

氏名	川原 彰人
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工乙第 250 号
学位授与年月日	令和元年 9 月 20 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 による遊離脂肪酸高生産
論文審査委員	委員長 教授 日原由香子 委員 教授 西田 生郎 委員 教授 西山 佳孝 委員 教授 戸澤 讓

## 論文の内容の要旨

近年、地球環境問題やエネルギー問題の解決策としてバイオ燃料生産が注目を集め、主に植物由来の可食バイオマスを用いた発酵生産法での商業生産が急増した。しかし、食料生産との競合が課題となっており、これを解決することのできるサステナブルなバイオ燃料生産法として、真核藻類やシアノバクテリアの光合成能を利用した生産法の開発が進められている。中でも培養や遺伝子改変が容易なシアノバクテリアでは、すでに様々な脂肪酸誘導体の生産技術が確立されており、効率的なバイオ燃料生産宿主として有望視されている。しかし、現時点でのシアノバクテリアの脂肪酸誘導体生産性は低く、実用化を目指して生産性向上技術の開発が進められている。本学位論文では、シアノバクテリアの遊離脂肪酸生産性の向上を目的とし、これまでに報告例のない転写因子の欠損というアプローチから、炭素代謝フラックスの改変を試み、これらの代謝改変が生理活性および脂肪酸生産性へ及ぼす影響を解析した。

第 1 章では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 において、炭素代謝および窒素代謝の制御に関わる *cyAbrB2* 転写因子の欠損株 ( $\Delta cyabrB2$ ) は、余剰炭素をグリコーゲンとして蓄積することから、この余剰炭素を原料とする遊離脂肪酸高生産を目的として、 $\Delta cyabrB2$  株に脂肪酸放出代謝改変を施した効果について記述している。 $\Delta cyabrB2$  株をバックグラウンドとして、アシル ACP シンテターゼ遺伝子 *aas* を破壊し、外来のチオエステラーゼ遺伝子 *UcTE* を導入する脂肪酸放出代謝改変を施した  $\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$  株では、野生株バックグラウンドの  $\Delta aas::UcTE$  株に比べて脂肪酸生産性が 2 倍以上増加し、増殖速度や光合成活性は同等であったことから、*cyAbrB2* 欠損が脂肪酸生産性を向上させる効果を持つこと、および  $\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$  株が脂肪酸誘導体生産宿主として有用であることが示された。代謝解析により  $\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$  株において酸化性的ペントースリン酸経路の糖リン酸の高蓄積が検出されたことから、脂肪酸生合成に必要な補酵素 NADPH の本経路での生産が充進した結果として、脂肪酸生産性が向上した可能性が示唆された。一方で、 $\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$  株は脂肪酸非放出株の  $\Delta cyabrB2$  株と同程度のグリコーゲンを依然高蓄積しており、グリコーゲン合成経路の欠損またはグリコーゲン分解促進による、さらなる脂肪酸生産性向上の可能性が示唆された。

第 2 章では、*cyAbrB2* およびグリコーゲン合成経路二重欠損 ( $\Delta cyabrB2\Delta glgC$ ) の表現型解析および脂肪酸生産性への影響の解析結果を記述している。 $\Delta cyabrB2$  株のグリコーゲン合成経路を欠損させるため、鍵

酵素であるグルコース-1-リン酸アデニルトランスフェラーゼをコードする *glgC* 遺伝子の破壊を試みたが、完全破壊株が得られなかった。そこで、 $\Delta cyabrB2$  株に銅イオン誘導プロモーター *PpetE* に接続した *cyabrB2* 遺伝子を導入し、*cyabrB2* 誘導条件である通常培養条件下で *glgC* を完全破壊した後に、銅欠乏条件下に移すことで  $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損状態を達成した。この条件下で代謝解析や電子顕微鏡観察を行った結果、 $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損により、解糖系や酸化的ペントースリン酸経路の糖リン酸類の減少、有機酸やアミノ酸の蓄積、ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) などの貯蔵物質の蓄積が顕著に見られた。以上の結果から、 $\Delta cyabrB2$  株では解糖系や酸化的ペントースリン酸経路の糖リン酸が高蓄積しているが、それに加えグリコーゲン合成経路を欠損した場合には、代謝経路上さらに下流に位置するクエン酸回路やアミノ酸合成経路に余剰炭素が流入することが示された。これは糖リン酸の過剰蓄積を防ぐための代謝応答であると考えられる。さらに、脂肪酸放出代謝改変  $\Delta aas::UcTE$  を導入した株を用いて、 $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損が脂肪酸生産性に及ぼす影響を解析したところ、 $\Delta glgC$  の増産効果は窒素欠乏条件下で特異的に観察されること、 $\Delta cyabrB2$  および  $\Delta glgC$  の単独破壊の効果に比べて二重破壊の増産効果が高く、野生株バックグラウンドの脂肪酸放出株に比べて3倍以上の生産性を示すことが明らかとなった。

