

論文の要約

報告番号	第 250 号 乙	氏名	川原 彰人
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		
論文の要約			
<p>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望まれている。本学位論文では、シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (S.6803) を用いて、炭素代謝の改変が、細胞増殖や代謝および脂肪酸生産性へ及ぼす影響を解析し、光合成で固定した炭素の脂肪酸生合成への利用を促進する改変技術の確立を目指した。具体的には、炭素・窒素代謝の制御に関わる <i>AbrB</i> 型転写因子の欠損により、炭素代謝挙動が大きく変化した結果、グリコーゲンを高蓄積している $\Delta cyabrB2$ 株を親株に用い、炭素代謝フラックスを改変して、グリコーゲン合成に利用されている余剰炭素の脂肪酸合成への利用を促進し、遊離脂肪酸生産性へ及ぼす影響を解析した。</p> <p>第 1 章では、$\Delta cyabrB2$ 株の脂肪酸生産性を評価するために、脂肪酸放出代謝改変としてアシル ACP シンターゼ遺伝子 <i>aas</i> の破壊およびチオエステラーゼ <i>UcTE</i> 遺伝子の導入を施し、$\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$ 株を作出した。この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約 2.5 倍増加し、増殖速度や光合成活性は野生株と同様であったことから、<i>cyAbrB2</i> 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。メタボローム解析より、$\Delta cyabrB2\Delta aas::UcTE$ 株は $\Delta aas::UcTE$ 株に比べて、酸化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、本経路での脂肪酸生合成に必要な補酵素 NADPH の生産が亢進した結果として、脂肪酸生産性が増加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って、さらに脂肪酸生産性を向上させられる可能性が示唆された。</p> <p>第 2 章では、$\Delta cyabrB2$ 株のグリコーゲン合成経路を欠損させるために、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 <i>glgC</i> 遺伝子の破壊を試みたが、完全破壊株を取得できなかったため、$\Delta cyabrB2$ 株に銅イオン誘導プロモーター <i>PpetE</i> に接続した <i>cyabrB2</i> 遺伝子を導入し、<i>cyabrB2</i> 誘導条件である通常培養条件</p>			

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。銅欠乏条件下の $\Delta glgC$ 株および $\Delta cyabrB2\Delta glgC$ 二重欠損状態のメタボローム解析や電子顕微鏡観察を行った結果、 $\Delta glgC$ バックグラウンドでは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、アミノ酸や有機酸の蓄積、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 TCA 回路やアミノ酸合成経路、および炭素貯蔵物質の合成経路に余剰炭素が流入することが示された。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、*glgC* 欠損による脂肪酸増産効果は窒素欠乏条件下で特異的に観察されること、窒素欠乏条件下では $\Delta cyabrB2$ 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、 $\Delta cyabrB2\Delta glgC$ 二重欠損状態で余剰炭素の新たな蓄積形態として示唆された PHB 合成経路の欠損を組み合わせた $\Delta cyabrB2\Delta glgC\Delta phaAB$ 三重欠損状態株を作製した結果、三重欠損状態となる銅欠乏条件下では、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約 1.7 倍向上することが示された。一方で、 $\Delta cyabrB2\Delta glgC$ 二重欠損状態または $\Delta cyabrB2\Delta phaAB$ 二重欠損状態では、銅欠乏条件下での脂肪酸生産性向上が見られなかったことから、主要な炭素の蓄積形態であるグリコーゲンと PHB の同時欠損により、炭素代謝フラックスが変化し、狙い通りに余剰炭素を脂肪酸合成に流入・利用させることができた可能性が示唆された。一方、野生株バックグラウンドでは、グリコーゲンと PHB の両方を欠損しても脂肪酸生産性が向上せず、これらの欠損効果を引き出すためには *cyAbrB2* の欠損が必須であることが示された。

以上、本研究により、S.6803 には、余剰炭素による生育障害を回避するため、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、*cyAbrB2*、グリコーゲン合成、PHB 合成の三重欠損を、S.6803 の炭素代謝フラックス制御による新規な脂肪酸生産性の向上技術として確立した。