

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

明治大学大学院農学研究科

2021年度

博士学位請求論文

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

(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)

学位請求者 農芸化学専攻

伊東 昇紀

1	目次	
2		
3	第1章 序論	
4	1-1 光合成生物を利用した物質生産の背景と変遷	4
5	1-2 シアノバクテリアを利用した物質生産とその課題	5
6	1-3 シアノバクテリアの糖異化に関する基礎研究の動向	8
7	1-4 本研究の目的と論文の構成	11
8		
9	第2章 <i>Synechocystis</i> 6803 の OPP 経路における鍵酵素の生化学解析	
10	2-1 緒言	13
11		
12	2-2 材料と方法	16
13	2-2-1 発現ベクターの構築	
14	2-2-2 GST タグ融合タンパク質のアフィニティー精製	
15	2-2-3 GST タグの切断	
16	2-2-4 酵素活性測定	
17	2-2-5 カイネティックパラメータの算出	
18		
19	2-3 結果	19
20	2-3-1 <i>Sy</i> G6PDH の最適温度・pH の決定	
21	2-3-2 <i>Sy</i> G6PDH の速度論的解析	
22	2-3-3 <i>Sy</i> G6PDH 活性に対する金属イオンと代謝産物の影響	
23	2-3-4 <i>Sy</i> 6PGDH 活性に対するオキサロ酢酸、クエン酸、2-オキシグルタル酸の影響	
24	2-3-5 <i>Synechocystis</i> 6803 由来コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (<i>Sy</i> SSADH)	
25	と OPP 経路酵素の生化学的性質の比較	
26		
27	2-4 考察	31

28	第3章 <i>Synechocystis</i> 6803 の TCA 回路におけるオキサロ酢酸代謝の再構成	
29	3-1 緒言	36
30		
31	3-2 材料と方法	39
32	3-2-1 発現ベクターの構築	
33	3-2-2 GST タグ融合タンパク質のアフィニティー精製	
34	3-2-3 L-リンゴ酸とクエン酸の定量	
35	3-2-4 酵素活性測定	
36	3-2-5 カイネティックパラメータの算出	
37		
38	3-3 結果	42
39	3-3-1 オキサロ酢酸代謝に対する温度と pH の影響	
40	3-3-2 オキサロ酢酸代謝に対するエフェクターの影響	
41	3-3-3 <i>SyMDH</i> と <i>SyCS</i> の $MgCl_2$ に対する感受性	
42	3-3-4 オキサロ酢酸代謝に対する MDH アイソザイムとしての <i>SyDdh</i> の影響	
43		
44	3-4 考察	51
45		
46	第4章 <i>Synechocystis</i> 6803 の TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応の解明	
47	4-1 緒言	56
48		
49	4-2 材料と方法	59
50	4-2-1 大腸菌を宿主とする発現ベクターの構築	
51	4-2-2 His タグ融合タンパク質のアフィニティー精製	
52	4-2-3 酵素活性測定	
53	4-2-4 カイネティックパラメータの算出	
54	4-2-5 フマラーゼ (FUM) とのカップリング反応の解析	
55	4-2-6 <i>Synechocystis</i> 6803 を宿主とするベクターの構築	
56	4-2-7 <i>Synechocystis</i> 6803 の好気培養	
57	4-2-8 ウェスタンブロットティング	
58	4-2-9 <i>Synechocystis</i> 6803 細胞からの L-リンゴ酸の抽出	
59	4-2-10 系統解析	
60	4-2-11 BLAST 解析	

61		
62	4-3	結果..... 63
63	4-3-1	SyME の最適条件の検討
64	4-3-2	SyME と SyMDH のカインティックパラメータの比較
65	4-3-3	<i>Synechocystis</i> 6803 由来 FUM (SyFUM) とのカップリング反応の解析
66	4-3-4	好気条件下における SyME 欠損株と SyMDH 欠損株のリンゴ酸量の比較
67	4-3-5	シアノバクテリアの ME と MDH のバイオインフォマティクス解析
68		
69	4-4	考察..... 74
70		
71		第 5 章 総括
72	5-1	本研究の結論..... 79
73		
74		巻末付録..... 81
75		
76		参考文献..... 98
77		
78		謝辞..... 116

79 第1章 序論

80 1-1 光合成生物を利用した物質生産の背景と変遷

81 私たちが利用しているプラスチックや燃料の多くは、石油を原料として作られている。
82 しかしながら、この石油ベースの製品の利用は、現在2つの深刻な問題を抱えている。1
83 つ目が、「環境負荷が大きい」ことである。石油を燃焼させたときに生じる二酸化炭素
84 は、地球温暖化への寄与が最も大きい温室効果ガスである（日本原子力文化財団 2021）。
85 また、プラスチックなどの石油化学製品は、ごみとして環境中に廃棄された際に分解され
86 ないため、海洋汚染などの原因物質となっている。海洋ごみによる生物死の約9割が、プ
87 ラスチックごみの摂取によるものと推定されている（Gall and Thompson, 2015）。2つ目が、
88 「持続性がない」ことである。化石燃料は、堆積した昔の生物の死骸が地熱の影響などを
89 受けて変成したものであり、限りある資源である。化石燃料の中でも、石油は、確認埋蔵
90 量が最も少なく、あと残り50年ほどで使い切ってしまうと見積もられている（日本原子力
91 文化財団 2021）。また、地球上の石油の多くは、中東地域に埋蔵されており、現在日本が
92 輸入している石油の約9割が、中東由来である（経済産業省 2021）。しかしながら、中東
93 地域の政情は不安定なため、過去のオイルショックのときのように、石油の供給が突如と
94 して滞る危険性を秘めている。世界人口の増加や経済発展に伴い、石油の消費量が年々増
95 えていく中、代替となる新たな資源の利用が、世界的な急務となっている。

96 そうした状況の中で、「環境に優しく、持続可能な資源」として注目されているのが、
97 バイオマス資源である。バイオマス資源は、再生利用可能な生物由来の有機資源のうち化
98 石燃料を除いたものである。バイオマス資源を原料として作られるプラスチックの中に
99 は、環境中に廃棄された際に、微生物の働きによって分解される生分解性という特性を有
100 するものが存在する。バイオマス資源の中でも、特に脚光を浴びているのが、「光合成生
101 物由来のバイオマス資源」である。光合成生物に由来するバイオマス資源は、光合成によ
102 って固定した二酸化炭素を原料としているため、空気中の炭素の絶対量を増やさないカー
103 ボンニュートラルな資源である。光合成生物に由来するバイオマス資源の主な利用先とし
104 ては、バイオ燃料が挙げられる。バイオ燃料は、第一世代から第二、第三世代へと遷移し
105 ていく中で、その製造プロセスの改良が行われてきた。第一世代のバイオ燃料では、トウ
106 モロコシなどの食用植物由来のデンプンが、原料として利用された。植物が蓄積したデンプ
107 ンを糖化し、酵母などの従属栄養微生物に与えて発酵を行う。しかしながら、世界的な
108 人口の増加や途上国での食生活の高度化により、食料との競合が、問題視されるようにな
109 った（山下 2009）。食料との競合問題を解決するために、第二世代バイオ燃料では、ワラ
110 などの非食用植物由来のセルロースやヘミセルロースが、原料として利用された。しかし
111 ながら、新たな耕作地を開墾せずに食用植物の耕作地を利用する場合には、間接的に食料

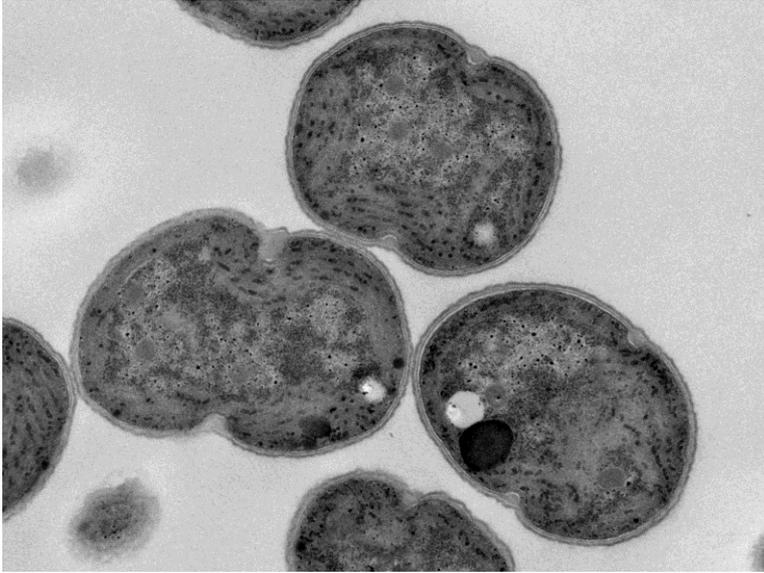
112 との競合が生じた (山下 2009)。さらに、セルロースやヘミセルロースは、デンプンと比
113 べて糖化効率が悪いため、特別な前処理を行う必要があるという技術的な課題も生じた
114 (製品評価技術基盤機構 2021)。こうした状況の中で、近年では、植物の代わりに「微細藻
115 類」を利用した第三世代バイオ燃料が、注目されている。微細藻類とは、酸素発生型の光
116 合成を行う藻類のうち、個体識別に顕微鏡を要する微細な種の総称である。微細藻類は、
117 植物のように栽培 (培養) に広大な土地を必要とせず、食料との競合が起こらない。加え
118 て、微細藻類は、二酸化炭素の固定から最終的な発酵に至るまでの工程を1つの系で賄う
119 ことができる。微細藻類を使用した場合のバイオ燃料の収率は、植物を使用した場合の10
120 倍から800倍であると見積もられている (Chisti 2007)。このように、微細藻類は、二酸化
121 炭素からの有用物質生産における理想的なプラットフォームであると考えられている。

122

123 1-2 シアノバクテリアを利用した物質生産とその課題

124 微細藻類は、真核微細藻類とシアノバクテリアに大別される。シアノバクテリアは、原
125 核生物であるため、真核微細藻類と比べて増殖が速い。また、シアノバクテリアは、真核
126 微細藻類と比べて、形質転換法などの合成生物学ツールが確立されているため、天然に細
127 胞内に蓄積しない化合物の生産も行うことができる (Wang et al. 2012)。そのため、近年、
128 シアノバクテリアを利用したバイオプラスチックやバイオ燃料の生産に関する研究が、世
129 界中で行われている (Oliver et al. 2016; Katayama et al. 2018)。シアノバクテリアは、窒素固
130 定能の有無や形態的な特徴の違いなどによって複数のグループに分かれる多様性に富んだ
131 微生物群である。シアノバクテリアの中でも、モデル種として基礎・応用の両分野におい
132 て広く利用されている種が、*Synechocystis* sp. PCC 6803 (以降 *Synechocystis* 6803)である。
133 *Synechocystis* 6803 は、シアノバクテリアとしては初めて全ゲノム配列が決定された種であ
134 り、そのゲノムサイズは3.6 Mbpほどである(Kaneko et al. 1996)。生態的特徴として、
135 *Synechocystis* 6803 は、非窒素固定型で、直径が1.5-2.0 μm ほどの単細胞性の球菌である
136 (図1-1)。また、*Synechocystis* 6803 は、淡水に生育するシアノバクテリアであり、30°Cで最
137 もよく増殖する (Tasaka et al. 1996)。*Synechocystis* 属のシアノバクテリアは、酸ストレスに
138 弱く、アルカリ条件下で最適な生育を示す (Huang et al. 2002)。

139



140

141 図 1-1 *Synechocystis* 6803 の電子顕微鏡写真

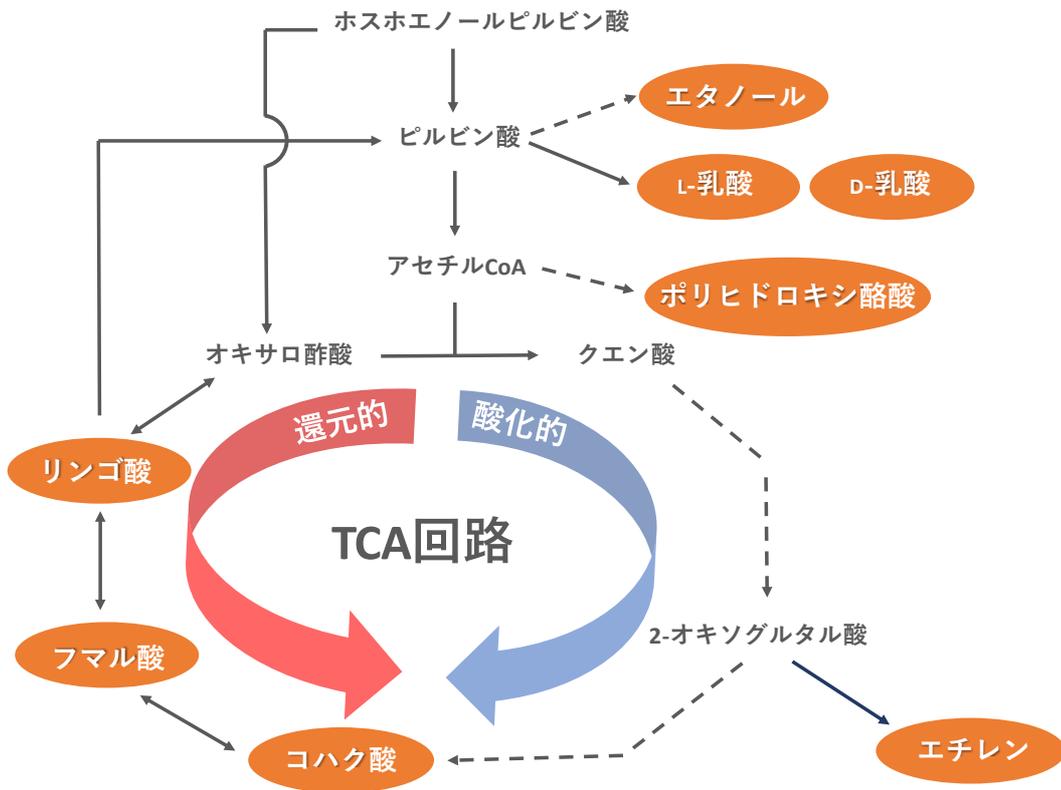
142

143 *Synechocystis* 6803 は、世代時間が 6 時間と他の微細藻類と比べて短く、増殖が速い。さ
144 らに、凍結保存が可能であり、相同組換えによって形質転換が容易に行えるなど (Yu et al.
145 2013)、取り扱いにおける多くの利点も有している。シアノバクテリアを含む藻類の培養に
146 おける課題として、水資源の確保が挙げられる。藻類の培養に必要な水は、陸上植物の栽
147 培に必要な水の 12 倍から 21 倍であると見積もられている (Clarens et al. 2010)。

148 *Synechocystis* 6803 は、淡水に生育するシアノバクテリアだが、窒素とリンを加えること
149 で、地球上に存在する水資源の大半を占める海中でも増殖することができる (Iijima et al.
150 2015)。 *Synechocystis* 6803 では、エビの廃水を培養に利用して、バイオプラスチックの生産
151 に成功した事例もある (Krasaesueb et al. 2019)。また、最近では、培地成分や窒素源の検討
152 による実用化に適した *Synechocystis* 6803 の培養系の開発も行われている (Iijima et al.
153 2020)。このように、 *Synechocystis* 6803 では、物質生産などの応用利用の際に生じる培養に
154 おける課題も解決されつつある。

155 二酸化炭素由来の有用物質の需要は年々多様化しており、近年では、 *Synechocystis* 6803
156 のトリカルボン酸回路 (TCA 回路) などの異化経路を利用した物質生産が、盛んに検討さ
157 れている (図 1-2)。韓国の研究チームは、酸化性的ペントースリン酸経路 (OPP 経路) の酵
158 素の過剰発現により、汎用化学品であるエタノールの増産に成功した (Choi and Park,
159 2016)。OPP 経路の酵素の発現強化は、バイオプラスチックであるポリヒドロキシ酪酸の増
160 産に寄与することも報告されている (Osanai et al. 2013)。オランダの研究チームは、
161 *Synechocystis* 6803 に、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の L-乳酸脱水素酵素を導入すること
162 で、バイオプラスチックなどの原料となる L-乳酸の生産を可能にした (Angermayr et al.

163 2012)。同研究チームはさらに、解糖系の酵素の過剰発現やグリコーゲン合成酵素の欠損と
164 いった糖異化の亢進に寄与する代謝工学的手法を用いて、乳酸の増産に成功した
165 (Angermayr et al. 2014; van der Woude et al. 2014)。本研究室では、*Synechocystis* 6803 が、暗
166 嫌気条件という光を当てずかつ酸素の供給を遮断した発酵条件下で、グリコーゲンを分解
167 し、内在の D-乳酸脱水素酵素に基づいた乳酸生産を行うことを発見した (Osanai et al.
168 2015)。また、*Synechocystis* 6803 は、暗嫌気条件下で、通常の好気条件下で機能する酸化的
169 TCA 回路ではなく、還元的 TCA 回路 (TCA 回路の逆回り) を介して、リンゴ酸、フマル
170 酸、コハク酸といった化学工業原料を生産することも明らかになっている (Osanai et al.
171 2015; Hasunuma et al. 2016)。本研究室では、TCA 回路の酵素の過剰発現と発酵法の改良を
172 組み合わせることで、これらのジカルボン酸の増産に成功した (Iijima et al. 2021)。フマル
173 酸とコハク酸に関しては、好気条件下における酸化的 TCA 回路を利用した生産も、それ
174 ぞれオランダとドイツの研究チームによって行われた (Du et al. 2019; Mock et al. 2019)。
175 *Synechocystis* 6803 の酸化的 TCA 回路を利用した物質生産としては、汎用化学品であるエ
176 チレンの生産も、長年検討されている (Ungerer et al. 2012; Xiong et al. 2015a; Zhu et al. 2015;
177 Veetil et al. 2017; Durall et al. 2020)。しかしながら、*Synechocystis* 6803 を宿主とした際のこ
178 れらの有用物質の生産量 (力価) は、従属栄養微生物が記録している実用化レベルの生産
179 量には届いていない。例えば、*Synechocystis* 6803 を利用した際のコハク酸の最高生産量
180 (4.2 g/L) (Iijima et al. 2021) は、*Corynebacterium glutamicum* を利用した際の生産量 (146 g/L)
181 (Okino et al. 2008) よりも 2 桁ほど低い。そのため、今後、各目的物質の生成経路への炭素
182 フローをさらに増加させるような培養条件の検討や遺伝子操作の発見が、必要不可欠であ
183 る。しかしながら、シアノバクテリアでは、従属栄養微生物と比べると、糖異化に関する
184 生化学的な知見が少なく、上述のプロセスが、現在、生産におけるボトルネックとなっ
185 ている。シアノバクテリアは、光合成を行う最も単純な生物であることから、これまで光合
186 成に関する生化学的研究が、盛んに行われてきた。異化経路を利用した物質生産の隆盛に
187 伴い、近年では、「シアノバクテリアの糖異化に関する生化学的研究」が、急速に注目を
188 集めている。
189

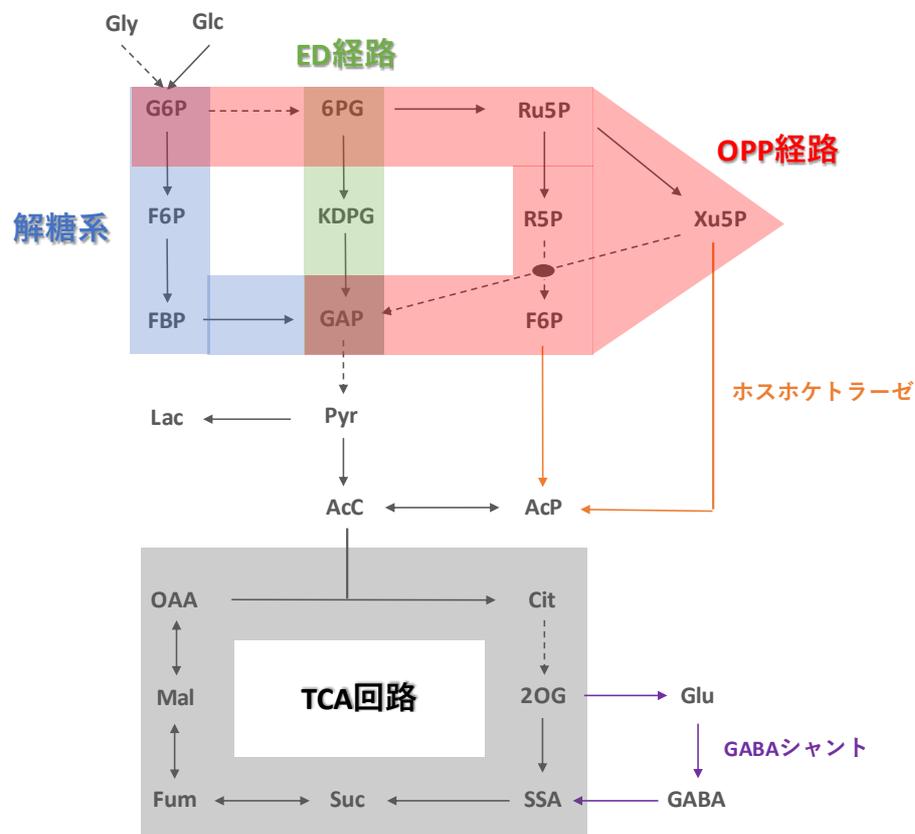


190
 191 図 1-2 *Synechocystis* 6803 の異化経路を利用した物質生産
 192 点線は、複数の酵素反応を表している。

193
 194 **1-3 シアノバクテリアの糖異化に関する基礎研究の動向**

195 シアノバクテリアの糖異化経路は、上流の3つの代謝経路と下流のTCA回路によって
 196 構成されている (図 1-3)。長年、シアノバクテリアの糖異化経路の上流部分は、解糖系と
 197 OPP 経路によって構成されていると考えられてきた。しかしながら、2016年に、エンター
 198 ー・ドウドロフ経路 (ED 経路) が、3番目の経路として機能していることが判明した
 199 (Chen et al. 2016)。また、*Synechocystis* 6803 では、OPP 経路の代謝産物であるキシロ
 200 -5-リン酸 (またはフルクトース-6-リン酸) からアセチルリン酸を生成するホスホケトラ
 201 ゼ経路の存在も確認されている (Xiong et al. 2015b) (図 1-3)。ED 経路だけでなく、下流の
 202 TCA 回路もまた、長年シアノバクテリアでは見落とされていた代謝経路である。シアノバ
 203 クテリアは、TCA 回路において、2-オキソグルタル酸からスクシニル CoA を生成する反
 204 応を触媒する2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼを欠いている (Pearce and Carr, 1967;
 205 Smith et al. 1967)。そのため、シアノバクテリアのTCA回路は、完全な回路としては機能
 206 していないと考えられてきた。しかしながら、2011年に、2-オキソグルタル酸デカルボキ
 207 シラーゼとコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼという2つの酵素が、コハク酸セミ

208 アルデヒドを経由して、2-オキソグルタル酸からコハク酸の生成を担うことが判明した
 209 (Zhang and Bryant, 2011) (図 1-3)。このコハク酸セミアルデヒドを経由する変形 TCA 回路
 210 は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) でも見つかっている (Tian et al. 2005)。
 211 *Synechocystis* 6803 では、 γ -アミノ酪酸 (GABA) を経由してコハク酸セミアルデヒドを生成
 212 する GABA シャントというバイパス経路も発見されている (Xiong et al. 2014) (図 1-3)。こ
 213 の GABA シャントを構成する酵素は、他のいくつかのシアノバクテリアのゲノム上にも確
 214 認されている (Xiong et al. 2014)。このように、シアノバクテリアは、シアノバクテリア固
 215 有の糖異化経路を有している (図 1-3)。
 216



217
 218 図 1-3 *Synechocystis* 6803 の糖異化経路の概観
 219 点線は、複数の酵素反応を表している。代謝産物の略語の説明は、下記の通りである。
 220 Gly: グリコーゲン, Glc: グルコース, G6P: グルコース-6-リン酸, F6P: フルクトース-6-リン
 221 酸, FBP: フルクトース-1,6-ビスリン酸, 6PG: 6-ホスホグルコン酸, KDPG: 2-ケト-3-デオキシ
 222 -6-ホスホグルコン酸, GAP: グリセルアルデヒド-3-リン酸, Ru5P: リブロース-5-リン酸,
 223 R5P: リボース-5-リン酸, Xu5P: キシルロース-5-リン酸, Pyr: ピルビン酸, Lac: 乳酸, AcC:
 224 アセチル CoA, AcP: アセチルリン酸, OAA: オキサロ酢酸, Cit: クエン酸, 2OG: 2-オキソグ
 225 ルタル酸, Glu: グルタミン酸, GABA: γ -アミノ酪酸, SSA: コハク酸セミアルデヒド, Suc: コ

226 ハク酸, Fum: フマル酸, Mal: リンゴ酸

227

228 これらの代謝経路が機能する栄養条件やシアノバクテリアの糖代謝における特徴を明ら
229 かにするために、これまで、*Synechocystis* 6803 において、メタボローム解析や代謝フラッ
230 クス解析が、盛んに行われてきた。様々な光条件下におけるメタボローム解析から、*E.coli*
231 と比べて、シアノバクテリアの生体内には、「OPP 経路の糖リン酸が多く存在し、TCA 回
232 路の代謝産物が少ない」というメタボロームにおける特徴が明らかになった (Abernathy et
233 al. 2017; Wan et al. 2017)。また、様々な栄養条件下における代謝フラックス解析から、OPP
234 経路は、生育環境の変化に伴い代謝フラックスが柔軟に変化する可塑性に富んだ代謝経路
235 であることが判明した (Young et al. 2011; Nakajima et al. 2014; You et al. 2015; Wan et al.
236 2017)。一方で、TCA 回路は、上流の OPP 経路と異なり、栄養条件の変化に伴い代謝フラ
237 ックスが大きく変化せず、炭素が流れにくい代謝経路であることが判明した(Young et al.
238 2011; Nakajima et al. 2014; You et al. 2015; Wan et al. 2017)。この「OPP 経路と比べて TCA 回
239 路に炭素が流れにくい」という代謝フラックスにおける特徴は、上述のメタボロームにお
240 ける特徴と整合性がある。また、経時的なメタボローム解析と代謝フラックス解析を組み
241 合わせることで、有用物質生産における律速段階の特定なども行われてきた (Hasunuma et
242 al. 2016, 2018)。

243 しかしながら、メタボローム解析や代謝フラックス解析などの代謝産物に着目した解析
244 は、あくまでも代謝の後の炭素の分配を可視化する解析法であり、その代謝変化を与える
245 要因を明らかにし、代謝の人為的な制御を可能にするためには、遺伝子の発現や酵素に着
246 目した生化学的研究が必要不可欠である。シアノバクテリアの糖異化の生化学的研究とし
247 ては、シグマ因子や転写因子の制御下にある糖異化経路の酵素遺伝子の解明といった遺伝
248 子の発現制御に関する研究が、主に行われてきた (Osanai et al. 2005; Osanai et al. 2011;
249 Tabei et al. 2007; Azuma et al. 2011; Liu and Yang, 2014)。一方で、発現した酵素の触媒活性や
250 活性制御に関する生化学的研究は、代謝経路ごとに部分的にしか行われておらず、代謝経
251 路全体がどのような生化学的特性を示すかは不明瞭である。以前行われた *Synechocystis*
252 6803 のトランスクリプトーム解析では、炭素中心代謝に関わる遺伝子の発現量が、解糖系
253 や OPP 経路の一部の酵素遺伝子を除いて、独立栄養条件と混合栄養条件の間で変化しない
254 ことが示された (Yoshikawa et al. 2013)。この結果は、翻訳後の酵素の制御が、各代謝経路
255 のフラックスを決める上で重要であることを示唆している。そのため、今後は、酵素に着
256 目した代謝経路の重点的解析を行い、酵素群の触媒活性や活性制御機構といった「代謝経
257 路の生化学的特性」を明らかにすることで、各代謝経路のフラックスを決める生化学的要
258 因が浮き彫りとなり、物質生産のボトルネック解消につながると考えられる。

259

260 1-4 本研究の目的と論文の構成

261 本研究では、シアノバクテリアの糖異化経路を構成する代謝経路の中でも、代謝フラッ
262 クス解析や遺伝子改変株を用いた実験から糖異化の上流経路の中でも中心的な役割を担う
263 と考えられている OPP 経路と、下流の TCA 回路の生化学的特性を明らかにすることを目
264 的とした。

265 第 1 章では、本研究の背景について記述した。

266 第 2 章では、*Synechocystis* 6803 の OPP 経路において、NADPH の生成反応を触媒する鍵
267 酵素の生化学解析を行った。*Synechocystis* 6803 の OPP 経路の酵素は、「酸化的 TCA 回路の
268 クエン酸によって阻害を受ける」という他の生物の同じ酵素では報告されていない特性を
269 有していることが判明した。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
270 に、酸化的 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
271 果、OPP 経路同様、酸化的 TCA 回路も、2 分子の NADPH の生成を担う代謝経路であるこ
272 とが判明した。また、酸化的 TCA 回路の NADPH 生成反応を触媒する酵素は、クエン酸に
273 よる阻害を受けないことが判明した。これまで行った酵素の速度論的解析の結果を統合し
274 たところ、OPP 経路は、酸化的 TCA 回路よりも高効率な NADPH 生成経路であることが
275 判明した。以上から、クエン酸は、NADPH の過剰生成を避けるために、OPP 経路と酸化
276 的 TCA 回路のフラックスをそれぞれ負と正に制御する役割があることが強く示唆され
277 た。複数の酵素の生化学解析を行うことで、OPP 経路と酸化的 TCA 回路間の「生化学的
278 な関係性」が明らかになった。

279 第 3 章では、*Synechocystis* 6803 の酸化的 TCA 回路と還元的 TCA 回路の分岐点となるオ
280 キサロ酢酸代謝を *in vitro* で再構成し、その生化学的制御機構を明らかにした。以前、本研
281 究グループは、*Synechocystis* 6803 のオキサロ酢酸代謝を構成する 3 種類の酵素の生化学解
282 析を行った。しかしながら、これらの解析は、測定条件が様々であると同時に、酵素間の
283 相互作用が考慮されておらず、オキサロ酢酸代謝の解析としては不十分であった。そこ
284 で、本研究では、精製した酵素を用いて、*in vitro* でオキサロ酢酸代謝を再構成し、生体内
285 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。その結
286 果、pH、ホスホエノールピルビン酸、マグネシウムイオンが、オキサロ酢酸の分配を決め
287 る重要な因子であることが判明した。今後、これらの因子に着目した遺伝子操作を行うこ
288 とで、各 TCA 回路のフラックスの改善につながると期待される。また、本研究で行った
289 「代謝の再構成」は、代謝の過程をピンポイントで重点的に調べることができる新規の代
290 謝解析手法である。今後は、生物全般の代謝解析に広く活用されると期待される。

291 第 4 章では、*Synechocystis* 6803 が持つ 2 つのリンゴ酸酸化酵素に着目した解析を行い、
292 TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応の触媒機構を明らかにした。一般的に、TCA 回路で

293 は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) が、リンゴ酸の酸化反応を触媒する。しかしなが
294 ら、第2章における解析によって、MDHだけが、他の酸化的 TCA 回路の酵素と異なり、
295 NAD⁺を補酵素として NADH の生成反応を触媒することが明らかになった。また、第3章
296 における解析によって、MDHは、還元的 TCA 回路のフラックスを調節する鍵酵素である
297 ことが示唆された。以前行った生化学解析においても、*Synechocystis* 6803 の MDH は、還
298 元反応に比べて、リンゴ酸酸化反応に対する活性が著しく低いことが分かっている。以上
299 の結果から、「MDH が、TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応を触媒しない」という仮説が
300 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)
301 を有している。本研究では、*Synechocystis* 6803 の ME と MDH に着目した解析によって、
302 リンゴ酸酸化反応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
303 は、MDH と異なり、リンゴ酸酸化反応に高い活性を示すことが判明した。また、ME は、
304 他の酸化的 TCA 回路の酵素同様、NADP⁺を補酵素とした。次に、酸化的 TCA 回路におい
305 て、リンゴ酸の生成反応を触媒するフマラーゼとのカップリング反応の解析を行った。そ
306 の結果、MDH とフマラーゼの間では、基質の受け渡しといった相互作用が働いていな
307 いことが判明した。これらの *in vitro* 解析の結果は、代謝フラックス解析などの *in vivo* 解
308 析の結果と整合性があった。したがって、*Synechocystis* 6803 では、ME が、TCA 回路のリ
309 ンゴ酸酸化反応を触媒しており、3 分子の NADPH を生成する ME 型 TCA 回路が機能して
310 いると考えられる。さらに、シアノバクテリアの ME と MDH の BLAST 解析の結果か
311 ら、この ME 型 TCA 回路が、シアノバクテリアで広く保存されていることが示唆され
312 た。

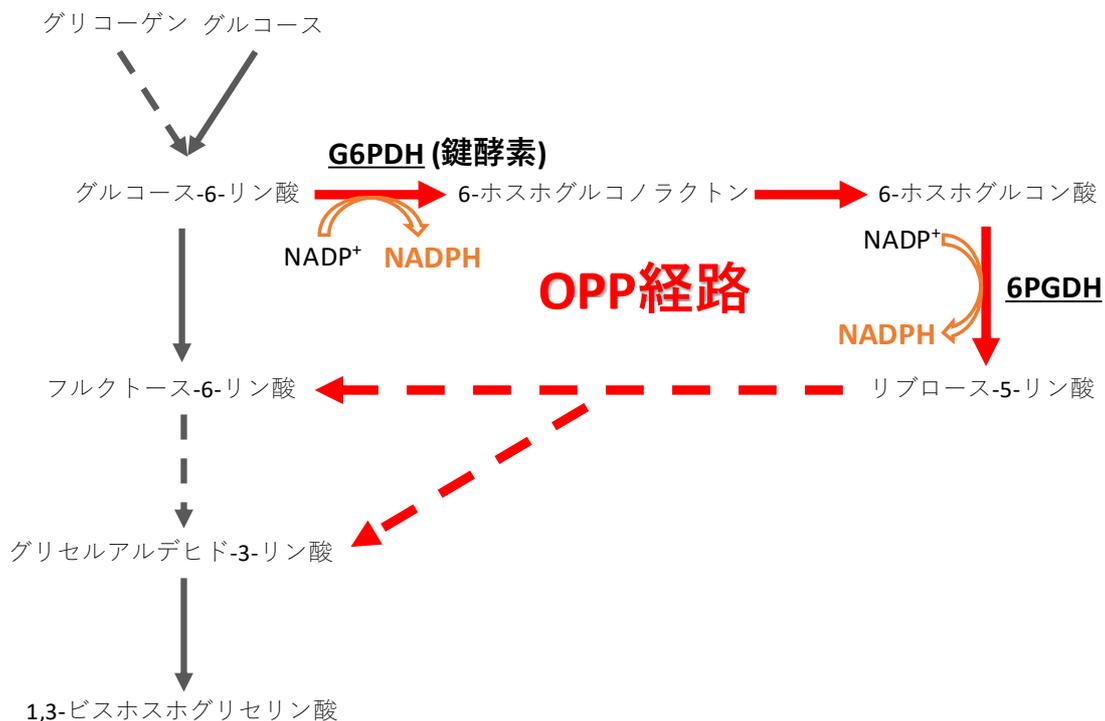
313 第5章では、本研究によって明らかになった OPP 経路と TCA 回路の生化学的特性を基
314 に、これらの代謝経路のフラックスを決める生化学的要因について考察した。

315

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

317 2-1 緒言

318 OPP 経路は、解糖系のグルコース-6-リン酸から派生する代謝経路で、還元力 NADPH や
319 核酸の生合成に必要なペントースの生成を担う (図 2-1)。糖異化における 3 種類の上流経
320 路の中でも、OPP 経路は、解糖系と ED 経路と異なり、すべてのシアノバクテリアで保存
321 されていると考えられている唯一の代謝経路である (Chen et al. 2016)。シアノバクテリア
322 では、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼが、約 4 割のシアノバクテリアの
323 ゲノム上に存在していない (Chen et al. 2016)。OPP 経路の酵素の中でも、グルコース-6-リ
324 ン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH, EC 1.1.1.49) と 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ
325 (6PGDH, EC 1.1.1.44) は、炭素の流れを決める NADPH の生成反応を触媒する (図 2-1)。特
326 に、OPP 経路の第 1 段階の反応を触媒する G6PDH は、OPP 経路全体の反応速度を決定す
327 る鍵酵素であると考えられている (Bonsignorea and De Flora 1972) (図 2-1)。
328



329 図 2-1 OPP 経路の代謝マップ

331 点線は、複数の酵素反応を表している。

332

333

334

335 *Synechocystis* 6803 において、OPP 経路の代謝フラックスは、光独立栄養条件よりも暗従
336 属栄養条件で増大する(Young et al. 2011; Wan et al. 2017)。光化学系 II の阻害剤の添加によ
337 って、リニア電子伝達を止めた *Synechocystis* 6803 の細胞内では、解糖系ではなく、OPP 経
338 路を介したグルコースの分解が促進される (You et al. 2015)。G6PDH または 6PGDH を欠
339 損した *Synechocystis* 6803 は、それぞれ低光条件と暗条件下で増殖できない (Ueda et al.
340 2018; Wan et al. 2017)。また、G6PDH または 6PGDH を欠損した *Synechocystis* 6803 は、解
341 糖系や ED 経路の鍵酵素の欠損株と異なり、暗条件におけるグリコーゲン分解速度が著し
342 く低下する (Makowka et al. 2020)。これらの研究結果は、光合成の明反応が十分に行われ
343 ない条件下で、OPP 経路における NADPH の生成が、酸化的リン酸化によるエネルギー生
344 産や各種生体物質の生合成において重要であることを強く示唆している。また、近年で
345 は、*Synechocystis* 6803 の OPP 経路に関与する酵素の発現強化が、いくつかの有用物質の増
346 産において、有効な代謝工学的アプローチであることが判明している (Osanai et al. 2013;
347 Osanai et al. 2015; Choi and Park, 2016; Lin et al. 2017)。以上から、OPP 経路は、*Synechocystis*
348 6803 の糖異化の上流経路の中でも、中心的な代謝経路であると考えられている。

