

## 論文審査の結果の要旨

氏名 張 マリ

ラン藻は光合成によって軽油や重油に相当するアルカンを合成できるため、再生可能エネルギーであるバイオ燃料の生産源として注目されている。しかし、その生産効率は低い。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、ラン藻でのアルカン合成に関与する酵素を高活性化させる必要がある。本論文では、これらの酵素の物性や機能の解明と、活性を向上させた変異体の構築を目指した研究について述べられている。本論文は全4章から構成されている。

第1章は全体の序論である。ラン藻でのアルカン合成は、アシルACP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つの酵素による2段階反応で起きる。最近、両酵素が相互作用することによって、AARがADOにアルデヒドを効率的に受け渡すことが報告されたが、両者の相互作用の詳細は未解明であった。また、ADOの活性に重要なアミノ酸残基や、ADOを高活性化させる変異体についても明らかでなかった。そこで本論文では、次の2つを目的として研究を行っている。1つ目は、AARとADOの相互作用の解明であり、2つ目は、変異解析によってADOの活性に重要なアミノ酸残基を同定し、その知見を用いてADOを高活性化させる変異体を構築することである。

第2章では、1つ目の目的であるAARとADOの相互作用の解明について述べられている。まず、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、両酵素の結合が塩濃度に依存することを示し、両者の結合に静電相互作用が重要であることを示した。次に、ADOタンパク質のどの部分がAARとの結合部位であるのかを探索するために、ADOの基質進入部位の荷電残基13ヶ所でアラニンスキャン変異解析を行い、活性が低下する部位を探した。そのうちADOの表面に露出している部位を探した結果、E201残基がAARとの結合部位の候補となった。また、この残基をアラニンに置換した変異体はAARと結合しないことをゲルろ過クロマトグラフィーにより示し、ADOのE201はAAR結合部位であることを証明した。したがってAARは、ADOの基質進入部位付近に結合することによって、アルデヒドを効率的に受け渡すことが示唆されたと述べている。

第3章では、ADOの変異解析により、ADOの活性に重要なアミノ酸残基の同定と、ADOを高活性化させる変異体の構築を行っている。まず、ADOのアラニンスキャン変異解析を完成させ、その結果から、ADOの活性に特に重要な部位を同定した。活性が野生型の半分以下に低下した変異部位は主に保存部位であり、鉄結合部位や基

質結合部位、プロトン供給チャンネルのアミノ酸が特に重要であることがわかった。一方、アラニン置換によって活性が向上した変異部位もあり、それらは主に非保存部位であった。次に、これらの知見を用いて、3通りの方法でADOを高活性化させる変異体の構築を行った。まず、アラニンスクランで高活性化した変異を多重に組み合わせて、ADOの更なる高活性化を目指したが、活性の向上は見られなかった。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変異を組み合わせて導入した結果、ほとんどの変異体の可溶性ADO量が増加した。特に、アラニンスクラン変異解析で最も高活性だったR219AとL109Aを組み合わせることにより、活性を高く維持し、可溶性ADO量を増加させ、炭化水素量を多く合成することに成功した。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。基質の進入を妨害するW179残基で飽和変異解析を行った結果、これを小さなアミノ酸に置換して基質を進入しやすくすると活性が増加した。また、アラニンスクランで最も高活性だったR219A変異体の変異部位での飽和変異解析の結果、活性が野生型よりも約1.9倍増加した変異体を得られ、今回作製した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。

第4章では結論であり、本論文のまとめについて述べられている。本論文ではまず、AARがADOの基質進入部位周辺に結合することを示した。また、AARとADOが結合しないとアルカン合成活性が半減したことから、両酵素の結合はアルカン合成に重要と言える。次に、アラニンスクラン変異解析により、ADOの活性に重要なアミノ酸残基を同定した。また、最高で野生型ADOの約1.9倍の活性を持つ変異体を作製できた。これらの知見は、今後さらに高活性なADO変異体を構築する上で有用であり、ラン藻によるバイオ燃料生産の効率化に貢献できると期待される。

本論文の第2章の内容は*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*誌に出版されており、第3章の内容は投稿準備中である。ともに榛葉啓悟氏、林勇樹博士、新井宗仁教授との共同研究であるが、いずれも提出者が主体となって実験および解析を行い、筆頭著者として執筆したものであり、その寄与が十分であると判断される。