

## 論文審査の結果の要旨

氏名 陳 泰 駿

本論文は General Introduction、1章、2章、General Discussion の構成になっており、1章ではシアノバクテリアの光合成によるソルビトール生産系の構築と光合成基質供給系の改変、2章ではソルビトール生産に必須なソルビトール6-リン酸ホスファターゼの探索とソルビトール生産への応用について述べており、全体としてシアノバクテリアにおけるソルビトール生産系の開発の総合的な研究となっている。

General Introduction では、シアノバクテリアの光合成による物質生産の重要性とこれまでのシアノバクテリアを用いた研究を整理し、光合成による物質生産における問題点を指摘した。とくに、シアノバクテリアは植物の葉緑体の祖先生物であり、遺伝子改変が容易であるため、これまでに集積された光合成研究の知見を総合して、物質生産へ向けた研究には最適あるとした。そして、シアノバクテリアのエンジニアリングにおける本研究の方針について述べ、生産の標的物質としてソルビトールを選定した。

1章では、常温性のモデルシアノバクテリアを用いて、ソルビトール生産系を構築し、その原材料となる光合成基質の供給系の改変を行った。経路として、光合成の炭酸固定回路から供給されるフルクトース6-リン酸もしくはグルコース6-リン酸を還元してソルビトール6-リン酸を生成し、その脱リン酸化を経て、ソルビトールとして細胞外へ輸送されることを想定した。まず、還元力として NADH を利用する乳酸菌のソルビトールリン酸合成酵素と、NADPH を利用するリンゴの酵素を比較し、大腸菌ではどちらの酵素もソルビトールを生産するが、シアノバクテリアでは後者のみが生産することを見いだした。また、シアノバクテリアにおけるソルビトール生産には細胞毒性があることがわかったので、リボスイッチによる生産誘導系を構築して、その誘導条件を最適化した。NADPH 依存ソルビトールリン酸合成酵素の基質の一つ、グルコース6-リン酸の供給の律速段階は光合成の炭酸固定回路のフルクトースビスホスファターゼといわれている。その遺伝子を植物とシアノバクテリアから単離し、強制発現した。その結果、細胞毒性の大幅な緩和を実現でき、とくにハウレンソウの酵素が有効であった。一方、もう一つの基質である NADPH を供給するため、さまざまな遺伝子改変を行い、シアノバクテリア由来のエネルギー依存型トランスヒドロゲナーゼの強制発現がソルビトール生産に有効であった。しかし、この強制発現による細胞毒性の軽減効果はやや

低いもので、それぞれの基質供給強化には異なる役割が推定された。また、生産されたソルビトールの大半は細胞外へ排出されており、その量は約2 mM程度であった。一方、細胞内のソルビトール濃度は約10 mM程度であり、細胞毒性の有無とは直接的な相関は見られなかった。以上、ソルビトールリン酸合成酵素の選定と誘導の最適化、基質供給系の最適化によって、本来シアノバクテリアが合成しないソルビトールをある程度大量に生産できる系が構築できた。

2章では、ソルビトールリン酸合成酵素の生成物ソルビトール6-リン酸の脱リン酸化を検討した。ソルビトール6-リン酸の脱リン酸化酵素はこれまで報告されていないが、合成酵素を発現させた大腸菌やシアノバクテリアは脱リン酸化されたソルビトールを生産排出することから、同等の活性をもつ酵素がすでに細胞内にある程度存在することが予測された。そのため、大腸菌とシアノバクテリアがもつ、細胞内で幅広いリン酸エステル加水分解活性を示す酵素群（ハロ酸デハロゲナーゼ）に注目し、いくつか候補を選定し、単離して活性を測定した。その結果、ソルビトール6-リン酸ホスファターゼ活性をもつ酵素を4種同定できた。これらには、基質親和性の高いものや触媒活性の高いものが含まれていた。このうち基質親和性の高い酵素を、1章で構築した生産株に導入し、細胞毒性の軽減とソルビトール生産の大きな増強を確認した。結果、細胞外での蓄積量は約3.4 mMまで上昇し、生産はさらに継続していた。

General Discussion では、本研究のまとめとともに、シアノバクテリアにおける光合成による物質生産の展望として考えうる問題について検討した。なお、本研究では、物質生産の鍵となる酵素の発現系の構築と最適化、2つの基質供給系の増強、さらに生産に必要ながまだ未同定の酵素を探索して増強することができた。まだ残っている課題は、未同定の排出系の増強だけといえる。そのため、生産性の上限としての理論生産量を計算し、本研究で実現した生産では、実質的な光合成生産の約27%がソルビトール生産に振り向けられていることが明らかになった。この数字は、本研究でのさまざまな遺伝子改変の結果として十分高いものではあるが、理論上限にはまだほど遠いといえる。この理論上限まで生産を引き上げるために必要な戦略について、理論的な考察をしている。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものであると認定する。