

シアノバクテリアの糖異化経路の重点的解析  
-酵素に着目した解析による酸化的ペントースリン酸  
経路とトリカルボン酸回路の生化学特性の解明-

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-03-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊東, 昇紀 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/22270">http://hdl.handle.net/10291/22270</a>

## 「博士学位請求論文」審査報告書

審査委員 (主査) 農学部 専任准教授

氏名 小山内 崇

(副査) 農学部 専任教授

氏名 中島 春紫

(副査) 農学部 専任准教授

氏名 鈴木 博実

1 論文提出者 伊東 昇紀

2 論文題名 シアノバクテリアの糖異化経路の重点的解析：酵素に着目した解析による酸化的ペントースリン酸経路とトリカルボン酸回路の生化学的特性の解明

(英文題) Focused analyses of cyanobacterial sugar catabolic pathways: elucidation of biochemical characteristics of the oxidative pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by the analyses focused on their enzymes.

### 3 論文の構成

本論文は、第1章から第4章までの4章構成となっている。第1章では、本研究の背景と目的について記述し、第2章以降で研究内容および成果を記述した。

### 4 論文の概要

微細藻類は、酸素発生型光合成を行う微生物の総称である。本論文は、微細藻類の中でも遺伝的取り扱い法等の研究ツールが揃っているシアノバクテリアを主材料として糖代謝の制御機構に着目し、酵素の生化学的手法を用いて解析した。

第1章では、シアノバクテリアの糖異化経路の特徴を説明した。シアノバクテリアの糖異化経路は、上流の3つの経路と下流のTCA回路から構成される。シアノバクテリアの糖異化上流は、解糖系、酸化的ペントースリン酸経路 (OPP 経路)、エントナー・デュールドルフ経路 (ED 経路) の3つの経路から構成される。また、下流のTCA回路は、2-オキソグルタル酸 (2-OG) デヒドロゲナーゼが存在せず、バイパス経路を介してサイクルが形成される特殊な代謝経路を有している。

これまでのシアノバクテリアの糖代謝研究は、メタボローム解析をはじめとするオミクス解析や、

遺伝子改変株を用いた遺伝学的解析、シグマ因子や転写因子を中心とした遺伝子発現解析が中心であった。一方、酵素の生化学解析の報告は少なく、もっとも研究が行われているシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 (シネコシスティス) でも、クエン酸回路の酵素については、2016 年以前には 1 つの酵素しか生化学解析の結果が公表されていなかった。本研究では、シネコシスティスを中心に糖異化経路の中で還元力である NADPH の生産に関与する酵素群の解析を行なった。

第 2 章では、OPP 経路の NADPH 生成酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼと 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼの生化学解析を行ない、シアノバクテリアの両酵素が従属栄養生物の酵素と比べて高い活性を有するとともにクエン酸によって活性阻害を受けることを明らかにした。一方、クエン酸回路における NADPH 生成酵素であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼとコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、クエン酸によって阻害を受けなかった。これらの結果は、TCA 回路が活性化してクエン酸が蓄積された場合は、上流の OPP 経路が阻害される可能性を示唆し、糖異化の上流と下流で還元力生産を相互に制御している可能性が示された。

第 3 章では、3 つの酵素を組み合わせた試験管内での代謝再構成実験を行なった。生化学解析では基本的に 1 つの酵素を精製し、その特性を明らかにするが、実際の細胞内では代謝は連続しており、酵素を組み合わせることで初めて明らかになる事象が存在すると考えた。本研究では、ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸を生成するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、クエン酸回路の酵素であるクエン酸シンターゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの 3 つの酵素を組み合わせ、クエン酸回路におけるリンゴ酸分配の鍵因子の探索を行なった。その結果、pH が低下すると、TCA 回路が還元的に進行してオキサロ酢酸からリンゴ酸の方向へ炭素が流れることが明らかになった。この結果は、シネコシスティスを暗嫌気条件で培養すると、TCA 回路が逆回転してコハク酸などの C4 ジカルボン酸が生成する結果と一致する。以上より、合成生物学的手法を用いることにより、シネコシスティスの TCA 回路の特性を明らかにした。