349 OPP 経路の酵素の生化学解析は、大腸菌や酵母などの従属栄養微生物において、主に行
350 われてきた (Bonsignorea and De Flora. 1972)。これまでの生化学解析から、従属栄養微生物
351 の OPP 経路は、生成物である NADPH が G6PDH および 6PGDH の活性を阻害することに
352 よって、負のフィードバック的に制御されていると考えられている (Moritz et al. 2000;
353 Kato et al. 1979)。以前本研究チームで行った *Synechocystis* 6803 の 6PGDH (Sy6PGDH) の生
354 化学解析から、Sy6PGDH も、NADPH によって阻害されることが判明した (Ito and Osanai.
355 2018)。しかしながら、その阻害様式は、これまで他の生物で報告されてきた阻害様式とは
356 異なっており、*Synechocystis* 6803 特有のものであった (Ito and Osanai. 2018)。*Synechocystis*
357 6803 の G6PDH (SyG6PDH) に関しては、活性化剤による活性制御とレドックス制御につい
358 て報告されている(Özkul and Karakaya, 2015; Guo et al. 2014)。窒素固定型のシアノバクテリ
359 アである *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 では、シアノバクテリアのみで保存されているタ
360 ンパク質である OpcA が、G6PDH のアロステリックな活性化剤として機能することが明ら
361 かになっている (Hagen and Meeks, 2001)。*Synechocystis* 6803 の OpcA の欠損株を用いた実
362 験から、*Synechocystis* 6803 においても、OpcA は、G6PDH の活性に影響を与えると考えら
363 れている (Özkul and Karakaya, 2015)。また、SyG6PDH は、レドックス制御に関与する 3 種
364 類のシステイン残基を有していることが報告されている (Guo et al. 2014)。しかしながら、
365 SyG6PDH の触媒活性の大きさや、pH や代謝産物による SyG6PDH 活性の生化学的制御機
366 構などは、明らかになっていない。そのため、*Synechocystis* 6803 の OPP 経路の生化学的

367 性はいまだ不明瞭であり、SyG6PDHに着目したさらなる解析が求められている。
368 ところで、本章では、SyG6PDHとSyG6PDHに関連するいくつかの代謝酵素の生化学解析
369 を行い、*Synechocystis* 6803のOPP経路酵素の生化学的特性を明らかにした。
370

371 2-2 材料と方法

372

373 2-2-1 発現ベクターの構築

374 *Synechocystis* 6803 のゲノム内において、*Sy*G6PDH をコードする *zwf*(slr1843) とコハク酸
375 セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(*Sy*SSADH)をコードする *gabD* (slr0370) のオープンリー
376 ディングフレームは、Eurofin Genomics Japan (Tokyo, Japan) によって人工的に合成され、
377 pGEX6P-1(GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) の *Bam*HI-*Xho*I 部位にクローニングされた。
378 *Sy*6PGDH の発現ベクターは、以前の生化学解析の際に作成したものを使用した (Ito and
379 Osanai, 2018)。 *Synechocystis* 6803 のゲノム内において、*Sy*6PGDH をコードする *gnd* 遺伝子
380 (slr0329) は、Eurofin Genomics Japan によって合成され、pGEX5X-1 (GE Healthcare Japan, Tokyo,
381 Japan) の *Bam*HI-*Xho*I 部位にクローニングされた。

382

383 2-2-2 GST タグ融合タンパク質のアフィニティー精製

384 グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ融合タンパク質の発現ベクターを、*E.*
385 *coli* DH5 α コンピテントセル (TakaraBio, Shiga, Japan) に形質転換した。形質転換後の大腸
386 菌 2 L 分を LB 培地で振盪培養 (30°C, 125 rpm) し、0.01 mM イソプロピル β -D-1-チオガラ
387 クトピラノシドによって一晩目的タンパク質の発現を誘導した。遠心分離によって回収し
388 た細胞を PBS-T (1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 14.7 mM KH₂PO₄, 0.05%
389 Tween-20) に懸濁し、超音波破碎機 model VC-750 (EYELA, Tokyo, Japan) を用いて、超音波
390 破碎した(20% intensity, 200 sec)。破碎後の細胞を遠心分離 (4°C, 5,800× g, 2 min) し、可溶性
391 タンパク質を含む上清を別の 50 ml チューブに移した。GST に特異的な担体である
392 Glutathione-Sepharose 4B resin (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) 560 μ L を上清に加えて氷上
393 で 30 分間穏やかに振盪し、GST タグが結合した目的タンパク質を担体に吸着させた。その
394 後、*Sy*G6PDH と *Sy*SSADH の精製においては、1 mM ATP/MgSO₄·7H₂O を混合物に加えて、
395 37°Cでさらに 30 分間穏やかに振盪させた。混合物を遠心分離 (4°C, 5,800× g, 2 min) して上
396 清を取り除き、残った担体を 1 mM ATP/MgSO₄·7H₂O を含む PBS-T (*Sy*6PGDH の精製では
397 通常の PBS-T) 700 μ L で 10 回洗浄した。目的タンパク質を、GST elution buffer (50 mM Tris-
398 HCl, pH 8.0, 10 mM 還元型グルタチオン) 700 μ L で 4 回溶出した後、VivaSpin 500 MWCO
399 50,000 device (Sartorius, Göttingen, Germany) で濃縮した。タンパク質濃度は、Pierce BCA
400 Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いて、BCA 法によって算出した。

401

402 2-2-3 GST タグの切断

403 精製後の GST タグ融合タンパク質(*Sy*G6PDH と *Sy*SSADH)から GST タグを取り除くため

404 に、7-9 Units の GST タグ切断用プロテアーゼ : PreScission Protease (GE Healthcare Japan,
405 Tokyo, Japan)を、目的タンパク質を含むサンプルに加え、4°Cで 18 時間反応させた。反応
406 後、600 μ L の Glutathione-Sepharose 4B resin をサンプルに加えて、室温で 1 時間転倒攪拌
407 した。その後、遠心分離 (4°C, 5,800 \times g, 2 min) して、GST タグおよび GST タグ融合タン
408 パク質である PreScission Protease が吸着した担体を取り除いた。

409

410 2-2-4 酵素活性測定

411 SyG6PDH によって触媒される反応は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶液 [50 mM リン酸
412 カリウム (pH 6.0-7.0) または Tris-HCl (pH 7.0-9.0)またはグリシン-NaOH (pH 9.0-10.0), 様々
413 な濃度の NAD(P)⁺, 様々な濃度のグルコース-6-リン酸, 8 pmol SyG6PDH] 中で行われた。

414 Sy6PGDH によって触媒される反応は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶液 [50 mM Tris-HCl
415 (pH 7.3), 様々な濃度の NADP⁺, 様々な濃度の 6-ホスホグルコン酸, 16 pmol Sy6PGDH] 中で
416 行われた。SySSADH によって触媒される反応は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶液 [50
417 mM グリシン-NaOH (pH 8.6-11.0), 様々な濃度の NADP⁺, 様々な濃度のコハク酸セミアル
418 デヒド, 2 mM MgCl₂, 40 pmol SySSADH] 中で行われた。基質を入れる前のアッセイ溶液を
419 各酵素の最適温度で 5 分間インキュベートした後、基質を加えて反応を開始した。分光光
420 度計 Hitachi U-3310 spectrophotometer (Hitachi High-Tech, Tokyo, Japan)を用いて、生成物であ
421 る NAD(P)H の特異吸収波長である 340 nm の光を照射したときの 1 分間の吸光度変化を測
422 定し、酵素の反応初速度 (Units/mg) を求めた。酵素活性 1 unit は、1 分間に 1 μ mol の基質
423 を変換することができる酵素量を表す。

424

425 2-2-5 カイネティックパラメータの算出

426 カイネティックパラメータは、Kaleida Graph ver. 4.5 という解析ソフトウェアを用いて、
427 基質および補酵素の飽和曲線に対してカーブフィッティングを行うことで算出した。基質
428 または補酵素に対して明らかな協同性を示した場合は、アロステリック酵素の速度式であ
429 るヒルの式 (式 1) (Dixon and Webb, 1979)を用いた。協同性を示さなかった場合は、ミカエ
430 リス・メンテンの式 (式 2) (Michaelis and Menten. 1913)を用いた。

431 (式 1) $v = V_{max}[S]^{n_H}/([S]^{n_H} + S_{0.5}^{n_H})$

432 (式 2) $v = V_{max}[S]/([S] + K_m)$

433 V_{max} は酵素 1 mg 当たりの最大反応速度を表す。 k_{cat} (酵素 1 分子当たりの最大反応速度、代
434 謝回転数)は、 V_{max} を酵素のモル数で割ることによって算出した。 n_H (ヒル係数)は、そのリ
435 ガンドの結合によるサブユニット間の協同性の度合いを表す。1 よりも大きければ正の協
436 同性、1 よりも小さければ負の協同性を表す。 $S_{0.5}$ と K_m は、それぞれヒルの式、ミカエリ

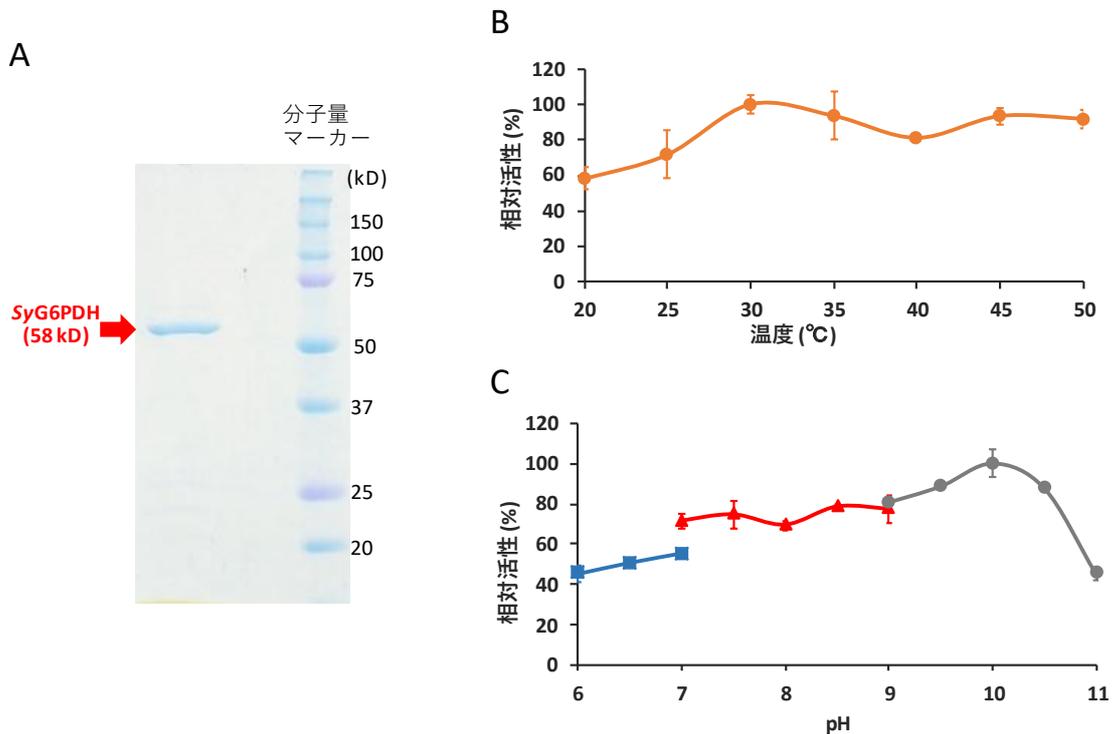
437 ス・メンテンの式によって算出された 50% V_{\max} を与える基質または補酵素の濃度を表して
438 おり、酵素とそのリガンドの親和性の尺度となる。 $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ は触媒反応効率を表しており、
439 主に基質や補酵素の特異性を評価する際に用いられ、特異性定数とも呼ばれる。
440 また、Sy6PGDH のカインティックパラメータに関しては、Ito and Osanai, 2018 同様、
441 Lineweaver-Burk plot (二重逆数プロット) によって算出した。様々な基質または補酵素濃度
442 における反応速度を測定し、反応速度の逆数を縦軸に、基質濃度の逆数を横軸にとったグ
443 ラフを作成した。得られたプロットの近似線と、縦軸との交点が $1/V_{\max}$ を、横軸との交点
444 が $-1/K_m$ を表す。
445

446 2-3 結果

447

448 2-3-1 SyG6PDH の最適温度・pH の決定

449 SyG6PDH は、大腸菌からアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製後
450 のサンプルを SDS-PAGE に供した結果、SyG6PDH の分子量である 58 kD 付近に単一バン
451 ドが得られた (図 2-2A)。SyG6PDH が最も高い活性を示す最適条件を決定するために、
452 様々な温度及び pH において、SyG6PDH の活性を測定した(図 2-2B と C)。SyG6PDH は、
453 30-50°Cの範囲で、恒常的に高い活性を示した(図 2-2B)。上記の範囲の中でも、SyG6PDH
454 は、30°Cで最も高い活性を示した(図 2-2B)。また、SyG6PDH は、pH 7.0-10.5 の範囲で、恒
455 常的に高い活性を示した(図 2-2C)。上記の範囲の中でも、SyG6PDH は、pH 10.0 で最も高
456 い活性を示した(図 2-2C)。そのため、30°C, pH 10.0 を SyG6PDH の最適条件とし、以降の
457 生化学解析は、最適条件下で行った。
458



459

460 図 2-2 SyG6PDH の温度依存性と pH 依存性

461 (A) 精製および GST タグ切断後の SyG6PDH の SDS-PAGE 結果。SDS-PAGE には、12%
462 SDS-PAGE ゲルを使用した。ゲルの染色には、InstantBlue (Expedion Protein Solutions, San
463 Diego, CA) を用いた。(B) 様々な温度における SyG6PDH 活性。測定は、pH 7.5 で行っ

464 た。グルコース-6-リン酸(G6P)と NADP⁺濃度は、それぞれ 50 mM と 0.5 mM にした。
465 SyG6PDH 活性は、30°C における活性を 100%としたときの相対活性で表した。平均値±標
466 準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。(C) 様々な pH における SyG6PDH 活
467 性。測定は、30°C で行った。G6P と NADP⁺濃度は、それぞれ 50 mM と 0.5 mM にした。
468 リン酸カリウムバッファー(pH 6.0-7.0)、Tris-HCl バッファー(pH 7.0-9.0)、グリシン-NaOH
469 バッファー(pH 9.0-11.0)を使用したときの活性は、それぞれ青い四角、赤い三角、グレーの
470 丸印で表した。SyG6PDH 活性は、pH 10.0 における活性を 100%としたときの相対活性で
471 表した。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。
472
473

474 2-3-3 SyG6PDH の速度論的解析

475 最適条件下における SyG6PDH の反応速度を評価するために、SyG6PDH のカインेटィッ
476 クパラメータを算出した(表 2-1)。

477 SyG6PDH のグルコース-6-リン酸 (G6P) に対する $S_{0.5}$ (50% V_{\max} を与える基質濃度), k_{cat} (酵
478 素 1 分子当たりの最大反応速度、代謝回転数), $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ (触媒反応効率、特異性定数)は、それ
479 ぞれ $25.0 \pm 1.2 \text{ mM}$, $67.5 \pm 5.0 \text{ s}^{-1}$, $2.71 \pm 0.32 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ だった(表 2-1)。また、SyG6PDH の G6P
480 に対する n_{H} (ヒル係数) は、 1.86 ± 0.031 で、G6P に対して正の協同性を示した(表 2-1)。

481 SyG6PDH は、補酵素として NADP^+ と NAD^+ のどちらを使用した場合でも活性を示した(表
482 2-1)。SyG6PDH の NADP^+ に対する $S_{0.5}$ と k_{cat} は、それぞれ $0.017 \pm 0.001 \text{ mM}$ と $61.8 \pm 5.7 \text{ s}^{-1}$
483 だった(表 2-1)。SyG6PDH の NAD^+ に対する $S_{0.5}$ と k_{cat} は、それぞれ $3.94 \pm 0.39 \text{ mM}$ と 37.3
484 $\pm 3.1 \text{ s}^{-1}$ だった(表 2-1)。SyG6PDH の NADP^+ に対する $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ は、 NAD^+ に対する $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ の 390
485 倍だった(表 2-1)。

486

487 表 2-1 SyG6PDH の基質と補酵素に対するカイネティックパラメータ

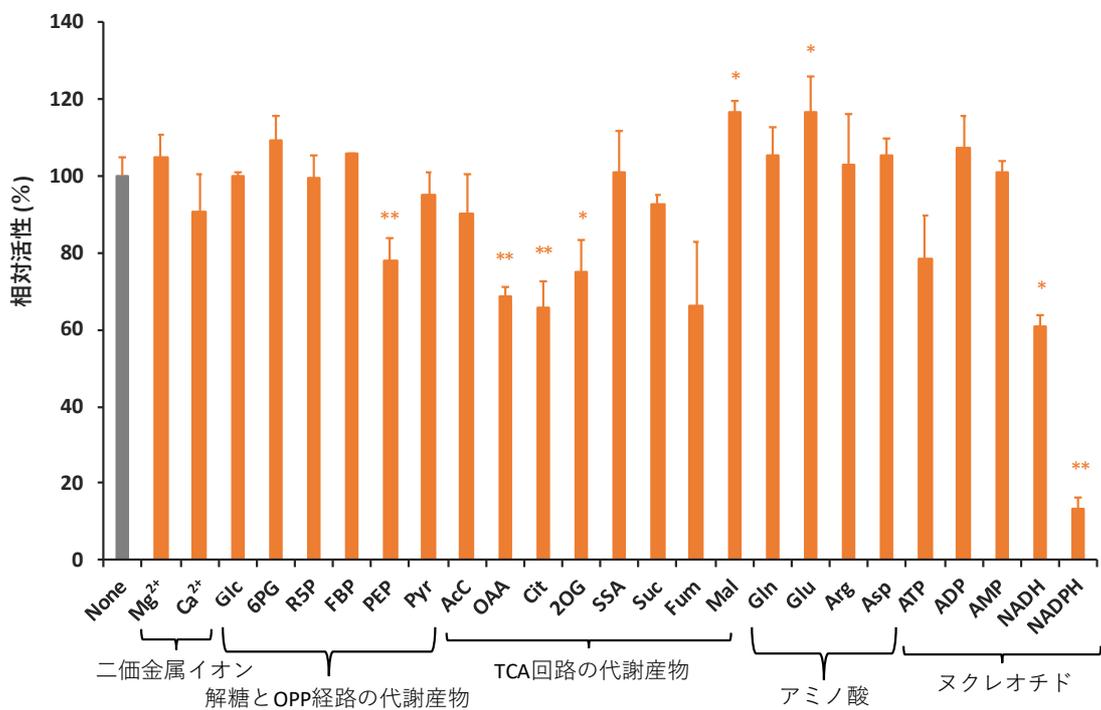
基質または補酵素	エフェクター	$S_{0.5} (K_m)$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/S_{0.5} (K_m)$ ($s^{-1} mM^{-1}$)	n_H
G6P	None	25.0 ± 1.2	67.5 ± 5.0	2.71 ± 0.32	1.86 ± 0.03
	10 mM PEP	$14.2 \pm 0.8^{**}$	$54.3 \pm 2.8^*$	$3.83 \pm 0.39^{**}$	2.06 ± 0.26
	10 mM OAA	$4.3 \pm 1.5^{**}$	$16.8 \pm 0.9^{**}$	4.26 ± 1.50	2.58 ± 0.71
	10 mM Cit	$9.4 \pm 1.2^{**}$	$25.0 \pm 0.7^{**}$	2.70 ± 0.37	
	10 mM 2OG	$9.4 \pm 1.6^{**}$	$25.4 \pm 1.1^{**}$	2.76 ± 0.61	
NADP ⁺	None	0.017 ± 0.001	61.8 ± 5.7	$3,698 \pm 158$	1.60 ± 0.05
	10 mM PEP	0.017 ± 0.003	56.0 ± 1.1	$3,337 \pm 513$	1.27 ± 0.11
	10 mM OAA	$0.0071 \pm 0.0003^{**}$	$19.3 \pm 1.8^{**}$	$2,714 \pm 168^{**}$	2.10 ± 0.45
	10 mM Cit	$0.0088 \pm 0.0007^{**}$	$24.5 \pm 3.1^{**}$	$2,798 \pm 139^{**}$	1.64 ± 0.04
	10 mM 2OG	$0.0080 \pm 0.0005^*$	$25.3 \pm 1.8^{**}$	$3,169 \pm 344^*$	$2.06 \pm 0.14^*$
	0.2 mM NADH	0.014 ± 0.001	$34.7 \pm 1.9^*$	$2,481 \pm 276^{**}$	1.60 ± 0.40
NAD ⁺	0.2 mM NADPH	$0.076 \pm 0.001^{**}$	61.3 ± 5.4	$808 \pm 79^{**}$	
	None	3.94 ± 0.39	37.3 ± 3.1	9.51 ± 0.86	1.34 ± 0.17

488 測定は、30°C, pH 10.0 で行った。G6P と NADP⁺濃度は、それぞれ 100 mM と 0.5 mM で固
 489 定した。平均値±標準偏差は、3回の独立した実験によって得られた。アスタリスクは、ス
 490 チューデントの *t* 検定によって得られたエフェクター存在下と非存在下の活性間の統計的
 491 有意差を表す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。

492
 493

494 2-3-3 *SyG6PDH* 活性に対する金属イオンと代謝産物の影響

495 生体内において、酵素の活性は、金属イオンや基質と補酵素以外の代謝産物が酵素に可
 496 逆的に結合することによって調節される。この調節物質をエフェクターと呼ぶ。エフェク
 497 ターによる酵素活性の調節様式は様々で、 $S_{0.5}$ (K_m)を変化させるもの、 k_{cat} を変化させるも
 498 の、どちらのパラメータも変化させるものが存在する。*SyG6PDH* のエフェクターを見つけ
 499 るために、どの調節機構でも酵素活性へ影響が反映される「基質と補酵素の濃度が酵素の
 500 $S_{0.5}$ 」の条件下で、金属イオンと代謝産物に対する感受性を調べた(図 2-3)。



501 図 2-3 金属イオンと代謝産物存在下の *SyG6PDH* 活性

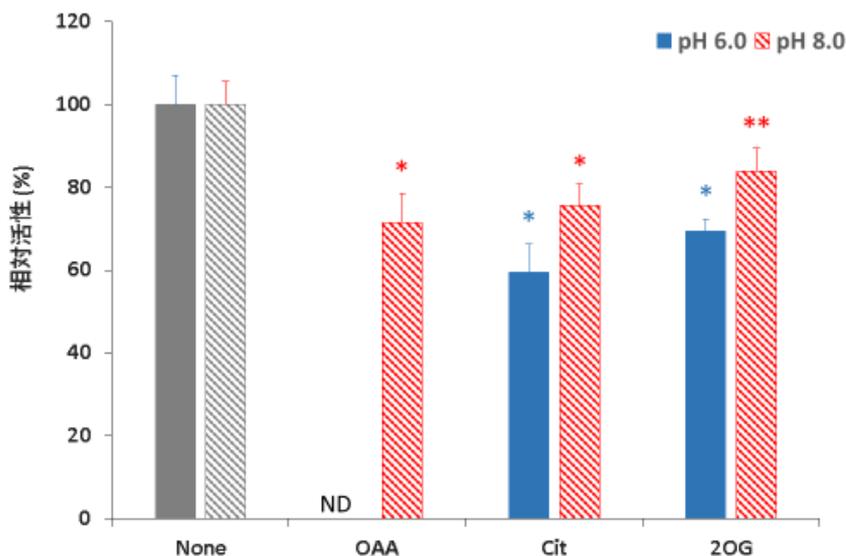
502 測定は、30°C, pH 10.0 で行った。NAD(P)H 以外のエフェクター候補は、10 mM になるよ
 503 うに添加した。測定時の吸光度が活性に影響を及ぼさないように、NAD(P)H の濃度は 0.2
 504 mM にした。G6P と NADP⁺濃度は、それぞれ $S_{0.5}$ である 25.0 mM と 0.017 mM で固定し
 505 た。*SyG6PDH* 活性は、エフェクター候補非存在下の活性を 100%としたときの相対活性で
 506 表した。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。アスタリスクは、ス
 507 チューデントの *t* 検定によって得られたエフェクター候補存在下と非存在下の活性間の統
 508 計的有意差を表す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。代謝産物の略語の説明は、下記の通りであ
 509 る。Glc: グルコース, 6PG: 6-ホスホグルコン酸, R5P: リボース-5-リン酸, FBP: フルクトー
 510 ス-1,6-ビスリン酸, PEP: ホスホエノールピルビン酸, Pyr: ピルビン酸, AcC: アセチル CoA,
 511

512 OAA: オキサロ酢酸, Cit: クエン酸, 2OG: 2-オキソグルタル酸, SSA: コハク酸セミアルデヒ
 513 ド, Suc: コハク酸, Fum: フマル酸, Mal: L-リンゴ酸, Gln: L-グルタミン, Glu: L-グルタミン酸,
 514 Arg: L-アルギニン, Asp: L-アスパラギン酸

515
 516

517 SyG6PDH の活性は、いくつかの代謝産物の存在下で変化した (図 2-3)。10 mM ホスホ
 518 エノールピルビン酸 (PEP) の存在下で、SyG6PDH の活性は、78% に低下した (図 2-3)。
 519 PEP の存在下では、SyG6PDH の G6P に対する $S_{0.5}$ と k_{cat} が低下し、G6P に対する $k_{cat}/S_{0.5}$
 520 が上昇した (表 2-1)。注目すべき点として、SyG6PDH の活性は、G6PDH のエフェクター
 521 として報告されてこなかった TCA 回路の代謝産物の存在下で大きく変化した (図 2-3)。10
 522 mM オキサロ酢酸 (OAA)、クエン酸 (Cit)、2-オキソグルタル酸 (2OG) の存在下で、
 523 SyG6PDH の活性は、それぞれ 69%、66%、75%に低下した (図 2-3)。これらの代謝産物の
 524 存在下では、SyG6PDH の G6P に対する $S_{0.5}$, k_{cat} と NADP^+ に対する $S_{0.5}$, k_{cat} , $k_{cat}/S_{0.5}$ が低下し
 525 した (表 2-1)。光合成を行うシアノバクテリアの生体内の pH は、光の強さに応じて大きく
 526 変化することが明らかになっている (Coleman and Colman, 1981; Mangan et al. 2016)。そこ
 527 で、pH 6.0 と pH 8.0 においても、SyG6PDH 活性に対する OAA, Cit, 2OG の影響を確認した
 528 (図 2-4)。その結果、pH 6.0 と pH 8.0 においても、これらの代謝産物の存在下では、
 529 SyG6PDH 活性は低下した (図 2-4)。

530



531

532 図 2-4 5 mM の TCA 回路代謝産物存在下の SyG6PDH 活性

533 測定は、30°C で行った。G6P と NADP^+ 濃度は、それぞれ 100 mM と 0.5 mM に固定した。

534 SyG6PDH 活性は、エフェクター非存在下の活性を 100%としたときの相対活性で表した。活

535 性が低すぎて検出できなかった場合は、ND と表記した。平均値±標準偏差は、3 回の独立し
536 た実験によって得られた。アスタリスクは、スチューデントの t 検定によって得られたエフ
537 ェクター存在下と非存在下の活性間の統計的有意差を表す ($*P < 0.05$, $**P < 0.005$)。

538

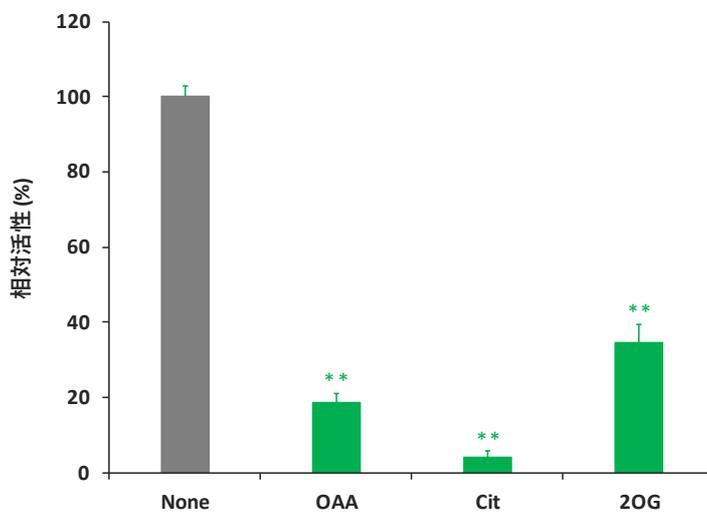
539

540 また、SyG6PDH の活性は、補酵素の還元型である NADH と NADPH の存在下で大きく
541 変化した(図 2-3)。0.2 mM NADH と NADPH の存在下で、SyG6PDH の活性は、それぞれ
542 61% と 13%に低下した (図 2-3)。NADH の存在下では、SyG6PDH の NADP⁺に対する k_{cat}
543 と $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ が低下した (表 2-1)。NADPH の存在下では、SyG6PDH の NADP⁺に対する $S_{0.5}$ が
544 上昇し、 $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ が低下した (表 2-1)。

545

546 2-3-4 Sy6PGDH 活性に対するオキサロ酢酸、クエン酸、2-オキソグルタル酸の影響

547 TCA 回路における 3 つの代謝産物 (OAA, Cit, 2OG) の OPP 経路フラックスへの影響をよ
548 り明確にするために、Sy6PGDH のこれらの代謝産物に対する感受性も調べた (図 2-5, 表
549 2-2)。Sy6PGDH としては、Ito and Osanai, 2018 で生化学解析を行った GST タグ融合
550 Sy6PGDH を使用し、測定は Ito and Osanai, 2018 で求めた最適条件下(30°C, pH 7.3)で行っ
551 た。5 mM OAA, Cit, 2OG の存在下では、Sy6PGDH の活性は、それぞれ 19%、4%、35%に
552 低下した (図 2-5)。



553

554 図 2-5 5 mM の TCA 回路代謝産物存在下の Sy6PGDH 活性

555 測定は、30°C, pH 7.3 で行った。6PG と NADP⁺濃度は、それぞれ K_m である 0.052 mM と
556 0.058 mM で固定した (Ito and Osanai, 2018)。Sy6PGDH 活性は、エフェクター非存在下の活
557 性を 100%としたときの相対活性で表した。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によ
558 って得られた。アスタリスクは、スチューデントの t 検定によって得られたエフェクター
559 存在下と非存在下の活性間の統計的有意差を表す (** $P < 0.005$)。

560

561

562 Sy6PGDH のカインेटリックパラメータに対する OAA, Cit, 2OG の影響は、代謝産物ごと
563 に異なっていた(表 2-2)。OAA の存在下では、Sy6PGDH の 6PG に対する K_m , k_{cat} , $k_{cat}/S_{0.5}$ と、
564 NADP⁺に対する K_m , k_{cat} が低下した(表 2-2)。Cit の存在下では、Sy6PGDH の 6PG に対する
565 K_m が上昇し、 k_{cat} と $k_{cat}/S_{0.5}$ が低下した(表 2-2)。さらに、Cit の存在下では、Sy6PGDH の
566 NADP⁺に対する K_m と k_{cat} が低下した(表 2-2)。2OG の存在下では、Sy6PGDH の 6PG に対す
567 る K_m , k_{cat} と、NADP⁺に対する K_m , k_{cat} が低下した(表 2-2)。

568 また、SyG6PDH と同様、Sy6PGDH も、PEP 存在下で活性が低下する(Ito and Osanai, 2018)。
 569 PEP の存在下では、Sy6PGDH の 6PG に対する K_m が上昇し、 k_{cat} と $k_{cat}/S_{0.5}$ が低下した(表 2-
 570 2)。さらに、PEP の存在下では、Sy6PGDH の $NADP^+$ に対する K_m と k_{cat} が低下した(表 2-2)。

571

572 表 2-2 Sy6PGDH の基質と補酵素に対するカイネティックパラメータ

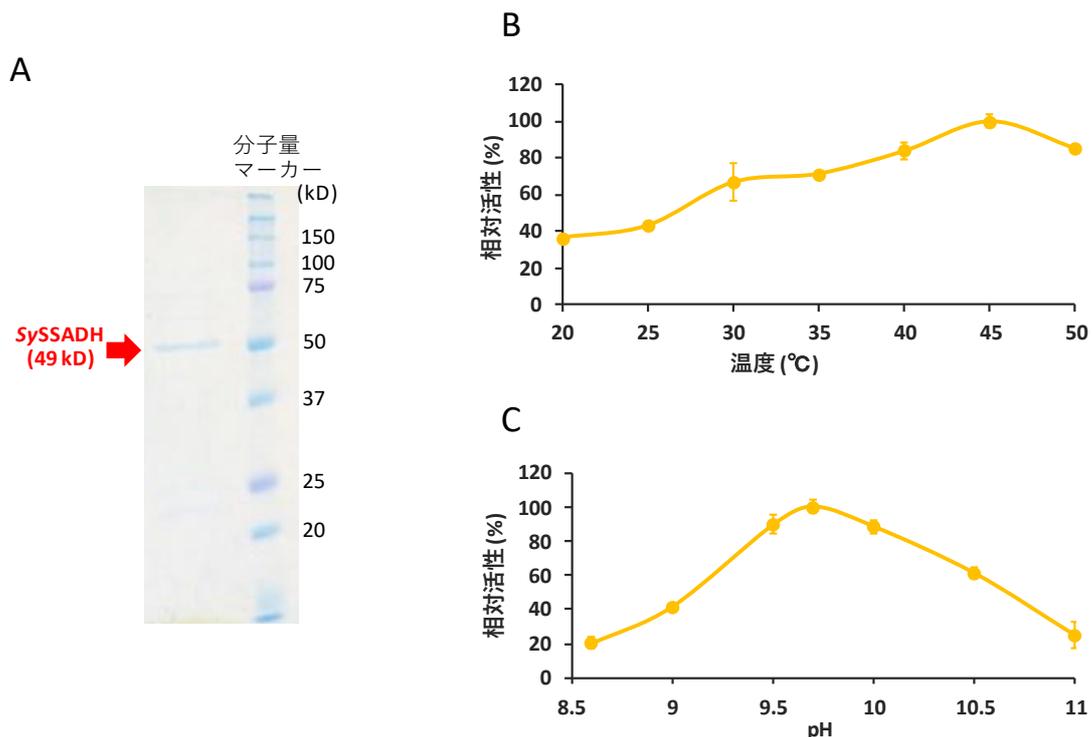
基質または 補酵素	エフェクター	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)
6PG	None (Ito and Osanai, 2018)	0.052 ± 0.005	64.5 ± 8.8	$1,239 \pm 41$
	3 mM PEP	$0.254 \pm 0.055^*$	$27.1 \pm 0.6^*$	$110 \pm 21^{**}$
	3 mM OAA	$0.048 \pm 0.007^*$	$34.5 \pm 5.1^*$	$719 \pm 20^{**}$
	3 mM Cit	$0.153 \pm 0.018^*$	$17.0 \pm 1.7^*$	$111 \pm 5^{**}$
	3 mM 2OG	$0.025 \pm 0.002^*$	$30.1 \pm 0.1^*$	$1,208 \pm 119$
$NADP^+$	None (Ito and Osanai, 2018)	0.058 ± 0.003	69.9 ± 5.5	$1,207 \pm 87$
	3 mM PEP	$0.022 \pm 0.004^*$	$30.3 \pm 1.6^*$	1400 ± 161
	3 mM OAA	$0.026 \pm 0.002^*$	$32.3 \pm 1.3^*$	$1,260 \pm 105$
	3 mM Cit	$0.030 \pm 0.008^*$	$26.8 \pm 5.2^{**}$	891 ± 78
	3 mM 2OG	$0.027 \pm 0.002^*$	$30.6 \pm 2.3^*$	$1,150 \pm 14$
NAD^+	None (Ito and Osanai, 2018)	4.46 ± 0.55	4.89 ± 0.54	1.10 ± 0.08

573 測定は、 $32^\circ C$, pH 7.3 で行った。6PG と $NADP^+$ 濃度はともに、2 mM で固定した。平均値±
 574 標準偏差は、3回の独立した実験によって得られた。アスタリスクは、スチューデントの t
 575 検定によって得られたエフェクター存在下と非存在下の活性間の統計的有意差を表す (* P
 576 < 0.05 , ** $P < 0.005$)。

577

578 2-3-5 *Synechocystis* 6803 由来コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*Sy*SSADH) と
579 OPP 経路酵素の生化学的性質の比較

