

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	http://hdl.handle.net/10291/22270

2021年度 農学研究科

博士学位請求論文 (要旨)

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

農芸化学専攻

伊東 昇紀

1 問題意識と目的

環境問題や石油の枯渇問題が懸念される近年、石油の代わりに、再生可能資源であるバイオマスを利用して有用物質を生産する「バイオリファイナー」への転換が求められている。バイオマス資源として長年利用されてきたのが、トウモロコシなどの植物である。植物は、光合成で固定した二酸化炭素からデンプンをつくる。そして、そのデンプンを糖化し、従属栄養微生物に与えて発酵 (生産) を行う。しかしながら、この植物を利用した生産では、生産に至るまでの工程が多だけでなく、食料との競合が生じる。こうした背景のもと、近年、次世代バイオマス資源として脚光を浴びているのが、「シアノバクテリア」である。シアノバクテリアは、植物と同じ酸素発生型の光合成を行う細菌である。シアノバクテリアは、二酸化炭素の固定から発酵までの工程を1つの系で賄うことができる。また、シアノバクテリアを利用した生産では、食料との競合が起こらない。シアノバクテリアの中でも、単細胞性の *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以降 *Synechocystis* 6803) は、増殖が速く、遺伝子改変が容易であるなどの利点から、物質生産における宿主として注目されている。特に、近年では、*Synechocystis* 6803 の糖異化経路を利用した物質生産が盛んに検討されている。しかしながら、*Synechocystis* 6803 を利用した際の有用物質の生産量は、従属栄養微生物を利用した際の実生産量よりも2桁ほど低く、実用化に向けて改善の余地を残している。有用物質の増産を難しくしている原因の1つが、「シアノバクテリアの糖異化に関する生化学的知見の不足」である。シアノバクテリアの糖異化に関する生化学的知見は、大腸菌や酵母と比べて乏しく、目的物質の増産につながる適切な培養条件や遺伝子操作が不明瞭であった。

シアノバクテリアの糖異化経路は、上流の代謝経路と下流のトリカルボン酸回路 (TCA 回路) から成る(図1)。シアノバクテリアは、解糖と酸化的ペントースリン酸 (OPP) 経路だけでなく、カルビンサイクルと反応が重複しないエントナー・ドウドロフ経路も持つ(図1)。また、シアノバクテリアの TCA 回路では、2-オキソグルタル酸 (2OG) が、スクシニル CoA ではなく、コハク酸セミアルデヒド (SSA) を介して、コハク酸 (Suc) に変換される (図1)。このように、シアノバクテリアは、固有の糖異化経路を有している。これまで、*Synechocystis* 6803 における糖代謝の特徴を明らかにするために、メタボローム解析や代謝フラックス解析が盛んに行われてきた。*Synechocystis* 6803 では、「上流の OPP 経路に炭素が流れやすく、下流の TCA 回路に炭素が流れにくい」という特徴を持つことが判明した。しかしながら、これらの解析は、代謝が行われた後の炭素の分配を可視化する解析であり、炭素の流れを決める要因を明らかにし、代謝の制御を可能にするためには、遺伝子や酵素に着目した生化学的解析が必要である。シアノバクテリアの糖異化に関する生化学的解析としては、シグマ因子や転写因子の制御下にある酵素遺伝子の解明といった遺伝子発現に着目した研究が主に行われてきた。一方で、酵素の触媒活性や活性制御に関する知見は限られており、各代謝経路がどのような生化学的特性を持つかは不明瞭である。したがって、今後は、酵素に着目した解析を行い、各代謝経路の生化学的特性を明らかにすることが、有用物質増産のカギであると考えられる。

本研究では、*Synechocystis* 6803 の糖異化経路の中でも、生命活動と物質生産の両方で中心的な役割を担う上流の代謝経路である OPP 経路と、下流の TCA 回路の生化学的特性を明らかにした。そして、これらの代謝経路の流れを決める生化学的要因について議論した。

