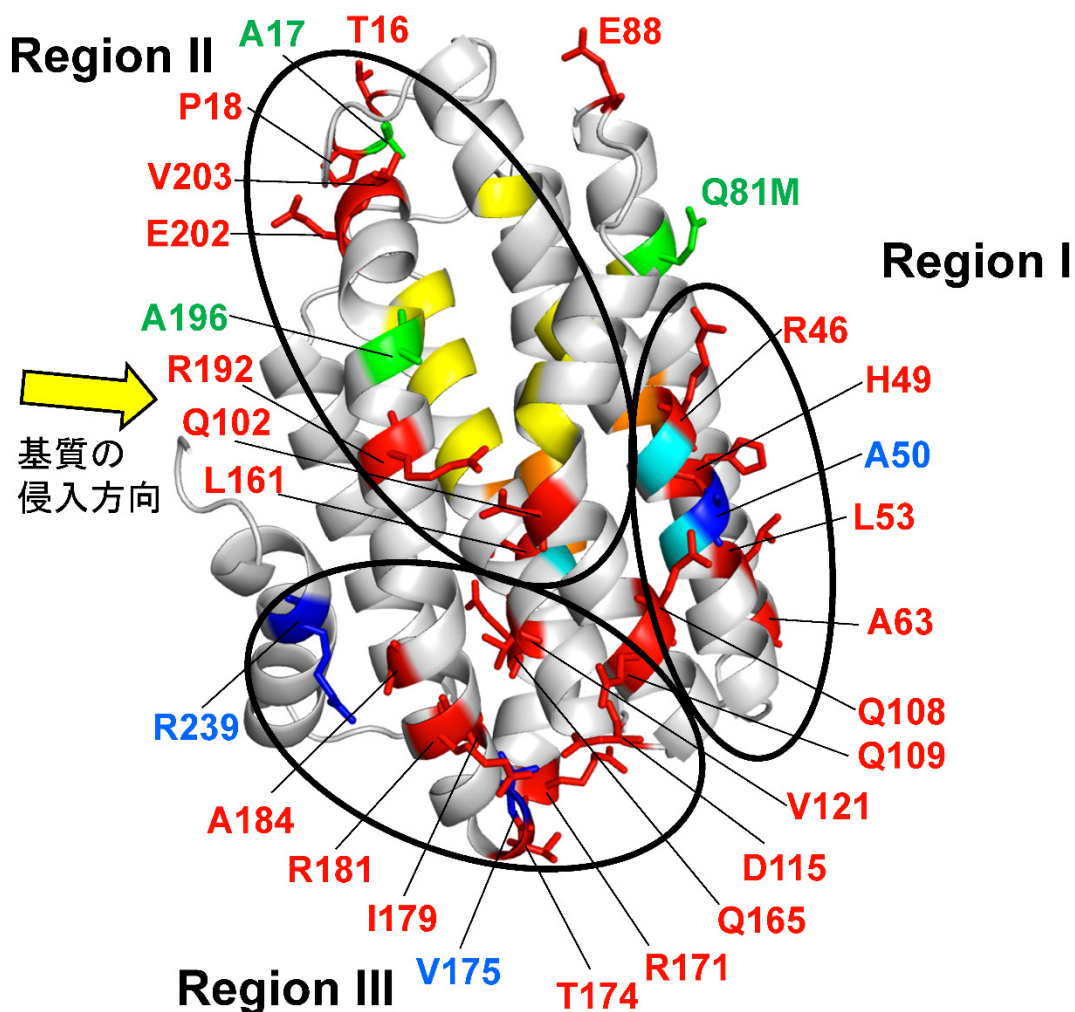


図 37. 7421ADO の立体構造と変異部位のマッピングの結果

I-TASSER によるホモロジーモデリングを利用して、7421ADO の立体構造を予測した。基質結合部位を黄色、鉄結合部位をオレンジ、プロトン供給路を水色で表す。

活性が向上した変異部位を赤色で表す。活性が 20 %以上低下した変異部位を青色で表す。また可溶性発現量が 1.5 倍以上向上した変異部位を緑色で表す。これらの変異部位の多くが、黒丸で示した 3 つの領域 I－III に分かれた。

## 結論と今後の展望

本研究では、以下の3点を目的として研究を行った。

- (1) 様々なラン藻に由来する AAR を比較し、高活性型 AAR を探索する。(第 I 章)
- (3) 様々なラン藻に由来する ADO を比較し、高活性型 ADO を探索する。(第 III 章)
- (4) ADO の活性を決める上で重要なアミノ酸残基を、変異解析によって同定する。(第 IV 章)