580 以上の「OPP 経路の酵素が TCA 回路の代謝産物による阻害を受ける」という結果は、
581 OPP 経路と酸化的 TCA 回路が共に NADPH を生成し、競合関係にあるといった生化学的
582 関係があることを示唆している。酸化的 TCA 回路では、FADH₂ の生成を伴う 1 種類の反
583 応と NAD(P)H の生成を伴う 3 種類の反応の計 4 種類の酸化反応が行われる。*Synechocystis*
584 6803 の酸化的 TCA 回路の NAD(P)H 生成反応を触媒すると考えられている 3 つの酵素の中
585 で、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (SSADH) だけが、生化学解析されていな
586 い。*Synechocystis* 6803 の OPP 経路と酸化的 TCA 回路の生化学的関係を理解するために、
587 *Synechocystis* 6803 由来 SSADH (*Sy*SSADH) を精製し(図 2-6A)、生化学解析を行った。
588 *Sy*SSADH は、45°C, pH 9.7 で最も高い活性を示した(図 2-6B と C)。そのため、*Sy*SSADH
589 の生化学解析は、最適条件である 45°C, pH 9.7 で行った。
590



591 図 2-6 *Sy*SSADH の温度依存性と pH 依存性
592 (A) 精製および GST タグ切断後の *Sy*SSADH の SDS-PAGE 結果。SDS-PAGE には、12%
593 SDS-PAGE ゲルを使用した。ゲルの染色には、InstantBlue (Expedion Protein Solutions, San
594 Diego, CA) を用いた。(B) 様々な温度における *Sy*SSADH 活性。測定は、pH 10.0 で行っ
595

596 た。コハク酸セミアルデヒド(SSA)と NADP⁺濃度は、1 mM にした。SySSADH 活性は、
 597 45°C における活性を 100%としたときの相対活性で表した。平均値±標準偏差は、3 回の独
 598 立した実験によって得られた。(C) 様々な pH における SySSADH 活性。測定は、45°C で
 599 行った。SSA と NADP⁺濃度は、1 mM にした。SySSADH 活性は、pH 9.7 における活性を
 600 100%としたときの相対活性で表した。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって
 601 得られた。

602

603

604 SySSADH のコハク酸セミアルデヒド (SSA) に対する K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m は、それぞれ 0.010
 605 ± 0.001 mM, 1.38 ± 0.02 s⁻¹, 135 ± 14 s⁻¹ mM⁻¹ だった(表 2-3)。SyG6PDH と Sy6PGDH 同様、
 606 SySSADH は、NAD⁺ではなく NADP⁺を補酵素として特異的に利用した(表 2-3)。SySSADH
 607 の NADP⁺に対する K_m と k_{cat} は、それぞれ 0.058 ± 0.004 mM と 1.45 ± 0.10 s⁻¹ だった(表 2-
 608 3)。SySSADH の NADP⁺に対する k_{cat}/K_m (24.9 s⁻¹ mM⁻¹) は、SyG6PDH の $k_{cat}/S_{0.5}$ (3698 s⁻¹
 609 mM⁻¹) の 0.7%で、Sy6PGDH の k_{cat}/K_m (1207 s⁻¹ mM⁻¹)の 2.1%だった(表 2-1, 2-2, 2-3)。

610

611 表 2-3 SySSADH の基質と補酵素に対するカイネティックパラメータ

基質または補酵素	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
SSA	0.010 ± 0.001	1.38 ± 0.02	135 ± 14
NADP ⁺	0.058 ± 0.004	1.45 ± 0.10	24.9 ± 0.4
NAD ⁺	ND	ND	ND

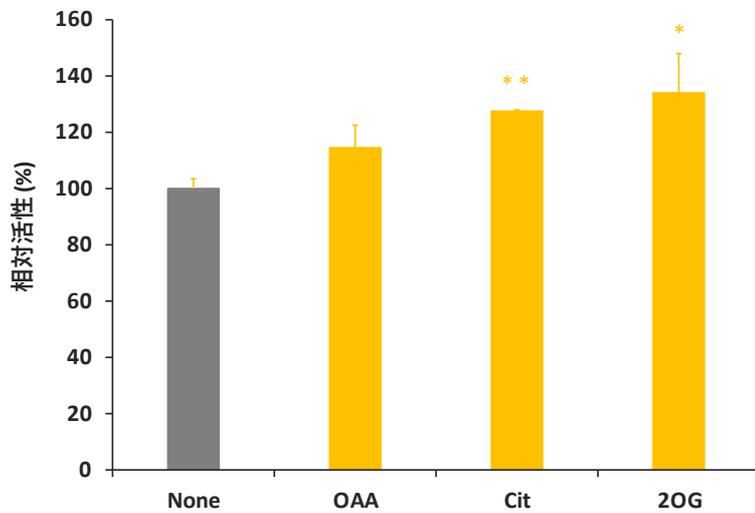
612 測定は、45°C, pH 9.7 で行った。SSA と NADP⁺濃度はともに、1 mM で固定した。平均値±
 613 標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。活性が低すぎて検出できなかった場
 614 合は、ND と表記した。

615

616

617 また、SyG6PDH と Sy6PGDH と異なり、SySSADH は、OAA, Cit, 2OG いずれの存在下で
 618 も活性が低下しなかった(図 2-7)。

619



620

621 図 2-7 5 mM の TCA 回路代謝産物存在下の SySSADH 活性

622 測定は、45°C, pH 9.7 で行った。SSA と NADP⁺濃度は、それぞれ K_m である 0.010 mM と

623 0.058 mM で固定した。SySSADH 活性は、エフェクター非存在下の活性を 100%としたと

624 きの相対活性で表した。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。アス

625 タリスクは、スチューデントの t 検定によって得られたエフェクター存在下と非存在下の

626 活性間の統計的有意差を表す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。

627

628

629 2-4 考察

630 本研究では、*Synechocystis* 6803 の OPP 経路において NADPH の生成反応を触媒する酵素
631 の生化学解析を行い、その生化学的特性を明らかにした。

632 *SyG6PDH* の G6P に対する $S_{0.5}$ (25.0 mM) (表 2-1) は、報告されている 10 種の従属栄養細菌
633 の $S_{0.5}$ (K_m) (0.019–3 mM) (Moritz et al. 2000; Opheim and Bernlohr, 1973; Hansen et al. 2002; Lessie
634 and Wyk, 1972; Ben-Bassat and Goldberg, 1980; TranNgoc et al. 2019; McCarthy et al. 2003; Rauch
635 et al. 2010; Lee and Levy, 1992; Banerjee and Fraenkel, 1972) よりも大きかった。窒素固定型の
636 シアノバクテリアである *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 由来の G6PDH の G6P に対する K_m
637 (65 mM) は、OpcA の存在下で 1.9 mM まで低下する (Hagen and Meeks, 2001)。低濃度 (飽
638 和濃度未満) の G6P 存在下で、OpcA を欠損させた変異株の *SyG6PDH* 活性は、野生株の
639 *SyG6PDH* 活性よりも低い (Özkul, K. and Karakaya, H, 2015)。これらの結果は、生体内におい
640 て、*SyG6PDH* の G6P に対する親和性が、OpcA によって制御されていることを示唆してい
641 る。*Sy6PGDH* 同様、*SyG6PDH* は、 NAD^+ ではなく $NADP^+$ を補酵素としたときに高い触媒効
642 率を示した (表 2-1, 2-2)。代謝産物の絶対定量から、*Synechocystis* 6803 の生体内には、 $NADP^+$
643 と NAD^+ が、同程度存在することが明らかになっている ($NADP^+$ 濃度: 0.614 $\mu\text{mol/g-dry cell}$
644 weight, NAD^+ 濃度: 0.514 $\mu\text{mol/g-drycell weight}$) (Dempo et al. 2014)。そのため、生体内におい
645 て、*Sy6PGDH* 同様、*SyG6PDH* は、 $NADP^+$ の方を補酵素として特異的に利用していると考え
646 えられる。*SyG6PDH* の $NADP^+$ に対する $S_{0.5}$ (0.017 mM) は、報告されている 12 種の細菌の
647 $S_{0.5}$ (K_m) (0.005–0.130 mM) (Moritz et al. 2000; Hagen and Meeks, 2001; Opheim and Bernlohr, 1973;
648 Hansen et al. 2002; Lessie and Wyk, 1972; Ben-Bassat and Goldberg, 1980; TranNgoc et al. 2019;
649 McCarthy et al. 2003; Rauch et al. 2010; Lee and Levy, 1992; Banerjee and Fraenkel, 1972; Acero-
650 Navarro et al. 2018) の範囲内にあり、*E.coli* の G6PDH の $NADP^+$ に対する K_m (0.015 mM)
651 (Banerjee and Fraenkel, 1972) と同程度だった (表 2-1)。また、*SyG6PDH* の $NADP^+$ に対する
652 $S_{0.5}$ (0.017 mM) は、*Sy6PGDH* の $NADP^+$ に対する K_m (0.058 mM) よりも低かった (表 2-1, 2-2)。
653 生体内において、 $NADP^+$ は、*Sy6PGDH* よりも、ボトルネックとなる第 1 段階の反応を触媒
654 する *SyG6PDH* の方に優先的に利用されていると考えられる。*SyG6PDH* の k_{cat} (G6P に対し
655 て 67.5 s^{-1} , $NADP^+$ に対して 61.8 s^{-1}) は、報告されている 6 種の細菌の k_{cat} (44.1–540 s^{-1})
656 (TranNgoc et al. 2019; McCarthy et al. 2003; Rauch et al. 2010; Lee and Levy, 1992; Acero-Navarro
657 et al. 2018; Fuentealba et al. 2016) の範囲内にあり、*Thermotoga maritima* の G6PDH の k_{cat} (72.3
658 s^{-1}) (McCarthy et al. 2003) と同程度だった (表 2-1)。以前行った細菌由来の 6PGDH のカイネ
659 ティックパラメータ比較から、*Sy6PGDH* の活性は、他の細菌の 6PGDH よりもはるかに高
660 いことが判明した (Ito and Osanai, 2018)。本研究における細菌由来の G6PDH のカイネティ
661 ックパラメータ比較から、*SyG6PDH* の活性は、他の細菌の G6PDH と大きな差がないこと

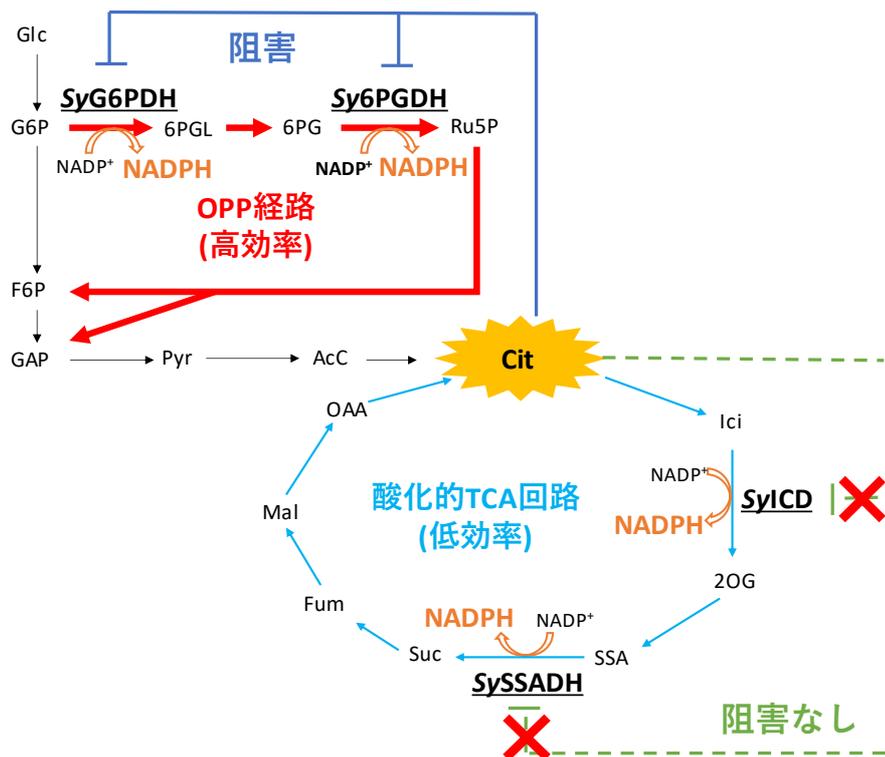
662 が判明した。

663 *Sy6PGDH* 同様 (Ito and Osanai, 2018)、*SyG6PDH* の活性は、二価金属イオンよりも代謝産
664 物による影響を受けた (図 2-3)。*SyG6PDH* の活性を低下させた代謝産物のうち、NADPH、
665 PEP, OAA, Cit, 2OG は、*Sy6PGDH* の活性も低下させた (Ito and Osanai, 2018) (図 2-3, 2-5)。速
666 度論的解析から、他の生物の *G6PDH* 同様 (Bonsignorea and De Flora, 1972)、*SyG6PDH* にお
667 いて、NADPH は、NADP⁺に対する競合阻害剤であることが判明した (表 2-1)。すなわち、
668 *SyG6PDH* の活性は、NADPH と NADP⁺の濃度比 (NADPH/NADP⁺比) によって制御されて
669 いる。*Synechocystis* 6803 において、NAD キナーゼの欠損は、NADPH/NADP⁺比の著しい上
670 昇と増殖の遅滞を引き起こす (Ishikawa et al. 2019)。このことは、生体内の NADPH/NADP⁺
671 比の著しい上昇が、細胞増殖に対して負の効果をもたらすことを示唆している。したがっ
672 て、NADPH による *SyG6PDH* 活性の制御は、生体内の NADPH/NADP⁺比を適切に保つため
673 に必要な制御であると考えられる。12 時間の明/暗サイクルの中で、*Synechocystis* 6803 の
674 NADPH/NADP⁺比は、光合成の明反応が活発に行われる明条件の初期段階において上昇する
675 (Saha et al. 2016)。光独立栄養条件下の OPP 経路の代謝フラックスは、暗従属栄養条件下の
676 代謝フラックスと比べて小さい (Young et al. 2011; Wan et al. 2017)。高い NADPH/NADP⁺比
677 によって *SyG6PDH* の活性が低く抑えられていることが、光独立栄養条件下における OPP 経
678 路の低フラックスの一因であると考えられる。*Sy6PGDH* において、NADPH は、NADP⁺に
679 対する非競合阻害剤として働く (Ito and Osanai, 2018)。PEP は、細菌の *G6PDH* の強力な阻
680 害剤であり (Levy, 1979)、*SyG6PDH* の k_{cat} も低下させた (表 2-1)。また、*Sy6PGDH* の速度論
681 的解析から、*Sy6PGDH* において、PEP は、6PG に対する混合阻害剤、NADP⁺に対する不競
682 合阻害剤であることが判明した (表 2-2)。*Synechocystis* 6803 において、PEP は、暗条件より
683 も明条件下で細胞内に蓄積する (Werner et al. 2019)。代謝産物の絶対定量が行われた 3 種の
684 シアノバクテリアの中で、*Synechocystis* 6803 は、細胞内に最も PEP を蓄積している (Dempo
685 et al. 2014)。したがって、PEP による OPP 経路酵素の阻害もまた、光独立栄養条件下におけ
686 る OPP 経路の低フラックスの原因であると考えられる。*SyG6PDH* と *Sy6PGDH* の活性を低
687 下させた 3 つの TCA 回路の代謝産物 (OAA, Cit, 2OG) のうち、OAA は、化学的に不安定な
688 化合物である (Krebs, 1942)。*Synechocystis* 6803 の生体内における OAA 濃度は、非常に低濃度
689 であり、検出できていない (Hasunuma et al. 2018)。そのため、生体内では、OAA は、*SyG6PDH*
690 と *Sy6PGDH* の活性に大きな影響を及ぼさないと考えられる。Cit による *Sy6PGDH* の阻害効
691 果は、OAA と 2OG の阻害効果よりも大きかった (図 2-5)。OAA と 2OG と異なり、Cit は、
692 *Sy6PGDH* の k_{cat} だけではなく、6PG に対する親和性も低下させた (表 2-2)。Cit は、1 mM で
693 も、*Sy6PGDH* に対して阻害効果を示す (Ito and Osanai, 2018)。*Synechocystis* 6803 の生体内に
694 における Cit 濃度 (2.16 $\mu\text{mol/g-drycell weight}$) は、2OG 濃度 (0.294 $\mu\text{mol/g-drycell weight}$) の約

695 7 倍であり、Cit は、絶対定量されている有機酸の中で 2 番目に生体内に多く存在する
696 (Dempo et al. 2014)。Cit 濃度が低下する窒素欠乏条件下で、*SyG6PDH* と *Sy6PGDH* の活性は
697 上昇する (Osanai et al. 2014)。これらの結果は、OAA, Cit, 2OG の中で、Cit が、主に生体内
698 において *SyG6PDH* と *Sy6PGDH* の阻害剤として機能していることを強く示唆している。
699 *SyG6PDH* の速度論的解析から、*SyG6PDH* において、Cit は、G6P に対する不競合阻害剤、
700 NADP⁺に対する混合阻害剤であることが判明した (表 2-1)。*Sy6PGDH* の速度論的解析から、
701 *Sy6PGDH* において、Cit は、6PG に対する混合阻害剤、NADP⁺に対する不競合阻害剤であ
702 ることが判明した (表 2-2)。*SyG6PDH* と *Sy6PGDH* とは異なり、従属栄養細菌である
703 *Corynebacterium glutamicum* の G6PDH と *Sy6PGDH* はともに、Cit による阻害を受けない
704 (Moritz et al. 2000)。

705 明条件から暗条件への培養条件の遷移によって、*Synechocystis* 6803 は、OPP 経路の代謝
706 産物を蓄積する (Maruyama et al. 2019)。一方、*SyG6PDH* を欠損させた変異株は、明条件か
707 ら暗条件への培養条件の遷移によって、OPP 経路ではなく酸化的 TCA 回路の代謝産物を蓄
708 積する (Maruyama et al. 2019)。窒素固定型シアノバクテリアと異なり、*Synechocystis* 6803 は、
709 グリオキシル酸回路を持たないので (Zhang and Bryant, 2015; Knoop et al. 2013)、イソクエン
710 酸デヒドロゲナーゼ (ICD) と SSADH の反応を介して酸化的 TCA 回路を回す (図 2-8)。
711 *Synechocystis* 6803 のリンゴ酸デヒドロゲナーゼは、NADH の生成反応を触媒するが (Takeya
712 et al. 2018)、*Synechocystis* 6803 の ICD と *SySSADH* は、NADPH の生成反応を特異的に触媒
713 する (Muro-Pastor and Florencio, 1992) (表 2-3)。したがって、*Synechocystis* 6803 の生体内に
714 において、酸化的 TCA 回路は、OPP 経路同様、NADPH の生成を担っていると考えられる (図
715 2-8)。また、Cit は、*SyICD* と *SySSADH* に対しては阻害効果を示さず (Muro-Pastor and Florencio,
716 1992) (図 2-7)、Cit の阻害効果は、OPP 経路の酵素に特異的だった (図 2-8)。*SySSADH* の
717 SSA に対する K_m (0.010 mM) は、報告されている 3 種の細菌の SSADH の K_m (0.003–0.0078
718 mM) (Jaeger et al., 2008; Wang et al. 2018; De Carvalho et al. 2011) よりも高かった (表 2-3)。
719 *SySSADH* の NADP⁺に対する K_m (0.058 mM) は、報告されている 4 種の細菌の SSADH の K_m
720 (0.0092–0.10 mM) (Jaeger et al., 2008; Wang et al. 2018; De Carvalho et al. 2011; Jang et al. 2014) の
721 範囲内だった (表 2-3)。*SySSADH* の k_{cat} (SSA に対して 1.38 s^{-1} , NADP⁺に対して 1.45 s^{-1}) は、
722 報告されている 3 種の細菌の SSADH の k_{cat} ($4.7\text{--}16.3\text{ s}^{-1}$) (Wang et al. 2018; De Carvalho et al.
723 2011; Jang et al. 2014) よりもはるかに低かった (表 2-3)。このように、細菌由来の SSADH の
724 カイネティックパラメータの比較から、*SySSADH* の活性は、他の細菌の SSADH よりもは
725 るかに低いことが判明した。同様に、生物間での酵素のカイネティックパラメータの比較か
726 ら、*Synechocystis* 6803 の他の酸化的 TCA 回路の酵素 (リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、フマラ
727 ーゼ、クエン酸シンターゼ) も活性が著しく低いことが明らかになっている (Takeya et al.

728 2018; Katayama et al. 2019; Ito et al. 2019)。さらに、*Sy*SSADH の NADP^+ に対する $k_{\text{cat}}/S_{0.5} (K_m)$
 729 は、OPP 経路の酵素の $k_{\text{cat}}/S_{0.5} (K_m)$ よりもはるかに低かった (表 2-1, 2-2, 2-3)。これらの速
 730 度論的解析の結果は、*Synechocystis* 6803 の酸化的 TCA 回路が、OPP 経路よりも、低効率な
 731 NADPH 生成経路であることを示している (図 2-8)。
 732



733
 734 図 2-8 Cit による *Synechocystis* 6803 の OPP 経路酵素の阻害モデル
 735 代謝産物の略語の説明は、下記の通りである。6PGL: 6-ホスホグルコノラクトン, Ru5P: リ
 736 ブロース-5-リン酸, F6P: フルクトース-6-リン酸, GAP: グリセルアルデヒド-3-リン酸, Ici:
 737 イソクエン酸
 738
 739

740 以上から、*Synechocystis* 6803 の生体内で Cit が蓄積し、酸化的 TCA 回路 (低効率な NADPH
 741 生成経路) が亢進するときは、NADPH の過剰生成を避けるために、OPP 経路 (高効率な
 742 NADPH 生成経路) の酵素の活性が抑えられると考えられる (図 2-8)。このように、Cit によ
 743 る OPP 経路酵素の阻害は、生体内での NADPH の過剰生成を避けるための阻害機構である
 744 と考えられる。

745 本章では、複数の酵素を解析することで、異なる還元力を生成すると考えられてきたシア
 746 ノバクテリアの OPP 経路と酸化的 TCA 回路が、共に NADPH の生成を担う代謝経路である

747 という生化学的関係を明らかにした。そして、Cit が、OPP 経路と酸化的 TCA 回路のフラ
748 ックスをそれぞれ負と正に制御し、生体内での NADPH の過剰な生成を避ける役割がある
749 ことが示唆された。本研究成果は、シアノバクテリアの OPP 経路における生化学的な制御
750 機構の理解に貢献すると期待される。

751

752 『本章の内容に相当する原著論文』

753 Ito S, Osanai, T. (2020) Unconventional biochemical regulation of the oxidative pentose phosphate
754 pathway in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. J.* 477:1309–1321. doi:
755 10.1042/BCJ20200038.

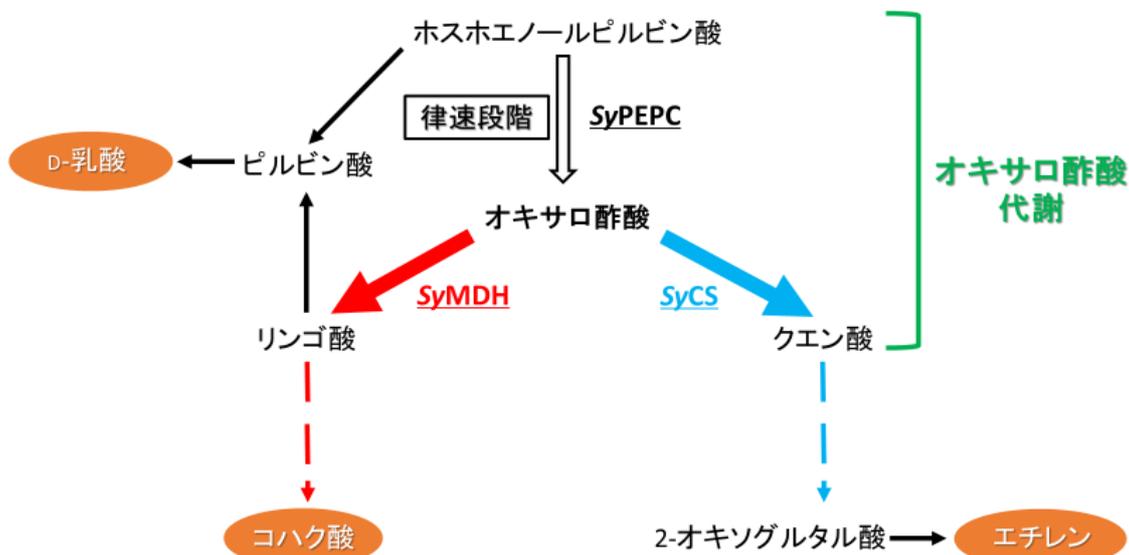
756 第3章 *Synechocystis* 6803 の TCA 回路におけるオキサロ酢酸代謝の再構成

757 3-1 緒言

758 TCA 回路には、酸化 TCA 回路 (時計回り) と還元 TCA 回路 (反時計回り) の 2 つの
759 分岐が存在する。酸化 TCA 回路は、好気呼吸を行う全ての生物が有しており、エネル
760 ギー生産やアミノ酸の生合成に関わる代謝経路である。しかしながら、シアノバクテリア
761 のように、一部の酵素を欠いており、代替となる別の酵素を有しているものや、GABA シ
762 ャントやグリオキシル酸シャントといったバイパス経路を持つ生物も存在する。還元
763 TCA 回路は、緑色硫黄細菌や水素酸化細菌に保存されている経路であり、酸化 TCA 回
764 路とは異なるいくつかの酵素を含み、還元力とエネルギーを用いて炭酸固定を行う (Evans
765 et al. 1966; Shiba et al. 1985)。シアノバクテリアにおいて、還元 TCA 回路は、嫌気条件
766 における発酵において重要であることが分かっている (Hasunuma et al. 2016)。また、近年
767 では、好熱性の水素酸化硫黄還元細菌において、全く同じ酵素群を用いて、栄養条件の変
768 化に伴い TCA 回路の方向を変化させる可逆的な TCA 回路が発見された (Nunoura et al.
769 2018)。このように、TCA 回路の機能は、生物種によって様々であり、それぞれの生物種
770 ごとに解析が必要である。序論で示したように、シアノバクテリアの TCA 回路を構成す
771 る酵素やバイパス経路の有無は明らかになりつつあるが、各 TCA 回路の生化学的調節に
772 関する研究は、まだ発展途上である。

773 *Synechocystis* 6803 は、暗嫌気条件下で、バイオプラスチック原料であるコハク酸と D-乳
774 酸を生産する (Osanai et al. 2015)。以前行われた代謝フラックス解析から、暗嫌気条件下に
775 おいて、コハク酸は、酸化 TCA 回路よりも、還元 TCA 回路を介して生成されることが
776 明らかになっている (Hasunuma et al. 2016) (図 3-1)。D-乳酸は、ピルビン酸から乳酸発
777 酵によって生成されるが、前駆物質であるピルビン酸は、還元 TCA 回路の中間体であ
778 るリンゴ酸からも供給される (Hidese et al. 2020) (図 3-1)。また、*Synechocystis* 6803 の代謝改
779 変株は、酸化 TCA 回路を介して、バイオプラスチックの 1 種であるポリエチレンの原
780 料となるエチレンを生成する (Ungerer et al. 2012) (図 3-1)。これら 3 種のバイオプラスチッ
781 ク原料は、*Synechocystis* 6803 のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC、
782 *Synechocystis* 6803 の PEPC: *Sy*PEPC) の過剰発現によって、増産することが報告されている
783 (Hasunuma et al. 2018; Durall et al. 2020) (図 3-1)。PEPC は、 Mg^{2+} の存在下で、ホスホエノー
784 ルピルビン酸 (PEP) からオキサロ酢酸を生成する反応を触媒する。そのため、オキサロ酢
785 酸の生成が、これらの有用物質の生産におけるボトルネック (律速段階) であると考えら
786 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 回路へのフ
787 ラックスを決める上で重要であると考えられる (図 3-1)。しかしながら、*Synechocystis*
788 6803 の生体内におけるオキサロ酢酸の濃度は極めて低く、オキサロ酢酸は、他の TCA 回

789 路の代謝産物と異なり検出できていない (Hasunuma et al. 2018)。そのため、オキサロ酢酸
 790 代謝の *in vivo* における解析は、困難である。
 791



792
 793 図 3-1 SyPEPC の過剰発現によって増産する有用物質
 794 点線は、複数の酵素反応を表している。

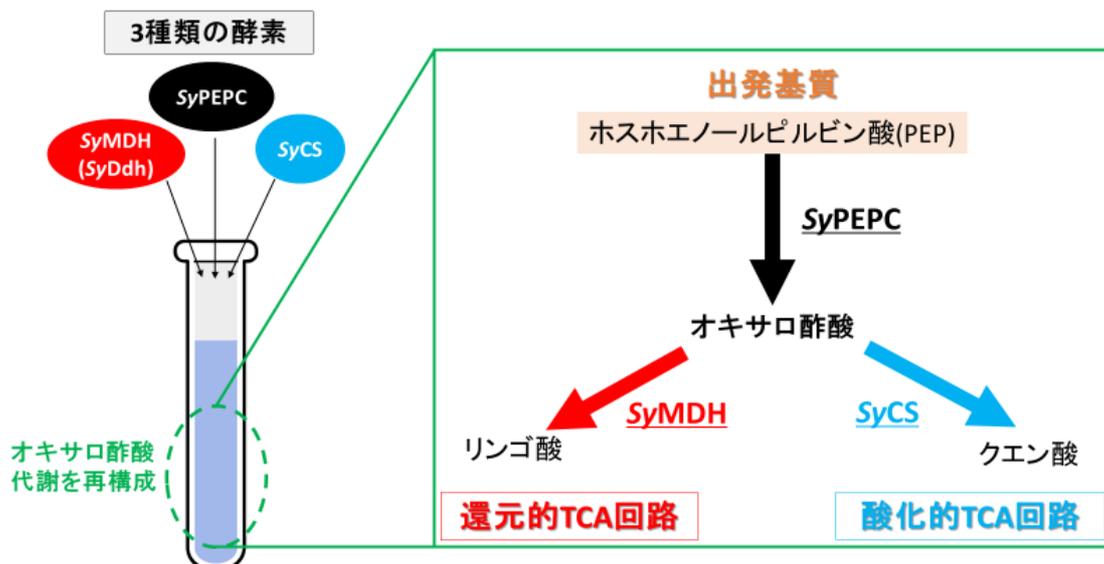
795
 796

797 そこで、以前、本研究チームは、*Synechocystis* 6803 の TCA 回路におけるオキサロ酢酸
 798 代謝を構成する酵素の生化学解析を行った (図 3-1)。他のシアノバクテリアの PEPC と異
 799 なり、SyPEPC は、TCA 回路の代謝産物によるアロステリック阻害を受けにくいという特
 800 性を有していた (Takeya et al. 2017)。TCA 回路において、PEPC が触媒する反応によって生
 801 成されるオキサロ酢酸は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) とクエン酸シンターゼ (CS)
 802 の基質になる。*Synechocystis* 6803 の MDH と CS (SyMDH と SyCS) はともに、オキサロ酢
 803 酸を基質とする反応を特異的に触媒した (図 3-1) (Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。SyMDH
 804 は、可逆反応を触媒するが、SyMDH のオキサロ酢酸を基質とする反応に対する特異性
 805 は、他の生物の MDH よりも著しく高いことが判明した (Takeya et al. 2018)。これらの結果
 806 は、SyMDH と SyCS が、それぞれ還元的 TCA 回路と酸化的 TCA 回路のフラックスを決定
 807 する重要な酵素であることを示唆している。また、本研究チームは、*Synechocystis* 6803 の
 808 D-乳酸脱水素酵素 (SyDdh) が、本基質であるピルビン酸だけでなく、オキサロ酢酸も基質
 809 として利用できることを発見した (Ito et al. 2017)。このことは、SyDdh が、生体内におい
 810 て、MDH のアイソザイムとしても機能し、オキサロ酢酸代謝に関与している可能性を示

811 唆している。しかしながら、これらの単一の酵素の生化学解析は、複数の酵素が基質を共
 812 有する場合において重要である「基質の受け渡し」といった隣接する酵素間の相互作用を
 813 一切反映していない。オキサロ酢酸は、化学的に不安定な代謝産物であることから、非酵
 814 素的な分解を防ぐ意味でも、この相互作用が重要であることが示唆された。また、これら
 815 の生化学解析は、各酵素の最適条件で行われており、測定条件が統一されていなかった。
 816 特に、SyMDH の最適温度が、他の3つの酵素の最適温度とかけ離れており、*Synechocystis*
 817 6803 の生育温度よりも高かった (Takeya et al. 2018)。そのため、これらの生化学解析は、
 818 「オキサロ酢酸代謝の解析」としては不十分であり、オキサロ酢酸代謝に対する pH や代
 819 謝産物などの細胞内における因子の影響や、SyMDH と SyDdh の機能の違いは、不明瞭な
 820 ままである。

821 そこで、本章では、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した SyPEPC、
 822 SyMDH (または SyDdh)、SyCS を同じ反応液に加え、*in vitro* で、*Synechocystis* 6803 の TCA
 823 回路におけるオキサロ酢酸代謝を再構成した (図 3-2)。PEP を出発基質として反応を開始
 824 し、反応停止後、最終生成物であるリンゴ酸 (L-リンゴ酸) とクエン酸の収率 (理論上 PEP
 825 から得ることができる最大量を 100%としたときの割合) を求めた。生体内環境を模倣し
 826 た様々な条件下において、オキサロ酢酸が、リンゴ酸とクエン酸のどちらにどれくらい分
 827 配されるかを調べた。

828



829

830 図 3-2 *In vitro* での *Synechocystis* 6803 のオキサロ酢酸代謝の再構成

831

832 3-2 材料と方法

833

834 3-2-1 発現ベクターの構築

835 各酵素の発現ベクターは、以前の生化学解析の際に作成したものを使用した (Takeya et al.
836 2017; Ito et al. 2017; Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。 *Synechocystis* 6803 のゲノム内におい
837 て、SyPEPC をコードする *pepc* (sll0920) のオープンリーディングフレームは、KOD plus neo
838 polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) とプライマー (5'-
839 GAAGGTCGTGGGATCATGAACTTGGCAGTTCCTG-3' および 5' -
840 GATGCGGCCGCTCGAGTCAACCAGTATTACGCATTC-3') を用いて、Polymerase Chain
841 Reaction (PCR) によって増幅した。増幅したフラグメントは、In-Fusion HD クローニングキ
842 ャット (Takara Bio, Shiga, Japan) によって、pGEX5X-1 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) の
843 *BamHI-XhoI* 部位にクローニングされた。SyMDH をコードする *citH* (sll0891) のオープンリ
844 ーディングフレームは、KOD plus neo polymerase とプライマー (5' -
845 GAAGGTCGTGGGATCATGAAATATTTTGGAGTATGCTC-3' および 5' -
846 GATGCGGCCGCTCGAGTTAACCGTCGCTAACCAT-3') を用いて、PCR によって増幅した。
847 増幅したフラグメントは、In-Fusion HD クローニングキットによって、pGEX5X-1 の *BamHI-*
848 *XhoI* 部位にクローニングされた。SyCS をコードする *glTA* (sll0401) と SyDdh をコードする
849 *ddh* (slr1556) のオープンリーディングフレームは、Eurofin Genomics Japan (Tokyo, Japan) に
850 よって人工的に合成され、pGEX5X-1 の *BamHI-XhoI* 部位にクローニングされた。

851

852 3-2-2 GST タグ融合タンパク質のアフィニティー精製

853 各 GST タグ融合タンパク質の精製は、以前の生化学解析の際に行った方法に準拠した
854 (Takeya et al. 2017; Ito et al. 2017; Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。SyPEPC と SyMDH のグル
855 タチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ融合タンパク質の発現ベクターを、*E. coli* BL21
856 (DE3) コンピテントセル (TakaraBio, Shiga, Japan) に形質転換した。SyCS と SyDdh のグル
857 タチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ融合タンパク質の発現ベクターを、*E. coli* DH5 α
858 コンピテントセル (TakaraBio, Shiga, Japan) に形質転換した。形質転換後の大腸菌 2 L 分を
859 LB 培地で振盪培養 (30°C, 125 rpm) (SyPEPC と SyMDH の精製の際には、30°C, 150 rpm) し、
860 0.01 mM イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシドによって一晩目的タンパク質の発現
861 を誘導した。遠心分離によって回収した細胞を PBS-T (1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM
862 Na₂HPO₄·12H₂O, 14.7 mM KH₂PO₄, 0.05% Tween-20) に懸濁し、超音波破砕機 model VC-750
863 (EYELA, Tokyo, Japan) を用いて、超音波破砕した(20% intensity, 200 sec) (SyPEPC と SyMDH
864 の精製の際には、30% intensity, 300 sec)。破砕後の細胞を遠心分離 (4°C, 5,800×g, 2 min) し、

865 可溶性タンパク質を含む上清を別の 50 ml チューブに移した。GST に特異的な担体である
866 Glutathione-Sepharose 4B resin (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) 560 μ L (*SyMDH* の精製の際
867 には、640 μ L) を上清に加えて氷上で 30 分間穏やかに振盪し、GST タグが結合した目的タ
868 ンパク質を担体に吸着させた。その後、*SyMDH*, *SyCS*, *SyDdh* の精製においては、1 mM
869 ATP/MgSO₄·7H₂O を混合物に加えて、37°Cでさらに 30 分間 (*SyDdh* の精製の際には、40 分
870 間) 穏やかに振盪させた。混合物を遠心分離 (4°C, 5,800×g, 2 min) して上清を取り除き、残
871 った担体を 1 mM ATP/MgSO₄·7H₂O を含む PBS-T 700 μ L (*SyPEPC* と *SyMDH* の精製の際に
872 は、500 μ L)で 10 回洗浄した。目的タンパク質を、700 μ L GST elution buffer (50 mM Tris-HCl,
873 pH 8.0, 10 mM 還元型グルタチオン)で 4 回 (*SyPEPC* と *SyMDH* の精製の際には、500 μ L で
874 3 回) 溶出した後、VivaSpin 500 MWCO 50,000 device (Sartorius, Göttingen, Germany) で濃縮
875 した。タンパク質濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用
876 いて、BCA 法によって算出した。精製後の目的タンパク質の純度の確認は、SDS-PAGE に
877 よって行った。8–12% SDS-PAGE ゲルを使用し、ゲルの染色には、InstantBlue (Expedion Protein
878 Solutions, San Diego, CA) を用いた。

