

論文の内容の要旨

Sorbitol production by cyanobacteria toward application of photosynthesis

(光合成の応用に向けたシアノバクテリアによるソルビトール生産)

陳 泰駿
Chin Taejun

【背景】

近年、地球温暖化や化石資源枯渇などの環境・資源問題の解決策として、光合成による二酸化炭素からの物質生産が注目されている。酸素発生型光合成を行う原核生物であるシアノバクテリアは、培養や遺伝子操作が行いやすいことから、光合成の基礎および応用研究のモデルとして汎用されている。シアノバクテリアの光合成能を物質生産に応用していくため、光合成と密接に関わる糖アルコールに着目した。糖アルコールは、光合成の明反応から生じる還元力 NADPH と、カルビン回路の炭酸固定反応で生じる糖を基質として生合成される。光合成生物において不可欠な NADPH と糖を過剰に利用することは、高効率な光合成生産に要求される代謝の本質を探れるかもしれない。

本研究では、生産させる糖アルコールとしてソルビトールに着目した。ソルビトールは、バラ科果樹の転流糖として多く含まれており、乳酸菌などの微生物もソルビトール生産能を有する。どちらも主要な糖リン酸を還元してソルビトール生合成を行うが、その全容、特に中間体ソルビトール-6-リン酸の脱リン酸化とソルビトールの細胞外排出に関わる機構は不明である。一方、ソルビトールは甘味料や保湿剤などの原料として工業利用されているが、従来の生産方法では環境負荷が大きく、結局光合成産物の糖が必要とされる。光合成の場で直接ソルビトールを生産することが望ましいが、バラ科果樹などの食糧と競合した利用は抑え、組み換えシアノ

バクテリアによる光合成生産を推進するためにはソルビトール生合成における様々な代謝改変の効果を探査する必要がある。

そこで本研究では、モデルシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) を代謝改変してソルビトール生産能を付与し、その生産性を向上するうえで重要な因子を探査することで、光合成を物質生産に応用する普遍的な可能性を広げることを目的とした(図)。

【結果および考察】

■シアノバクテリアにおけるソルビトール生産能の付与

ソルビトール生産能が報告されている二つの酵素、乳酸菌由来 NAD 依存ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素 (SrlD2) とリンゴ由来 NADP 依存ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素 (S6PDH) をコードする遺伝子をそれぞれ構成的に強い *trc* プロモーターにつないで *Synechocystis* に導入した。結果、SrlD2 発現では、大腸菌におけるソルビトール生産は確認できたが、*Synechocystis* ではソルビトールを生産しなかった。SrlD2 反応基質の NADH がシアノバクテリア細胞では十分に供給されないためかもしれない。一方、構成的な S6PDH 発現では *Synechocystis* の形質転換体を得られなかった。その原因が S6PDH 発現によるソルビトール生産であると考え、*trc* プロモーターにテオフィリン誘導型リボスイッチを組み込んで *s6pdh* 遺伝子を導入した *Synechocystis* (*s6pdh* 株) を作出した。この *s6pdh* 株をテオフィリン誘導下で培養した結果、光合成によるソルビトール生産に成功した(10 日間の生産培養で 11 mg/L)。しかし、生産に伴って著しく細胞が死滅する増殖阻害を示した。ソルビトール自体に細胞毒性がほとんどないことを考慮すると、ソルビトール生産によって消費される基質グルコース-6-リン酸 (G6P) もしくはその前駆体フルクトース-6-リン酸 (F6P)、および還元力 NADPH の不足が致命的な増殖阻害を引き起こしている可能性が考えられた。

