

論文の内容の要旨

ラン藻由来アルカン合成関連酵素の物性解析 (Analysis of physical properties of cyanobacterial enzymes for alkane biosynthesis)

張 マリ

ラン藻には軽油と重油の主成分であるアルカン（炭素数 13–17）を合成する能力がある。しかし、ラン藻によるバイオ燃料の生産効率は低い。したがってラン藻によるバイオ燃料生産を実用化するためには、その生産効率を高めることが不可欠である。

生物による物質生産効率を向上させる方法の一つとして、物質生産に関与する酵素の活性を高めることがある。ラン藻のアルカン合成に直接関与する 2 つの酵素は、アシル – (アシル輸送タンパク質) 還元酵素 (acyl-(acyl carrier protein (ACP)) reductase, 以下 AAR と略す) とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (aldehyde deformylating oxygenase, 以下 ADO と略す) である。この 2 つの酵素は、2 段階の反応の各段階を触媒する。まず、AAR は NADPH を用いて、脂肪酸合成の中間産物である脂肪酸アシル ACP を長鎖アルデヒドに還元する。次に ADO がアルデヒドのカルボニル基を切除し、C13 – C17 の長鎖アルカン (またはアルケン) とギ酸を合成する。また、この酵素を大腸菌で発現させると、大腸菌がアルカンを合成できるようになる。したがって、生物を使用したアルカン合成の鍵は、AAR と ADO に集約される。

これまでに、AAR と ADO について様々な研究が行われてきているが、AAR と ADO との相互作用、ADO が機能を発現する上で重要なアミノ酸残基、および、ADO を高活性化させる変異体については、未だ明らかでない。これらを明らかにすることは、AAR と ADO を用いたアルカン合成を効率化する上で重要である。そこで本研究では、両酵素を用いた炭化水素生産を効率化することを最終的な目標として、AAR と ADO に関する 2 つの研究を行った。

最初に、AAR と ADO の相互作用について調べた。最近、AAR と ADO が相互作用するということが報告された。これらの相互作用により、ミセルを形成しやすい長鎖アルデヒドを AAR が ADO に効率的に渡すことができる。しかし、この相互作用のメカニズムは未解明である。そこで、分析用のサイズ排除クロマトグラフィー（ゲル濾過; size-exclusion chromatography, SEC）を使用することにより、両酵素の結合に静電相互作用が重要な役割を果たすことが示唆された。また、ADO の基質進入部位周辺の荷電残基のアラニンスキャン変異解析により、E201A 変異体が炭化水素の生産を大幅に減少させることが明らかになった。この変異体の SEC 測定は、ADO の E201 が AAR-ADO 相互作用に必須であることを証明した。以上の結果は、AAR が ADO の基質入口に結合することを示唆しており、こうした結合によって、反応性が高く可溶性の低い長鎖アルデヒドを、AAR から ADO に効率的に受け渡すことが可能になる。

次に、アルカン合成を行う酵素 ADO の機能発現に重要な部位を探索するためにアラニンスキャン変異解析を完成させたあと、その知見を用いて高活性化 ADO を創出することを目指した。アラニンスキャン変異解析の結果から、鉄結合部位や基質結合部位などが ADO の機能発現に特に重要であることがわかった。また、この変異解析の結果を用いて、3 通りの変異体設計を行った。(1) まず、高活性化した変異を多重に組み合わせることにより、ADO の更なる高活性化を目指した。しかし活性の向上は見られなかった。(2) そこで次に、活性が高い変異体に、大腸菌内での可溶性 ADO 量を増加させる L109A 変異を追加導入した結果、活性を増大させる変異を導入するに従って、炭化水素合成量が増大する様子が観測された。(3) 最後に、活性増大に重要と考えられる 2 つの部位において飽和変異解析を行った。1 つ目の部位は、基質進入部位にある W179 残基であり、先行研究では、これが基質の進入を妨げると推定されていた。W179 の飽和変異解析の結果、これを小さなアミノ酸で置換して基質を進入しやすくすると活性が増加した。2 つ目の部位は、アラニンスキャン変異体の中で最も高活性だった R219A 変異体の変異部位である。R219 の飽和変異解析の結果、活性

が野生型よりも 1.85 倍増加した変異体が得られ、今回用いた ADO のあらゆる変異体の中で、最も活性が高い変異体の創出に成功した。