879

880 3-2-3 L-リンゴ酸とクエン酸の測定

881 出発基質として、4 mM PEP を、アッセイ溶液 [100 mM Tris-HCl (pH 7–9), 10 mM MgCl₂,
882 4 mM NaHCO₃, 4 mM アセチル CoA, 4 mM NADH, 100 pmol *SyPEPC*, 100 pmol *SyMDH* (また
883 は *SyDdh*), 100 pmol *SyCS*] (全量 300 μ L) に加えて、酵素反応を開始した。反応は、20–40°C
884 で 20 時間行われた。反応後、VivaSpin 500 MWCO 10,000 device (Sartorius, Göttingen, Germany)
885 を用いた限外ろ過によって、タンパク質を除去した。反応後の最終産物である L-リンゴ酸
886 とクエン酸の濃度は、それぞれ E-kit Liquid L-Malate (J. K. International, Tokyo, Japan) と E-kit
887 Citrate (J. K. International, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

888

889 3-2-4 酵素活性測定

890 *SyMDH* によって触媒される反応は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶液 [100 mM Tris-HCl
891 (pH 7.3), 0–10 mM MgCl₂, 0.03–0.2 mM NADH, 0.012–0.5 mM オキサロ酢酸, 50–150 pmol
892 *SyMDH*] 中で行われた。*SyCS* によって触媒される反応は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶
893 液 [100 mM Tris-HCl (pH 7.3), 0–10 mM MgCl₂, 0.22–1 mM アセチル CoA, 0.002–0.15 mM オ
894 キサロ酢酸, 0.2 mM 2-ニトロ安息香酸 (DTNB), 20 pmol *SyCS*] 中で行われた。*SyDdh* によ
895 って触媒される反応は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶液 [100 mM Tris-HCl (pH 7.3), 10 mM
896 MgCl₂, 0.2 mM NADH, 0.5–0.5 mM オキサロ酢酸, 50 pmol *SyDdh*] 中で行われた。オキサロ
897 酢酸を入れる前のアッセイ溶液を 30°Cで 5 分間インキュベートした後、オキサロ酢酸を加

898 えて反応を開始した。SyMDH と SyDdh の反応初速度は、分光光度計 Hitachi U-3310
899 spectrophotometer (Hitachi High-Tech, Tokyo, Japan)を用いて、補酵素 NADH の特異吸収波長
900 である 340 nm の光を照射したときの 1 分間の吸光度変化を測定することで算出した。
901 SyCS の反応初速度は、分光光度計 Hitachi U-3310 spectrophotometer を用いて、生成物であ
902 る CoA-SH と DTNB との反応によって生じる 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸 (TNB) の特
903 異吸収波長である 412 nm の光を照射したときの 1 分間の吸光度変化を測定することで算
904 出した。酵素活性 1 unit は、1 分間に 1 μmol の基質を変換することができる酵素量を表
905 す。

906

907 3-2-5 カイネティックパラメータの算出

908 2-2-5 と同じ。本実験における飽和曲線のカーブフィッティングは全て、ヒルの式 (Dixon
909 and Webb, 1979) で行った。

910

911 3-3 結果

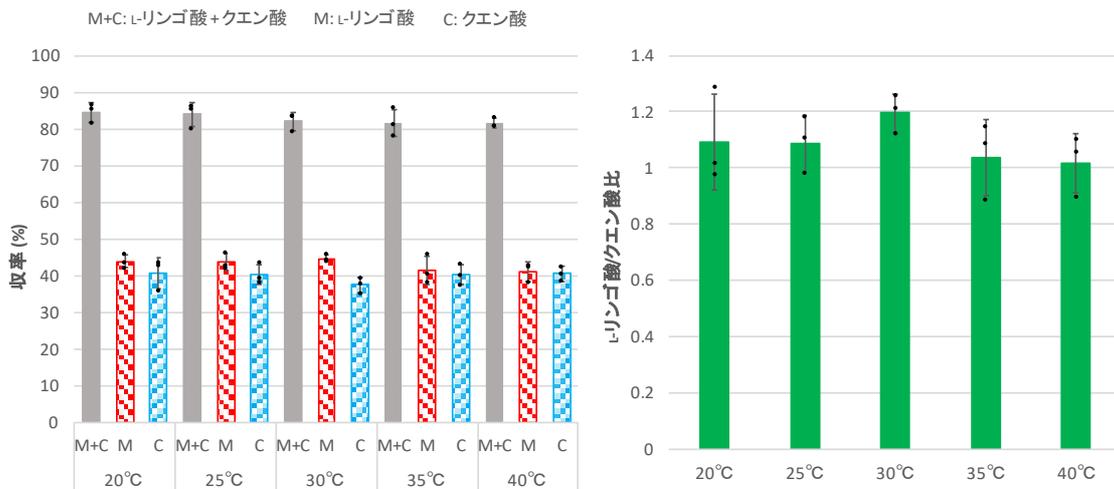
912

913 3-3-1 オキサロ酢酸代謝に対する温度と pH の影響

914 SyMDH と SyCS の活性は、温度と pH に依存して変化することが、生化学解析によって
915 明らかになっている (Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。はじめに、様々な温度と pH におい
916 て、オキサロ酢酸がどのように分配されるかを調べた (図 3-3, 3-4)。

917 *Synechocystis* 6803 は、SyPEPC の最適温度である 30°C で最もよく増殖し、40°C を超え
918 る温度では増殖できない (Tasaka et al. 1996; Takeya et al. 2017)。このことは、*Synechocystis*
919 6803 の生体内の温度が、40°C 以下に維持されていることを示唆している。そこで、20-
920 40°C の範囲で、オキサロ酢酸がどのように分配されるかを調べた (図 3-3)。20-40°C の範
921 囲では、L-リンゴ酸とクエン酸の収率の合計、L-リンゴ酸とクエン酸それぞれの収率、L-
922 リンゴ酸とクエン酸の収率の比 (L-リンゴ酸/クエン酸比) は、ほぼ一定だった (図 3-3)。

923



924

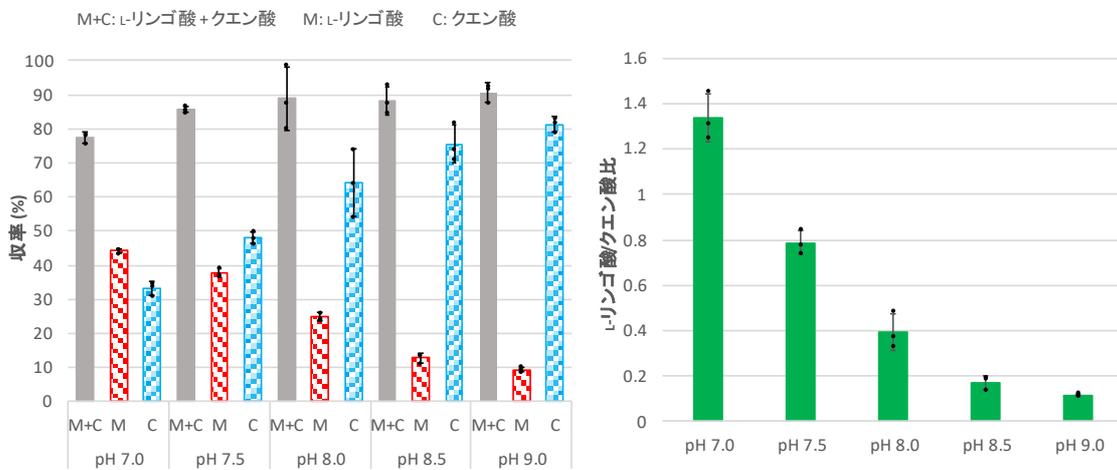
925 図 3-3 各温度における L-リンゴ酸とクエン酸の収率 (左図) とそれらの収率の比 (右図)
926 pH は、SyPEPC の最適 pH (pH 7.3) (Takeya et al. 2017) に固定した。平均値±標準偏差は、3
927 回の独立した実験によって得られた。各実験のデータは、黒い丸印で表した。

928

929

930 シアノバクテリアの生体内の pH は、光の強さの影響を受け、暗条件における生体内の
931 pH は、明条件における生体内の pH よりも 0.5-1.1 ほど低い (Coleman and Colman, 1981;
932 Mangan et al. 2016)。Synechocystis 属のシアノバクテリアの暗条件における生体内の pH

933 は、7.5–7.7 である (Lawrence et al. 1997)。これらの報告は、*Synechocystis* 6803 の生体内 pH
 934 が、弱塩基性の範囲で変化していることを示唆している。そこで、pH 7–9 の範囲で、オキ
 935 サロ酢酸がどのように分配されるかを調べた (図 3-4)。pH 7–9 の範囲では、pH が低いほ
 936 ど、L-リンゴ酸の収率が高かった (図 3-4)。対照的に、pH が高いほど、クエン酸の収率は
 937 高かった (図 3-4)。すなわち、pH が低いほど、L-リンゴ酸/クエン酸比が高かった (図 3-
 938 4)。pH 7–9 の範囲では、L-リンゴ酸とクエン酸の収率の合計は、ほぼ一定だった (図 3-
 939 4)。
 940



941
 942 図 3-4 各 pH における L-リンゴ酸とクエン酸の収率 (左図) とそれらの収率の比 (右図)
 943 温度は、*SyPEPC* の最適温度 (30°C) (Takeya et al. 2017) に固定した。平均値±標準偏差は、
 944 3 回の独立した実験によって得られた。各実験のデータは、黒い丸印で表した。
 945

946 3-3-2 オキサロ酢酸代謝に対するエフェクターの影響

947 SyMDH と SyCS は、一部の金属イオンや代謝産物によって、他の生物の同じ酵素では報
948 告されていない独自の活性調節を受ける (Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。そこで、次
949 に、この独自のエフェクターの存在下で、オキサロ酢酸がどのように分配されるかを調べ
950 た (図 3-5)。

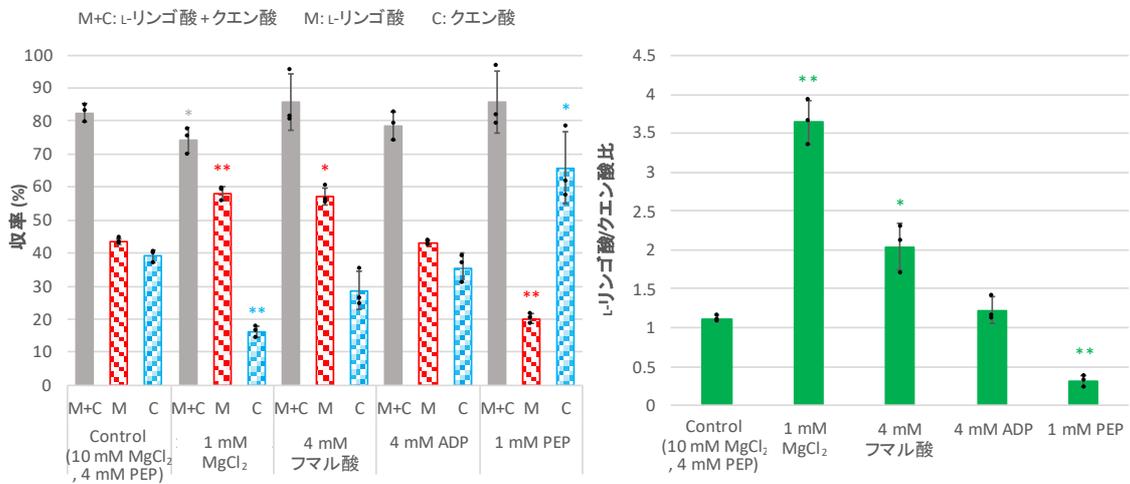
951 SyMDH の活性化剤の 1 つである $MgCl_2$ は、SyCS に対しても活性化効果をもたらす
952 (Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。 $MgCl_2$ 濃度を 10 mM から 1 mM に下げたとき、L-リンゴ
953 酸とクエン酸の収率の合計およびクエン酸の収率が低下し、L-リンゴ酸の収率が上昇した
954 (図 3-5)。1 mM $MgCl_2$ 存在下の L-リンゴ酸/クエン酸比は、10 mM $MgCl_2$ 存在下の L-リンゴ
955 酸/クエン酸比の 3.3 倍だった (図 3-5)。

956 SyMDH のもう 1 つの活性化剤であるフマル酸は、SyCS の活性に対しては、ほとんど影
957 響を及ぼさない (Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。4 mM フマル酸の存在下では、L-リンゴ
958 酸とクエン酸の収率の合計およびクエン酸の収率は変化せず、L-リンゴ酸の収率が上昇し
959 た (図 3-5)。4 mM フマル酸存在下の L-リンゴ酸/クエン酸比は、フマル酸非存在下の L-リ
960 ンゴ酸/クエン酸比の 1.8 倍だった (図 3-5)。

961 SyCS の活性化剤である ADP の SyMDH に対する影響は報告されていない (Takeya et al.
962 2018; Ito et al. 2019)。4 mM ADP の存在下では、L-リンゴ酸とクエン酸の収率の合計、L-リ
963 ンゴ酸とクエン酸それぞれの収率、L-リンゴ酸/クエン酸比は、変化しなかった (図 3-5)。

964 SyCS の阻害剤である PEP は、SyMDH の活性に対しては、ほとんど影響を及ぼさない
965 (Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。PEP 濃度を 4 mM から 1 mM に下げたとき、L-リンゴ酸
966 とクエン酸の収率の合計は変化せず、L-リンゴ酸の収率は低下し、クエン酸の収率は上昇
967 した (図 3-5)。1 mM PEP 存在下の L-リンゴ酸/クエン酸比は、4 mM PEP 存在下の L-リンゴ
968 酸/クエン酸比の 0.3 倍だった (図 3-5)。

969



970

971 図 3-5 *SyMDH* と *SyCS* のエフェクター存在下の L-リンゴ酸とクエン酸の収率 (左図) と

972 それらの収率の比 (右図)

973 測定条件は、*SyPEPC* の最適条件 (30°C, pH 7.3) (Takeya et al. 2017) に固定した。平均値±標

974 準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。各実験のデータは、黒い丸印で表し

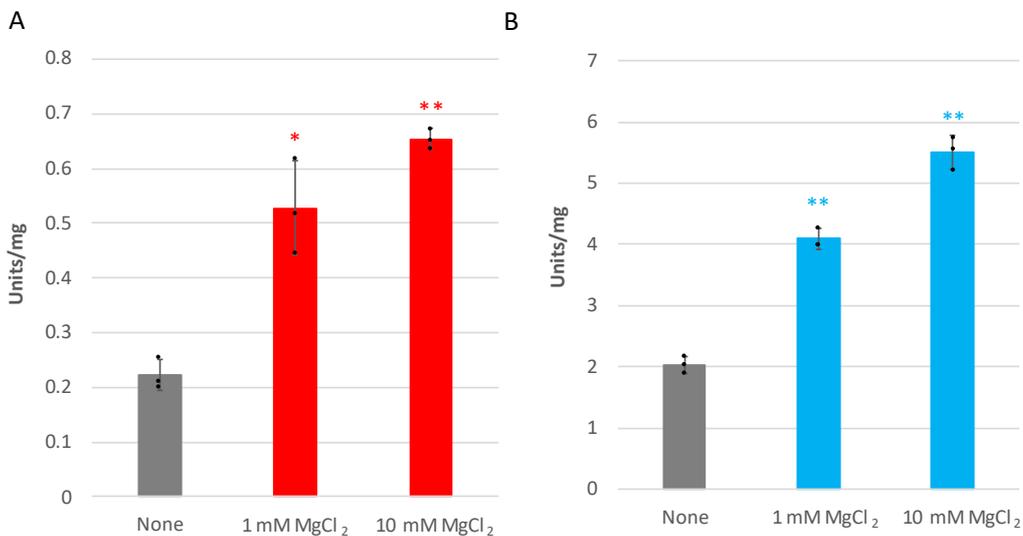
975 た。アスタリスクは、スチューデントの *t* 検定によって得られた各エフェクター存在下と

976 コントロール間の統計的有意差を表す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。

977

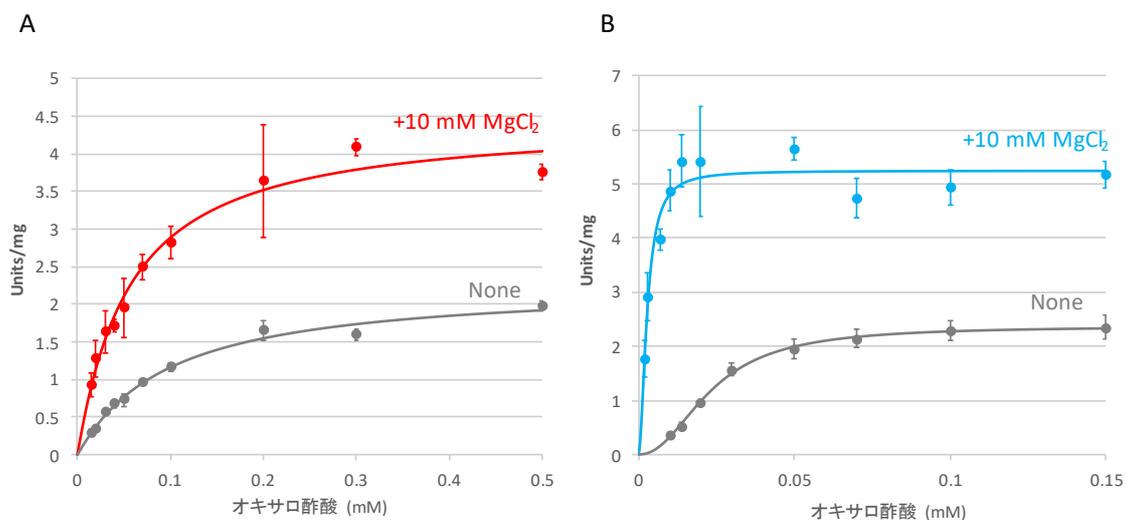
978 3-3-3 *Sy*MDH と *Sy*CS の $MgCl_2$ に対する感受性

979 $MgCl_2$ は、*Sy*MDH と *Sy*CS の両方に活性化効果をもたらすにもかかわらず、 $MgCl_2$ 濃度
980 を下げると、L-リンゴ酸の比率が上昇した (図 3-5)。このことは、*Sy*MDH と *Sy*CS の間
981 で、 $MgCl_2$ に対する感受性が異なっていることを示唆している。そこで、次に、*Sy*MDH と
982 *Sy*CS の $MgCl_2$ に対する感受性を調べた (図 3-6 と 3-7)。1 mM $MgCl_2$ 存在下と 10 mM
983 $MgCl_2$ 存在下の両方で、*Sy*MDH と *Sy*CS の活性は上昇した (図 3-6)。*Sy*MDH に対する
984 $MgCl_2$ の活性化効果は、オキサロ酢酸の濃度の影響をあまり受けなかった (図 3-7A)。10
985 mM $MgCl_2$ 存在下では、*Sy*MDH のオキサロ酢酸に対する $S_{0.5}$ が低下し、 k_{cat} が上昇した (表
986 3-1)。10 mM $MgCl_2$ 存在下の *Sy*MDH のオキサロ酢酸に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ は、 $MgCl_2$ 非存在下
987 の $k_{cat}/S_{0.5}$ の 3.3 倍だった (表 3-1)。一方で、*Sy*CS に対する $MgCl_2$ の活性化効果は、オキ
988 サロ酢酸の濃度が低いほど顕著に大きかった (図 3-7B)。10 mM $MgCl_2$ 存在下では、*Sy*CS
989 のオキサロ酢酸に対する $S_{0.5}$ が大きく低下し、 k_{cat} が上昇した (表 3-1)。10 mM $MgCl_2$ 存在
990 下の *Sy*CS のオキサロ酢酸に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ は、 $MgCl_2$ 非存在下の $k_{cat}/S_{0.5}$ の 18 倍だった
991 (表 3-1)。
992



993 図 3-6 *Sy*PEPC の最適条件下 (30°C, pH 7.3) における *Sy*MDH と *Sy*CS の活性に対する
994 $MgCl_2$ の影響
995 (A) $MgCl_2$ 存在下の *Sy*MDH 活性。オキサロ酢酸と NADH 濃度は、それぞれ *Sy*MDH の最適
996 条件下における K_m である 0.012 mM と 0.03 mM (Takeya et al. 2018) に固定した。平均値±
997 標準偏差は、3回の独立した実験によって得られた。アスタリスクは、スチューデントの *t*
998 検定によって得られた $MgCl_2$ 存在下と非存在下の活性間の統計的有意差を表す (* $P < 0.05$,
999

1000 ****P < 0.005**)。 (B) MgCl₂ 存在下の SyCS 活性。 オキサロ酢酸とアセチル CoA 濃度は、それ
 1001 ぞれ SyCS の最適条件下における K_m である 0.091 mM と 0.22 mM (Ito et al. 2019) に固定し
 1002 た。 平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。 アスタリスクは、スチュ
 1003 ーデントの *t* 検定によって得られた MgCl₂ 存在下と非存在下の活性間の統計的有意差を表
 1004 す (**P < 0.005)。
 1005
 1006



1007
 1008 図 3-7 SyPEPC の最適条件下 (30°C, pH 7.3)における SyMDH と SyCS のオキサロ酢酸飽
 1009 和曲線
 1010 (A) SyMDH のオキサロ酢酸飽和曲線。 NADH の濃度は、0.2 mM に固定した。 10 mM
 1011 MgCl₂ 存在下と非存在下の飽和曲線のカーブフィッティングにおける決定係数 (R²) は、
 1012 それぞれ 0.97689 と 0.98826 だった。 平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得
 1013 られた。 (B) SyCS のオキサロ酢酸飽和曲線。 アセチル CoA の濃度は、1 mM に固定した。
 1014 10 mM MgCl₂ 存在下と非存在下の飽和曲線のカーブフィッティングにおける決定係数 (R²)
 1015 は、それぞれ 0.92665 と 0.99692 だった。 平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によっ
 1016 て得られた。
 1017

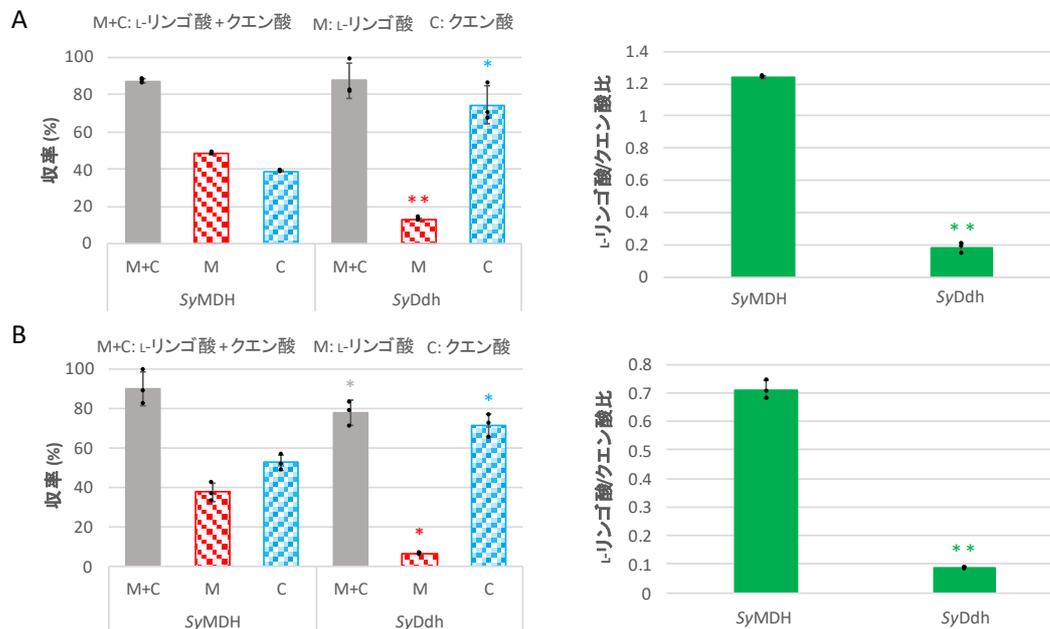
1018 表 3-1 SyPEPC の最適条件下 (30°C, pH 7.3) における SyMDH と SyCS のオキサロ酢酸に
 1019 対するカイネティックパラメータ

酵素	エフェクター	$S_{0.5}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/S_{0.5}$ ($s^{-1}mM^{-1}$)	n_H
SyMDH	None	0.095 ± 0.005	2.26 ± 0.08	23.8 ± 1.9	1.04 ± 0.01
	10 mM $MgCl_2$	$0.059 \pm 0.015^*$	$4.50 \pm 0.11^{**}$	$79.6 \pm 19.7^*$	1.03 ± 0.11
SyCS	None	0.023 ± 0.0002	2.81 ± 0.24	120 ± 9	2.19 ± 0.06
	10 mM $MgCl_2$	$0.0029 \pm 0.0003^{**}$	$6.21 \pm 0.45^{**}$	$2200 \pm 344^*$	$1.91 \pm 0.07^{**}$

1020 各飽和曲線の測定条件は、図 3-7 の説明文に記載した。平均値 \pm 標準偏差は、3 回の独立し
 1021 た実験によって得られた。アスタリスクは、スチューデントの t 検定によって得られた
 1022 $MgCl_2$ 存在下と非存在下の活性間の統計的有意差を表す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。
 1023

1024 3-3-4 オキサロ酢酸代謝に対する MDH アイソザイムとしての SyDdh の影響

1025 最後に、オキサロ酢酸代謝に対する MDH アイソザイムとしての SyDdh の影響を明らか
 1026 にするために、SyMDH の代わりに SyDdh を使用したときに、オキサロ酢酸の分配がどの
 1027 ように変化するかを調べた (図 3-8)。SyPEPC の最適条件下 (30°C, pH 7.3) (Takeya et al.
 1028 2017) では、L-リンゴ酸とクエン酸の収率の合計は変化せず、L-リンゴ酸の収率は低下
 1029 し、クエン酸の収率は上昇した (図 3-8A)。SyDdh を使用したときの L-リンゴ酸/クエン酸
 1030 比は、SyMDH を使用したときの L-リンゴ酸/クエン酸比の約 0.1 倍だった (図 3-8A)。
 1031 SyDdh の活性は pH に大きく依存することが、以前の生化学解析によって明らかになって
 1032 いる (Ito et al. 2017)。そこで、SyDdh の最適条件下 (30°C, pH 7.5) (Ito et al. 2017) でも同様
 1033 に、SyMDH の代わりに SyDdh を使用したときに、オキサロ酢酸の分配がどのように変化
 1034 するかを調べた (図 3-8B)。SyDdh の最適条件下 (30°C, pH 7.5)では、L-リンゴ酸とクエン
 1035 酸の収率の合計および L-リンゴ酸の収率は低下し、クエン酸の収率は上昇した (図 3-
 1036 8B)。SyDdh を使用したときの L-リンゴ酸/クエン酸比は、SyMDH を使用したときの L-リン
 1037 ゴ酸/クエン酸比の約 0.1 倍だった (図 3-8B)。
 1038



1039 図 3-8 SyMDH または SyDdh を使用したときの L-リンゴ酸とクエン酸の収率とそれらの
 1040 収率の比
 1041 (A) SyPEPC の最適条件下 (30°C, pH 7.3) における L-リンゴ酸とクエン酸の収率 (左図) と
 1042 それらの収率の比 (右図)。 (B) SyDdh の最適条件下 (30°C, pH 7.5) における L-リンゴ酸と
 1043 クエン酸の収率 (左図) とそれらの収率の比 (右図)。 平均値±標準偏差は、3 回の独立した
 1044 実験によって得られた。各実験のデータは、黒い丸印で表した。アスタリスクは、スチュ
 1045

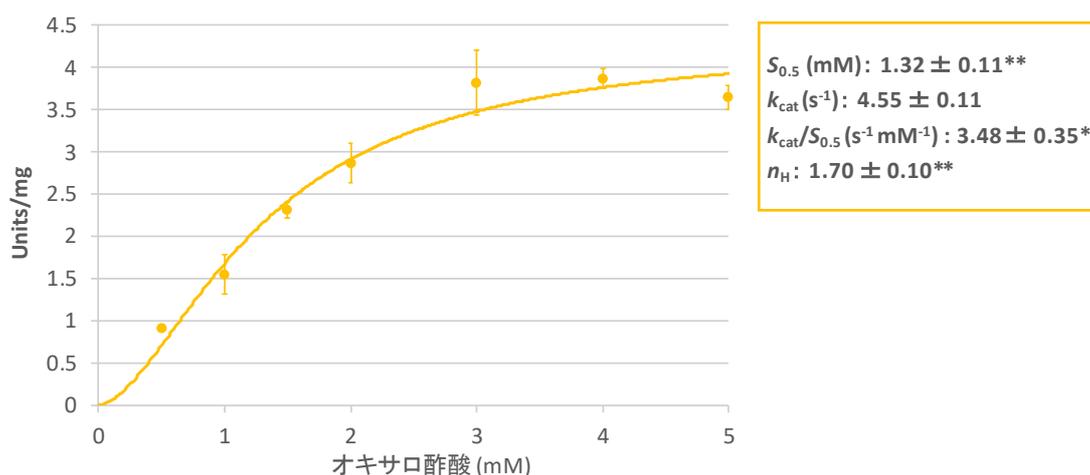
1046 ーデントの t 検定によって得られた SyMDH を使用したときと SyDdh を使用したときの間
1047 の統計的有意差を表す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。

1048

1049

1050 上記の結果を与える要因を明らかにするために、SyPEPC の最適条件下 (30°C, pH 7.3) で、
1051 SyDdh のオキサロ酢酸に対するカイネティックパラメータを算出し (図 3-9)、SyMDH のも
1052 のと比較した。10 mM MgCl₂ 存在下で、SyDdh の $S_{0.5}$ (1.32 mM) は、SyMDH の $S_{0.5}$ (0.059 mM)
1053 の 22 倍で、SyDdh の k_{cat} (4.55 s⁻¹) は、SyMDH の k_{cat} (4.50 s⁻¹) と同程度だった (表 3-1, 図 3-
1054 9)。SyDdh の k_{cat}/K_m (3.48 s⁻¹mM⁻¹) は、SyMDH の k_{cat}/K_m (79.6 s⁻¹mM⁻¹) の 0.04 倍だった (表
1055 3-1, 図 3-9)。

1056



1057

1058 図 3-9 SyPEPC の最適条件下 (30°C, pH 7.3) における SyDdh のオキサロ酢酸飽和曲線と
1059 カイネティックパラメータ

1060 MgCl₂ と NADH の濃度は、それぞれ 10 mM と 0.2 mM に固定した。飽和曲線のカーブフィ
1061 ッティングにおける決定係数 (R^2) は、0.9664 だった。平均値±標準偏差は、3 回の独立し
1062 た実験によって得られた。アスタリスクは、スチューデントの t 検定によって得られた
1063 SyMDH と SyDdh のカイネティックパラメータ間の統計的有意差を表す (* $P < 0.05$, ** $P <$
1064 0.005)。

1065

1066 3-4 考察

1067 本研究では、*in vitro* における合成生物学的解析によって、*Synechocystis* 6803 のオキサロ
1068 酢酸代謝に対する pH や代謝産物などの因子の影響と MDH アイソザイムの機能の違いを調
1069 べた。

1070 *SyMDH* の最適温度 (45°C) と *SyCS* の最適温度 (37°C) は異なっているにもかかわらず
1071 (Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)、温度は、L-リンゴ酸/クエン酸比に大きな影響を与えな
1072 かった (図 3-3)。*SyMDH* の最適温度 (45°C) は、予想される *Synechocystis* 6803 の生体内温度
1073 (40°C 以下) よりも高い (Takeya et al. 2018)。そのため、生体内では、*SyMDH* と *SyCS* の活
1074 性は、温度変化に伴い同じように変化すると考えられる。

1075 pH の低下は、L-リンゴ酸の収率の上昇とクエン酸の収率の低下につながった (図 3-4)。
1076 この結果は、*SyMDH* の pH 依存性 (最適 pH 6.5) と *SyCS* の pH 依存性 (最適 pH 7.5) の違い
1077 を反映している (Takeya et al. 2018; Ito et al. 2019)。全体的に、*Synechocystis* 6803 の還元的
1078 TCA 回路の酵素の最適 pH は、酸化的 TCA 回路の酵素の最適 pH よりも低い傾向がある (表
1079 3-2)。生化学解析された *Synechocystis* 6803 の TCA 回路の酵素の中で、MDH とフマラーゼ
1080 (FUM) は、酸化的、還元的どちらの TCA 回路の反応も触媒する (表 3-2)。*SyMDH* では、
1081 還元的 TCA 回路の反応における最適 pH は、酸化的 TCA 回路の反応における最適 pH より
1082 も低い (表 3-2)。一方、*Synechocystis* 6803 の FUM (*SyFUM*) の最適 pH は、どちらの反応方向
1083 でも pH 7.5 である (表 3-2)。*SyFUM* のフマル酸に対する触媒効率は、リンゴ酸に対する触
1084 媒効率の 4.6 倍である (Katayama et al. 2019)。このことは、フマル酸とリンゴ酸が同程度存
1085 在する生体内では (Dempo et al. 2014)、*SyFUM* が、酸化的 TCA 回路の反応 (フマル酸→リ
1086 ンゴ酸) を優先的に触媒していることを示唆している。*SyFUM* が還元的 TCA 回路の反応
1087 (リンゴ酸→フマル酸) を触媒するためには、*SyMDH* が触媒する反応によってリンゴ酸が多
1088 量に供給される必要がある。したがって、*SyMDH* が還元的 TCA 回路の反応に対して高い
1089 活性を示す低 pH 条件下で、*SyFUM* も還元的 TCA 回路の反応を触媒すると考えられる。シ
1090 アノバクテリアの生体内の pH は、明条件よりも、暗条件で低い (Coleman and Colman, 1981;
1091 Mangan et al. 2016)。*Synechocystis* 6803 において、還元的 TCA 回路は、明条件と比べて pH
1092 が低いと予想される暗嫌気条件下で機能する (Hasunuma et al. 2016)。これらの結果は、pH
1093 による TCA 回路酵素の活性の調節が、*Synechocystis* 6803 の TCA 回路の方向 (酸化的方向
1094 または還元的方向) を決める上で重要であることを示唆している (図 3-10)。そのため、
1095 *Synechocystis* 6803 の生体内の pH を変化させると予想される培地の pH、光の強さ、窒素源
1096 などの培養における因子の調節は、各 TCA 回路のフラックスの改善をもたらす可能性があ
1097 る。

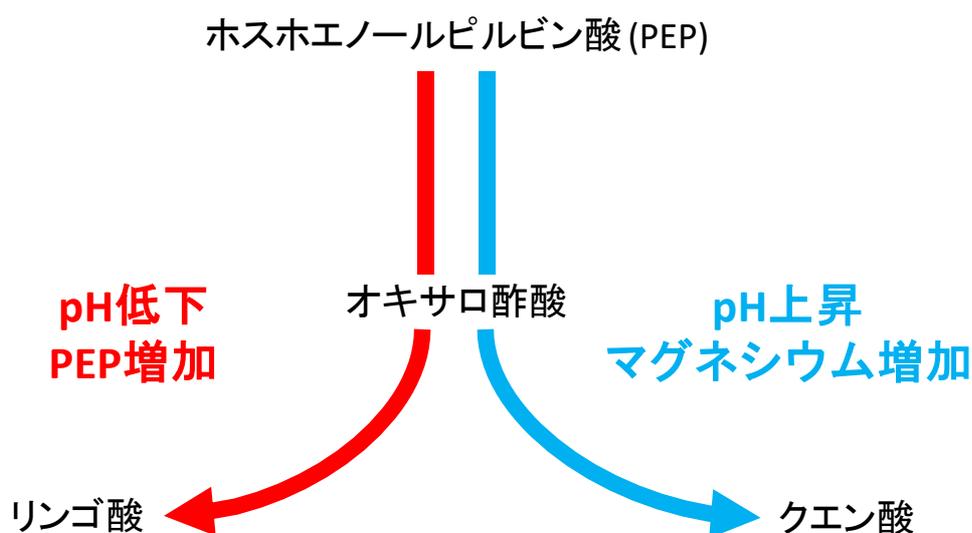
1098

1099 表 3-2 *Synechocystis* 6803 の TCA 回路の酵素の最適 pH

酵素	反応	最適 pH	参考文献
酸化 TCA 回路の酵素			
クエン酸シンターゼ	オキサロ酢酸 + アセチル CoA + H ₂ O → クエン酸 + CoA-SH	7.5	Ito et al. 2019
アコニターゼ	クエン酸 → <i>cis</i> -アコニット酸 + H ₂ O → イソクエン酸	7.7	Nishii et al. 2021
イソクエン酸デヒドロ ゲナーゼ	イソクエン酸 + NADP ⁺ → 2-オキシ グルタル酸 + NADPH + CO ₂	9.0	Muro-Pastor and Florencio, 1992
2-オキシグルタル酸デ カルボキシラーゼ	2-オキシグルタル酸 → コハク酸 セミアルデヒド + CO ₂	7.5	Wang et al. 2017
コハク酸セミアルデヒ ドデヒドロゲナーゼ	コハク酸セミアルデヒド + NADP ⁺ + H ₂ O → コハク酸 + NADPH	9.7	Ito and Osanai, 2020
コハク酸デヒドロゲナ ーゼ	コハク酸 + キノン → フマル酸 + キノール	報告なし	
フマラーゼ	フマル酸 + H ₂ O → L-リンゴ酸	7.5	Katayama et al. 2019
リンゴ酸デヒドロゲナ ーゼ	L-リンゴ酸 + NAD ⁺ → オキサロ 酢酸 + NADH	8.0	Takeya et al. 2018
還元 TCA 回路の酵素			
リンゴ酸デヒドロゲナ ーゼ	オキサロ酢酸 + NADH → リンゴ 酸 + NAD ⁺	6.5	Takeya et al. 2018

