

論文の内容の要旨

論文題目 Basic research for photosynthetic production of isoprenoids in cyanobacteria
(シアノバクテリアを用いたイソプレノイドの光合成的生産に関する基礎研究)

氏名 清田浩史

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成原核生物である。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*)を高効率の光合成物質生産工場へと変えることを目指し、イソプレノイドを目的物とした代謝工学研究を行った。本論文は 1 章 *Synechocystis* を用いたイソプレノイドの生産 2 章 ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) 合成酵素 Slr0739 の酵素学的解析の 2 章からなる。

1 章では、シアノバクテリアを用いたイソプレノイド生産のモデルとして、植物由来のリモネン合成酵素を発現する *Synechocystis* を作製した。シアノバクテリアはイソプレノイドであるカロテノイドやフィトールを非メバロン酸経路である MEP 経路を介して合成する。リモネン合成酵素はイソプレノイド合成経路の中間体であるゲラニルピロリン酸(GPP)を基質として 1 ステップの酵素反応でリモネンを合成する。*Synechocystis* で一般的に用いられる恒常発現プロモータである *trc* プロモータの制御下でリモネン合成酵素を発現する株を作製した。この株の抽出物をガスクロマトグラフィー質量分析器(GC-MS)で分析したところ、リモネン合成酵素導入株の方でのみ、標準品のリモネンと同じ保持時間で溶出するピークが確認され、*Synechocystis* 細胞中でリモネンが合成されていることが確かめられた。

揮発性化合物であるリモネンの生産量を評価するため、ガストリッピング法を用いた生産装置を作製した。ガストリッピング法は、培養液に通気を行うことで、揮発性の生成物を培地から追い出し、その排気中の生成物を冷却トラップにより回収する方法である。この装置を用いてリモネン合成酵素導入株を 168 時間培養し、トラップ中の生成物を GC-MS で分析し、リモネンがトラップ中に捕えられていることを確認した。また、168 時間後の培地についても菌体と培養上清を分け、それぞれに含まれるリモネ

ンの量を定量した。この結果から、ガスストリッピング法により生産されたリモネンはほぼトラップ側に移動し、捕集されていることがわかった。作製した株のリモネン生産速度を評価したところ、100時間以上ほぼ一定速度 (41 $\mu\text{g/L culture/day}$)であった。

生産性をさらに向上させるため、MEP 経路を構成する酵素のうち律速となることが予想されたデオキシシロロース-1-リン酸合成酵素 (Dxs)、GPP 合成酵素 (CrtE)、イソペンテニルピロリン酸 (IPP) 異性化酵素 (Ipi)の 3 個の内在遺伝子を追加増強して、リモネン合成酵素導入株を親株とした MEP 経路強化株を作製した。この株では親株に比べ約 1.4 倍の生産速度の向上が見られた。この株を用いて長期間の生産実験を行った結果、1ヶ月の長期に渡ってリモネンを生産することができた。同様に生産性の向上を目的として、酵母由来のメバロン酸経路遺伝子をリモネン合成酵素導入株に導入した。この株では親株に比べ約 1.7 倍の生産速度の向上が見られた。

リモネン以外のイソプレノイドとしてアモルファジエン合成酵素の導入株を作製し、GC-MS 分析によりアモルファジエンの合成が確認された。アモルファジエン合成酵素導入株では、リモネン合成酵素導入株に比べ高い生産性を持つ可能性が示唆された。

2 章では、シアノバクテリアの内在のゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP)合成酵素 (Slr0739)の酵素学的解析を行った。GGPP 合成酵素はジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP)から、GPP、ファルネシルピロリン酸 (FPP)を経て GGPP を合成する酵素である。まず生成物である GPP、FPP、GGPP の GC-MS による定量法を確立した。次に Slr0739 をクローニングし、大腸菌中で発現させてリコンビナントタンパク質を得た。得られた Slr0739 タンパク質を DMAPP と IPP と共に反応させ、各生成物の蓄積プロファイルを経時的に調べた。この結果、中間体 GPP や FPP の蓄積は低く、最終産物の GGPP を主に蓄積した。また、蓄積プロファイルとしては GPP→FPP→GGPP の順であった。次に、DMAPP、FPP を基質とした短時間の酵素反応の結果を解析し、酵素学的パラメータ k_{cat} や K_m の値を得た。GPP に対する k_{cat} や K_m を得ることはできなかったが、中間生成物(GPP、FPP)の蓄積プロファイルについて、シミュレーション解析と蓄積プロファイルとの比較から、Slr0739 は GPP と FPP に対してほぼ同程度の k_{cat} や K_m を持つことを推定した。また実験とシミュレーションでの反応の進行を比較すると、実験の方が速く最終生成物の GGPP が蓄積していた。これは中間生成物が酵素にすぐに再結合することで反応が促進されているためと考えられる。また、GPP の蓄積が非常に少ないこと、FPP の蓄積は低いながらも GPP より高いことは、1 章で示したリモネンの合成速度がアモルファジエンより遅いことと対応しているのかもしれない。

本研究によって、シアノバクテリアで初めてリモネンの光合成による合成を実現し、その前駆体の供給系の強化や導入によって、リモネン生産を増強することに成功した。リモネンは内在の必須イソプレノイドの合成経路の途中から生産しているため、リモネン合成の直近の前駆体を供給する GGPP 合成酵素の酵素学的研究を行い、特殊な反応機構を推定するとともに、前駆体供給の問題点も明らかにした。今後、さまざまなイソプレノイド生産を改良するために検討すべき問題への対処法も明らかになったと考えている。また、さまざまな物質の光合成生産をさらに改良するためには、もっと基本的な代謝経路の改変や新規経路の導入が必要と考えられる。そのためには、遺伝子を自在に改変、導入できるシアノバクテリアのさらなる育種が求められており、本研究はその礎となると期待している。