### <I 章>

まず、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 または ADO の活性を評価できる系を確立した (図 3b)。

次に、高活性型 AAR の探索のために、12 種類のラン藻に由来する AAR について、炭化水素合成量、可溶性発現量、活性、基質特異性、可溶性度及び全発現量を調べた。

その結果、最も活性が高かったのが 7942AAR であった (図 8、12、13)。

興味深いことに、海洋性のラン藻に由来する AAR では主に C16:0 の palmitoyl-ACP を基質としている一方で、淡水性のラン藻に由来する AAR では主に C18:1 の oleoyl-ACP を基質としていることが明らかとなった。このことから、AAR の基質特異性がラン藻の生育環境に依存する可能性が新たに示唆された。

### <III 章>

I 章で利用した方法を用いて、今度は ADO の活性を評価した。高活性型 ADO の探索のために、10 種類のラン藻に由来する ADO について、炭化水素合成量、可溶性発現量、活性、基質特異性、可溶性度及び全発現量を調べた。

その結果、最も活性が高かったのが 7942ADO であった (図 28)。

一方で AAR とは異なり、ADO 間で基質特異性に違いは見られなかった。

### <IV 章>

III 章での結果から、7942ADO と 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一アミノ酸変異を導入した。計 40 種類の 7421ADO 変異体を作製し、III 章と同様の解析を行なうことで、特に ADO の酵素活性を決定する上で重要なアミノ酸残基を同定することを目指した。

その結果、酵素活性が野生型に比べて増大した変異体 22 個が得られた (図 33)。また、残り 18 個のうち 13 個の変異体について、酵素活性は野生型の 80 %以上は維持されていた。よって、非保存部位における ADO の活性にとって重要なアミノ酸部残基の同定に成功した。さらに活性と可溶性度とのあいだの相関を調べた結果、負の相関が見られたことから、ADO では活性と可溶性度のトレードオフが存在していることが示唆された (図 34)。

以上より、今回の実験で得られた様々な知見は、AAR と ADO の高性能化、さらにはこれらの酵素を利用したバイオエネルギー生産への応用に向けて、極めて有用であると考えられる。

今後は本研究によって高機能化させた AAR、ADO を実際にラン藻に導入する事によって、カーボンニュートラルなアルカンの大量生産を目指す。ここで、ラン藻を用いてアルカンの大量生産を実際に実用化するためには、乾燥重量当たりで数倍ものアルカン合成量が必要であるといわれている。ラン藻ではアルカンを細胞内に蓄積してしまうため、これを達成するには将来的にアルカンの分泌系を導入することが必須となる。一方で大腸菌では炭化水素は分泌されるが[10]、そのメカニズムの詳細は明らかではない。もし、大腸菌での炭化水素分泌のメカニズムを明らかにして、炭化水素を細胞外へと運ぶ輸送体を見出せば、その輸送体をラン藻に導入することでアルカンの分泌を促せるかもしれない。またラン藻由来の脂肪酸輸送体については知られており、過剰発現させることで脂肪酸の分泌量を向上させたことが報告されている[54]。脂肪酸用の輸送体ではあるが、この輸送体を過剰発現させればアルカンも分泌されるようになるかもしれない。

また本研究では AAR、ADO の酵素活性が非常に低いため[10, 12]、両酵素の活性を増大させることに注目している。その他にアルカン合成量を上げる方法として、基質となる fatty acyl-ACP/CoA の量を増大させる方法が考えられる。*Synechocystis* sp. PCC 6803 で、fatty acyl-ACP 合成酵素 (AAS) を過剰発現させた株に AAR、ADO を導入することによって、アルカン合成量が野生型に比べて大きく増加した研究例が報告されている[29]。また窒素欠乏条件下 (N-) ではラン藻内の炭素源が非常に増加することが分かっている[55]。修士論文の時に、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 株に AAR、ADO を導入する方法については構築済みであるため、上述の AAS の導入や N 欠培地



での培養はすぐにでも検討可能である。さらにラン藻での代謝改変の研究例は多く報告されている[29, 56-63]。これらラン藻の代謝改変による基質量の増大と AAR、ADO の酵素活性向上による炭化水素合成量の増大は互いに相補的であり、相乗効果的にアルカン合成量が増加することが期待できる。特にラン藻の代謝改変については共同研究を行うことで、様々な知見を組み合わせることで、ラン藻によるアルカンの大量生産を実現させていこうと考えている。