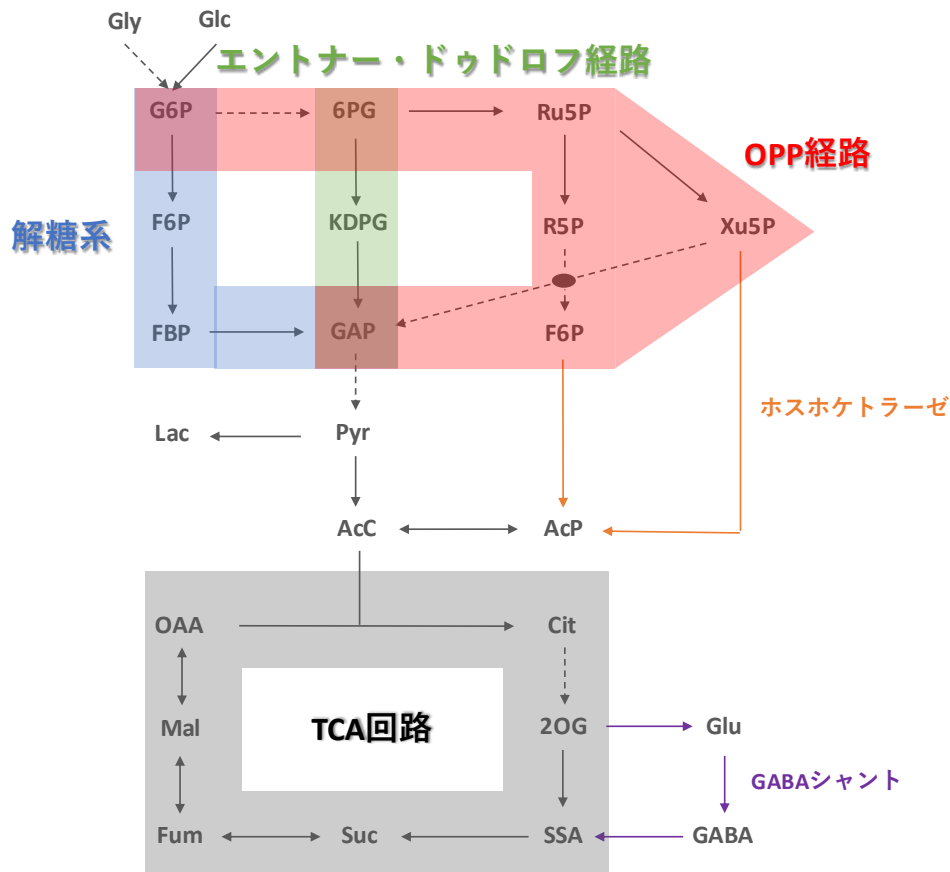


図1 *Synechocystis* 6803 の糖異化経路の概観

2 構成及び各章の要約

本論文は、第1章から第5章までの5章構成となっている。

第1章では、本研究全体の背景と目的について記述した。第2-4章で、自身の研究内容について記述した。第5章では、本研究全体の結論について記述した。

第2章：*Synechocystis* 6803 の OPP 経路における鍵酵素の生化学解析

OPP 経路は、糖異化の3つの上流経路の中でも、全てのシアノバクテリアに保存されている唯一の経路で、還元力 NADPH の生成を担う。*Synechocystis* 6803 において、OPP 経路からの NADPH 生成は、光合成が十分に行われない条件下でのエネルギー生産や生体物質の生合成に重要である。また、NADPH は、有用物質の生成に利用される還元力となっている。OPP 経路における NADPH 生成反応は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) と 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6PGDH) が触媒する。特に、OPP 経路の第1段階を触媒する G6PDH は、OPP 経路全体の流れを律する鍵酵素であると考えられている。そこで、本章では、*Synechocystis* 6803 の G6PDH といくつかの関連酵素の生化学解析を行った。その結果、*Synechocystis* 6803 の G6PDH は、G6PDH の阻害剤としての報告例がない「クエン酸」によって阻害を受けた。同様に、*Synechocystis* 6803 の 6PGDH もクエン酸による阻害を受けた。このクエン酸による阻害の生理的意義を明らかにするために、TCA 回路の NAD(P)H 生成反応を触媒する酵素の生化学解析を行った。その結果、TCA 回

路の酵素は、クエン酸による阻害を受けないことが判明した。また、TCA 回路も 2 分子の NADPH の生成経路であることが判明した。以上の結果から、クエン酸は、TCA 回路を回すときに、OPP 経路の流れを抑えて、NADPH の過剰生成を避ける役割があると考えられる(図 2)。