フマラーゼ	L-リンゴ酸 → フマル酸 + H ₂ O	7.5	Katayama et al. 2019
コハク酸デヒドロゲナーゼ	フマル酸 + キノール酸 → コハク酸 + キノン	報告なし	

1100



1101

1102 図 3-10 *Synechocystis* 6803 の TCA 回路のオキサロ酢酸代謝のモデル図

1103

1104

1105 MgCl₂ 濃度の低下は、L-リンゴ酸の収率の上昇とクエン酸の収率の低下につながった (図
 1106 3-5)。この結果は、SyMDH と SyCS の MgCl₂ に対する感受性の違いを反映している (表 3-
 1107 1)。MgCl₂ は、SyMDH よりも SyCS のオキサロ酢酸に対する親和性と触媒効率を大きく向上
 1108 させた (表 3-1)。この結果は、オキサロ酢酸が飽和していないとき、SyMDH よりも SyCS の
 1109 方が、Mg²⁺によって活性化されることを示している。オキサロ酢酸が痕跡量である
 1110 *Synechocystis* 6803 の生体内において (Hasunuma et al. 2018)、Mg²⁺は、主に SyMDH ではなく
 1111 SyCS の活性化剤として機能していると考えられる。ハウレンソウの葉緑体のストロマでは、
 1112 暗条件よりも明条件の方が、遊離 Mg²⁺濃度が 4 倍高い (Ishijima et al. 2003)。*Synechocystis*
 1113 6803 においても、遊離 Mg²⁺濃度は、明/暗遷移に伴って同様に変化すると考えられている
 1114 (Osanai et al. 2009)。これらの結果は、暗嫌気条件において、低濃度の Mg²⁺が、オキサロ酢酸
 1115 からのリンゴ酸 (コハク酸と D-乳酸の前駆物質) の生成を促していることを示唆している。

1116 また、 Mg^{2+} は、*SyPEPC* の補因子でもあり、*SyPEPC* の活性は、 Mg^{2+} 濃度に依存して増加す
1117 る (Mg^{2+} に対する $K_m=4.27$ mM) (Scholl et al. 2020)。したがって、 Mg^{2+} は、*Synechocystis* 6803
1118 のオキサロ酢酸代謝を包括的に制御しており、生体内における Mg^{2+} 濃度の上昇は、クエン
1119 酸生成へのフラックスの増大をもたらすと考えられる (図 3-10)。*Synechocystis* 6803 におい
1120 て、 Mg^{2+} は、窒素同化の制御においても重要である。酸化的 TCA 回路の代謝産物の 1 つで
1121 ある 2-オキソグルタル酸は、窒素同化における炭素骨格基質である。*Synechocystis* 6803 に
1122 において、 Mg^{2+} は、2-オキソグルタル酸の生成反応を触媒するイソクエン酸デヒドロゲナーゼ
1123 と窒素同化における第 1 段階の反応を触媒する 2 種類のグルタミンシンターゼの補因子
1124 である (Mérida et al. 1990; Muro-Pastor and Florencio, 1992; García-Domínguez et al. 1997)。2-オ
1125 キソグルタル酸とその前駆物質であるクエン酸は、*SyCS* の強力な阻害剤である (Ito et al.
1126 2019)。したがって、高濃度の Mg^{2+} 存在下において、窒素同化の亢進による 2-オキソグルタ
1127 ル酸とクエン酸の消費もまた、クエン酸生成フラックスの増大に寄与すると考えられる。
1128 *Synechocystis* 6803 の生体内の Mg^{2+} 濃度を上昇させると予想されるマグネシウムトランスポ
1129 ーターの過剰発現などの遺伝子操作は、酸化的 TCA 回路のフラックスの改善をもたらす可
1130 能性がある。

1131 フマル酸と PEP もまた、L-リンゴ酸/クエン酸比に影響を与えた (図 3-5)。この結果は、
1132 これらの代謝産物の *SyMDH* と *SyCS* の活性に対する影響の違いを反映している (Takeya et
1133 al. 2018; Ito et al. 2019)。*Synechocystis* 6803 の生体内において、PEP の濃度は、フマル酸の濃
1134 度の 15 倍である (Dempo et al. 2014)。そのため、生体内では、フマル酸よりも、PEP のオキ
1135 サロ酢酸代謝に対する影響の方が、はるかに大きいと考えられる。*Synechocystis* 6803 の生
1136 体内において、PEP のプールサイズは、暗嫌気条件における培養開始から 6 時間の間で上昇
1137 する (Hasunuma et al. 2016)。これらの結果は、PEP の蓄積もまた、暗嫌気条件におけるオキ
1138 サロ酢酸からのリンゴ酸の生成を促していることを示唆している。したがって、PEP も、
1139 *Synechocystis* 6803 のオキサロ酢酸代謝を直接的に制御しており、生体内における PEP 濃度
1140 の上昇は、リンゴ酸生成へのフラックスの増大をもたらすと考えられる (図 3-10)。
1141 *Synechocystis* 6803 の生体内の PEP 濃度を上昇させると予想される PEP の生成反応を触媒す
1142 る酵素 (エノラーゼやホスホエノールピルビン酸シンターゼ) の過剰発現などの遺伝子操
1143 作は、還元的 TCA 回路のフラックスの改善をもたらす可能性がある。

1144 オキサロ酢酸代謝の生化学的制御機構を理解するためには、*SyMDH* 活性に対する NADH
1145 の濃度変化の影響と *SyCS* 活性に対するアセチル CoA の濃度変化の影響も考慮する必要が
1146 ある。生体内の NADH とアセチル CoA の絶対濃度 (モル濃度) は、*E.coli* では報告されて
1147 いるが (Bennett et al. 2009)、シアノバクテリアでは報告されていない。*SyMDH* の NADH に
1148 対する K_m (0.014-0.030 mM) (Takeya et al. 2018) は、*E.coli* の NADH 濃度 (0.083 mM) (Bennett

1149 et al. 2009) よりもはるかに低い。同様に、SyCS のアセチル CoA に対する K_m (0.153-0.220
1150 mM) (Ito et al. 2019) は、*E.coli* のアセチル CoA 濃度 (0.61 mM) (Bennett et al. 2009) よりもは
1151 るかに低い。乾燥重量当たりのアセチル CoA の絶対濃度 ($\mu\text{mol/g-dry cell weight}$) が、
1152 *Synechocystis* 6803 を含む 3 種のシアノバクテリアで明らかになっている (Dempo et al. 2014)。
1153 *Synechocystis* 6803 のアセチル CoA 濃度は、他の 2 種のシアノバクテリアのアセチル CoA 濃
1154 度よりも約 7 倍高い (Dempo et al. 2014)。これらの結果は、*Synechocystis* 6803 の生体内に
1155 おいて、NADH とアセチル CoA の濃度が、それぞれ SyMDH と SyCS の飽和濃度に達して
1156 いることを示唆している。したがって、NADH とアセチル CoA の濃度変化は、それぞれ
1157 SyMDH と SyCS の活性に大きな影響を及ぼさないと考えられる。

1158 リンゴ酸デヒドロゲナーゼとして SyDdh を使用したときの L-リンゴ酸の収率は、SyMDH
1159 を使用したときの収率よりもはるかに低かった (図 3-8)。この結果は、SyMDH と SyDdh の
1160 オキサロ酢酸に対する親和性の違いを反映している (表 3-1, 図 3-9)。オキサロ酢酸が痕跡
1161 量である生体内では (Hasunuma et al. 2018)、オキサロ酢酸に対する親和性が、各酵素の活性
1162 に重要であると考えられる。そのため、生体内では、オキサロ酢酸に対して高い親和性を示
1163 す SyMDH の方が、主にリンゴ酸デヒドロゲナーゼとして機能していると考えられる。

1164 本章では、pH, Mg^{2+} , PEP が、*Synechocystis* 6803 の TCA 回路のオキサロ酢酸代謝に直接影
1165 響を及ぼす重要な因子であることを明らかにした。さらに、SyDdh が、低活性の MDH アイ
1166 ソザイムであることも明らかにした。これらの発見は、TCA 回路のオキサロ酢酸代謝の生
1167 化学的制御機構の理解に大きく貢献し、培養方法や遺伝子操作などの各 TCA 回路を利用し
1168 た物質生産のアプローチの幅を広げられると思われる。また、本研究で行った代謝の *in vitro* 再
1169 構成は、一般的な代謝解析法であるメタボローム解析や代謝フラックス解析では明らかに
1170 することができない「どの酵素が代謝変化を引き起こすか」という代謝の過程を明確にする
1171 ことができる画期的な新規の代謝解析手法である。単一の酵素の生化学解析と異なり、隣接
1172 する酵素間の相互作用や代謝の変化に伴う経時的な酵素活性の変化を反映するといったメ
1173 リットを持つ。そのため、今後、シアノバクテリアに留まらず、生物全般の代謝解析に広く
1174 利用されると期待される。

1175

1176

1177 『本章の内容に相当する原著論文』

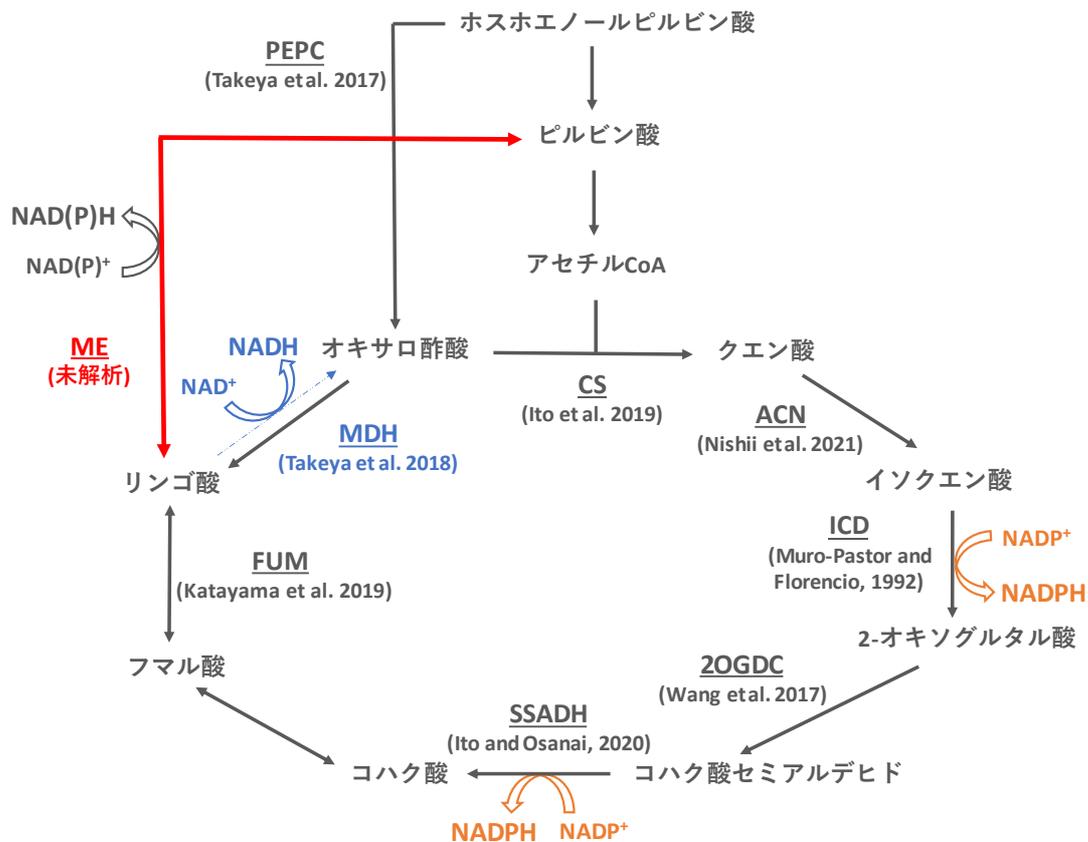
1178 Ito S, Hakamada T, Ogino T, Osanai T. (2021) Reconstitution of oxaloacetate metabolism in the
1179 tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803: discovery of important factors that directly
1180 affect the conversion of oxaloacetate. *Plant J.* 105:1449–1458. doi: 10.1111/tpj.15120.

1181

1182 第4章 *Synechocystis* 6803 の TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応の解明

1183 4-1 緒言

1184 *Synechocystis* 6803 の TCA 回路の生化学的特性の解明を目的として、これまで本研究チ
1185 ームを中心に、精製が困難な膜タンパク質および多酵素複合体を除いた 8 種類の TCA 回
1186 路に関連する酵素の生化学解析が行われた (図 4-1)。生化学解析によって、各酵素の触媒
1187 活性の大きさ、基質や補酵素に対する特異性などが明らかになった。TCA 回路における典
1188 型的な酵素の 1 つである MDH (EC 1.1.1.37) は、一般的に、下記の可逆的な酸化還元反応
1189 を触媒する：リンゴ酸 + NAD⁺ ⇌ オキサロ酢酸 + NADH。第 3 章における解析から、
1190 *Sy*MDH は、還元的 TCA 回路のフラックスを調節する鍵酵素であることが判明した。以前
1191 行われた生化学解析においても、*Sy*MDH は、リンゴ酸酸化反応に対する活性が著しく低
1192 く、還元反応に対して特異的に活性を示すことが分かっている (Takeya et al. 2018) (図 4-
1193 1)。また、*Sy*MDH は、*Synechocystis* 6803 の TCA 回路において、NAD(P)H の生成反応を触
1194 媒する他の 2 つの TCA 回路酵素である *Sy*ICD (Muro-Pastor and Florencio, 1992) と *Sy*SSADH
1195 (第 2 章で解析, Ito and Osanai, 2020) の補酵素である NADP⁺ に対して活性を示さないことが
1196 明らかになっている (Takeya et al. 2018) (図 4-1)。これらの生化学解析の結果は、*Sy*MDH
1197 が、*Synechocystis* 6803 の TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応を触媒せず、リンゴ酸酸化
1198 反応を触媒する別の酵素が存在していることを示唆している。
1199



1200

1201 図 4-1 *Synechocystis* 6803 の TCA 回路に関連する酵素の生化学解析

1202 MDH が触媒する反応は、反応速度が大きい還元反応を実線で、反応速度が小さい酸化反
 1203 応を細い二点鎖線で表した。各酵素の略語の下には、その酵素の生化学解析の文献を記し
 1204 た。酵素の略語の説明は、下記の通りである。

1205 PEPC: ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ, CS: クエン酸シンターゼ, ACN: アコ
 1206 ニターゼ, ICD: イソクエン酸デヒドロゲナーゼ, 2OGDC: 2-オキシグルタル酸デカルボキシ
 1207 ラーゼ, SSADH: コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ, FUM: フマラーゼ, MDH: リ
 1208 ンゴ酸デヒドロゲナーゼ, ME: マリックエンザイム

1209

1210

1211 真核生物と原核生物の両方で高度に保存されており、リンゴ酸酸化反応を触媒すること
 1212 ができる他の酵素としては、マリックエンザイム (ME、EC 1.1.1.38、1.1.1.39、1.1.1.40) が
 1213 挙げられる。ME は、下記の可逆的な酸化還元反応を触媒する：リンゴ酸 + NAD(P)⁺ ⇌
 1214 ピルビン酸 + NAD(P)H + CO₂。真核生物では、細胞質基質、葉緑体、ミトコンドリアな
 1215 どの様々な場所にアイソザイムが存在し、それぞれのアイソザイムの役割は、生物種ごと
 1216 に大きく異なる (Hsu, 1982; Loeber et al. 1994; Drincovich et al. 2001; Dolezal et al. 2004)。真
 1217 核生物と比べて、原核生物の ME に関する生化学的知見は少ないが、大腸菌と放線菌にお

1218 いても、2つアイソザイムが存在することが判明しており、アイソザイム間で、補酵素の
1219 特異性などの一部の性質が異なることが報告されている (Bologna et al. 2007; Rodriguez et
1220 al. 2012)。大腸菌の2つのMEはともに、酢酸を単一炭素源とする際のグリオキシル酸回
1221 路を介した糖新生において重要であると考えられている (Oh et al. 2002)。一方、放線菌の
1222 2つのMEは、主にトリアシルグリセロールや抗生物質の合成におけるアナプレロティッ
1223 ク反応としての役割を担っていると考えられている (Rodriguez et al. 2012)。全ゲノム解析
1224 から、*Synechocystis* 6803 は、*me* 遺伝子 (slr0721) からコードされる単一のME (SyME)を有
1225 していることが明らかになっている (Kaneko et al. 1996) (図 4-1)。*Synechocystis* 6803 の *me*
1226 遺伝子の過剰発現と欠損は、それぞれ細胞内のリンゴ酸濃度の低下と上昇を引き起こす
1227 (Yoshikawa et al. 2015)。また、*me* 遺伝子にトランスポゾン挿入変異を有する *Synechocystis*
1228 6803 の変異株は、光独立栄養条件下では増殖速度が低下し (Bricker et al. 2004)、*me* 遺伝子
1229 の欠損株は、暗従属栄養条件下では増殖できない (Wan et al. 2017)。これらの以前の *in vivo*
1230 における解析の結果は、SyME が、生体内においてリンゴ酸酸化反応を触媒し、この反応
1231 が、*Synechocystis* 6803 の正常な細胞増殖において重要であることを示唆している。しかし
1232 ながら、ME の生化学的な知見は、*Synechocystis* 6803 だけでなく、シアノバクテリア全体
1233 で乏しい (図 4-1)。そのため、生体内における SyME の具体的な役割はいまだ謎に包まれ
1234 ており、TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応を触媒しているかどうか不明瞭である。

1235 そこで、本章では、*Synechocystis* 6803 が持つ2つのリンゴ酸酸化酵素 (SyME と SyMDH)
1236 に着目した解析を行い、*Synechocystis* 6803 の TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応の触媒
1237 機構を解明した。

1238

1239 4-2 材料と方法

1240

1241 4-2-1 大腸菌を宿主とする発現ベクターの構築

1242 *Synechocystis* 6803 のゲノム内において、SyME をコードする *me* (slr0721) と SyMDH をコ
1243 ードする *citH* (slr0891) と SyFUM をコードする *fumC* (slr0018) のオープンリーディングフ
1244 レームは、Eurofin Genomics Japan (Tokyo, Japan) によって人工的に合成され、pQE80L (Qiagen,
1245 Venlo Netherlands) の *Bam*HI-*Xho*I 部位にクローニングされた。

1246

1247 4-2-2 His タグ融合タンパク質のアフィニティー精製

1248 His タグ (6 つのヒスチジンから成るタグ) 融合タンパク質の発現ベクターを、*E. coli*
1249 BL21(DE3) コンピテントセル (BioDynamics Laboratory Inc, Tokyo, Japan) に形質転換し
1250 た。形質転換後の大腸菌 3.2 L 分を LB 培地で振盪培養 (25°C, 150 rpm) し、0.1 mM イソプ
1251 ロピル β -D-1-チオガラクトピラノシドによって一晩目的タンパク質の発現を誘導した。遠
1252 心分離によって回収した細胞を平衡バッファー (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0) に
1253 懸濁し、超音波破碎機 model VC-750 (EYELA, Tokyo, Japan) を用いて、超音波破碎した
1254 (20% intensity, 2.5 min)。破碎後の細胞を遠心分離 (4°C, 9,100× g, 20 min) し、可溶性タンパ
1255 ク質を含む上清を別の 50 ml チューブに移した。His タグに特異的な担体である TALON®
1256 Metal Affinity Resin (TakaraBio, Shiga, Japan) 1.5 ml を上清に加えて氷上で 30 分間穏やかに振
1257 盪し、His タグが結合した目的タンパク質を担体に吸着させた。混合物を遠心分離 (4°C,
1258 2,300× g, 5 min) して上清を取り除き、残った担体を洗浄バッファー(20 mM Tris-HCl, 500
1259 mM NaCl, 5 mM イミダゾール, pH 8.0) で 5 回洗浄した。上清を除去した後、平衡バッ
1260 ファーで 5 回洗浄した。目的タンパク質を、His タグ溶出バッファー[20 mM Tris-HCl (pH
1261 8.0), 500 mM NaCl, 150 mM イミダゾール] 700 μ L で 5 回溶出した後、VivaSpin 500 MWCO
1262 30kDa (GE Healthcare, Chicago, USA) で濃縮した。タンパク質濃度は、Pierce BCA Protein
1263 Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いて、BCA 法によって算出した。SDS-PAGE
1264 には、12% SDS-PAGE ゲルを使用した。ゲルの染色には、InstantBlue (Expedion Protein
1265 Solutions, San Diego, CA) を用いた。

1266

1267 4-2-3 酵素活性測定

1268 SyME によって触媒される酸化反応 (リンゴ酸→ピルビン酸) は、下記の組成の 1 ml ア
1269 ッセイ溶液 [100 mM Tris-HCl (pH 7-9), 様々な濃度の L-リンゴ酸, 様々な濃度の NAD(P)⁺,
1270 様々な濃度の NH₄Cl, 様々な濃度の MnCl₂, 5-50 pmol SyME] 中で行われた。SyME によって
1271 触媒される還元反応 (ピルビン酸→リンゴ酸) は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶液 [100

1272 mM Tris-HCl (pH 8.3), 様々な濃度のピルビン酸, 様々な濃度の NADPH, 100 mM NH₄Cl, 0.5
1273 mM MnCl₂, 50 mM KHCO₃, 25-200 pmol SyME] 中で行われた。SyMDH によって触媒される
1274 酸化反応 (リンゴ酸→オキサロ酢酸) は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶液 [100 mM Tris-
1275 HCl (pH 8.0), 様々な濃度の L-リンゴ酸, 様々な濃度の NAD⁺, 129 pmol SyMDH] 中で行われ
1276 た。SyMDH によって触媒される還元反応 (オキサロ酢酸→リンゴ酸) は、下記の組成の 1
1277 ml アッセイ溶液 [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 様々な濃度のオキサロ酢酸, 様々な濃度の
1278 NADH, 30-100 pmol SyMDH] 中で行われた。基質を入れる前のアッセイ溶液を各酵素の最
1279 適温度で 5 分間インキュベートした後、基質を加えて反応を開始した。各酵素の反応初速
1280 度は、分光光度計 Hitachi U-3310 spectrophotometer (Hitachi High-Tech, Tokyo, Japan) を用い
1281 て、生成物もしくは補酵素となる NAD(P)H の特異吸収波長である 340 nm の光を照射した
1282 ときの 1 分間の吸光度変化を測定することで算出した。酵素活性 1 unit は、1 分間に 1
1283 μmol の基質を変換することができる酵素量を表す。

1284

1285 4-2-4 カイネティックパラメータの算出

1286 2-2-5 と同じ。本実験における飽和曲線のカーブフィッティングは全て、ヒルの式 (Dixon
1287 and Webb, 1979) で行った。

1288

1289 4-2-5 フマラーゼ (FUM) とのカップリング反応の解析

1290 SyME をリンゴ酸酸化酵素として使用したときのカップリング反応は、下記の組成の 1 ml
1291 アッセイ溶液 [100 pmol *Synechocystis* 6803 由来の FUM (SyFUM), 100 pmol SyME, 100 mM
1292 Tris-HCl (SyFUM の最適 pH である pH 7.5, Katayama et al. 2019), 0.163 mM フマル酸, 0.614
1293 mM NADP⁺, 100 mM NH₄Cl, 0.5 mM MnCl₂] 中で行われた。SyMDH をリンゴ酸酸化酵素とし
1294 て使用したときのカップリング反応は、下記の組成の 1 ml アッセイ溶液 [100 pmol
1295 *Synechocystis* 6803 由来の FUM (SyFUM), 100 pmol SyMDH, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.163
1296 mM フマル酸, 0.514 mM NAD⁺] 中で行われた。上記の基質および補酵素の濃度は、報告さ
1297 れている *Synechocystis* 6803 の生体内の代謝産物の濃度比 (Dempo et al. 2014) に合わせた。
1298 フマル酸を加えて室温で反応を開始した後、分光光度計 Hitachi U-3310 spectrophotometer を
1299 用いて 340 nm の光を 10 分間照射し、吸光度の変化 (NADH もしくは NADPH の生成) を測
1300 定した。

1301

1302 4-2-6 *Synechocystis* 6803 を宿主とするベクターの構築

1303 N 末端側に EcoRI サイト、C 末端側に XhoI サイトをつけた *Synechocystis* 6803 の *me*
1304 (slr0721) のオープンリーディングフレームは、Eurofin Genomics Japan によって合成され、

1305 Amp プロモーターを含む pEX-A2J1 ベクターにクローニングされた。N 末端側に BamHI サ
1306 イト、C 末端側に XhoI サイトをつけた *Synechocystis* 6803 の *citH* (sl10891) のオープンリー
1307 ィングフレームは、Eurofin Genomics Japan によって合成され、pEX-A2J1 ベクターにクロー
1308 ニングされた。また、SyME 相補株の作成に使用したベクターに関しては、N 末端側の NdeI
1309 サイトと C 末端側に HpaI サイトに、それぞれ *Synechocystis* 6803 の *me* (slr0721) の遺伝子上
1310 流 500 bp と下流 100 bp を導入し、Eurofin Genomics Japan によって pTKP2031V ベクターに
1311 クローニングされた。

1312

1313 4-2-7 *Synechocystis* 6803 の好気培養

1314 Williams によって単離された *Synechocystis* 6803 のグルコース耐性株 (Glucose tolerant 株、
1315 GT 株) (William, 1988) は、BG-11 液体培地に 20 mM HEPES-KOH (pH 7.8) を含む改変 BG11
1316 液体培地 (付録 1) 70 ml 中で培養させた。SyME 欠損株と SyMDH 欠損株は、0.3 µg/ml のク
1317 ロラムフェニコールを含む改変 BG11 液体培地中で培養させた。SyME 相補株は、0.8 µg/ml
1318 のカナマイシンを含む改変 BG11 液体培地中で培養させた。培養液は、1% (v/v) CO₂ を含む
1319 エアードバブリングし、連続白色光 (約 50 µmol photons m⁻² s⁻¹) を照射しながら、30°C でイ
1320 ンキュベートした。細胞の密度は、分光光度計 UV-2700 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて、
1321 OD₇₃₀ を測定することで決定した。GT 株と変異株ともに、培養開始時の OD₇₃₀ は、0.4 にな
1322 るようにした。

1323

1324 4-2-8 ウェスタンブロッティング

1325 SyME と SyMDH に対する一次抗体は、Cosmo Bio 社 (Tokyo, Japan) から購入した。SyME
1326 に対する一次抗体は、下記のアミノ酸から成る合成ペプチド (CDSKGIVGKHRDLNS) を
1327 ウサギに導入することで製造された。SyMDH に対する一次抗体は、下記のアミノ酸から成
1328 る合成ペプチド (CAGLPRRPGMSRDDLGLK) をウサギに導入することで製造された。3 日
1329 間培養した細胞をプロテアーゼ阻害剤 Complete Mini (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を含
1330 む PBS-T (1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 14.7 mM KH₂PO₄, 0.05% Tween-
1331 20) 500 µl に懸濁した。懸濁した細胞を、超音波破砕機 model VC-750 を用いて、超音波破砕
1332 した (20% intensity, 40 sec)。遠心分離後 (4°C, 20,400× g, 2 min)、400 µl の上清に 133 µl の
1333 SDS サンプルバッファー [250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 8%
1334 (w/v) SDS, 20% (w/v) スクロース, 1% (w/v) ブロモフェノールブルー] を加え、98°C で 4
1335 分間インキュベートした。6 µg または 20 µg のタンパク質を、12% SDS-PAGE ゲルを用い
1336 て、SDS-PAGE に供した。タンパク質濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit を用いた BCA 法
1337 によって算出した。電気泳動後、タンパク質のバンドは、Immobilon-P PVDF Membrane (Merck

1338 Millipore, Burlington, USA) に転写された。抗体が非特異的にメンブレン表面に結合するのを
1339 防ぐために、3%の BSA を含む PBS-T 中で一晩振盪し、ブロッキングした。作成した抗体を
1340 用いて抗原タンパク質との抗原抗体反応を行った後、1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution
1341 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 中で、SyMDH のウェスタンブロッティングでは 120 分間、
1342 SyME のウェスタンブロッティングでは 35 分間振盪し、発色させた。

1343

1344 4-2-9 Synechocystis 6803 細胞からの L-リンゴ酸の抽出

1345 *Synechocystis* 6803 を好気条件下で 3 日間培養した後、OD₇₃₀×液量 (ml) =150 となる量の
1346 培養液に含まれる細胞を遠心分離 (25°C, 5,800× g, 2 min) によって回収した。細胞を 600 μl
1347 の 60% (v/v)メタノールに懸濁し、混合物を TWIN MIXER TM-282 (ASONE, Osaka, Japan) で
1348 15 分間攪拌した。遠心分離 (4°C, 20,400× g, 5 min) し、上清を 500 μl 回収した。回収した
1349 上清を、Amicon Ultra 3 kD カットオフフィルター (Merck, Billerica, MA, USA)に加え、遠心
1350 分離 (4°C, 20,400× g, 60 min)した。350 μl のろ液を、遠心エバポレーター-CVE-2000 (EYELA,
1351 Tokyo, Japan) を用いて 3 時間乾燥させた。乾燥後の残渣を、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 30 μl
1352 に溶解した。サンプルの L-リンゴ酸濃度は、E-kit Liquid L-Malate (J. K. International, Tokyo,
1353 Japan) を用いて測定した。

1354

1355 4-2-10 系統解析

1356 シアノバクテリアの ME と MDH のマルチプルアライメントは、それぞれ保存された 463
1357 と 279 個のアミノ酸残基に基づいて、CLC Sequence Viewer ver. 8.0 上で行われた。系統樹は、
1358 アライメントの結果をもとに、PHYML online (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) 上で最尤
1359 法によって作成された。系統樹の枝の信頼性の尺度となるブートストラップ値は、500 回の
1360 試行から得た。

1361

1362 4-2-11 BLAST 解析

1363 KEGG GENES データベース (<https://www.genome.jp/kegg/genes.html>) に登録されている全
1364 ゲノム配列既知のシアノバクテリア (130 種)に対する ME と MDH の BLAST 検索は、
1365 BLASTP プログラムを用いて、2021 年 1 月 28 日に行われた。ME と MDH の BLAST 検索
1366 の際には、それぞれ SyME (アクセッション番号: BAA16663)と SyMDH (アクセッション番
1367 号: BAA10470)のアミノ酸配列をクエリ配列として用いた。BLAST 検索における E-value の
1368 閾値は、10⁻¹⁰ とした。MDH と配列相同性が高い L-乳酸脱水素酵素 (LDH) と MDH の配列
1369 は、Yin と Kirsch によって定義されたこれらの酵素の基質特異性を決定する 5 つのアミノ
1370 酸残基 (Yin and Kirsch, 2007) によって識別された。

1371 4-3 結果

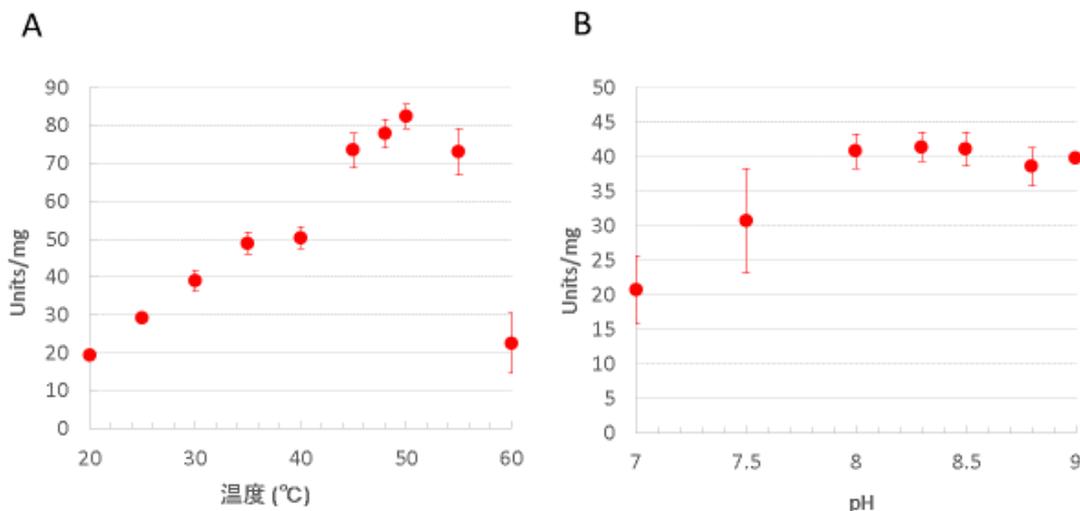
1372

1373 4-3-1 SyME の最適条件の検討

1374 シアノバクテリアの ME の触媒活性を明らかにするために、SyME の生化学解析を行っ
1375 た。SyME は、His タグ融合タンパク質として、大腸菌からアフィニティークロマトグラフ
1376 ーによって精製した (付録 2)。

1377 基質および補酵素に対するカイネティックパラメータを算出する前に、SyME が最も高い
1378 活性を示す最適条件 (温度、pH、補因子) の検討を行った(図 4-2 と 4-3)。SyME の活性は、
1379 温度によって大きく変化し、50°Cで最も高かった (図 4-2A)。また、SyME は、pH 8-9 の範
1380 囲で恒常的に高い活性を示した (図 4-2B)。上記の範囲の中でも、SyME は、pH 8.3 で最も
1381 高い活性を示した (図 4-2B)。細菌の ME の活性は、一価と二価の陽イオンに強く依存する
1382 (Kawai et al. 1996; Driscoll and Finan, 1997; Rozova et al. 2019)。SyME の活性は、一価と二価の
1383 陽イオンの中でも、NH₄⁺(NH₄Cl)と Mn²⁺(MnCl₂) に強く依存した (付録 3)。SyME の活性は、
1384 NH₄Cl と MnCl₂ の濃度に依存して上昇し、それぞれ 100 mM と 0.5 mM 付近では完全に頭打
1385 ちになった (図 4-3)。SyME の NH₄Cl と MnCl₂ に対する S_{0.5} は、それぞれ 18.1 mM と 0.0072
1386 mM だった (図 4-3)。以上の結果から、SyME の最適条件は、「50°C, pH 8.3 で 100 mM NH₄Cl,
1387 0.5 mM MnCl₂ 存在下」とした。

1388

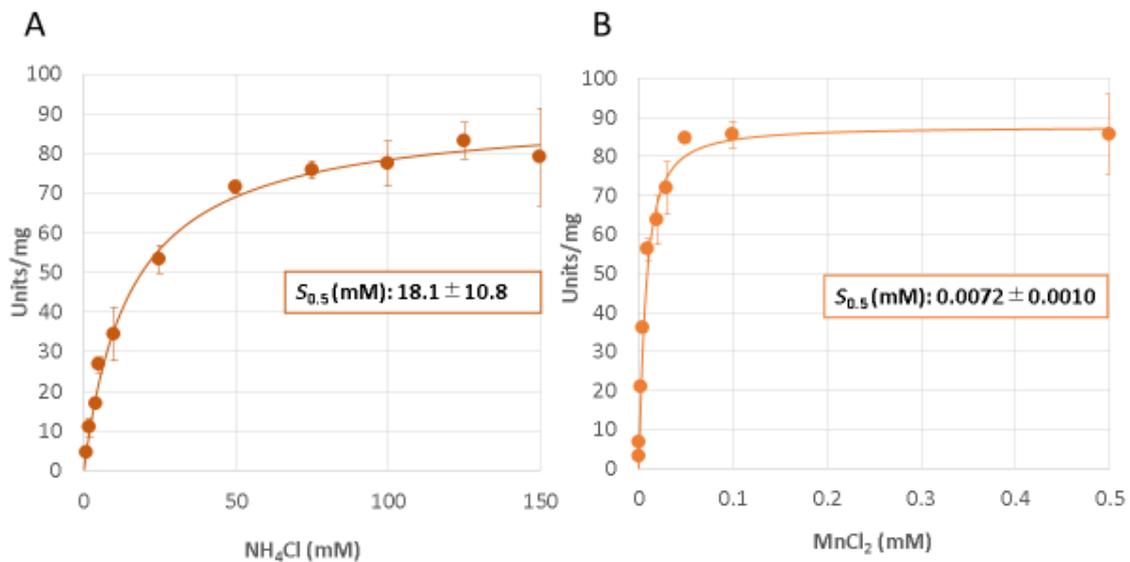


1389

1390 図 4-2 SyME の温度依存性と pH 依存性

1391 (A) 様々な温度における SyME 活性。測定は、pH 8.0 で行った。L-リンゴ酸と NADP⁺濃度
1392 は、それぞれ 2 mM と 0.5 mM にした。NH₄Cl と MnCl₂ 濃度は、50 mM と 1 mM にした。平
1393 均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。(B) 様々な pH における SyME 活