# 参考文献

1. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010;14:557-577.
2. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*. 2007;25:294-306.
3. Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol*. 2002;22:245-79.
4. Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol*. 2011;29:95-103.
5. Nozzi NE, Oliver JW, Atsumi S. Cyanobacteria as a platform for biofuel production. *J Frontiers in bioengineering biotechnology*. 2013;1:7.
6. Lu X. A perspective: photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnol Adv*. 2010;28:742-6.
7. Arai M, Hayashi Y, Kudo H. Cyanobacterial Enzymes for Bioalkane Production. In *Synthetic Biology of Cyanobacteria*; Zhang, W., Song, X., Eds.; Springer Singapore: Singapore. 2018:119-54.
8. Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, *et al*. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:1053-8.
9. Winters K, Parker PL, Van Baalen C. Hydrocarbons of blue-green algae: geochemical significance. *Science*. 1969;163:467-8.
10. Schirmer A, Rude MA, Li X, Popova E, Del Cardayre SB. Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*. 2010;329:559-62.
11. Coates Rc Podell S, Korobeynikov A, Lapidus A, Pevzner P, Sherman DH, Allen EE, Gerwick L, Gerwick WH. Characterization of cyanobacterial hydrocarbon composition and distribution of biosynthetic pathways. *PLoS ONE*. 2014;9:e85140.
12. Warui Dm Pandelia ME, Rajakovich LJ, Krebs C, Bollinger JM Jr, Booker SJ Efficient delivery of long-chain fatty aldehydes from the *Nostoc punctiforme* acyl-acyl carrier protein reductase to its cognate aldehyde-deformylating oxygenase. *Biochemistry*. 2015;54:1006-1015.
13. Hu P, Borglin S, Kamennaya NA, Chen L, Park H, Mahoney L, *et al*. Metabolic phenotyping of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 engineered for production of alkanes and free fatty acids. *Applied energy*. 2013;102:850-859.
14. Tan X, Yao L, Gao Q, Wang W, Qi F, Lu X. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. *Metab Eng*. 2011;13:169-176.
15. Buer BC, Paul B, Das D, Stuckey JA, Marsh EN. Insights into substrate and metal

- binding from the crystal structure of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase with substrate bound. *ACS Chem Biol.* 2014;9:2584-93.
16. Jia C, Li M, Li J, Zhang J, Zhang H, Cao P, *et al.* Structural insights into the catalytic mechanism of aldehyde-deformylating oxygenases. *Protein Cell.* 2015;6:55-67.
  17. Hayashi Y, Yasugi F, Arai M. Role of cysteine residues in the structure, stability, and alkane producing activity of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase. *PLoS One.* 2015;10:e0122217.
  18. Wang Q, Bao L, Jia C, Li M, Li JJ, Lu X. Identification of residues important for the activity of aldehyde-deformylating oxygenase through investigation into the structure-activity relationship. *BMC Biotechnol.* 2017;17:31.
  19. Bao L, Li JJ, Jia C, Li M, Lu X. Structure-oriented substrate specificity engineering of aldehyde-deformylating oxygenase towards aldehydes carbon chain length. *Biotechnol Biofuels.* 2016;9:185.
  20. Khara B, Menon N, Levy C, Mansell D, Das D, Marsh EN, *et al.* Production of propane and other short-chain alkanes by structure-based engineering of ligand specificity in aldehyde-deformylating oxygenase. *Chembiochem.* 2013;14:1204-8.
  21. Zhang L, Liang Y, Wu W, Tan X, Lu X. Microbial synthesis of propane by engineering valine pathway and aldehyde-deformylating oxygenase. *Biotechnol Biofuels.* 2016;9:80.
  22. Lin F, Das D, Lin XN, Marsh EN. Aldehyde-forming fatty acyl-CoA reductase from cyanobacteria: expression, purification and characterization of the recombinant enzyme. *FEBS J.* 2013;280:4773-4781.
  23. Li N, Chang WC, Warui DM, Booker SJ, Krebs C, Bollinger JM Jr. Evidence for only oxygenative cleavage of aldehydes to alk(a/e)nes and formate by cyanobacterial aldehyde decarbonylases. *Biochemistry.* 2012;51:7908-16.
  24. Kudo H, Nawa R, Hayashi Y, Arai M. Comparison of aldehyde-producing activities of cyanobacterial acyl-(acyl carrier protein) reductases. *Biotechnol Biofuels.* 2016;9:234.
  25. Liu A, Zhu T, Lu X, Song L. Hydrocarbon profiles and phylogenetic analyses of diversified cyanobacterial species. *Applied energy.* 2013;111:383-393.
  26. Fujisawa T, Narikawa R, Maeda SI, Watanabe S, Kanesaki Y, Kobayashi K, *et al.* CyanoBase: a large-scale update on its 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D551-D554.
  27. Coursolle D, Lian J, Shanklin J, Zhao H. Production of long chain alcohols and alkanes upon coexpression of an acyl-ACP reductase and aldehyde-deformylating oxygenase with a bacterial type-I fatty acid synthase in *E. coli*. *Mol Biosyst.* 2015;11:2464-72.
  28. Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Ikeuchi M, Katoh H, Sasamoto S, *et al.* Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA res.* 2002;9:123-130.
  29. Wang W, Liu X, Lu X. Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes. *Biotechnol Biofuels.* 2013;6:69.