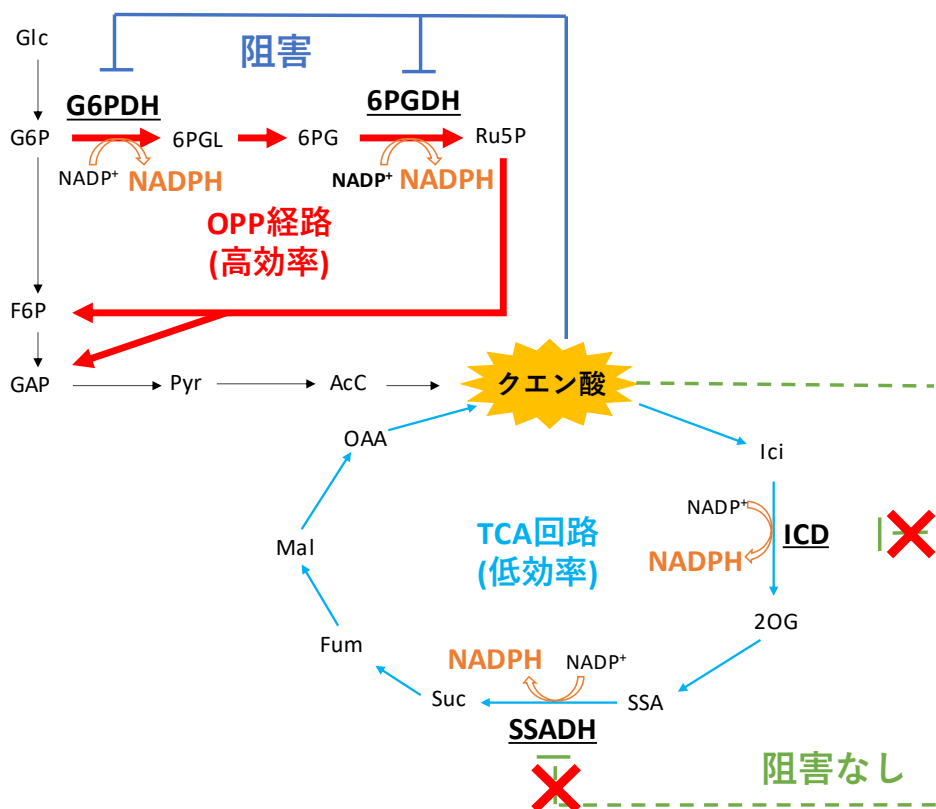


図 2 クエン酸による *Synechocystis* 6803 の OPP 経路酵素の阻害モデル

第 3 章 : *Synechocystis* 6803 の TCA 回路におけるオキサロ酢酸代謝の再構成

Synechocystis 6803 の TCA 回路は、通常の酸化方向だけでなく、還元方向にも進行する。どちらの TCA 回路も、物質生産に利用されており、各 TCA 回路への分岐点となる「オキサロ酢酸代謝」の制御が、各 TCA 回路の流れを決める上で重要であると考えられている。以前、本研究チームは、オキサロ酢酸代謝を構成する 3 種類の酵素の生化学解析を行った。しかしながら、過去の酵素の生化学解析では、隣接する酵素間の相互作用が考慮されていない。オキサロ酢酸は、化学的に不安定な化合物であり、生体内にも極微量しか存在しないため、酵素間でのオキサロ酢酸の受け渡しが、代謝反応を進める上で重要であることが示唆された。そこで、本章では、精製した酵素を使って、*in vitro* で、オキサロ酢酸代謝を再構成した(図 3)。そして、生体内を模倣した様々な条件下で、オキサロ酢酸がどのように分配されるかを調べた(図 3)。その結果、特に、pH が、各 TCA 回路への流れを決める重要な因子であることが判明した。