■FBPase 過剰発現の影響

光合成生物における G6P および F6P 供給の律速は、一般にカルビン回路のフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) であるといわれている。そこで、シアノバクテリア内在の調節を受けないことが期待されるハウレンソウ由来 FBPase を過剰発現した株 (*s6pdh/fbp* 株) を作出した。*s6pdh/fbp* 株は、テオフィリン誘導後の致命的な増殖阻害を緩和し、それに伴ってソルビトール生産を継続できた。同様に作出した *Synechocystis* 内在の 2 種の FBPase をそれぞれ過剰発現させた株もソルビトール生産誘導に伴う細胞の死滅を緩和したが、ハウレンソウ由来 FBPase 発現株以上の改善は見られなかった。FBPase 過剰発現株の細胞抽出物で FBPase 活性を調べたところ、ハウレンソウ由来 FBPase 発現株では野生株の約 1.5 倍であったが、内在酵素の過剰発現株ではさらに高かった。以上の結果は、内在の調節を受けない外来の FBPase 発現がソルビトール生産細胞の死滅抑制に有効であることを示唆している。

■NADPH 供給増強へのアプローチ

光合成生産において NADPH 供給は肝要であるが、その強化は容易ではない。NADPH 増

強の第一アプローチとして、NADH からの NADPH 生成を触媒する膜結合型トランスヒドロゲナーゼ (PntAB) に着目した。PntAB は、膜内外の H⁺濃度勾配エネルギーを用い、化学平衡に逆らって NADPH を供給する酵素で、物質生産などで還元力のバランスが崩れるとき有効であると考えられる。*Synechocystis* 内在 PntAB の過剰発現株を作出してソルビトール生産培養を行ったところ、その生産性が明らかに改善され、特に誘導初期では FBPase 過剰発現よりも生産量が多かった。しかし、PntAB 過剰発現のみではソルビトール生産誘導に伴った細胞死滅を FBPase 過剰発現ほどは抑制できなかった。また、細胞内の NADPH と NADP⁺を定量したところ、その親株と比べて NADPH の有意な増加は検出できなかったが、ソルビトール生産誘導後に NADPH の有意な減少が見られた。PntAB 過剰発現によってソルビトール生産が促進されたことから、NADPH 供給増強はソルビトール生産性向上において効果的であるかもしれない。

NADPH 供給増強の可能性を探るため、s6pdh/fbp 株でさらなる改変を試みた。酸化のペントースリン酸経路入り口の律速酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の過剰発現では、ソルビトール生産性は改善しなかった。また、フラボジアイロンタンパク (FLV) や NADPH 脱水素酵素複合体 (NDH) の機能を抑制し、明反応における NADP⁺還元を促すことも試みたが、ソルビトール生産性向上につながる NADPH 増強の影響はあまり見られなかった。NADPH 供給増強によるソルビトール生産性の向上が見えればさらなる検討を行う予定だったが、今のところ良好な効果を検出するには至っていない。NADPH 供給以外の律速要素を改良し、ソルビトールの生合成が行われやすくなるように代謝改変した生産株を用いれば、NADPH 増強の影響をより顕著に見られるかもしれない。

■ソルビトール-6-リン酸脱リン酸化酵素の探索とその応用

代謝改変でソルビトール生産性をさらに向上させるためには、ソルビトール-6-リン酸を積極的にソルビトールに脱リン酸化することが望ましいと考えた。*Synechocystis* および大腸菌はソルビトールを通常は生合成しないので、代謝改変で生じたソルビトール-6-リン酸は非特異的な酵素によって脱リン酸化されていると考えられる。その候補として、ハロ酸デハロゲナーゼ-加水分解酵素スーパーファミリー (HAD) に着目した。HAD に属する酵素は、ほぼ全ての生物に存在しており、様々なリン酸化合物に対して幅広い活性を持つ。比較的糖リン酸の脱リン酸化能が高いと報告されている 6 種の大腸菌 HAD 酵素を生化学解析したところ、4 種がソルビトール-6-リン酸に対して活性を示した。特に、HAD1 および HAD2 は、これまでに知られていた優先的な反応基質と比べても遜色ない触媒効率を示した。