1394 性。測定は、30°Cで行った。L-リンゴ酸と NADP⁺濃度は、それぞれ 2 mM と 0.5 mM にした。
1395 NH₄Cl と MnCl₂濃度は、50 mM と 1 mM にした。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験
1396 によって得られた。
1397
1398



1399
1400 図 4-3 様々な補因子濃度における SyME 活性
1401 (A) 様々な NH₄Cl 濃度における SyME 活性。測定は、50°C, pH 8.3 で行った。L-リンゴ酸と
1402 NADP⁺濃度は、それぞれ 2 mM と 0.5 mM にした。MnCl₂濃度は、1 mM にした。飽和曲線
1403 のカーブフィッティングにおける決定係数 (R^2) は、0.99391 だった。平均値±標準偏差は、
1404 3 回の独立した実験によって得られた。(B) 様々な MnCl₂ 濃度における SyME 活性。測定は、
1405 50°C, pH 8.3 で行った。L-リンゴ酸と NADP⁺濃度は、それぞれ 2 mM と 0.5 mM にした。
1406 NH₄Cl 濃度は、100 mM にした。飽和曲線のカーブフィッティングにおける決定係数 (R^2)
1407 は、0.99265 だった。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。
1408
1409

1410 4-3-2 SyME と SyMDH のカインेटリックパラメータの比較

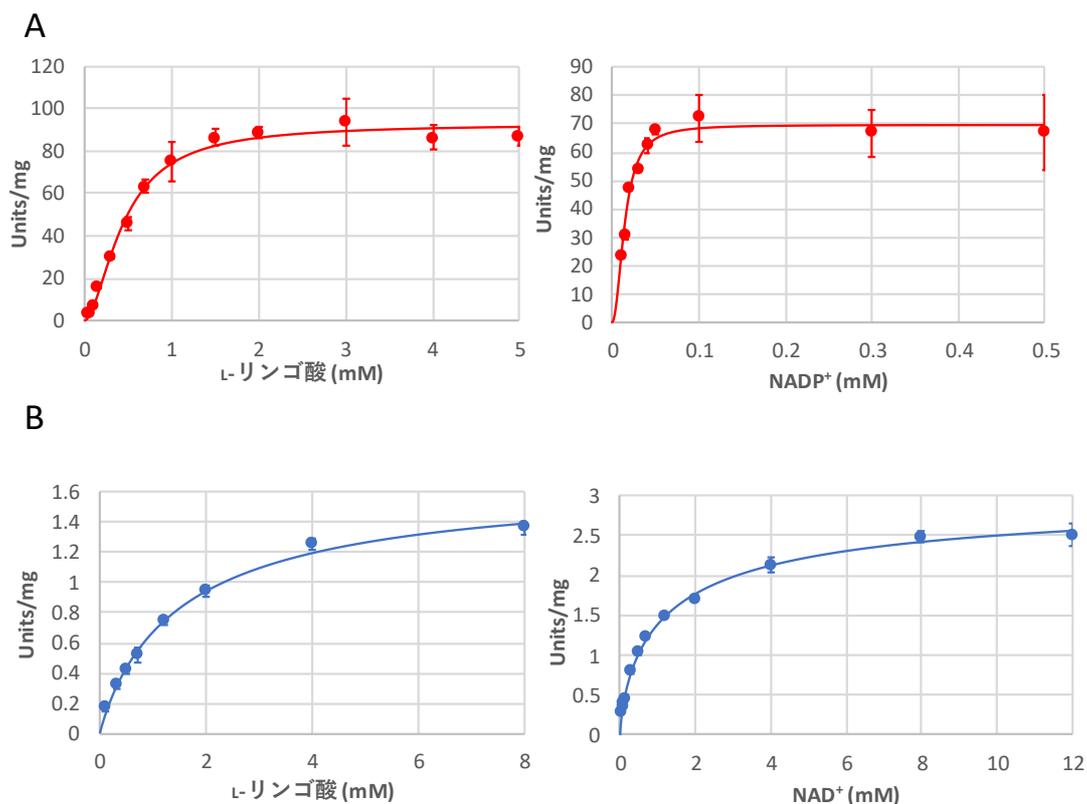
1411 最適条件下で SyME のリンゴ酸酸化反応におけるカインेटリックパラメータを求め、同
1412 じく最適条件下で求めた SyMDH のカインेटリックパラメータと比較した (表 4-1)。SyME 同
1413 様、SyMDH もまた、His タグ融合タンパク質として、大腸菌からアフィニティークロマト
1414 グラフィーによって精製した (付録 2)。

1415 SyMDH のリンゴ酸飽和曲線と異なり、SyME のリンゴ酸飽和曲線は、シグモイド型にな
1416 り(図 4-4)、SyME は、リンゴ酸に対して正の協同性を示した ($n_H=1.76$)(表 4-1)。SyME のリ
1417 ンゴ酸に対する $S_{0.5}$ は、SyMDH のリンゴ酸に対する $S_{0.5}$ の約 4 分の 1 だった (表 4-1)。SyME
1418 のリンゴ酸に対する k_{cat} は、SyMDH のリンゴ酸に対する k_{cat} の 77 倍だった (表 4-1)。SyME
1419 のリンゴ酸に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ は、SyMDH のリンゴ酸に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ の 264 倍だった (表 4-
1420 1)。

1421 SyMDH と異なり、SyME は、補酵素として NAD^+ よりも $NADP^+$ を使用したときに、はる
1422 かに高い $k_{cat}/S_{0.5}$ (NAD^+ に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ の 437 倍) を示した (表 4-1)。Synechocystis 6803 の
1423 生体内では、 $NADP^+$ と NAD^+ が、同程度存在する($NADP^+$ 濃度: 0.614 $\mu\text{mol/g-drycell weight}$,
1424 NAD^+ 濃度: 0.514 $\mu\text{mol/g-drycell weight}$) (Dempo et al. 2014)。そこで、SyME の $NADP^+$ に対す
1425 るカインेटリックパラメータを、SyMDH の NAD^+ に対するカインेटリックパラメータと比
1426 較した (表 4-1)。SyMDH の NAD^+ 飽和曲線と異なり、SyME の $NADP^+$ 飽和曲線は、シグモ
1427 イド型になり(図 4-4)、SyME は、 $NADP^+$ に対して正の協同性を示した ($n_H=2.14$) (表 4-1)。
1428 SyME の $NADP^+$ に対する $S_{0.5}$ は、SyMDH の NAD^+ に対する $S_{0.5}$ の約 90 分の 1 だった (表 4-
1429 1)。SyME の $NADP^+$ に対する k_{cat} は、SyMDH の NAD^+ に対する k_{cat} の 31 倍だった (表 4-1)。
1430 SyME の $NADP^+$ に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ は、SyMDH の NAD^+ に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ の 2,673 倍だった (表
1431 4-1)。

1432 また、SyME は、還元反応 (ピルビン酸→リンゴ酸) に対しては、活性を示さなかった。
1433 一方、SyMDH は、以前生化学解析を行った GST タグ融合 SyMDH 同様 (Takeya et al. 2018)、
1434 酸化反応よりも還元反応 (オキサロ酢酸→リンゴ酸) に対して高い反応特異性を示した
1435 (表 4-1 と 4-2)。SyMDH のオキサロ酢酸に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ は、リンゴ酸に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ の 56
1436 倍だった (表 4-1 と 4-2)。SyMDH の $NADH$ に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ は、 NAD^+ に対する $k_{cat}/S_{0.5}$ の 264
1437 倍だった (表 4-1 と 4-2)。

1438



1439

1440 図 4-4 *SyME* と *SyMDH* のリンゴ酸と補酵素の飽和曲線

1441 (A) *SyME* のリンゴ酸飽和曲線 (左図)と NAD⁺飽和曲線 (右図)。測定は、50°C, pH 8.3 で行

1442 った。L-リンゴ酸と NAD⁺濃度は、それぞれ 3 mM と 0.5 mM で固定した。NH₄Cl と MnCl₂

1443 濃度は、100 mM と 0.5 mM にした。リンゴ酸飽和曲線のカーブフィッティングにおける決

1444 定係数 (R^2) は、0.99219 だった。NAD⁺飽和曲線のカーブフィッティングにおける決定係

1445 数 (R^2) は、0.96929 だった。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。

1446 (B) *SyMDH* のリンゴ酸飽和曲線 (左図)と NAD⁺飽和曲線 (右図)。測定は、最適条件である

1447 50°C, pH 8.0 (Takeya et al. 2018) で行った。L-リンゴ酸と NAD⁺濃度は、それぞれ 4 mM と 8

1448 mM で固定した。リンゴ酸飽和曲線のカーブフィッティングにおける決定係数 (R^2) は、

1449 0.99445 だった。NAD⁺飽和曲線のカーブフィッティングにおける決定係数 (R^2) は、0.99743

1450 だった。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。

1451

1452

1453 表 4-1 リンゴ酸酸化反応における SyME と SyMDH のカイネティックパラメータ

酵素	基質または 補酵素	$S_{0.5}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/S_{0.5}$ ($s^{-1}mM^{-1}$)	n_H
SyME	リンゴ酸	$0.46 \pm 0.06^*$	$77.2 \pm 5.9^{**}$	$169 \pm 10^{**}$	$1.76 \pm 0.25^*$
	NADP ⁺	$0.015 \pm 0.001^*$	$55.7 \pm 3.3^{**}$	$3689 \pm 23^{**}$	$2.14 \pm 0.29^*$
	NAD ⁺	4.89 ± 1.37	40.0 ± 5.4	8.44 ± 1.42	1.45 ± 0.24
SyMDH	リンゴ酸	1.61 ± 0.37	1.0 ± 0.1	0.64 ± 0.09	0.93 ± 0.06
	NAD ⁺	1.34 ± 0.30	1.8 ± 0.1	1.38 ± 0.20	0.72 ± 0.03

1454 SyME のリンゴ酸と NADP⁺の飽和曲線の測定条件は、図 4-4A の説明文に記載した。SyME

1455 の NAD⁺飽和曲線の測定は、SyME の最適条件で行い、リンゴ酸濃度は 3 mM で固定した。

1456 SyMDH のリンゴ酸と NAD⁺の飽和曲線の測定条件は、図 4-4B の説明文に記載した。上記の

1457 カイネティックパラメータは、3 つの独立した飽和曲線から得られた平均値±標準偏差を表

1458 す。アスタリスクは、ウェルチの *t* 検定によって得られた SyME と SyMDH のカイネティッ

1459 クパラメータ間の統計的有意差を表す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。

1460

1461

1462 表 4-2 還元反応における SyMDH のカイネティックパラメータ

酵素	基質または 補酵素	$S_{0.5}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/S_{0.5}$ ($s^{-1}mM^{-1}$)	n_H
SyMDH	オキサロ酢酸	0.11 ± 0.002	3.95 ± 0.04	36 ± 1	1.71 ± 0.07
	NADH	0.018 ± 0.002	6.57 ± 0.52	364 ± 19	1.75 ± 0.27

1463 測定は、最適条件である 50°C, pH 8.0 で行った。オキサロ酢酸と NADH 濃度は、それぞれ

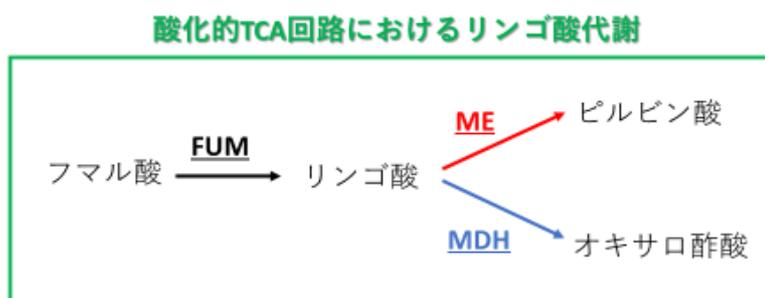
1464 0.5 mM と 0.1 mM で固定した。上記のカイネティックパラメータは、3 つの独立した飽和曲

1465 線から得られた平均値±標準偏差を表す。

1466

1467 4-3-3 *Synechocystis* 6803 由来 FUM (SyFUM) とのカップリング反応の解析

1468 高等植物の TCA 回路において、隣接する酵素間の相互作用は、基質を次の酵素に受け渡
1469 し、効率的に連続した酵素反応を進める上で重要である (基質チャネリング) (Zhang et al.
1470 2017)。酸化 TCA 回路において、リンゴ酸は、フマラーゼ (FUM) が触媒する反応によっ
1471 て、フマル酸から生成する (図 4-5)。
1472



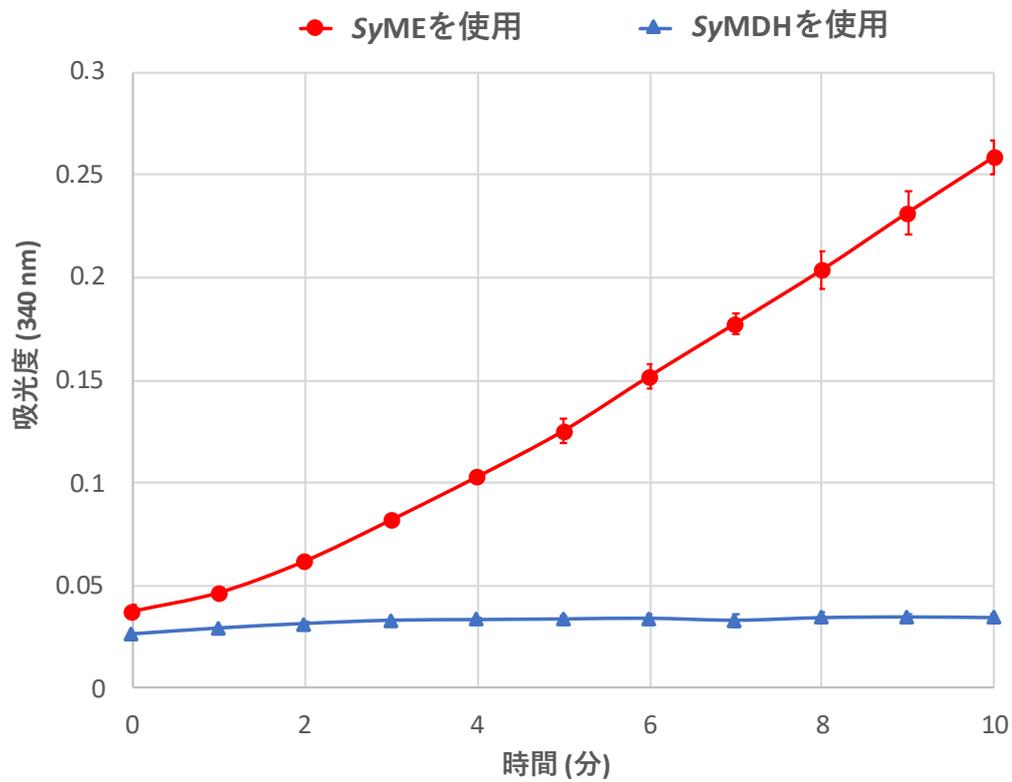
1473
1474 図 4-5 酸化的 TCA 回路におけるリンゴ酸代謝のモデル図

1475

1476

1477 *Synechocystis* 6803 の FUM (SyFUM) とリンゴ酸酸化酵素 (SyME と SyMDH) との間の相互
1478 作用の影響を明らかにするために、精製した SyFUM と、SyME もしくは SyMDH を用いて
1479 *in vitro* でリンゴ酸代謝を再構成し、カップリング反応 (連続した酵素反応) の解析を行った
1480 (図 4-6)。SyFUM は、His タグ融合タンパク質として、大腸菌からアフィニティークロマト
1481 グラフィーによって精製した (付録 2)。フマル酸を出発基質として反応液に加えた後、連続
1482 した反応の最終産物である NAD(P)H の生成を、340 nm の光を照射したときの吸光度の変
1483 化として観察した (図 4-6)。SyME をリンゴ酸酸化酵素として使用したときは、時間の経過
1484 とともに吸光度が上昇し、SyFUM との連続した酵素反応は持続的に進行した (図 4-6)。一
1485 方、SyMDH をリンゴ酸酸化酵素として使用したときは、反応を開始してすぐに吸光度が頭
1486 打ちになり、SyFUM との連続した酵素反応はほとんど進行しなかった (図 4-6)。

1487



1488

1489 図 4-6 SyFUM とのカップリング反応の解析結果

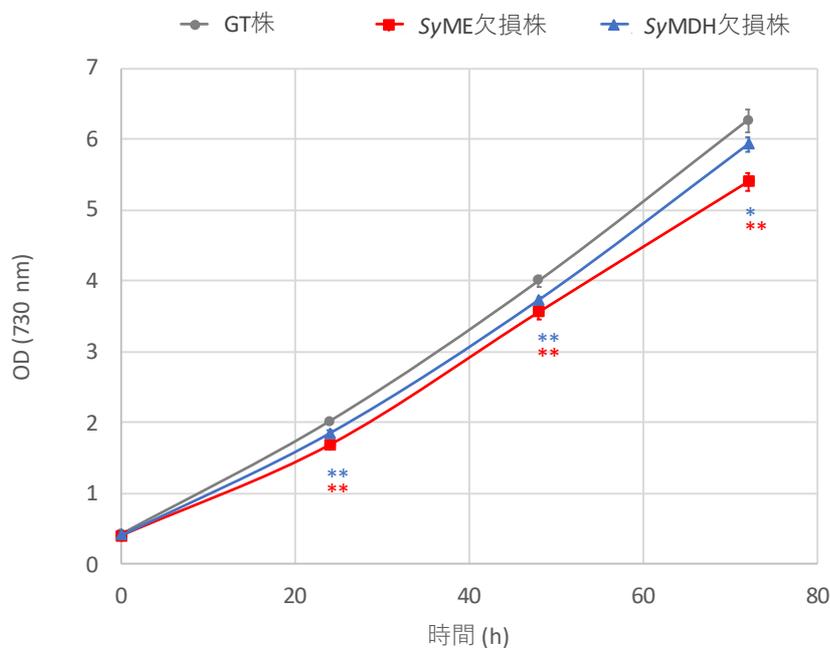
1490 平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。

1491

1492 4-3-4 好気条件下における SyME 欠損株と SyMDH 欠損株のリンゴ酸量の比較

1493 大腸菌によって発現させた精製タンパク質を用いて行った上記の *in vitro* の解析は、
1494 *Synechocystis* 6803 の生体内における酵素の発現量や修飾などの影響を反映しておらず、生
1495 体内における SyME と SyMDH の機能的差異を明らかにする上で十分ではない。そこで、次
1496 に、SyME と SyMDH それぞれを欠損させたシネコシスティスの変異株を作製し (付録 4)、
1497 各変異株の好気条件下におけるリンゴ酸量を調べた。SyME 欠損株と SyMDH 欠損株の増殖
1498 速度はともに、GT 株 (野生株) の増殖速度よりも低かった (図 4-7)。培養 3 日後の SyME 欠
1499 損株のリンゴ酸量は、GT 株のリンゴ酸量の約 3 倍だった (図 4-8A)。一方、SyMDH 欠損株
1500 のリンゴ酸量は、GT 株のリンゴ酸量と同程度だった (図 4-8A)。

1501



1502

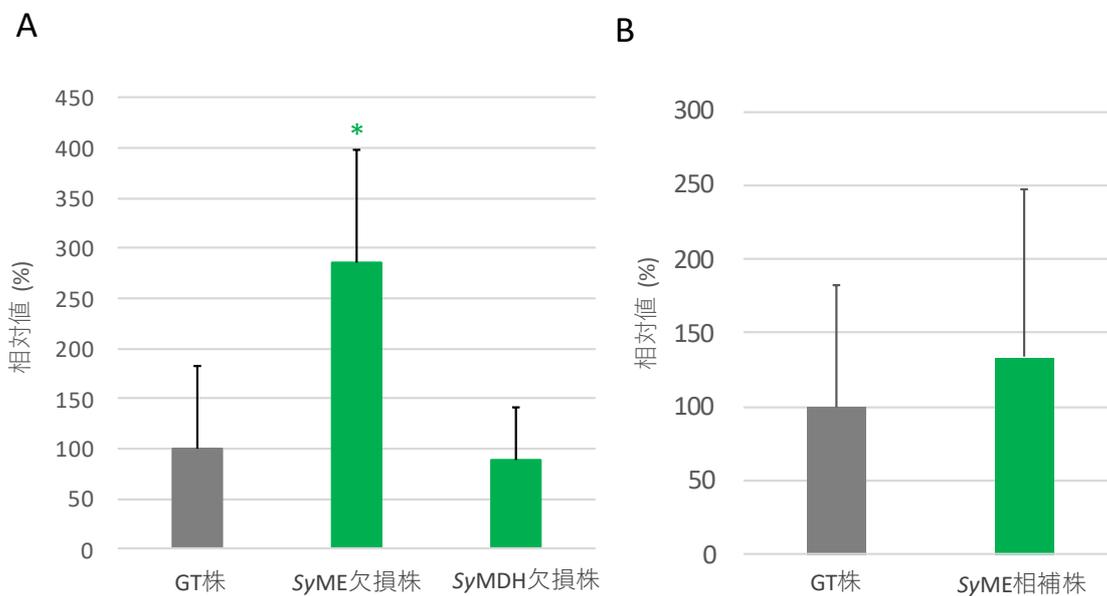
1503 図 4-7 好気条件下における GT 株、SyME 株、SyMDH 株の増殖曲線

1504 平均値±標準偏差は、4 回の独立した実験によって得られた。アスタリスクは、ウェルチの
1505 *t* 検定によって得られた GT 株と変異株の OD₇₃₀ の間の統計的有意差を表す (**P* < 0.05, ***P*
1506 < 0.005)。

1507

1508

1509



1510

1511 図 4-8 好気条件下におけるリンゴ酸量の比較

1512 (A) GT 株、SyME 欠損株、SyMDH 欠損株のリンゴ酸量。変異株のリンゴ酸量は、GT 株にお
 1513 けるリンゴ酸量を 100%としたときの相対値で表した。平均値±標準偏差は、4 回の独立した
 1514 実験によって得られた。アスタリスクは、ウェルチの *t* 検定によって得られた GT 株と変異
 1515 株のリンゴ酸量との統計的有意差を表す (* $P < 0.05$)。 (B) GT 株と SyME 相補株のリンゴ
 1516 酸量。SyME 相補株のリンゴ酸量は、GT 株におけるリンゴ酸量を 100%としたときの相対値
 1517 で表した。平均値±標準偏差は、3 回の独立した実験によって得られた。統計的有意差の有
 1518 無は、ウェルチの *t* 検定によって確認した。

1519

1520

1521 SyME 欠損株で確認されたリンゴ酸の蓄積が、偶発的に起こった他の変異によるものでは
 1522 ないことを確認するために、SyME 欠損株に再度 SyME を発現させた SyME 相補株を作製し
 1523 (付録 4B)、好気条件下におけるリンゴ酸量を調べた。SyME 相補株のリンゴ酸量は、GT 株
 1524 のリンゴ酸量と同程度だった (図 4-8B)。

1525

1526

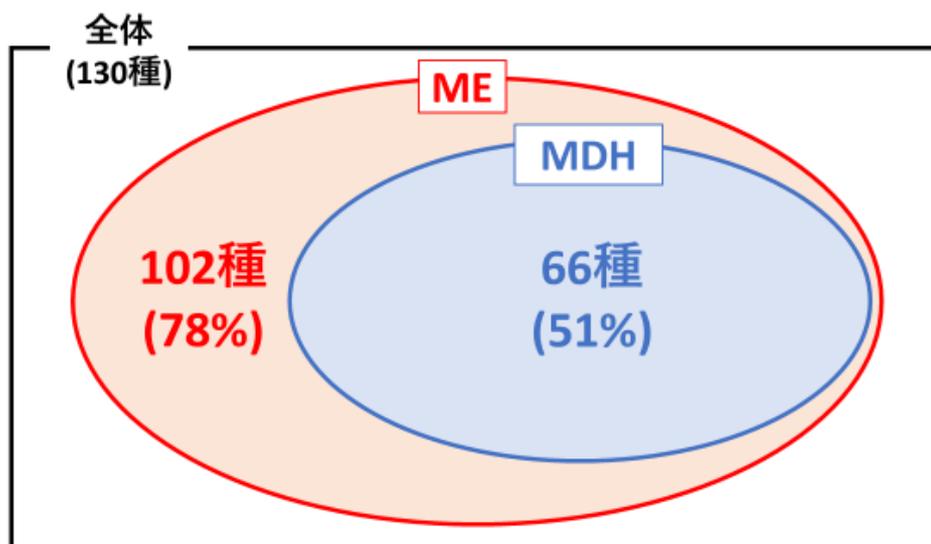
1527

1528 4-3-5 シアノバクテリアの ME と MDH のバイオインフォマティクス解析

1529 最後に、シアノバクテリアの中での ME と MDH の保存パターンを明らかにするために、
1530 2 種類のバイオインフォマティクス解析 (BLAST 解析と系統解析)を行った。

1531 BLAST 解析は、*Sy*ME と *Sy*MDH のアミノ酸配列をクエリ配列とし、全ゲノム配列が決定
1532 されているシアノバクテリア 130 種に対して行われた (付録 5)。BLAST 解析によって、全
1533 ゲノム配列が決定されているシアノバクテリアのうち、ME を有している種が 102 種 (78%)、
1534 MDH を有している種が 66 種 (51%) 存在することが判明した (図 4-9)。さらに、ME と
1535 MDH の両方を有している種も 66 種 (51%) 存在しており、MDH の方だけを有している種
1536 が存在しないことも判明した (図 4-9)。*Prochlorococcus* 属などの ME を持たない種 (付録 5)
1537 の多くは、リンゴ酸-キノン酸化還元酵素 (EC: 1.1.5.4) というキノンを電子伝達体としてリ
1538 ンゴ酸酸化反応を触媒する酵素を持つ。

1539



1540

1541 図 4-9 シアノバクテリアの ME と MDH の BLAST 解析結果のまとめ (ベン図)

1542 付録 5 の BLAST 解析結果をもとに作成した。

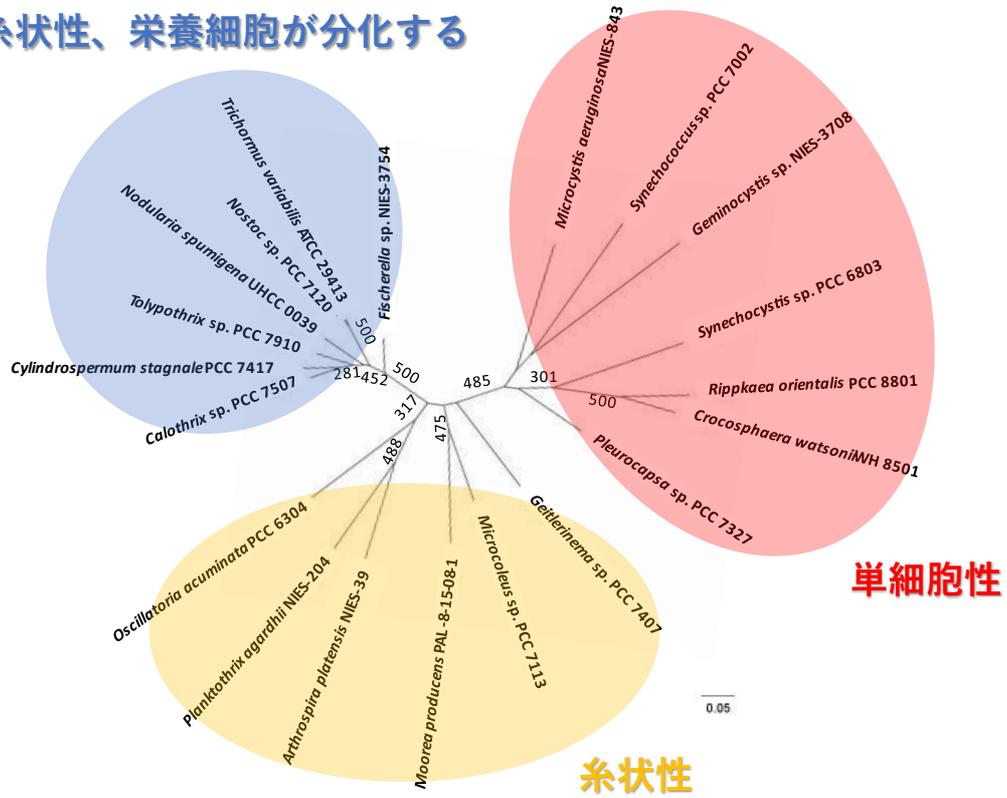
1543

1544

1545 シアノバクテリアは、形態的に、単細胞性と糸状性に分けられ、さらに糸状性のシアノバ
1546 クテリアの中には、栄養細胞が特殊な細胞に分化する種が存在する。シアノバクテリアの
1547 ME の系統解析によって、シアノバクテリアの ME のアミノ酸配列は、形態的な特徴に基づ
1548 いた 3 つのグループごとに高度に保存されていることが判明した (図 4-10)。シアノバクテ
1549 リアの MDH の系統解析によって、シアノバクテリアの MDH のアミノ酸配列もまた、同様

1550 の3つのグループごとに高度に保存されていることが判明した (付録 6)。
 1551

糸状性、栄養細胞が分化する



1552
 1553 図 4-10 シアノバクテリアの ME の最尤系統樹
 1554 ブートストラップ値は、250 (50%) 以上のものを表示した。酵素のアクセッション番号は、
 1555 付録 5 に記した。
 1556

1557 4-4 考察

1558 本研究では、酵素の生化学解析をはじめとする多角的な解析によって、*Synechocystis* 6803
1559 の TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応の触媒機構を調べた。

1560 *SyME* と *SyMDH* のカイネティックパラメータの比較から、*SyMDH* よりも *SyME* の方が、
1561 リンゴ酸酸化反応に対して高い触媒活性を有することが判明した (表 4-1)。放線菌
1562 *Streptomyces coelicolor* (Rodriguez et al. 2012)、サツマイモ *Ipomea Batatas* (Wedding et al. 1976)、
1563 指状糸状虫 *Setaria digitata* (Banu et al. 1992) においても、ME と MDH (真核生物の場合は、
1564 ともにミトコンドリア内のアイソザイム) 間のリンゴ酸に対する $S_{0.5}$ (K_m) の比較が、行われ
1565 ている。これら 3 種の生物では、ME よりも MDH の方が、リンゴ酸に対してはるかに高い
1566 親和性 (ME の 5-109 倍) を示す (Rodriguez et al. 2012; Wedding et al. 1976; Banu et al. 1992)。
1567 対照的に、*Synechocystis* 6803 では、MDH よりも ME の方が、リンゴ酸に対して高い親和性
1568 を示すことが判明した (表 4-1)。生体内のリンゴ酸の絶対濃度 (モル濃度) は、シアノバク
1569 テリアでは報告されていないが、*E.coli* では報告されている (Bennett et al. 2009)。*SyME* の
1570 リンゴ酸に対する $S_{0.5}$ (0.46 mM) (表 4-1) は、*E.coli* の生体内のリンゴ酸濃度 (1.7 mM) (Bennett
1571 et al. 2009) よりもはるかに低い。一方、*SyMDH* のリンゴ酸に対する $S_{0.5}$ (1.61 mM) (表 4-1)
1572 は、*E.coli* の生体内のリンゴ酸濃度と同程度である。そのため、*SyME* と *SyMDH* のリンゴ
1573 酸に対する親和性の差は、生体内における各酵素の活性に大きな差をもたらすと考えられ
1574 る。*SyMDH* と異なり、*SyME* は、*Synechocystis* 6803 の TCA 回路において NAD(P)H の生成
1575 反応を触媒する他の 2 つの酵素 (*SyICD* と *SySSADH*) 同様、NADP⁺ を補酵素として特異的
1576 に利用した (表 4-1) (Takeya et al. 2018; Muro-Pastor and Florencio, 1992 ; Ito and Osanai, 2020)。
1577 *SyME* は、*SyMDH* よりも、補酵素に対してはるかに高い親和性を示した (表 4-1)。
1578 *Synechocystis* 6803 の生体内の NADP⁺ 濃度は、NAD⁺ 濃度と同程度である (Dempo et al. 2014)。
1579 そのため、*SyME* と *SyMDH* の補酵素に対する親和性の差もまた、生体内における各酵素の
1580 活性に大きな差をもたらすと考えられる。高等植物 (*Nicotiana tabacum*, *Zea mays*, *Arabidopsis*
1581 *thaliana*) の ME は、酸化反応だけではなく、還元反応 (ピルビン酸→リンゴ酸) に対しても
1582 活性を示す (ピルビン酸に対する K_m : 0.5-5.0 mM) (Müller et al. 2008; Ziegler, 1974; Gerrard
1583 Wheeler et al. 2009)。*SyME* は、還元反応に対して活性を示さず、*SyMDH* と対照的に、酸化
1584 反応を特異的に触媒する酵素であることが判明した (表 4-1, 4-2)。また、高等植物では、TCA
1585 回路酵素が複合体 (メタボロン) を形成し、隣接する酵素間で基質チャネリングが行われて
1586 いると考えられている (Zhang et al. 2017)。*SyFUM* と *SyMDH* との連続した酵素反応が進行
1587 しなかったことから、*SyFUM* と *SyMDH* 間のリンゴ酸のチャネリングは、行われていない
1588 と考えられる (図 4-6)。以上から、*SyMDH* ではなく、*SyME* が、TCA 回路のリンゴ酸酸化
1589 反応の触媒に適した性質を有しているといえる (表 4-3)。

1590

1591 表 4-3 SyME と SyMDH の生化学的性質のまとめ

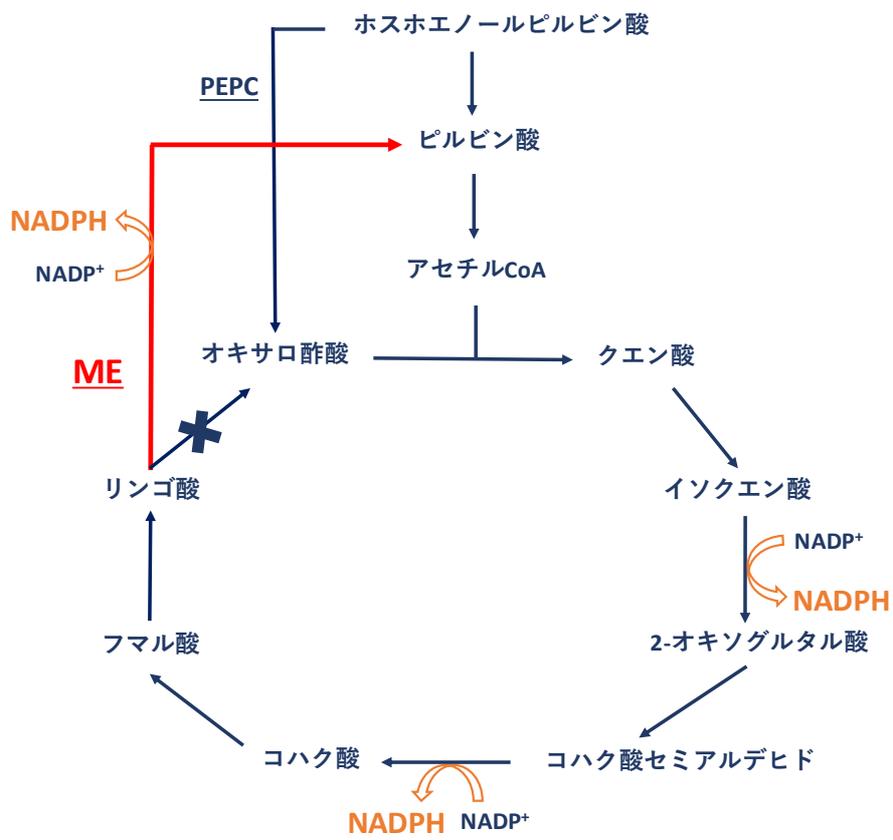
	SyME	SyMDH
リンゴ酸酸化反応に対する触媒活性	高い	低い
補酵素特異性	NADP ⁺	NAD ⁺
反応特異性	酸化反応	還元反応