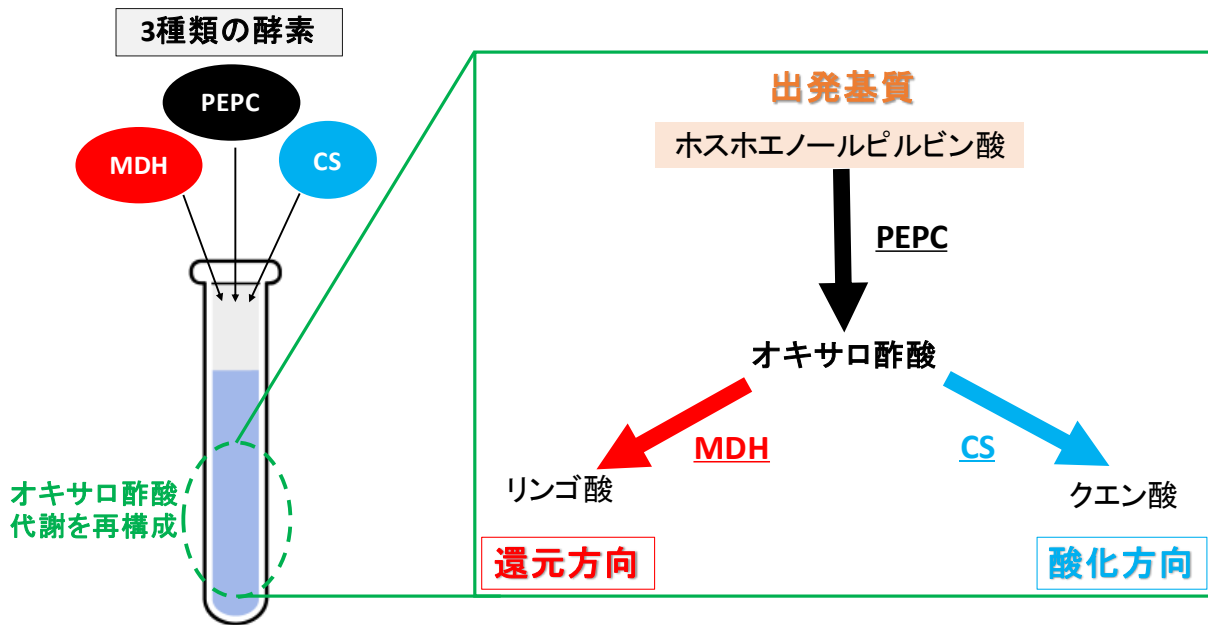


図3 *In vitro* での *Synechocystis* 6803 のオキサロ酢酸代謝の再構成

第4章：*Synechocystis* 6803 の TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応の解明

TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応は、一般的に、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) が触媒する。しかしながら、*Synechocystis* 6803 の MDH は、第3章における解析で、逆反応である還元反応を特異的に触媒することが分かった。また、MDH は、第2章までで解析された他の TCA 回路の酵素と異なり、 NAD^+ を補酵素とする。これらの結果から、MDH 以外の酵素がリンゴ酸酸化を触媒するという仮説が生じた。*Synechocystis* 6803 は、他のリンゴ酸酸化酵素として、マリックエンザイム (ME) を持つ。本章では、ME と MDH に着目した解析を行い、TCA 回路のリンゴ酸酸化の触媒機構を明らかにした。はじめに、ME の生化学解析を行った。ME のリンゴ酸への触媒効率は、MDH の 264 倍であった。また、ME は、他の TCA 回路の酵素同様、 NADP^+ を補酵素とした。次に、各酵素遺伝子の欠損株のリンゴ酸量を調べた。ME の欠損株は、MDH の欠損株と異なり、リンゴ酸を過剰に蓄積していた。最後に、各酵素を持つシアノバクテリアがどれくらい存在するかを明らかにするために、BLAST 解析を行った。ME の方が、MDH よりも、多くのシアノバクテリアに保存されていた。以上の解析から、シアノバクテリアでは、ME がリンゴ酸酸化反応を触媒しており、ME 型 TCA 回路 (図4) が存在することが示唆された。ME 型 TCA 回路では、経路全体で 3 分子の NADPH が生成される (図4)。この結果は、シアノバクテリアの呼吸鎖の電子伝達体が NADPH であるという過去の報告とも整合性がある。