30. Rodriguez GM, Atsumi S. Toward aldehyde and alkane production by removing aldehyde reductase activity in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2014;25:227-37.
31. Imburgio D, Rong M, Ma K, Mcallister WT. Studies of promoter recognition and start site selection by T7 RNA polymerase using a comprehensive collection of promoter variants. *Biochemistry*. 2000;39:10419-10430.
32. Sarcina M, Tobin MJ, Mullineaux CW. Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus 7942*: effects of phycobilisome size, temperature and membrane lipid composition. *J Biol Chem* 2001.
33. Van Waasbergen LG, Dolganov N, Grossman AR. nblS, a Gene Involved in Controlling Photosynthesis-Related Gene Expression during High Light and Nutrient Stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J bacteriol*. 2002;184:2481-2490.
34. Wolf-Watz M, Thai V, Henzler-Wildman K, Hadjipavlou G, Eisenmesser EZ, Kern D. Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11:945-9.
35. Shakeel T, Gupta M, Fatma Z, Kumar R, Kumar R, Singh R, *et al*. A consensus-guided approach yields a heat-stable alkane-producing enzyme and identifies residues promoting thermostability. *J Biol Chem*. 2018;293:9148-9161.
36. Shakeel T, Fatma Z, Fatma T, Yazdani SS. Heterogeneity of alkane chain length in freshwater and marine cyanobacteria. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:34.
37. Weier D, Muller C, Gaspers C, Frentzen M. Characterisation of acyltransferases from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334:1127-34.
38. Sato N, Tsuzuki M, Kawaguchi A. Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h: I. Existence of a eukaryotic pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1633:27-34.
39. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, Mcwilliam H, *et al*. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-8.
40. Zhu Z, Zhou YJ, Kang MK, Krivoruchko A, Buijs NA, Nielsen J. Enabling the synthesis of medium chain alkanes and 1-alkenes in yeast. *Metab Eng*. 2017;44:81-88.
41. Patrikainen P, Carbonell V, Thiel K, Aro EM, Kallio P. Comparison of orthologous cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenases in the production of volatile C3-C7 alkanes in engineered *E. coli*. *Metab Eng Commun*. 2017;5:9-18.
42. Cao YX, Xiao WH, Liu D, Zhang JL, Ding MZ, Yuan YJ. Biosynthesis of odd-chain fatty alcohols in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2015;29:113-123.
43. Kang MK, Zhou YJ, Buijs NA, Nielsen J. Functional screening of aldehyde decarbonylases for long-chain alkane production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2017;16:74.
44. Eser BE, Das D, Han J, Jones PR, Marsh EN. Oxygen-independent alkane formation by non-heme iron-dependent cyanobacterial aldehyde decarbonylase: investigation of kinetics and requirement for an external electron donor. *Biochemistry*. 2011;50:10743-50.
45. Arai M. Unified understanding of folding and binding mechanisms of globular and

