

氏名	工藤 海
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	甲 第 7 2 号
学位授与の日付	平成 2 9 年 3 月 2 0 日
学位授与の要件	信州大学学位規程第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Analysis and engineering of MEP pathway for highly efficient isoprenoid production in cyanobacteria (シアノバクテリアにおける高効率イソプレノイド生産のための MEP 経路の解析と改変)
論文審査委員	主査 教授 中村 宗一郎 教授 藤井 博 教授 鏡味 裕 教授 福田正樹 教授 前田 瑞夫 (理化学研究所)

論 文 内 容 の 要 旨

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う唯一の細菌群であることから、光合成を利用したクリーンな物質生産が可能なホストとして近年高い注目を浴びている。今回私は、同菌体における生産物質としてイソプレノイドに焦点を当てた。イソプレノイドはイソプレンを構成単位とした化合物群であり、医薬品原料、エネルギー物質など様々な有用物質が存在している。しかしながら、これらイソプレノイドは天然における存在量が少なく、また合成も困難であることから、遺伝子工学による生合成能の向上が求められている。生合成においてすべてのイソプレノイドはイソペンテニルニリン酸 (IPP) とジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) という二つの物質を原料として生産される。そして、これら IPP と DMAPP はシアノバクテリアにおいて非メバロン酸経路 (MEP 経路) によって生産される。よって、イソプレノイド生合成能の向上にはこの MEP 経路の強化が不可欠である。そこで、本論文ではシアノバクテリアの MEP 経路強化によるイソプレノイド生産の増加を目指した。

本論文は以下の章より構成され、各章の概要は以下の通りである。

第 1 章では、本研究の生産ホストであるシアノバクテリアおよび目的物質であるイソプレノイドについての基本的な事項について記述した。

第 2 章では、シアノバクテリアのイソプレノイド増産を目指し、MEP 経路の律速段階と予想される 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases (DXS) の過剰発現を行い、同変異体におけるイソプレノイド生産量を調べた。また、MEP 経路と競合する経路を明らかにするために、イソプレノイド以外の炭素含有物質 (糖・脂肪酸・タンパク質) の定量を行なった。その結果、DXS 過剰発現株 (DXS_{ox}) において、DXS タンパク質の 1.5 倍の発現増加、およびイソプレノイドの一種であるカロテノイドの 1.5 倍の増産に成功した。また炭素含有物質定量の結果、シアノバクテリアでは細胞壁や集光タンパク質であるフィコシアニンタンパク質などの細胞構成成分の合成に多くの炭素が使用されていることが明らかとなった。これら結果から、シアノバクテリアのイソプレノイド生産の増強には、更なる DXS 発現の強化と、細胞構成成分つまりは細胞成長との炭素の奪い合いを回避することが必要であることが判明した。

第 3 章では、シアノバクテリアにおけるより最適な MEP 経路評価系の開発を目指し、イソプレノイド生産株の作出および、その回収法の確立を目指した。イソプレノイドは MEP 経路の最終産物である DMAPP より一段階で合成され、かつ菌体内に蓄積しない揮発性物質であることから MEP 経路の炭素フラックスをより直接的に反映する物質であると考えられ

る。結果、野生株 (WT) および DXS_{ox} 株にクズ由来イソプレレン合成酵素(IspS)を導入することで、イソプレレン生産株である WT-isP 株および DXSox-isP 株の作出に成功した。また、活性炭チューブを用いることで、通気条件下におけるイソプレレン生産株からのイソプレレン回収に成功した。更に、WT-isP 株および DXSox-isP 株における DXS タンパク質の可溶性発現量の比較を行った。すると興味深いことに、DXS 過剰発現株である DXSox-isP 株において WT-isP 株よりも低い DXS タンパク質蓄積量が確認された。そこで、DXS タンパク質の発現をより詳細に調査したところ、DXS-isP において発現した DXS タンパク質の多くが不溶化されていることが判明した。一方、異種由来酵素である IspS タンパク質の発現は WT-isP 株と DXSox-isP 株の間で大きく変わらなかった。このことから、シアノバクテリアにおいて内在性 DXS は翻訳後調節を受けていることが示され、内在性 DXS の過剰な発現はその不溶化を引き起こすことが明らかとなった。それゆえ、シアノバクテリアにおいて内在性 DXS の大幅な過剰発現は困難であることが判明した。

第 4 章では、シアノバクテリアにおける内在性 DXS の翻訳後調節の結果を受け、より高活性かつ高安定な異種 DXS の発現が MEP 経路強化に必須であると考え、異種生物からの DXS の取得を目指した。具体的には 9 種の生物より計 11 種類の DXS を大腸菌システムにより発現し、可溶性・活性強度・フィードバック阻害、また安定性の指標としてプロテアーゼ耐性・熱耐性について調査した。その結果、*Paracoccus aminophilus* 由来 DXS は最も高い可溶性を、*Bacillus subtilis* 由来 DXS は最も高いフィードバック耐性およびプロテアーゼ耐性を、*Rhodobacter capsulatus* 由来 DXS は最も高い活性および熱耐性をそれぞれ示した。これら 3 種をシアノバクテリア内で高い安定性・活性を示すことが可能な DXS の候補として選択した。

第五章では本論文全体の総括を行うとともに、今後の課題について述べた。