第 4 章では、通常培養条件におけるリンゴ酸の分配について解析した。通常の TCA 回路では、リンゴ酸はリンゴ酸デヒドロゲナーゼによってオキサロ酢酸に変換される。しかし、これまでの生化学解析から、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性が逆の方向であるオキサロ酢酸からリンゴ酸への活性が強いことが判明し、本酵素が基質として NAD<sup>+</sup>を用いる一方で、他の TCA 回路の酵素が NADP<sup>+</sup>を利用することも疑問であった。生化学的解析により、リンゴ酸をピルビン酸に変換するリンゴ酸酵素が基質として NADP<sup>+</sup>を用いてリンゴ酸の代謝に働くことが明らかになった。また、リンゴ酸への触媒効率、リンゴ酸酵素がリンゴ酸デヒドロゲナーゼの 264 倍であり、リンゴ酸酵素の遺伝子欠損株を作製したところ、細胞内のリンゴ酸濃度が上昇することも判明した。以上より、シアノバクテリアではリンゴ酸がリンゴ酸酵素を経由する特殊な TCA 回路を有する可能性が示唆された。

## 5 論文の特質

本論文は、シアノバクテリアの酵素の生化学解析を中心に、糖代謝の全体像の解明に挑戦したものである。個別の酵素の活性制御については、多くの研究が行われているが、本研究では、クエン酸によって OPP 経路の主要な酵素が、2 つ同時に抑制されることを明らかにした。この結果は、クエン酸により代謝経路の変換を伴って制御されることを明らかにしたものであり、このような

代謝経路レベルでの制御機構の発見は、非常に珍しいものである。

また、3つの酵素を組み合わせた合成生物学的研究も行なった。1つずつの酵素の生化学解析では、細胞内で行われる代謝の連続的な反応は解析することができない。一方で、細胞を用いた遺伝子改変株の解析では、相補的な調節機構のため、個別の代謝反応を解析することが困難である。本研究では、3つの酵素を組み合わせることで、pHやマグネシウムイオンが、代謝の方向性を決めることを明らかにした。これは、個別の酵素の生化学解析では明らかにならなかったことであり、試験管内で連続的な酵素反応を再構成することの重要性を明らかにしたものである。また、これらの結果は、シアノバクテリアの発酵研究の結果とも一致しており、代謝工学への応用も期待できる結果である。

## 6 論文の評価

伊東氏の博士学位請求論文は、シアノバクテリアにおける多数の酵素の生化学解析を中心に、糖代謝の制御機構を明らかにしたものである。糖代謝酵素の個別の生化学解析から出発し、代謝のパスウェイレベルでの制御の解明、合成生物学的解析による代謝制御の鍵因子の発見により新しい代謝経路の提示にたどり着いた研究成果は、学術的に高く評価できる。

伊東氏は、博士後期課程在学中に、The Plant Journal や Biochemical Journal などの国際誌に3報の筆頭著者論文を発表し、The Plant Journal 誌に掲載された論文は同誌の Research highlights にも選出された。これらに加え、伊東氏は博士前期課程修了までに3報の筆頭著者論文を発表しており、これらの結果を統合・発展させた本論文は、シアノバクテリアにおける代謝研究で欠けていた酵素の生化学解析を補完することになった。これらの研究成果は、シアノバクテリアは代謝酵素から遺伝子の発現制御、さらにメタボローム解析の結果を統合的に考察することを可能にするものである。

## 7 論文の判定

本学位請求論文は、農学研究科において必要な研究指導を受けたうえ提出されたものであり、本学学位規程の手続きに従い、審査委員全員による所定の審査及び最終試験に合格したので、博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定する。

以上

主査氏名(自署) \_\_\_\_\_