第3章では、 $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損に、PHB合成経路欠損を組み合わせることの脂肪酸生産性への影響の解析結果を記述している。 $\Delta cyabrB2\Delta glgC\Delta phaAB$  三重欠損株は、銅欠乏条件下で窒素の有無によらず  $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損株より脂肪酸生産性が1.7倍向上したことから、シアノバクテリアにおける炭素貯蔵物質の主要形態であるグリコーゲンとPHBの両方を欠損させることで、代謝フラックスが変化し、目的通り余剰炭素を脂肪酸合成に優先的に流入、利用することができた可能性が示唆された。

以上、本学位論文では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 に、*cyAbrB2* 転写因子の欠損と炭素貯蔵物質合成経路の欠損を組み合わせ実施し、詳細な表現型解析を行った。その結果、*Synechocystis* sp. PCC 6803 には、余剰炭素による生育阻害を回避するため、柔軟に炭素代謝フラックスを切り替える代謝応答機構が備わっていることを明らかにした。さらに、これらの株に脂肪酸放出代謝改変を施すことにより、炭素代謝フラックスの制御が脂肪酸誘導体生産効率の増加に寄与するという応用研究に有用な知見を得た。今後、炭素フラックスの制御による生産性向上技術と、細胞外への脂肪酸排出促進などの生産性向上技術を組み合わせることで、遊離脂肪酸生産性をさらに向上させることができると期待される。

## 論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、川原彰人氏の提出した学位論文について、令和元年8月8日に理学部第3会議室において公開で論文発表会を開催し、論文内容の審査を行った。審査結果を以下に要約する。

近年、地球環境問題やエネルギー問題の解決策としてバイオ燃料生産が注目を集め、主に植物由来の可食バイオマス为原料とした発酵法での商業生産が急増している。しかしこれらの生産法は、食料生産との競合が課題となっており、これを解決することのできるサステナブルな手段として、真核藻類やシアノバクテリアの光合成能を利用した生産法の開発が進められている。中でも培養や遺伝子改変が容易なシアノバクテリアは効率的なバイオ燃料生産宿主として有望視されており、すでに様々な脂肪酸誘導体の生産技術が確立されている。しかし、現時点でのシアノバクテリアの脂肪酸誘導体生産性は低く、実用化を目指して生産性向上技術の開発が進められている。本学位論文では、シアノバクテリアの遊離脂肪酸生産性の向上を目的とし、これまでに報告例のない転写因子の欠損というアプローチから、炭素代謝フラックスの改変を試み、これらの代謝改変が生理活性および脂肪酸生産性へ及ぼす影響を解析している。

第1章では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 において、炭素代謝および窒素代謝の制御に関わる *cyAbrB2* 転写因子の欠損株 ( $\Delta cyabrB2$ ) は、余剰炭素をグリコーゲンとして蓄積することから、この余剰炭素を原料とする遊離脂肪酸高生産を目的として、 $\Delta cyabrB2$  株に脂肪酸放出代謝改変を施した効果について記述している。 $\Delta cyabrB2$  株をバックグラウンドとして、アシル ACP シンテターゼ遺伝子 *aas* を破壊し、外来のチオエステラーゼ遺伝子 *UcTE* を導入する脂肪酸放出代謝改変を施した  $\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$  株では、野生株バックグラウンドの  $\Delta aas::UcTE$  株に比べて脂肪酸生産性が2倍以上増加し、増殖速度や光合成活性は同等であったことから、*cyAbrB2* 欠損が脂肪酸生産性を向上させる効果を持つこと、および  $\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$  株が脂肪酸誘導体生産宿主として有用であることが示された。さらに、 $\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$  株は脂肪酸非放出株の  $\Delta cyabrB2$  株と同程度のグリコーゲンを依然として高蓄積していたことから、グリコーゲン合成経路の欠損またはグリコーゲン分解促進による、さらなる脂肪酸生産性向上の可能性が示唆された。