それら活性の高い大腸菌 HAD 酵素を S6PDH 発現シアノバクテリアで過剰発現し、ソルビトール生産性への影響を検討した。興味深いことに、これまでに見られた増殖阻害が改善して明らかにソルビトール生産量が増加し、FBPase と PntAB を共発現させた株でさらにソルビトール生産性が向上した (15 日間の生産培養で 612 mg/L)。この生産株は、常にテオフィリン誘導下で培養しても継続的にソルビトールを生産できた。S6PDH と HAD 発現のみでは常時の生産培養を行えなかったことから、ソルビトール-6-リン酸脱リン酸化の促進だけでは細胞死滅の

阻害を克服できず、FBPase のカルビン回路強化および PntAB の NADPH 増強を組み合わせることが継続的なソルビトール生産性の改善で重要であると考えられる。

【総括】

シアノバクテリアは NADPH 依存的な生合成酵素の導入によってソルビトールを生産でき、死滅抑制と物質生産の異なるステップが重要であることが示唆された。FBPase 共発現はソルビトール生産細胞の死滅を抑制でき、その生産性を PntAB の NADPH 供給増強で向上できた。ソルビトール-6-リン酸の脱リン酸化の促進は死滅抑制と物質生産どちらもさらに改善でき、継続的なソルビトール生産を実現できた。これらの知見に基づいて NADPH 増強や細胞外排出などを試みれば、代謝改変によるソルビトールの光合成生産をさらに推進できるかもしれない。本研究は、光合成産物である糖と還元力を目的の物質生産へつなげる普遍的な可能性を示してくれるだろう。

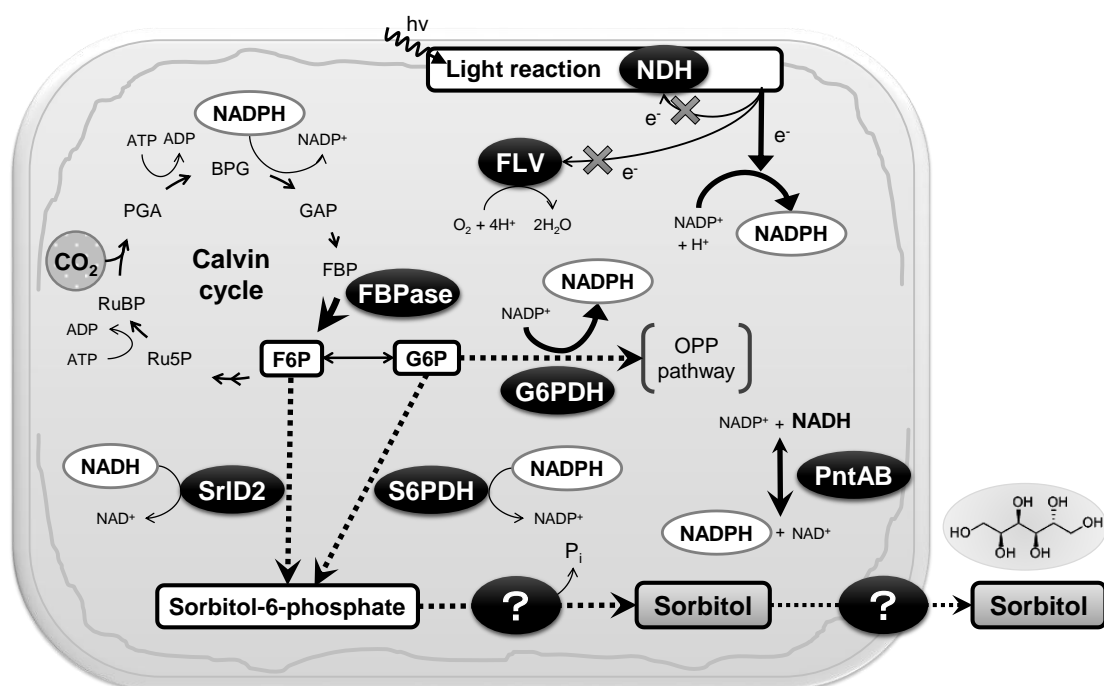


図. 代謝改変シアノバクテリアによるソルビトールの光合成生産.