1592

1593

1594 好気条件下において、SyMDH の欠損は、生体内のリンゴ酸量に影響を及ぼさないのに対
1595 し、SyME の欠損は、生体内のリンゴ酸量を増加させた (図 4-8A)。こちらの培養条件下で
1596 は、SyMDH ではなく、SyME が、リンゴ酸を消費する酸化反応を触媒していると考えられ
1597 る。好気条件下において、SyMDH の過剰発現は、*Synechocystis* 6803 の生体内のリンゴ酸量
1598 を増加させることが報告されている (Iijima et al. 2021)。また、*Synechocystis* 6803 では、これ
1599 まで 5 つの栄養条件 (光独立栄養条件、混合栄養条件、光従属栄養条件、窒素制限条件、暗
1600 従属栄養条件) 下で、炭素の安定同位体を用いた代謝フラックス解析が行われている
1601 (Young et al. 2011; Nakajima et al. 2014; You et al. 2015; Nakajima et al. 2017; Wan et al. 2017)。上
1602 記の 5 つの培養条件全てにおいて、リンゴ酸とピルビン酸間の反応は、時計回り (酸化方向)
1603 に進行している (Young et al. 2011; Nakajima et al. 2014; You et al. 2015; Nakajima et al. 2017;
1604 Wan et al. 2017)。一方、上記の 5 つの培養条件全てにおいて、リンゴ酸とオキサロ酢酸間の
1605 反応は、確認された TCA 回路の反応の中で唯一、反時計回り (還元方向) に進行している
1606 (Young et al. 2011; Nakajima et al. 2014; You et al. 2015; Nakajima et al. 2017; Wan et al. 2017)。こ
1607 れらの *in vivo* 解析の結果は、本研究で明らかにした SyME と SyMDH の生化学的性質の差
1608 異 (表 4-3) をよく反映しており、各酵素の生化学的性質が、生体内で各酵素が触媒する反
1609 応を決定していることを強く示唆している。したがって、*Synechocystis* 6803 では、MDH で
1610 はなく、ME が、TCA 回路におけるリンゴ酸酸化反応を触媒しており、ME 型 TCA 回路が
1611 機能していると考えられる (図 4-11)。この ME 型 TCA 回路では、オキサロ酢酸は、全ての
1612 光独立栄養生物に保存されている PEPC が触媒する反応によって、ホスホエノールピルビ
1613 ン酸から生成する (図 4-11)。

1614



1615
 1616 図 4-11 *Synechocystis* 6803 の ME 型 TCA 回路のモデル図
 1617

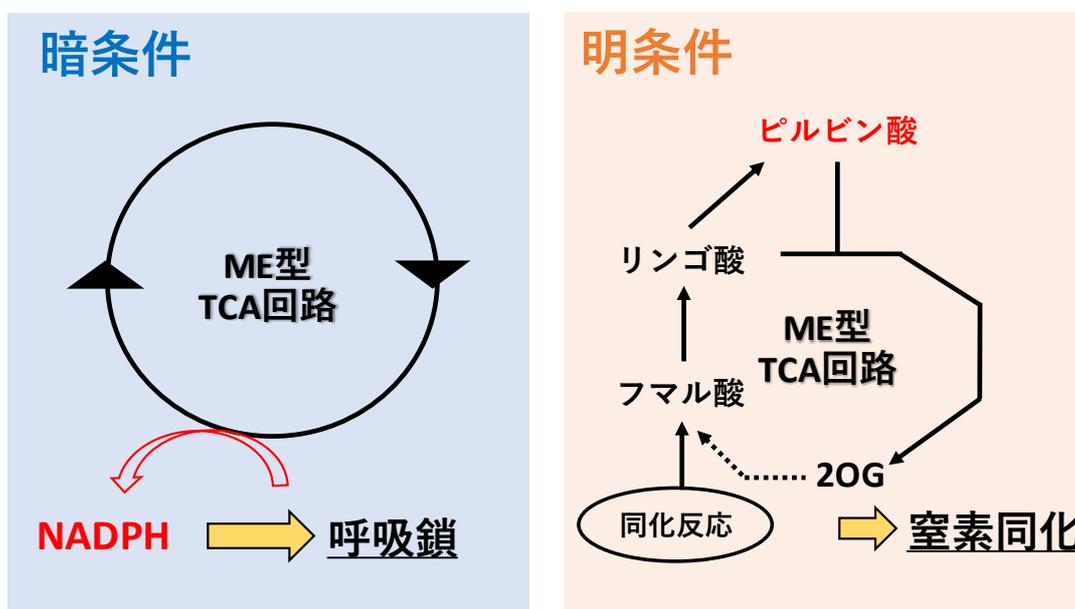
1618
 1619 シアノバクテリアの ME と MDH の BLAST 解析の結果は、MDH よりも ME の方が、シ
 1620 アノバクテリア全体で高度に保存されており、生命活動において重要であることを示唆し
 1621 ている (図 4-9)。16sRNA の系統解析 (Honda et al. 1999) から、現存するシアノバクテリア
 1622 の中で最も原始的であると考えられている *Gloeobacter violaceus* は、ME と MDH の両方を
 1623 持っている (付録 5)。そのため、シアノバクテリアの進化の中で、元々保存されていた MDH
 1624 が淘汰されていったと考えられる。また、シアノバクテリアの ME と MDH の系統解析の結
 1625 果は、ME と MDH の生化学的性質が、シアノバクテリアの形態的な特徴に基づいた 3 つの
 1626 グループごとに高度に保存されていることを示唆している (図 4-10 と付録 6)。シアノバク
 1627 テリアの PEPC と 6PGDH では、系統的に離れた酵素間で、阻害剤に対する感受性などの一
 1628 部の性質が異なっていた (Takeya et al. 2017; Ito and Osanai, 2018)。そのため、今後、SyME と
 1629 SyMDH とは異なるグループに属するシアノバクテリアの ME と MDH の生化学解析も行う
 1630 ことで、「シアノバクテリアで広く、ME が TCA 回路のリンゴ酸酸化反応を触媒している」
 1631 ことを、より明確にすることができると考えられる。

1632 ME 型 TCA 回路では、3 分子の NADH の代わりに、3 分子の NADPH が生成する(図 4-

1633 11)。シアノバクテリアでは、呼吸鎖と光合成電子伝達系がともに、チラコイド膜上に存在
1634 する (Omata and Murata, 1984; Mullineaux, 2014)。そのため、これら 2 つの電子伝達系は、プ
1635 ラストキノンやシトクロム *b₆f* 複合体などの構成要素を共有している (Peschek et al. 2004;
1636 Lea-Smith et al. 2013)。酸化的リン酸化だけでなく、光合成のサイクリック電子伝達にも関与
1637 するシアノバクテリアの NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (複合体 I) は、NAD(P)H の結合部位
1638 を持たず、還元型のフェレドキシンから電子を受け取る (Schuller et al. 2019)。シアノバクテ
1639 リアのフェレドキシン-NADP⁺レダクターゼは、窒素固定型のシアノバクテリア *Anabaena*
1640 PCC7119 の酵素が生化学解析されており、NADH ではなく、NADPH を補酵素として特異的
1641 に利用する (Medina et al. 2001)。光合成が行われない暗条件下で、複合体 I のサブユニット
1642 を欠損した *Synechocystis* 6803 の変異株は、野生株と比べて NADPH を多く蓄積する (Mi et
1643 al. 2000; Ogawa et al. 2021)。これらの研究報告から、シアノバクテリアの呼吸鎖では、NADH
1644 ではなく NADPH が、電子伝達体として使用されていると考えられている。この「呼吸鎖の
1645 電子伝達体が NADPH である」という過去の研究報告は、「シアノバクテリアの酸化的 TCA
1646 回路が NADPH の生成経路である」という本研究の結果と整合性がある (図 4-12)。暗条件
1647 下では、糖異化の上流の OPP 経路も、NADPH の生成経路として機能する (Wan et al. 2017)。
1648 暗従属栄養条件下において、SyME の欠損株は、OPP 経路の Sy6PGDH の欠損株同様、ほと
1649 んど増殖しない (Wan et al. 2017)。この結果もまた、暗条件下における NADPH 生成経路と
1650 しての ME 型 TCA 回路の重要性を強調している。第 2 章における解析から、*Synechocystis*
1651 6803 の OPP 経路の 2 つのデヒドロゲナーゼは、NADPH の過剰生成を避けるために、TCA
1652 回路のクエン酸によって強く阻害されることが判明した (Ito and Osanai, 2020)。そのため、
1653 生体内でクエン酸が蓄積し、OPP 経路酵素の活性が低下したときに、ME 型 TCA 回路によ
1654 る NADPH の生成が活発になると予想される。

1655 ME 型 TCA 回路では、リンゴ酸が、オキサロ酢酸ではなくピルビン酸に変換される (図
1656 4-11)。細胞小器官を持たず、光合成と呼吸が同じ細胞質で行われるシアノバクテリアでは、
1657 ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸を生成する反応を触媒するピルビン酸キナーゼ
1658 (PK) が、光合成の明反応によって多量に生成する ATP によって阻害される (Knowles et al.
1659 2001; Haghghi, 2021)。*Synechocystis* 6803 における代謝フラックス解析は、暗従属栄養条件
1660 と対照的に、光独立栄養条件下では、PK が触媒する反応を通るフラックスよりも、PEPC が
1661 触媒する反応 (ホスホエノールピルビン酸→オキサロ酢酸) を通るフラックスの方が大き
1662 いことを明らかにした (Wan et al. 2017; Young et al. 2011)。光独立栄養条件下において、SyME
1663 をコードする遺伝子にトランスポゾン挿入変異を持つ変異株は、GT 株と比べて低い増殖速
1664 度を示すが、その増殖速度は、ピルビン酸の添加によって回復する (Bricker et al. 2004)。し
1665 たがって、PK の活性が低い明条件下では、ME は、ピルビン酸の生成において重要である

1666 と考えられる。十分な光強度の明条件下では、光合成の明反応により過剰の NADPH が生成
 1667 され、シアノバクテリアの光合成効率とバイオマス生産量が低下する (Zhou et al. 2016)。そ
 1668 のため、光合成が行われる明条件下で、ME 型 TCA 回路は、NADPH を生成するためのサイ
 1669 クルとしてではなく、主に光合成と共役して行われる窒素同化の一部として機能している
 1670 と考えられる (図 4-12)。 *Synechocystis* 6803 において、明条件下におけるフマル酸の供給は、
 1671 主にプリン代謝や尿素代謝といった同化反応から行われていると予測されている (Du et al.
 1672 2019) (図 4-12)。
 1673



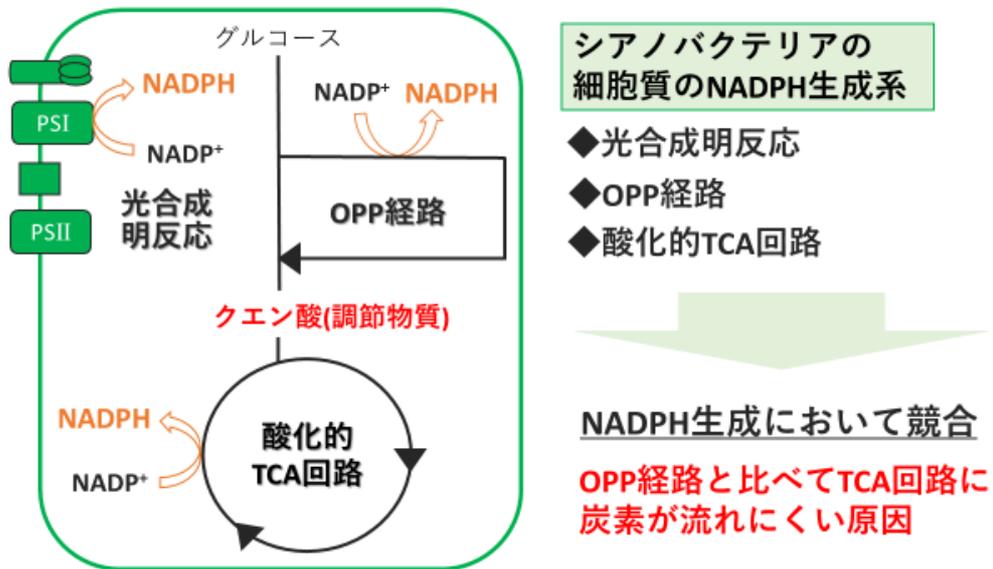
1674
 1675 図 4-12 暗条件と明条件における ME 型 TCA 回路の生理的役割

1676
 1677
 1678 本章では、 *Synechocystis* 6803 の TCA 回路のリンゴ酸酸化反応を解明し、酸化的 TCA 回
 1679 路の全体像を明らかにした。シアノバクテリアの酸化的 TCA 回路が、シアノバクテリア独
 1680 自の生体内環境に適応した機能を持っていることが示唆された。この発見は、生物の TCA
 1681 回路を構成する酵素や TCA 回路の機能に多様性があることを示唆し、ゲノム解析結果に基
 1682 づいた代謝マップの作成が、長年にわたってミスリードを招く危険性があることを示して
 1683 いる。

1685 第5章 総括

1686 5-1 本研究の結論

1687 本研究における解析によって、シアノバクテリアの OPP 経路と酸化的 TCA 回路が共に
1688 NADPH の生成経路であることが判明した (図 5-1)。呼吸と光合成が同じ細胞質で行われる
1689 シアノバクテリアでは、OPP 経路と酸化的 TCA 回路に加えて、光合成の明反応もまた、細
1690 胞質における NADPH の生成系として存在している (図 5-1)。これらの NADPH の生成系が
1691 亢進することで、生体内では NADPH/NADP⁺の比率が向上する。NAD⁺キナーゼという酵素
1692 を欠損させた *Synechocystis* 6803 の変異株では、NADPH/NADP⁺ が、野生株と比べて 6-14 倍
1693 に向上する (Ishikawa et al. 2019)。この変異株は、野生株と比べて著しい増殖の遅滞をもた
1694 らず (Ishikawa et al. 2019)。また、光合成の明反応が亢進する強光条件下において、NADPH
1695 を消費する代謝経路の導入は、*Synechocystis* 6803 の光合成効率を向上させ、バイオマス生
1696 産量を改善する (Zhou et al. 2016)。これらの過去の研究報告は、シアノバクテリアの生体内
1697 の NADPH/NADP⁺の過度の上昇が、シアノバクテリアの細胞増殖における阻害要因になる
1698 ことを強く示唆している。第2章における解析によって、クエン酸という OPP 経路と酸化的
1699 TCA 回路のフラックスをそれぞれ負と正に制御する因子が見つかったことから、これ
1700 ら3つの NADPH の生成系が同時に機能すると、生体内における NADPH/NADP⁺のバラン
1701 スが崩壊すると予想される。すなわち、これら3つの NADPH の生成系は、「競合関係」に
1702 あり、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主な生化学
1703 的要因であると結論付けた。明条件下では主に光合成明反応、暗条件下では OPP 経路か
1704 ら NADPH が生成する。そして、暗条件下でクエン酸が蓄積し、OPP 経路酵素の活性が低下
1705 したときに、酸化的 TCA 回路からの NADPH の生成が亢進すると考えられる。酸化的 TCA
1706 回路に炭素が流れにくいことが、酸化的 TCA 回路を利用した有用物質生産の障害となっ
1707 ていたが、この NADPH 生成の競合を取り除くことで、酸化的 TCA 回路のフラックスが増大
1708 すると期待される。



「シアノバクテリアの細胞質におけるNADPH生成」

1709

1710 図 5-1 OPP 経路と TCA 回路のフラックスを決める生化学的要因

1711

1712

1713 卷末付録

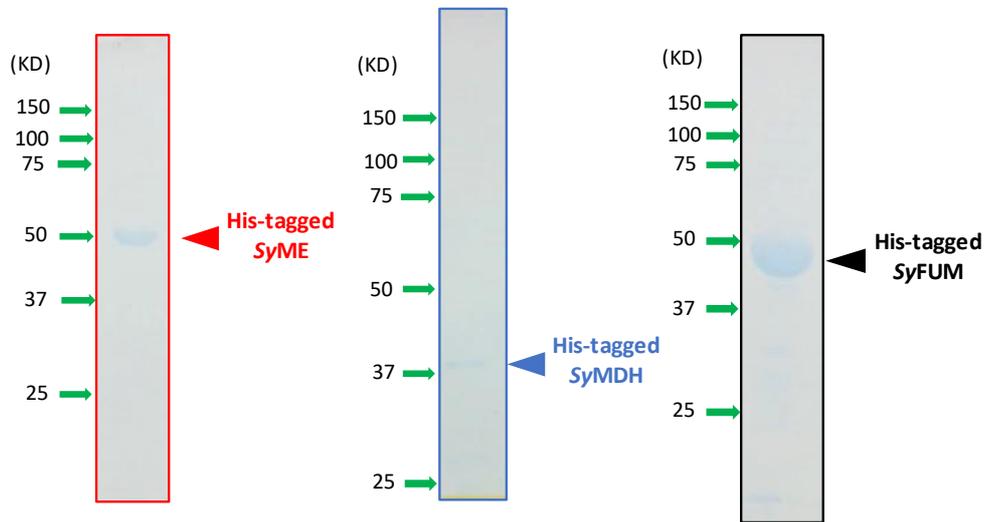
1714

1715 付録1 改変 BG11 液体培地の組成

NaNO ₃	150 mg
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	4 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.5 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.6 mg
Citric acid	0.6 mg
Ferric ammonium citrate	0.6 mg
Na ₂ EDTA-Mg	0.1 mg
Na ₂ CO ₃	2 mg
Trace metal mix A ₅ + Co	0.1 ml
1 M HEPES-KOH (pH 7.8)	2 ml
Distilled water	97.9 ml
	/100 ml
Trace metal mix A₅ + Co	
H ₃ BO ₃	286 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	181 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.2 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	39 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	7.9 mg
Co (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	4.9 mg
Distilled water	100 ml

1716

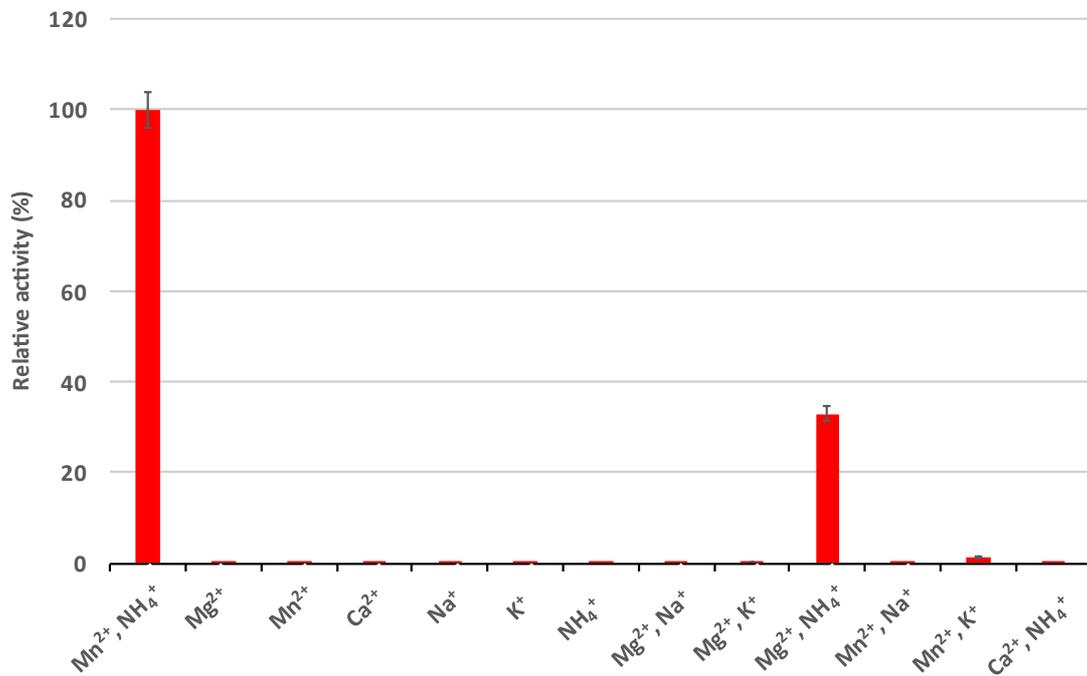
1717



1718

1719 付録2 精製後の His タグ融合タンパク質の SDS-PAGE 結果

1720



1721

1722 付録3 SyME 活性に対する一価と二価の陽イオンの影響

1723 測定は、30°C, pH 8.0 で行った。L-リンゴ酸と NADP⁺濃度は、それぞれ 2 mM と 0.5 mM に

1724 した。一価と二価の陽イオンの濃度は、それぞれ 50 mM と 1 mM にした。使用した一価と

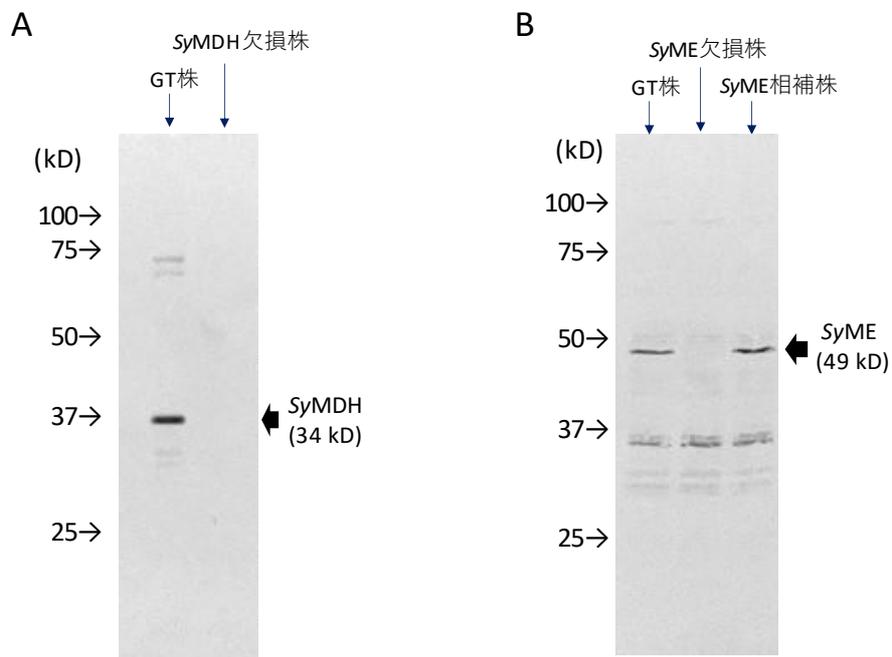
1725 二価の陽イオンは、全て塩化物である。SyME 活性は、Mn²⁺と NH₄⁺存在下における活性を

1726 100%としたときの相対活性で表した。平均値±標準偏差は、3回の独立した実験によって得

1727 られた。

1728

1729



1730

1731 付録4 ウェスタンブロットティングの結果

1732 (A) *SyMDH* 欠損株の *SyMDH* 発現量。SDS-PAGE では、6 μ g のタンパク質をアプライした。

1733 一次抗体と二次抗体の希釈倍率はともに、20000 倍にした。(B) *SyME* 欠損株と *SyME* 相補

1734 株の *SyME* 発現量。SDS-PAGE では、20 μ g のタンパク質をアプライした。一次抗体と二次

1735 抗体の希釈倍率は、それぞれ 4000 倍と 20000 倍にした。

1736

1737

1738

1739 付録5 シアノバクテリアのMEとMDHのBLAST解析結果

生物種名	M E	M D H	MEの アクセ ッション 番号	ME のE- value	MDHの アクセ ッション 番号	MDH のE- value	MDHとLDHを識別するア ミノ酸残基 (位置は <i>E.coli</i> の MDHに準拠)				
							12	81	85	210	214
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655					NP_417703		I→V (LDH)	R→Q (LDH)	M→E (LDH)	G→A (LDH)	V→I (LDH)
<i>Acaryochloris marina</i>	+	+	ABW28889	0	ABW27151/ABW29992	6E-137/2E-33	V/V	R/P	M/Q	G/A	V/F
<i>Anabaena cylindrica</i>	+		AFZ56527	0							
<i>Anabaena</i> sp. 90	+		AFW95584	0							
<i>Anabaena</i> sp. WA102	+		ALB41023	0							
<i>Anabaena</i> sp. YBS01	+	+	QFZ15624	0	QFZ12649	1E-138	V	R	M	G	V
<i>Arthrospira platensis</i>	+	+	BAI88015	0	BAI92946	5E-137	V	R	M	G	V
<i>Calothrix</i> sp. 336/3	+	+	AKG22572	0	AKG23096	5E-147	V	R	M	G	V
<i>Calothrix</i> sp. PCC 6303	+		AFZ04053	0							
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7507	+	+	AFY32837	0	AFY32641	1E-146	V	R	M	G	V
<i>Candidatus Atelocyanobacterium thalassa</i>											

<i>Candidatus Melainabacteria bacterium MEL.A1</i>											
<i>Chamaesiphon minutus</i>	+		AFY95 806	0							
<i>Chondrocystis sp. NIES- 4102</i>	+		BAZ46 539	0							
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	+	+	AFY88 167/A FY874 84	0/0							
<i>Crinalium epipsammum</i>					AFZ138 27	4E- 40	V	Q	E	A	I
<i>Crocospaera subtropica</i>	+	+	ACB5 2594/A CB537 04	0/9E- 104	ACB512 00/ACB 54533	5E- 143/2 E-46	V/V	R/Q	I/E	G/A	V/I
<i>Crocospaera watsonii</i>	+	+	EAM5 1289	0	EAM52 233	2E- 143	V	R	I	G	V
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	+		AFZ54 646	0	AFZ539 18	2E- 38	V	Q	E	A	I
<i>Cyanobacterium endosymbiont of Epithemia turgida</i>	+		BAP17 186	0							
<i>Cyanobacterium endosymbiont</i>	+		BBA7 8875	0							

<i>of Rhopalodia gibberula</i>											
<i>Cyanobacterium</i> sp. HL-69	+	+	AUC6 1422	0	AUC600 95/AUC 61299	8E- 147/2 E-38	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Cyanobacterium stanieri</i>	+	+	AFZ47 161	0	AFZ463 77/AFZ4 7136	1E- 144/1 E-39	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Cyanobium gracile</i>	+		AFY30 484	##### ##	AFY282 09	4E- 38	V	Q	Q	A	I
<i>Cyanobium</i> sp. NIES-981	+		SBO42 223	1E- 10							
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	+		ACL42 945	0							
<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	+		QNP29 098	0							
<i>Cylindrospermum stagnale</i>	+	+	AFZ27 687	0	AFZ269 95	6E- 137	V	R	M	G	V
<i>Dactylococopsis salina</i>	+		AFZ49 864	0							
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	+		QJB45 869	0							
<i>Dolichospermum</i> sp. UHCC 0315A	+		QEI43 486	0							
<i>Euhalothece natronophila</i>	+		QDZ3 9171	0							
<i>Fischerella</i> sp. NIES-3754	+	+	BAU0 6826	0	BAU050 67	3E- 143	V	R	M	G	V

<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7407	+	+	AFY66 223	0	AFY678 47/AFY 65878	6E- 140/3 E-45	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Geminocystis</i> sp. NIES- 3708	+	+	BAQ6 1851	0	BAQ628 33/BAQ 60973	2E- 145/2 E-40	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Geminocystis</i> sp. NIES- 3709	+	+	BAQ6 5903	0	BAQ648 40/BAQ 63873	1E- 143/8 E-41	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Gloeobacter</i> <i>kilaueensis</i>	+		AGY5 7735	0							
<i>Gloeobacter</i> <i>violaceus</i>	+	+	NP_92 5095	0	NP_925 488/NP_ 926270	5E- 113/7 E-47	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Gloeocapsa</i> sp. PCC 7428	+	+	AFZ30 136	0	AFZ290 33/AFZ3 3285	1E- 136/1 E-45	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Gloeotheca</i> <i>citriformis</i>	+	+	ACK6 9645	0	ACK706 00/ACK 72159	5E- 169/6 E-43	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Gloeotheca</i> <i>verrucosa</i>	+	+	ADN1 6119	0	ADN149 59/ADN 16327	1E- 165/8 E-44	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Halomicrone</i> <i>ma</i> <i>hongdechlori</i> <i>s</i>	+	+	ASC71 376	0	ASC699 57	2E- 137	V	R	M	G	V
<i>Halothece</i> sp. PCC 7418	+		AFZ44 813	0	AFZ427 38	6E- 49	V	Q	Q	A	I
<i>Leptolyngbya</i> <i>boryana</i>	+	+	BAS59 531	0	BAS551 36	6E- 145	V	R	M	G	V

<i>Leptolyngbya</i> sp. NIES- 3755	+	+	BAU1 3571	0	BAU120 73	1E- 146	V	R	M	G	V
<i>Leptolyngbya</i> sp. O-77	+	+	BAU4 4542	0	BAU441 71	1E- 146	V	R	M	G	V
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7376	+	+	AFY36 915	0	AFY384 43/AFY 38960	1E- 154/2 E-33	V/V	R/G	M/E	G/A	V/I
<i>Limnospira</i> <i>fusiformis</i>	+	+	QJB28 988	0	QJB265 71	6E- 136	V	R	M	G	V
<i>Microcoleus</i> sp. PCC 7113	+	+	AFZ19 167	0	AFZ195 88/AFZ1 7355	2E- 145/5 E-43	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i>	+	+	BAG0 0608	0	BAG007 76/BAG 00356	9E- 163/5 E-42	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Microcystis</i> <i>panniformis</i>	+		AKV6 5432	0	AKV664 65	2E- 42	V	Q	E	A	I
<i>Microcystis</i> sp. MC19	+	+	AVQ7 3176	0	AVQ739 85/AVQ 73147	1E- 162/8 E-43	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Microcystis</i> <i>viridis</i>	+	+	BBH4 1618	0	BBH417 66/BBH 41405	1E- 161/4 E-42	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Moorea</i> <i>producens</i>	+	+	AOX0 3522	0	AOW99 059	5E- 145	V	R	M	G	V
<i>Nodularia</i> <i>spumigena</i>	+	+	AVZ30 362	0	AVZ303 93/AVZ 30390	2E- 138/1 26	V/ —	R/ —	M/ —	G/ —	V/ —
<i>Nostoc</i> <i>azollae'</i> 0708	+		ADI63 821	0							

<i>Nostoc edaphicum</i>	+	+	QMS89012	0	QMS88757/QMS90063	9E-148/3E-41	V/V	R/Q	M/Q	G/G	V/S
<i>Nostoc flagelliforme</i>	+	+	AUB36562	0	AUB38486/AUB44893	1E-146/2E-41	V/V	R/P	M/Q	G/G	V/S
<i>Nostoc punctiforme</i>	+	+	ACC79754	0	ACC82315/ACC80623	2E-148/3E-38	V/V	R/P	M/Q	G/G	V/F
<i>Nostoc</i> sp. CENA543	+	+	AUT00646	0	AUT02194	5E-145	V	R	M	G	V
<i>Nostoc</i> sp. NIES-3756	+	+	BAT53590	0	BAT51925	4E-136	V	R	M	G	V
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7107	+	+	AFY42583	0	AFY41578	9E-143	V	R	M	G	V
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	+	+	BAB76295	0	BAB76021	1E-127	—	R	M	G	V
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7524	+	+	AFY50454	0	AFY50037	2E-146	V	R	M	G	V
<i>Nostoc sphaeroides</i>	+	+	QFS47860	0	QFS45658/QFS51054/QFS50987	5E-148/4E-40/2E-26	V/V /V	R/P/ P	M/ Q/Q	G/G /—	V/F /—
<i>Nostocales cyanobacterium</i> HT-58-2	+	+	ARV62053	0	ARV62746	1E-146	V	R	M	G	V
<i>Oscillatoria acuminata</i>	+	+	AFY80012	0	AFY84793/AFY84788	2E-137/3E-43	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i>	+	+	AFZ07688	0	AFZ08881	7E-132	V	R	I	G	V

<i>Oxynema</i> sp. AP17	+	+	QIZ72 188	0	QIZ7182 3/QIZ73 290	6E- 141/1 E-43	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Planktothrix</i> <i>agardhii</i>	+	+	BBD5 4111	0	BBD539 95	3E- 137	V	R	M	G	V
<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327	+	+	AFY77 245	0	AFY772 78/AFY 78364	2E- 162/1 E-46	V/V	R/Q	M/ Q	G/A	V/I
<i>Prochlorococ</i> <i>cus marinus</i> AS9601											
<i>Prochlorococ</i> <i>cus marinus</i> MIT 9211											
<i>Prochlorococ</i> <i>cus marinus</i> MIT 9215											
<i>Prochlorococ</i> <i>cus marinus</i> MIT 9301											
<i>Prochlorococ</i> <i>cus marinus</i> MIT 9303											
<i>Prochlorococ</i> <i>cus marinus</i> MIT 9312											
<i>Prochlorococ</i> <i>cus marinus</i> MIT 9313											
<i>Prochlorococ</i> <i>cus marinus</i> MIT 9515											

<i>Prochlorococcus marinus</i> NATL1A											
<i>Prochlorococcus marinus</i> NATL2A											
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i> CCMP1375											
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> CCMP1986											
<i>Prochlorococcus</i> <i>sp.</i> MIT 0604											
<i>Prochlorococcus</i> <i>sp.</i> MIT 0801											
<i>Pseudanabaena</i> <i>sp.</i> ABRG5-3	+	+	BBC23 141	0	BBC251 22	1E- 126	V	R	M	G	V
<i>Pseudanabaena</i> <i>sp.</i> PCC 7367	+	+	AFY71 791	0	AFY685 72/AFY 70884	3E- 129/3 E-42	V/V	R/Q	M/E	G/A	V/I
<i>Rippkaea</i> <i>orientalis</i> PCC 8801	+	+	ACK6 6891/A CK645 44	0/4E- 110	ACK646 13	2E- 159	V	R	L	G	V

<i>Rippkaea orientalis</i> PCC 8802	+	+	ACV0 2041/A CU994 17	0/5E- 110	ACU994 86	2E- 159	V	R	L	G	V
<i>Rivularia</i> sp. PCC 7116	+		AFY54 508	0							
<i>Stanieria cyanosphaera</i>	+		AFZ37 433	0	AFZ381 14	2E- 44	V	Q	E	A	I
<i>Stanieria</i> sp. NIES-3757	+		BAU6 3731	0							
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC6301	+		BAD7 8446	0							
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942	+		ABB5 7327	0							
<i>Synechococcus lividus</i>	+	+	ATS19 042	0	ATS187 63	1E- 118	V	R	M	G	V
<i>Synechococcus</i> sp. CB0101	+		QCH1 6091	7E- 16							
<i>Synechococcus</i> sp. CC9311											
<i>Synechococcus</i> sp. CC9605											
<i>Synechococcus</i> sp. CC9902											
<i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a(2-13)	+		ABD0 1601	0	ABD031 11	4E- 50	V	Q	E	A	I
<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	+		ABC9 8875	0	ABD007 82	3E- 50	V	Q	E	A	I

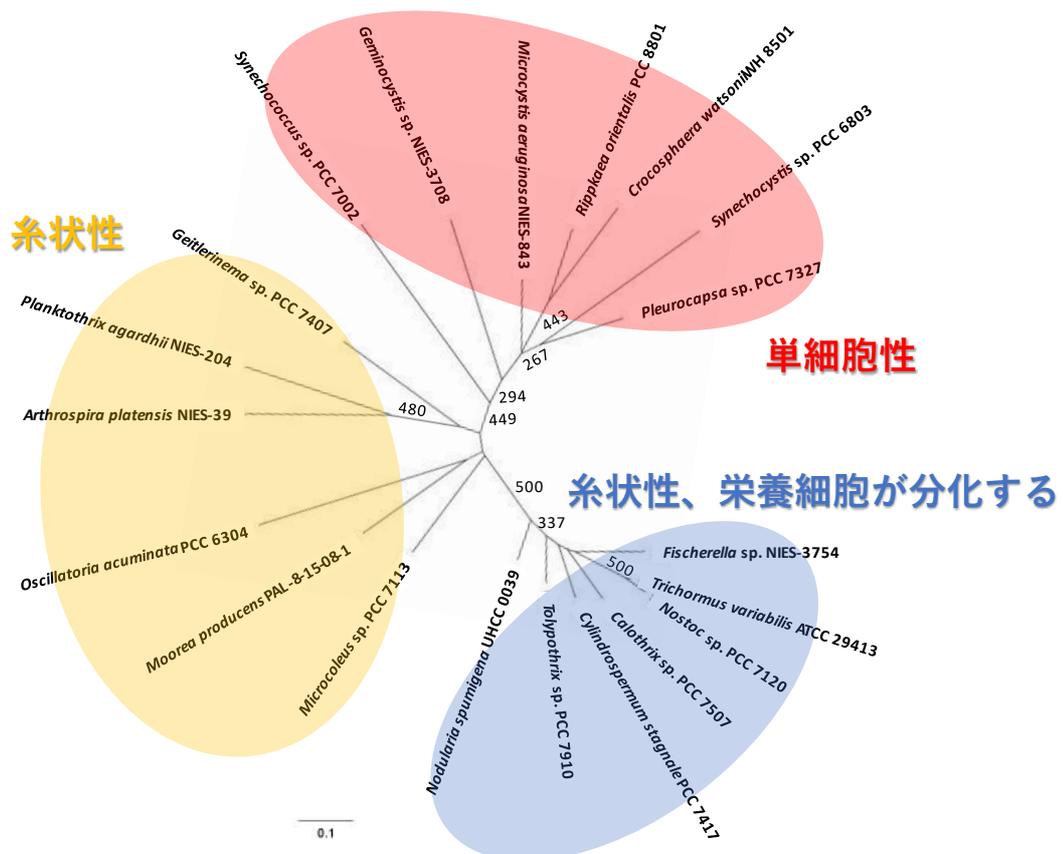
<i>Synechococcus</i> sp. KORDI-100											
<i>Synechococcus</i> sp. KORDI-49											
<i>Synechococcus</i> sp. KORDI-52											
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	+	+	AFY62740	0	AFY59449	5E-110	V	R	M	G	V
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7003	+	+	ANV83320	0	ANV84801	6E-148	V	R	M	G	V
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 73109	+	+	AMA08254	0	AMA09714	8E-148	V	R	M	G	V
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7502	+	+	AFY75356	0	AFY72424	7E-137	V	R	M	G	V
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	+	+	ACA98456	0	ACB00077	7E-149	V	R	M	G	V
<i>Synechococcus</i> sp. RCC307											
<i>Synechococcus</i> sp. UTEX 2973	+		AJD58162	0							
<i>Synechococcus</i> sp. WH 7803											