- intrinsically disordered proteins. *Biophys Rev*. 2018;10:163-181.
46. Iwakura M, Maki K, Takahashi H, Takenawa T, Yokota A, Katayanagi K, *et al*. Evolutional design of a hyperactive cysteine- and methionine-free mutant of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. *J Biol Chem*. 2006;281:13234-46.
  47. Park AK, Kim IS, Jeon BW, Roh SJ, Ryu MY, Baek HR, *et al*. Crystal structures of aldehyde deformylating oxygenase from *Limnothrix* sp. KNUA012 and *Oscillatoria* sp. KNUA011. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;477:395-400.
  48. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*. 2010;5:725.
  49. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*. 2015;12:7.
  50. Malabanan MM, Amyes TL, Richard JP. A role for flexible loops in enzyme catalysis. *Curr Opin Struct Biol*. 2010;20:702-10.
  51. Henzler-Wildman KA, Lei M, Thai V, Kerns SJ, Karplus M, Kern D. A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature*. 2007;450:913-6.
  52. Cao YX, Xiao WH, Zhang JL, Xie ZX, Ding MZ, Yuan YJ. Heterologous biosynthesis and manipulation of alkanes in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2016;38:19-28.
  53. Wang Q, Huang X, Zhang J, Lu X, Li S, Li JJ. Engineering self-sufficient aldehyde deformylating oxygenases fused to alternative electron transfer systems for efficient conversion of aldehydes into alkanes. *Chem Commun (Camb)*. 2014;50:4299-301.
  54. Kato A, Use K, Takatani N, Ikeda K, Matsuura M, Kojima K, *et al*. Modulation of the balance of fatty acid production and secretion is crucial for enhancement of growth and productivity of the engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9:91.
  55. Hasunuma T, Kikuyama F, Matsuda M, Aikawa S, Izumi Y, Kondo A. Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *J Exp Bot*. 2013;64:2943-54.
  56. Kaczmarzyk D, Cengic I, Yao L, Hudson EP. Diversion of the long-chain acyl-ACP pool in *Synechocystis* to fatty alcohols through CRISPRi repression of the essential phosphate acyltransferase PlsX. *Metab Eng*. 2018;45:59-66.
  57. Peramuna A, Morton R, Summers ML. Enhancing alkane production in cyanobacterial lipid droplets: a model platform for industrially relevant compound production. *Life (Basel)*. 2015;5:1111-26.
  58. Chin T, Okuda Y, Ikeuchi M. Sorbitol production and optimization of photosynthetic supply in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J Biotechnol*. 2018;276-277:25-33.
  59. Gao Q, Wang W, Zhao H, Lu X. Effects of fatty acid activation on photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol Biofuels*. 2012;5:17.
  60. Kaiser BK, Carleton M, Hickman JW, Miller C, Lawson D, Budde M, *et al*. Fatty

- aldehydes in cyanobacteria are a metabolically flexible precursor for a diversity of biofuel products. PLoS One. 2013;8:e58307.
61. Varman AM, Xiao Y, Pakrasi HB, Tang YJ. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 for isobutanol production. Appl Environ Microbiol. 2013;79:908-14.
  62. Osanai T, Oikawa A, Numata K, Kuwahara A, Iijima H, Doi Y, *et al.* Pathway-Level Acceleration of Glycogen Catabolism by Response Regulator Rre37 in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Physiol. 2014;164:1831-41.
  63. Kaniya Y, Kizawa A, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Kaneko Y, *et al.* Deletion of the transcriptional regulator cyAbrB2 de-regulates primary carbon metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Physiol. 2013;162:1153-1163.

## 謝辞

本研究を進める上で、多くの方々にお世話になりました。特に共同研究先の池内昌彦教授にはラン藻の形質転換に必要なプラスミドなどを譲っていただいただけでなく、培養装置まで使わせていただき、深く感謝申し上げます。ラン藻を用いた研究を進める上で大変力強い支えとなりましたこと、心から感謝申し上げます。また、渡辺麻衣さんには、直接、ラン藻の形質転換方法や培養方法をご指導頂き、感謝申し上げます。さらに池内研究室の皆様には、研究に関する多くのアドバイスをいただいたこと、深く感謝しております。そして皆様のご協力を無駄にしないためにも、卒業までにはなんとか高機能化 AAR、ADO を実際にラン藻に導入し、アルカン合成量を評価していきたいと考えております。

研究を進めるにあたり、新井宗仁先生には、ときには厳しくも、温かく的確なご助言をいただけたこと、心から感謝申し上げます。修士、博士合わせて 5 年間の中で AAR、ADO に関わる様々な実験を自由に行うことが出来たのも、新井先生の丁寧なご指導の賜物と、深く感謝申し上げます。

助教の林先生にはウェスタンブロッティングの系の立ち上げのほか、様々なところで面倒を見てくださり、さらに研究などに対するアドバイスを多く頂けたこと、心より感謝申し上げます。

また、本研究を始めるにあたり、先行研究として AAR のコンストラクトを作製してくださった名和良太さんには、深く感謝申し上げます。

また後輩の榛葉君、野村君には、測定のための条件検討を手伝ってもらいました。同じく後輩のマリさんには、SAXS での AAR、ADO などのサンプル調製などを手伝ってもらいました。

新井研究室の皆様には、たくさんのお支えと協力を頂きました。SAXS での測定では多くの方に測定を手伝ってもらい、感謝しております。様々な場面で私を励まして下さったすべての方々にこの場を借りて深くお礼申し上げます。有難うございました。来年度から、新井研究室のポスドクとして在籍予定ですので、皆様、今後ともよろしくお願い申し上げます。