

## 論文審査の結果の要旨

氏名 清田浩史

本論文は General Introduction、1章、2章、General Discussion の構成になっており、1章ではリモネンやアモルファジエンの光合成による生産を述べ、2章ではイソプレノイド生産における重要な多段階酵素ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) 合成酵素の酵素学的研究について述べている。

General Introduction では、光合成による物質生産の問題点とイソプレノイド生産の概略、研究方針について述べている。

1章では、植物のリモネン合成酵素をシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入し、ガス・ストリッピング法の構築によって揮発性生産物を回収し、ガスクロマトグラフィー・質量分析法 (GC-MS) によって生産物の同定と定量を行った。この株では、100時間以上の間、ほぼ一定速度 (41  $\mu\text{g/L culture/day}$ ) でリモネンを生産した。リモネン合成酵素は基質としてゲラニルピロリン酸を用いるので、その供給経路の増強として、内在の非メバロン酸経路の MEP 経路の律速となりそうなデオキシキシルロース-1-リン酸合成酵素、ゲラニルピロリン酸 (GPP) 合成酵素、イソペンテニルピロリン酸 (IPP) 異性化酵素の遺伝子をシアノバクテリア自身からクローニングし、強いプロモーターをつないで発現させた。この株では、約 1.4 倍のリモネン生産の増強が見られた。また、シアノバクテリアが本来もたないメバロン酸経路の 6 種の酵素の全遺伝子 (酵母由来) を導入した株では、リモネン生産が約 1.7 倍に増強された。

また、ゲラニオール合成酵素やアモルファジエン合成酵素を導入して、同様の系で生産評価をした。前者ではゲラニオール派生物と思われる産物、後者ではアモルファジエンとされる産物が得られた。とくに後者の生産速度はリモネンの約 10 倍であった。

2章では、シアノバクテリアの内在の 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 を大腸菌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 タンパク質に DMAPP と IPP を添加し、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 がおもに蓄積した。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。つまり、イソプレノイド生産酵素の直接の基質濃度を上げることが、生産性の向上において重要かもしれない。

General Discussion では、本研究のまとめとともに、イソプレノイド生産における問題点を整理し、さらなる増強に向けた方策や光合成の物質生産への展望を述べている。

本研究によって、光合成微生物によるリモネン生産をリコンビナントで初めて実現し、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も成功した。また、リモネン合成の前駆体供給の観点から、GGPP 合成酵素の酵素学的研究を行い、初めて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。これによって、光合成によるイソプレノイド生産における検討すべき問題と対処法も明らかになった。また、本研究を発展させて、さらに基本的な代謝経路の改変や新規経路の導入を新たに提案することで、光合成物質生産の増強や光合成効率の改良への展望を開いた。そのような取り組みには、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、本研究はその礎ともなると期待される。

なお、本論文第 1 章は、奥田裕紀子、伊藤美千穂、平井優美、池内昌彦との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。