第2章では、*cyAbrB2* およびグリコーゲン合成経路二重欠損 ( $\Delta cyabrB2\Delta glgC$ ) の表現型解析および脂肪酸生産性への影響の評価結果を記述している。第1章での結果を受け、 $\Delta cyabrB2$  株を用いてのさらなる脂肪酸生産性向上を目指すため、グリコーゲン合成経路の鍵酵素であるグルコース-1-リン酸アデニルトランスフェラーゼをコードする *glgC* 遺伝子の破壊を試みたが、完全破壊株を得ることができなかった。そこで、 $\Delta cyabrB2$  株に銅イオン誘導プロモーター *PpetE* に接続した *cyabrB2* 遺伝子を導入し、*cyabrB2* 誘導条件である通常培養条件下で *glgC* を完全破壊した後に、銅欠乏条件下に移すことで  $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損状態を達成した。この条件下で代謝解析や電子顕微鏡観察を行った結果、 $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損により、解糖系や酸化的ペントースリン酸経路の糖リン酸類の減少、有機酸やアミノ酸の蓄積、ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) などの貯蔵物質の蓄積が顕著に見られた。

以上の結果から、 $\Delta cyabrB2$  株では解糖系や酸化的ペントースリン酸経路の糖リン酸が高蓄積しているが、それに加えグリコーゲン合成経路を欠損した場合には、代謝経路上さらに下流に位置するクエン酸回路やアミノ酸合成経路に余剰炭素が流入することが示された。これは糖リン酸の過剰蓄積を防ぐための代謝応答であると考えられる。さらに、脂肪酸放出代謝改変  $\Delta aas::UcTE$  を導入した株を用いて、 $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損が脂肪酸生産性に及ぼす影響を解析したところ、 $\Delta glgC$  の増産効果は窒素欠乏条件下で特異的に観察されること、 $\Delta cyabrB2$  および  $\Delta glgC$  の単独破壊の効果に比べて二重破壊の増産効果が高く、野生株バックグ

ラウンドの脂肪酸放出株に比べて3倍以上の生産性を示すことが明らかとなった。

第3章では、 $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損に、PHB 合成経路欠損を組み合わせることの脂肪酸生産性への影響の解析結果を記述している。 $\Delta cyabrB2\Delta glgC\Delta phaAB$  三重欠損株は、銅欠乏条件下で窒素の有無によらず  $\Delta cyabrB2\Delta glgC$  二重欠損株より脂肪酸生産性が1.5倍以上向上したことから、シアノバクテリアにおける炭素貯蔵物質の主要形態であるグリコーゲンと PHB の両方を欠損させることで、代謝フラックスが変化し、目的通り余剰炭素を脂肪酸合成に優先的に流入、利用することができたと考えられた。

以上、本学位論文では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 に、*cyAbrB2* 転写因子の欠損と炭素貯蔵物質合成経路の欠損を組み合わせ実施し、詳細な表現型解析を行った。その結果、*Synechocystis* sp. PCC 6803 には、余剰炭素による生育阻害を回避するため、柔軟に炭素代謝フラックスを切り替える代謝応答機構が備わっていることを明らかにした。さらに、これらの株に脂肪酸放出代謝改変を施すことにより、炭素代謝フラックスの制御が脂肪酸誘導体生産効率の増加に寄与するという応用研究に有用な知見を得た。今後、炭素フラックスの制御による生産性向上技術と、細胞外への脂肪酸排出促進などの生産性向上技術を組み合わせることで、遊離脂肪酸生産性をさらに向上させることができると期待される。

申請者は、本論文の第1章の内容を筆頭著者として、第2章の内容を筆頭共著者として、査読付き英文学術雑誌に発表しており、さらに二報の論文を共著者として発表している。以上のことから、当学位論文審査委員会は、本論文が博士（理学）の学位授与に十分値するものと認め「合格」と判定した。