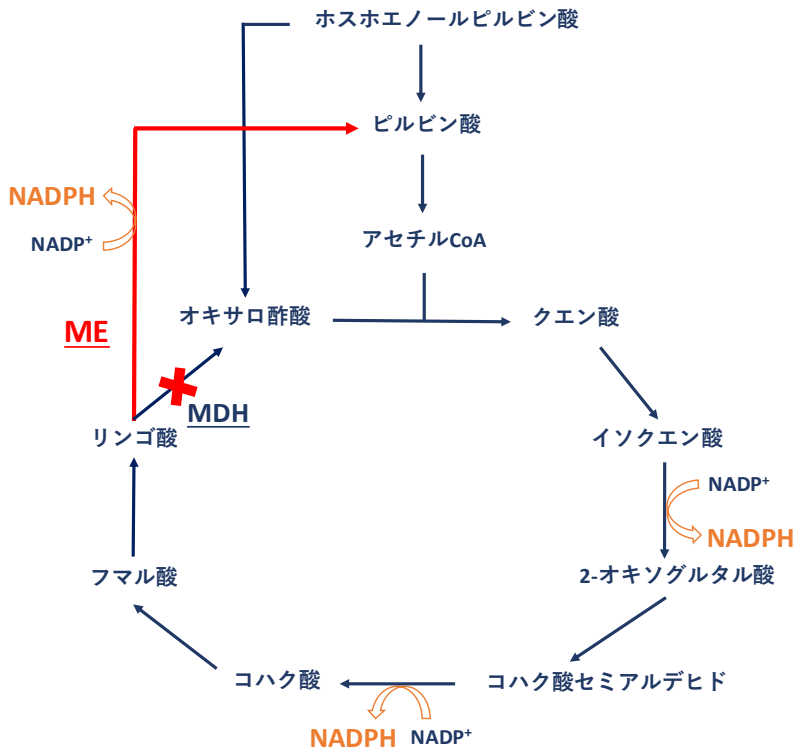
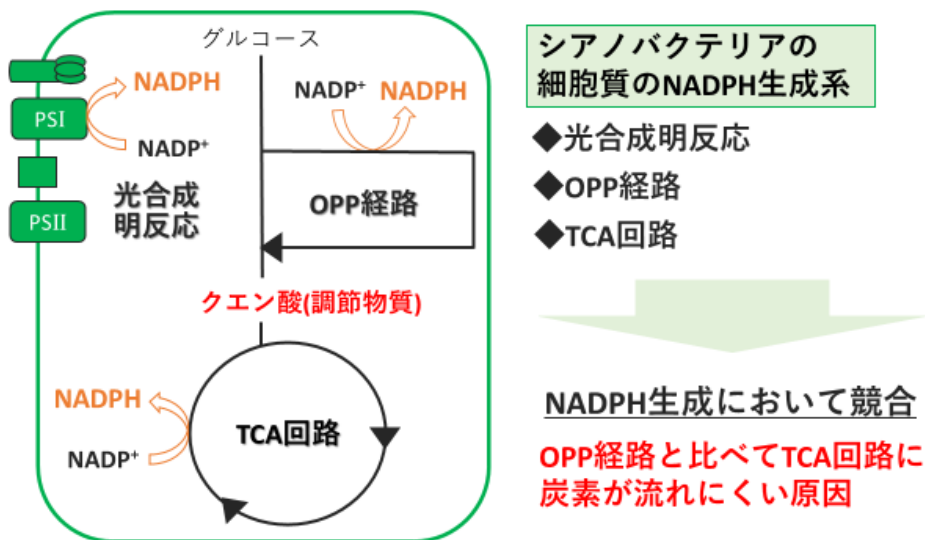


図4 *Synechocystis* 6803 がもつ ME 型 TCA 回路のモデル

第5章：総括 (本研究全体の結論)

以上の解析によって、異なる還元力を生成すると考えられてきたシアノバクテリアの OPP 経路と TCA 回路が、共に NADPH の生成経路であることが判明した (図5)。シアノバクテリアでは、OPP 経路と TCA 回路だけでなく、光合成の明反応も細胞質における NADPH の生成系として機能する (図5)。第2章の解析から、クエン酸という OPP 経路と TCA 回路のフラックスを調節し、NADPH の過剰生成を避ける調節因子が見つかったことから、これらの3つの系が同時に亢進すると、生体内で NADPH が過剰となると予想される。したがって、これらの NADPH の生成系は、互いに競合しており、このことが、上流の OPP 経路と比べて下流の TCA 回路に炭素が流れにくい生化学的要因であると考えられる。



「シアノバクテリアの細胞質における NADPH 生成」

図5 シアノバクテリアの OPP 経路と TCA 回路の流れを決める生化学的要因