<i>Synechococcus</i> sp. WH 8103											
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8109											
<i>Synechococcus</i> sp. WH8102											
<i>Synechocystis</i> sp. IPPAS B-1465	+	+	AVP88 294	0	AVP913 58	0	V	R	M	G	A
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	+	+	AIE76 016	0	AIE7449 4	0	V	R	M	G	A
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	+	+	AGF50 352	0	AGF527 62	0	V	R	M	G	A
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	+	+	BAA1 6663	0	BAA104 70	0	V	R	M	G	A
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 GT-I	+	+	BAL27 832	0	BAL302 53	0	V	R	M	G	A
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 GT-S	+	+	BAK4 8833	0	BAK512 55	0	V	R	M	G	A
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 PCC-N	+	+	BAL31 002	0	BAL334 22	0	V	R	M	G	A
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 PCC-P	+	+	BAL34 171	0	BAL365 91	0	V	R	M	G	A
<i>Thermoleptol</i> <i>ynghya</i> sp.	+	+	QKD8 2375	0	QKD826 72	5E- 147	V	R	M	G	V

PKUAC-SCTA183											
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	+		NP_682230	0							
<i>Thermosynechococcus</i> sp. CL-1	+		QEQ01803	0							
<i>Thermosynechococcus</i> sp. NK55	+		AHB87887	0							
<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>	+		BAY51304	0							
<i>Tolypothrix</i> sp. PCC 7910	+	+	QIR36236	0	QIR38461	6E-143	V	R	M	G	V
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	+		ABG53008	0							
<i>Trichormus variabilis</i>	+	+	ABA22073	0	ABA20897	1E-138	V	R	M	G	V

1740 ME と MDH のホモログがゲノム上に存在する場合は、プラスマーク (+) で表した。

1741



1742

1743 付録6 シアノバクテリアのMDHの最尤系統樹

1744 ブートストラップ値は、250 (50%) 以上のものを表示した。酵素のアクセッション番号は、

1745 付録5に記した。

1746

- 1747 参考文献
- 1748 Abernathy MH, Yu J, Ma F, Liberton M, Ungerer J, Hollinshead WD, Gopalakrishnan S, He L,
1749 Maranas CD, Pakrasi HB, Allen DK, Tang YJ. (2017) Deciphering cyanobacterial phenotypes for
1750 fast photoautotrophic growth via isotopically nonstationary metabolic flux analysis. *Biotechnol*
1751 *Biofuels*. 10:273. doi: 10.1186/s13068-017-0958-y.
- 1752
- 1753 Acero-Navarro KE, Jiménez-Ramírez M, Villalobos MA, Vargas-Martínez R, Perales-Vela HV,
1754 Velasco-García R. (2018) Cloning, overexpression, and purification of glucose-6-phosphate
1755 dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expre. Purif.* 142:53–61 doi:
1756 10.1016/j.pep.2017.10.004.
- 1757
- 1758 Angermayr SA, Paszota M, Hellingwerf KJ. (2012) Engineering a cyanobacterial cell factory for
1759 production of lactic acid. *Appl Environ Microbiol.* 2012 78:7098–7106. doi:
1760 10.1128/AEM.01587-12.
- 1761
- 1762 Angermayr SA, van der Woude AD, Correddu D, Vreugdenhil A, Verrone V, Hellingwerf KJ (2014)
1763 Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid
1764 by *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol Biofuels* 7:99. doi: 10.1186/1754-6834-7-99.
- 1765
- 1766 Azuma M, Osanai T, Hirai MY, Tanaka K. (2011) A response regulator Rre37 and an RNA
1767 polymerase sigma factor SigE represent two parallel pathways to activate sugar catabolism in a
1768 cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 52:404–412. doi:
1769 10.1093/pcp/pcq204.
- 1770
- 1771 Banerjee S, Fraenkel DG. (1972) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* and
1772 from a “high-level” mutant. *J. Bacteriol.* 110:155–160. doi: 10.1128/jb.110.1.155-160.1972.
- 1773
- 1774 Banu MJ, Nellaiappan K, Dhandayuthapani S. (1992) Mitochondrial malate dehydrogenase and
1775 malic enzyme of a filarial worm *Setaria digitata*: some properties and effects of drugs and herbal
1776 extracts. *Jpn J Med Sci Biol.* 45:137–150. doi: 10.7883/yoken1952.45.137.
- 1777
- 1778 Ben-Bassat A, Goldberg I. (1980) Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase
1779 (NADP⁺/NAD⁺) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (NADP⁺/NAD⁺) from methanol-grown

1780 *Pseudomonas C.* Biochim. Biophys. Acta. 611:1–10. doi: 10.1016/0005-2744(80)90036-4.
1781
1782 Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, Van Dien SJ, Rabinowitz JD. (2009) Absolute
1783 metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. Nat.
1784 Chem. Biol. 5:593–599. doi: 10.1038/nchembio.186.
1785
1786 Bologna FP, Andreo CS, Drincovich MF. (2007) *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with
1787 substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure. J Bacteriol.
1788 189:5937–5946. doi: 10.1128/JB.00428-07.
1789
1790 Bonsignorea A, De Flora A. (1972) Regulatory properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
1791 Curr. Top. Cell. Reg. 6:21–62. doi: 10.1016/B978-0-12-152806-5.50009-6
1792
1793 Bricker TM, Zhang S, Laborde SM, Mayer PR 3rd, Frankel LK, Moroney JV. (2004) The malic
1794 enzyme is required for optimal photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803
1795 under continuous light but not under a diurnal light regimen. J Bacteriol. 186:8144–8148. doi:
1796 10.1128/JB.186.23.8144-8148.2004.
1797
1798 Chen X, Schreiber K, Appel J, Makowka A, Fährnich B, Roettger M, Hajirezaei MR, Sönnichsen
1799 FD, Schönheit P, Martin WF, Gutekunst K. (2016) The Entner-Doudoroff pathway is an
1800 overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113:5441–
1801 5446. doi: 10.1073/pnas.1521916113.
1802
1803 Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25:294–306. doi:
1804 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
1805
1806 Choi YN, Park JM. (2016) Enhancing biomass and ethanol production by increasing NADPH
1807 production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresour Technol*. 213:54–57. doi:
1808 10.1016/j.biortech.2016.02.056.
1809
1810 Clarens AF, Resurreccion EP, White MA, Colosi LM. (2010) Environmental life cycle comparison
1811 of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental science & technology*. 44:1813–1819. doi:
1812 10.1021/es902838n.

1813
1814 Coleman JR, Colman B. (1981) Inorganic carbon accumulation and photosynthesis in a blue-green
1815 alga as a function of external pH. *Plant Physiol.* 67:917–921. doi: 10.1104/pp.67.5.917.
1816
1817 De Carvalho LP, Ling Y, Shenm C, Warren JD, Rhee KY. (2011) On the chemical mechanism of
1818 succinic semialdehyde dehydrogenase (GabD1) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch.*
1819 *Biochem. Biophys.* 509: 90–99. doi: 10.1016/j.abb.2011.01.023.
1820
1821 Dempo Y, Ohta E, Nakayama Y, Bamba T, Fukusaki E. (2014) Molar-based targeted metabolic
1822 profiling of cyanobacterial strains with potential for biological production. *Metabolites.* 4:499–
1823 516. doi: 10.3390/metabo4020499.
1824
1825 Dixon M, Webb EC. (1979) *Enzymes*, Longman, London, pp. 400–402
1826
1827 Dolezal P, Vanáčová S, Tachezy J, Hrdý I. (2004) Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two
1828 enzyme families, two distinct origins. *Gene.* 329:81–92. doi: 10.1016/j.gene.2003.12.022.
1829
1830 Drincovich MF, Casati P, Andreo CS. (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme
1831 involved in different metabolic pathways. *FEBS Lett.* 490:1– 6. doi: 10.1016/s0014-
1832 5793(00)02331-0.
1833
1834 Driscoll BT, Finan TM. (1997) Properties of NAD⁺- and NADP⁺-dependent malic enzymes of
1835 *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* and differential expression of their genes in nitrogen-fixing
1836 bacteroids. *Microbiology (Reading)*.143:489–498. doi: 10.1099/00221287-143-2-489.
1837
1838 Durall C, Lindberg P, Yu J, Lindblad P. (2020) Increased ethylene production by overexpressing
1839 phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biotechnol*
1840 *Biofuels.* 13:16. doi: 10.1186/s13068-020-1653-y.
1841
1842 Du W, Jongbloets JA, Guillaume M, van de Putte B, Battaglino B, Hellingwerf KJ, Branco Dos
1843 Santos F. (2019) Exploiting day- and night-time metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for
1844 fitness-coupled fumarate production around the clock. *ACS Synth Biol.* 8:2263–2269. doi:
1845 10.1021/acssynbio.9b00289.

1846
1847 Evans MC, Buchanan BB, Arnon DI. (1966) A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in
1848 a photosynthetic bacterium. Proc Natl Acad Sci U S A. 55:928–934. doi: 10.1073/pnas.55.4.928
1849
1850 Fuentealba M, Muñoz R, Maturana P, Krapp A, Cabrera R. (2016) Determinants of cofactor
1851 specificity for the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*: simulation, kinetics
1852 and evolutionary studies. PLoS One. 11:e0152403. doi: 10.1371/journal.pone.0152403.
1853
1854 Gall SC, Thompson RC. (2015) The impact of debris on marine life. Mar Pollut Bull. 92:170–179.
1855 doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.12.041.
1856
1857 García-Domínguez M, Reyes JC, Florencio FJ. (1997) Purification and characterization of a new
1858 type of glutamine synthetase from cyanobacteria. Eur. J. Biochem. 244:258–264. doi:
1859 10.1111/j.1432-1033.1997.00258.x.
1860
1861 Gerrard Wheeler MC, Arias CL, Maurino VG, Andreo CS, Drincovich MF. (2009) Identification of
1862 domains involved in the allosteric regulation of cytosolic *Arabidopsis thaliana* NADP-malic
1863 enzymes. FEBS J. 276:5665–5677. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07258.x.
1864
1865 Guo J, Nguyen AY, Dai Z, Su D, Gaffrey MJ, Moore RJ, Jacobs JM, Monroe ME, Smith RD,
1866 Koppelaar DW, Pakrasi HB, Qian WJ. (2014) Proteome-wide light/dark modulation of thiol
1867 oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. Mol Cell
1868 Proteomics. 13:3270–3285. doi: 10.1074/mcp.M114.041160.
1869
1870 Hagen KD, Meeks JC. (2001) The unique cyanobacterial protein OpcA is an allosteric effector of
1871 glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. J. Biol. Chem.
1872 276:11477–11486. doi: 10.1074/jbc.M010472200.
1873
1874 Haghighi O. (2021) In silico study of the structure and ligand preference of pyruvate kinases from
1875 cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Appl Biochem Biotechnol. 193:3651–3671. doi:
1876 10.1007/s12010-021-03630-9.
1877
1878 Hansen T, Schlichting B, Schönheit, P. (2002) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the

1879 hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: expression of the g6pd gene and
1880 characterization of an extremely thermophilic enzyme. FEMS Microbiol. Lett. 216:249–253. doi:
1881 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11443.x.
1882
1883 Hasunuma T, Matsuda M, Kato Y, Vavricka CJ, Kondo, A. (2018) Temperature enhanced succinate
1884 production concurrent with increased central metabolism turnover in the cyanobacterium
1885 *Synechocystis* sp. PCC 6803. Metab. Eng. 48:109–120. doi: 10.1016/j.ymben.2018.05.013.
1886
1887 Hasunuma T, Matsuda M, Kondo A. (2016) Improved sugar-free succinate production by
1888 *Synechocystis* sp. PCC 6803 following identification of the limiting steps in glycogen catabolism.
1889 Metab. Eng. Commun. 3:130–141. doi: 10.1016/j.meteno.2016.04.003.
1890
1891 Hidese R, Matsuda M, Osanai T, Hasunuma T, and Kondo A. (2020) Malic enzyme facilitates D-
1892 lactate production through increased pyruvate supply during anoxic dark fermentation in
1893 *Synechocystis* sp. PCC 6803. ACS Synth. Biol. 9, 260–268. doi: 10.1021/acssynbio.9b00281.
1894
1895 Honda D, Yokota A, Sugiyama J. (1999) Detection of seven major evolutionary lineages in
1896 cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine
1897 *Synechococcus* strains. J Mol Evol. 48:723–739. doi: 10.1007/pl00006517.
1898
1899 Hsu RY. (1982) Pigeon liver malic enzyme. Mol. Cell. Biochem. 43:3–26. doi:
1900 10.1007/BF00229535
1901
1902 Huang JJ, Kolodny NH, Redfearn JT, Allen MM. (2002) The acid stress response of the
1903 cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6308. Arch Microbiol. 177:486–493. doi:
1904 10.1007/s00203-002-0419-1.
1905
1906 Iijima H, Nakaya Y, Kuwahara A, Hirai MY, Osanai T. (2015) Seawater cultivation of freshwater
1907 cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 drastically alters amino acid composition and
1908 glycogen metabolism. Front. Microbiol. 6:326. doi: 10.3389/fmicb.2015.00326.
1909
1910 Iijima H, Watanabe A, Sukigara H, Shirai T, Kondo A, Osanai T. (2020) Simultaneous increases in
1911 the levels of compatible solutes by cost-effective cultivation of *Synechocystis* sp. PCC 6803.

1912 Biotechnol Bioeng. 117:1649–1660. doi: 10.1002/bit.27324.
1913
1914 Iijima H, Watanabe A, Sukigara H, Iwazumi K, Shirai T, Kondo A, Osanai T. (2021) Four-carbon
1915 dicarboxylic acid production through the reductive branch of the open cyanobacterial tricarboxylic
1916 acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Metab Eng. 65:88–98. doi:
1917 10.1016/j.ymben.2021.03.007.
1918
1919 Ishijima S, Uchibori A, Takagi H, Maki R, Ohnishi M. (2003) Light-induced increase in free Mg²⁺
1920 concentration in spinach chloroplasts: measurement of free Mg²⁺ by using a fluorescent probe and
1921 necessity of stromal alkalization. Arch. Biochem. Biophys. 412:126–132. doi: 10.1016/s0003-
1922 9861(03)00038-9.
1923
1924 Ishikawa Y, Miyagi A, Ishikawa T, Nagano M, Yamaguchi M, Hihara Y, Kaneko Y, Kawai-Yamada
1925 M. (2019) One of the NAD kinases, sll1415, is required for the glucose metabolism of
1926 *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant. J. 98, 654–666. doi: 10.1111/tpj.14262.
1927
1928 Ito S, Koyama N, Osanai T. (2019) Citrate synthase from *Synechocystis* is a distinct class of bacterial
1929 citrate synthase. Sci. Rep. 9:6038. doi: 10.1038/s41598-019-42659-z.
1930
1931 Ito S, Osanai T. (2018) Single amino acid change in 6-phosphogluconate dehydrogenase from
1932 *Synechocystis* conveys higher affinity for NADP⁺ and altered mode of inhibition by NADPH.
1933 Plant Cell Physiol. 59:2452–2461. doi: 10.1093/pcp/pcy165.
1934
1935 Ito S, Osanai, T. (2020) Unconventional biochemical regulation of the oxidative pentose phosphate
1936 pathway in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochem. J. 477:1309–1321.
1937 doi: 10.1042/BCJ20200038.
1938
1939 Ito S, Takeya M, Osanai T. (2017) Substrate specificity and allosteric regulation of a D-lactate
1940 dehydrogenase from a unicellular cyanobacterium are altered by an amino acid substitution. Sci.
1941 Rep. 7:15052. doi: 10.1038/s41598-017-15341-5.
1942
1943 Jaeger M, Rothacker B, Ilg, T. (2008) Saturation transfer difference NMR studies on substrates and
1944 inhibitors of succinic semialdehyde dehydrogenases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 372:400–

1945 406. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.183.

1946

1947 Jang EH, Park SA, Chi YM, Lee KS. (2014) Kinetic and structural characterization for cofactor

1948 preference of succinic semialdehyde dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*. Mol. Cells

1949 37:719–726. doi: 10.14348/molcells.2014.0162.

1950

1951 Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura

1952 M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S,

1953 Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. (1996) Sequence

1954 analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II.

1955 Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions.

1956 DNA Res. 3:109–136. doi: 10.1093/dnares/3.3.109.

1957

1958 Katayama N, Iijima H, Osanai T. (2018) Production of bioplastic compounds by genetically

1959 manipulated and metabolic engineered cyanobacteria. Adv. Exp. Med. Biol. 1080:155–169. doi:

1960 10.1007/978-981-13-0854-3_7.

1961

1962 Katayama N, Takeya M, Osanai T. (2019) Biochemical characterisation of fumarase C from a

1963 unicellular cyanobacterium demonstrating its substrate affinity, altered by an amino acid

1964 substitution. Sci. Rep. 9:10629. doi: 10.1038/s41598-019-47025-7.

1965

1966 Kato N, Sahm H, Schütte H, Wagner F. (1979) Purification and properties of glucose-6-phosphate

1967 dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida*

1968 *bovidinii*. Biochim. Biophys. Acta. 566: 1–11. doi: 10.1016/0005-2744(79)90242-0

1969

1970 Kawai S, Suzuki H, Yamamoto K, Inui M, Yukawa H, Kumagai H. (1996) Purification and

1971 characterization of a malic enzyme from the ruminal bacterium *Streptococcus bovis* ATCC 15352

1972 and cloning and sequencing of its gene. Appl Environ Microbiol. 62:2692–2700. doi:

1973 10.1128/aem.62.8.2692-2700.1996.

1974

1975 Krasaesueb N, Incharoensakdi A, Khetkorn W. (2019) Utilization of shrimp wastewater for poly-β-

1976 hydroxybutyrate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain ΔSphU cultivated in

1977 photobioreactor. Biotechnol. Rep. (Amst). 23:e00345. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00345.

1978

1979 Krebs HA. (1942) The effect of inorganic salts on the ketone decomposition of oxaloacetic acid.

1980 Biochem. J. 36:303–305. doi: 10.1042/bj0360303.

1981

1982 Knoop H, Gründel M, Zilliges Y, Lehmann R, Hoffmann S, Lockau W, Steuer R. (2013) Flux

1983 balance analysis of cyanobacterial metabolism: the metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC

1984 6803. PLoS Comput. Biol. 9:e1003081. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003081.

1985

1986 Knowles VL, Smith CS, Smith CR, Plaxton WC. (2001) Structural and regulatory properties of

1987 pyruvate kinase from the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301. *J Biol Chem.* 276:20966–

1988 20972. doi: 10.1074/jbc.M008878200.

1989

1990 Lawrence BA, Polse J, DePina A, Allen MM, Kolodny NH. (1997) ³¹P NMR identification of

1991 metabolites and pH determination in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6308. *Curr.*

1992 *Microbiol.* 34:280–283. doi: 10.1007/s002849900182.

1993

1994 Lee WT, Levy HR. (1992) Lysine-21 of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate

1995 dehydrogenase participates in substrate binding through charge-charge interaction. *Protein Sci.*

1996 1:329–334. doi: 10.1002/pro.5560010304.

1997

1998 Lessie TG, Wyk JC. (1972) Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-

1999 phosphogluconate dehydrogenases: differences in size, pyridine nucleotide specificity, and

2000 susceptibility to inhibition by adenosine 5'-triphosphate. *J. Bacteriol.* 110:1107–1117. doi:

2001 10.1128/jb.110.3.1107-1117.1972.

2002

2003 Lea-Smith DJ, Ross N, Zori M, Bendall DS, Dennis JS, Scott SA, Smith AG, Howe CJ. (2013)

2004 Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to

2005 survive rapidly changing light intensities. *Plant Physiol.* 162, 484–495. doi:

2006 10.1104/pp.112.210260.

2007

2008 Levy HR. (1979) Glucose-6-phosphate dehydrogenases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*

2009 48:97–192. doi: 10.1002/9780470122938.ch3

2010

- 2011 Lin PC, Saha R, Zhang F, Pakrasi, H.B. (2017) Metabolic engineering of the pentose phosphate
2012 pathway for enhanced limonene production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.
2013 Sci. Rep. 7:17503. doi: 10.1038/s41598-017-17831-y.
2014
- 2015 Liu D, Yang C (2014) The nitrogen-regulated response regulator NrrA controls cyanophycin
2016 synthesis and glycogen catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. J Biol
2017 Chem 289:2055–2071. doi: 10.1074/jbc.M113.515270.
2018
- 2019 Loeber G, Dworkin MB, Infante A, Ahorn H. (1994) Characterization of cytosolic malic enzyme in
2020 human tumor cells. FEBS Lett. 344:181–186. doi: 10.1016/0014-5793(94)00386-6.
2021
- 2022 Makowka A, Nichelmann L, Schulze D, Spengler K, Wittmann C, Forchhammer K, Gutekunst K.
2023 (2020) Glycolytic shunts replenish the calvin-benson-bassham cycle as anaplerotic reactions in
2024 cyanobacteria. Mol Plant. 13:471–482. doi: 10.1016/j.molp.2020.02.002.
2025
- 2026 Mangan NM, Flamholz A, Hood RD, Milo R, Savage, D.F. (2016) pH determines the energetic
2027 efficiency of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 113:
2028 E5354–E5362. doi: 10.1073/pnas.1525145113.
2029
- 2030 Maruyama M, Nishiguchi H, Toyoshima M, Okahashi N, Matsuda F, Shimizu H. (2019) Time-
2031 resolved analysis of short term metabolic adaptation at dark transition in *Synechocystis* sp. PCC
2032 6803. J. Biosci. Bioeng. 128:424–428. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.03.016.
2033
- 2034 McCarthy JK, O’Brien CE, Eveleigh DE. (2003) Thermostable continuous coupled assay for
2035 measuring glucose using glucokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from the marine
2036 hyperthermophile *Thermotoga maritima*. Anal. Biochem. 318:196–203. doi: 10.1016/s0003-
2037 2697(03)00243-4.
2038
- 2039 Mérida A, Leurentop L, Candau P, Florencio FJ. (1990) Purification and properties of glutamine
2040 synthetases from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain
2041 PCC 7601. J. Bacteriol. 172:4732–4735. doi: 10.1128/jb.172.8.4732-4735.1990.
2042
- 2043 Medina M, Luquita A, Tejero J, Hermoso J, Mayoral T, Sanz-Aparicio J, Grever K, Gomez-Moreno

2044 C. (2001) Probing the determinants of coenzyme specificity in ferredoxin-NADP⁺ reductase by
2045 site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 276:11902–11912. doi: 10.1074/jbc.M009287200.
2046

2047 Mi H, Klughammer C, Schreiber U. (2000) Light-induced dynamic changes of NADPH fluorescence
2048 in *Synechocystis* PCC 6803 and its *ndhB*-defective mutant M55. *Plant Cell Physiol.* 41:1129–
2049 1135. doi: 10.1093/pcp/pcd038.
2050

2051 Michaelis L, Menten ML. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49:333–369
2052

2053 Mock M, Schmid A, Bühler K, (2019) Photoautotrophic production of succinate via the oxidative
2054 branch of the tricarboxylic acid cycle influences glycogen accumulation in *Synechocystis* sp. PCC
2055 6803. *Algal Res.* 43, 101645. doi: 10.1016/j.algal.2019.101645.
2056

2057 Moritz B, Striegel K, De Graaf AA, Sahm H. (2000) Kinetic properties of the glucose-6-phosphate
2058 and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application
2059 for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *Eur. J. Biochem.* 267:3442–3452. doi:
2060 10.1046/j.1432-1327.2000.01354.x.
2061

2062 Müller GL, Drincovich MF, Andreo CS, Lara MV. (2008) *Nicotiana tabacum* NADP-malic enzyme:
2063 cloning, characterization and analysis of biological role. *Plant Cell Physiol.* 49:469–480. doi:
2064 10.1093/pcp/pcn022.
2065

2066 Mullineaux CW. (2014) Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial
2067 thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1837:503–511. doi:
2068 10.1016/j.bbabi.2013.11.017.
2069

2070 Muro-Pastor MI, Florencio FJ. (1992) Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase
2071 from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 203:99–105.
2072 doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19833.x.
2073

2074 Nakajima T, Kajihata S, Yoshikawa K, Matsuda F, Furusawa C, Hirasawa T, Shimizu H. (2014)
2075 Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic
2076 and photoheterotrophic conditions. *Plant Cell Physiol.* 55:1605–1612. doi: 10.1093/pcp/pcu091.

2077
2078 Nakajima T, Yoshikawa K, Toya Y, Matsuda F, Shimizu H. (2017) Metabolic flux analysis of the
2079 *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta nrtABCD$ mutant reveals a mechanism for metabolic adaptation to
2080 nitrogen-limited conditions. *Plant Cell Physiol.* 58:537–545. doi: 10.1093/pcp/pcw233.
2081
2082 Nishii M, Ito S, Katayama N, Osanai T. (2021) Biochemical elucidation of citrate accumulation in
2083 *Synechocystis* sp. PCC 6803 via kinetic analysis of aconitase. *Sci Rep.* 11:17131. doi:
2084 10.1038/s41598-021-96432-2.
2085
2086 Nunoura T, Chikaraishi Y, Izaki R, Suwa T, Sato T, Harada T, Mori K, Kato Y, Miyazaki M,
2087 Shimamura S, Yanagawa K, Shuto A, Ohkouchi N, Fujita N, Takaki Y, Atomi H, Takai K. (2018)
2088 A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile.
2089 *Science.* 359:559–563. doi: 10.1126/science.aao3407.
2090
2091 Ogawa T, Suzuki K, Sonoike K. (2021) Respiration interacts with photosynthesis through the
2092 acceptor side of photosystem I, reflected in the dark-to-light induction kinetics of chlorophyll
2093 fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front Plant Sci.* 12:717968. doi:
2094 10.3389/fpls.2021.717968.
2095
2096 Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC. (2002) Global expression profiling of acetate-grown
2097 *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277:13175–13183. doi: 10.1074/jbc.M110809200.
2098
2099 Okino S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, Yukawa H. An efficient succinic acid production
2100 process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. (2008) *Appl.*
2101 *Microbiol. Biotechnol.* 81, 459–464. doi: 10.1007/s00253-008-1668-y.
2102
2103 Oliver NJ, Rabinovitch-Deere CA, Carroll AL, Nozzi NE, Case AE, Atsumi S. (2016) Cyanobacterial
2104 metabolic engineering for biofuel and chemical production. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 35:43–50.
2105 doi: 10.1016/j.cbpa.2016.08.023.
2106
2107 Omata T, Murata N. (1984) Cytochromes and prenylquinones in preparations of cytoplasmic and
2108 thylakoid membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Anacystis nidulans*. *Biochim.*
2109 *Biophys. Acta Bioenerg.* 766, 395–402. doi: 10.1016/0005-2728(84)90255-X.

2110
2111 Opheim D, Bernlohr RW. (1973) Purification and regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase
2112 from *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol. 116:1150–1159. doi: 10.1128/jb.116.3.1150-1159.1973.
2113
2114 Osanai T, Imashimizu M, Seki A, Sato S, Tabata S, Imamura S, Asayama M, Ikeuchi M, Tanaka K.
2115 (2009) ChlH, the H subunit of the Mg-chelatase, is an anti-sigma factor for SigE in *Synechocystis*
2116 sp. PCC 6803. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 106:6860–6865. doi: 10.1073/pnas.0810040106.
2117
2118 Osanai T, Kanesaki Y, Nakano T, Takahashi H, Asayama M, Shirai M, Kanehisa M, Suzuki I, Murata
2119 N, Tanaka K. (2005) Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium
2120 *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2 sigma factor SigE. J Biol Chem. 280:30653–30659.
2121 doi: 10.1074/jbc.M505043200.
2122
2123 Osanai T, Numata K, Oikawa A, Kuwahara A, Iijima H, Doi Y, Tanaka K, Saito K, Hirai MY. (2013)
2124 Increased bioplastic production with an RNA polymerase sigma factor SigE during nitrogen
2125 starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. DNA Res. 20, 525–535. doi: 10.1093/dnares/dst028.
2126
2127 Osanai T, Oikawa A, Azuma M, Tanaka K, Saito K, Hirai MY, Ikeuchi M. (2011) Genetic
2128 engineering of group 2 sigma factor SigE widely activates expressions of sugar catabolic genes in
2129 *Synechocystis* species PCC 6803. J Biol Chem 286:30962–30971. doi: 10.1074/jbc.M111.231183.
2130
2131 Osanai T, Oikawa A, Shirai T, Kuwahara A, Iijima H, Tanaka K, Ikeuchi M, Kondo A, Saito K, Hirai
2132 MY. (2014) Capillary electrophoresis-mass spectrometry reveals the distribution of carbon
2133 metabolites during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Environ. Microbiol.
2134 16:512–524. doi: 10.1111/1462-2920.12170.
2135
2136 Osanai T, Shirai T, Iijima H, Nakaya Y, Okamoto M, Kondo A, Hirai MY. (2015) Genetic
2137 manipulation of a metabolic enzyme and a transcriptional regulator increasing succinate excretion
2138 from unicellular cyanobacterium. Front Microbiol 6:1064. doi: 10.3389/fmicb.2015.01064.
2139
2140 Özkul K, Karakaya H. (2015) Characterisation of an *opcA* mutant of the unicellular cyanobacterium
2141 *Synechocystis* sp. PCC 6803. Curr. Microbiol. 71:572–578. doi: 10.1007/s00284-015-0889-4.
2142

- 2143 Pearce J, Carr NG. (1967) The metabolism of acetate by the blue-green algae, *Anabaena variabilis*
2144 and *Anacystis nidulans*. J Gen Microbiol. 49:301–313. doi: 10.1099/00221287-49-2-301.
2145
- 2146 Peschek GA, Obinger C, Paumann M. (2004) The respiratory chain of blue-green algae
2147 (cyanobacteria). Physiol. Plant. 120:358–369. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00274.x.
2148
- 2149 Rauch B, Pahlke J, Schweiger P, Deppenmeier U. (2010) Characterization of enzymes involved in
2150 the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 88:711–718. doi:
2151 10.1007/s00253-010-2779-9.
2152
- 2153 Rodriguez E, Navone L, Casati P, Gramajo H. (2012) Impact of malic enzymes on antibiotic and
2154 triacylglycerol production in *Streptomyces coelicolor*. Appl Environ Microbiol. 78:4571–4579.
2155 doi: 10.1128/AEM.00838-12.
2156
- 2157 Rozova ON, Khmelenina VN, Mustakhimov II, But SY, Trotsenko YA. (2019) Properties of malic
2158 enzyme from the aerobic methanotroph *Methylosinus trichosporium*. Biochemistry (Mosc).
2159 84:390–397. doi: 10.1134/S0006297919040060.
2160
- 2161 Saha R, Liu D, Hoynes-O’Connor A, Liberton M, Yu J, Bhattacharyya-Pakrasi M, Balassy A, Zhang
2162 F, Moon TS, Maranas CD, Pakrasi HB. (2016) Diurnal regulation of cellular processes in the
2163 cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: insights from transcriptomic, fluxomic, and
2164 physiological analyses. mBio 7, e00464-16. doi: 10.1128/mBio.00464-16.
2165
- 2166 Scholl J, Dengler L, Bader L, Forchhammer K. (2020) Phosphoenolpyruvate carboxylase from the
2167 cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is under global metabolic control by PII signaling.
2168 Mol. Microbiol. 114:292–307. doi: 10.1111/mmi.14512.
2169
- 2170 Schuller JM, Birrell JA, Tanaka H, Konuma T, Wulfhorst H, Cox N, Schuller SK, Thiemann J,
2171 Lubitz W, Sétif P, Ikegami T, Engel BD, Kurisu G, Nowaczyk MM. (2019) Structural adaptations
2172 of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer. Science. 363:257–260.
2173 doi: 10.1126/science.aau3613.
2174
- 2175 Shiba H, Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y. (1985). The CO₂ assimilation via the

2176 reductive tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing
2177 bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. Arch. Microbiol. 141, 198–203. doi:
2178 10.1007/BF00408058
2179
2180 Smith AJ, London J, Stanier RY. (1967) Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green
2181 algae and thiobacilli. J Bacteriol. 94:972–983. doi: 10.1128/jb.94.4.972-983.1967.
2182
2183 Tabei Y, Okada K, Tsuzuki M. (2007) Sll1330 controls the expression of glycolytic genes in
2184 *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochem Biophys Res Commun 355:1045–1050. doi:
2185 10.1016/j.bbrc.2007.02.065.
2186
2187 Takeya M, Hirai MY, Osanai T. (2017) Allosteric inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylases is
2188 determined by a single amino acid residue in cyanobacteria. Sci. Rep. 7:41080. doi:
2189 10.1038/srep41080.
2190
2191 Takeya M, Ito S, Sukigara H, Osanai, T. (2018) Purification and characterisation of malate
2192 dehydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803: Biochemical barrier of the oxidative
2193 tricarboxylic acid cycle. Front. Plant. Sci. 9:947. doi: 10.3389/fpls.2018.00947.
2194
2195 Tasaka Y, Gombos Z, Nishiyama Y, Mohanty P, Ohba T, Ohki K, Murata, N. (1996) Targeted
2196 mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of
2197 polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. EMBO J. 15:6416–
2198 6425.
2199
2200 Tian J, Bryk R, Itoh M, Suematsu M, Nathan C. (2005) Variant tricarboxylic acid cycle in
2201 *Mycobacterium tuberculosis*: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase. Proc Natl Acad
2202 Sci U S A. 102:10670–10675. doi: 10.1073/pnas.0501605102.
2203
2204 TranNgoc K, Pham N, Lee C, Jang SH. (2019) Cloning, expression, and characterization of a
2205 psychrophilic glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Sphingomonas* sp. PAMC 26621. Int. J.
2206 Mol. Sci. 20:E1362. doi: 10.3390/ijms20061362.
2207
2208 Ueda K, Nakajima T, Yoshikawa K, Toya Y, Matsuda F, Shimizu H. (2018) Metabolic flux of the

2209 oxidative pentose phosphate pathway under low light conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803.
 2210 J. Biosci. Bioeng. 126:38–43. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.020.
 2211
 2212 Ungerer J, Ling T, Mark D, Maria G, Pin-Ching M, Jianping Y. (2012) Sustained photosynthetic
 2213 conversion of CO₂ to ethylene in recombinant cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Energy
 2214 Environ. Sci. 5, 8998–9006. doi: 10.1039/C2EE22555G
 2215
 2216 van der Woude AD, Angermayr SA, Puthan Veetil V, Osnato A, Hellingwerf KJ (2014) Carbon sink
 2217 removal: Increased photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803 in a
 2218 glycogen storage mutant. J Biotechnol 184:100–102. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.029.
 2219
 2220 Veetil VP, Angermayr SA, Hellingwerf KJ. (2017) Ethylene production with engineered
 2221 *Synechocystis* sp PCC 6803 strains. Microb Cell Fact. 16:34. doi: 10.1186/s12934-017-0645-5.
 2222
 2223 Wang B, Wang J, Zhang W, Meldrum DR. (2012) Application of synthetic biology in cyanobacteria
 2224 and algae. Front Microbiol. 3:344. doi: 10.3389/fmicb.2012.00344.
 2225
 2226 Wang X, Lai C, Lei G, Wang F, Long H, Wu X, Chen J, Huo G, Li Z. (2018) Kinetic
 2227 characterization and structural modeling of an NADP⁺-dependent succinic semialdehyde
 2228 dehydrogenase from *Anabaena* sp. PCC7120. Int. J. Biol. Macromol. 108, 615–624. doi:
 2229 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.059.
 2230
 2231 Wang X, Lei G, Wu X, Wang F, Lai C, Li Z. (2017) Expression, purification and characterization of
 2232 sll1981 protein from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. Protein Expr. Purif. 139:21–28.
 2233 doi: 10.1016/j.pep.2017.07.013.
 2234
 2235 Wan N, DeLorenzo DM, He L, You L, Immethun CM, Wang G, Baidoo EEK, Hollinshead W,
 2236 Keasling JD, Moon TS, Tang YJ. (2017) Cyanobacterial carbon metabolism: fluxome plasticity
 2237 and oxygen dependence. Biotechnol. Bioeng. 114, 1593–1602. doi: 10.1002/bit.26287.
 2238
 2239 Wedding RT, Black MK, Pap D. (1976) Malate dehydrogenase and NAD malic enzyme in the
 2240 oxidation of malate by sweet potato mitochondria. Plant Physiol. 58:740–743. doi:
 2241 10.1104/pp.58.6.740.

2242
2243 Werner A, Broeckling CD, Prasad A, Peebles CAM. (2019) A comprehensive time-course metabolite
2244 profiling of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under diurnal light:dark
2245 cycles. *Plant. J.* 99:379–388 . doi: 10.1111/tpj.14320.
2246
2247 Williams JGK. (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction
2248 center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Meth. Enzymol.* 167:766–
2249 778.doi:10.1016/0076-6879(88)67088-1
2250
2251 Xiong W, Brune D, Vermaas WF. (2014) The γ -aminobutyric acid shunt contributes to closing the
2252 tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol.* 93:786–796. doi:
2253 10.1111/mmi.12699.
2254
2255 Xiong W, Morgan JA, Ungerer J, Wang B, Maness PC, Yu J. (2015a) The plasticity of cyanobacterial
2256 metabolism supports direct CO₂ conversion to ethylene. *Nat Plants.* 1:15053. doi:
2257 10.1038/NPLANTS.2015.53.
2258
2259 Xiong W, Lee T-C, Rommelfanger S, Gjersing E, Cano M, Maness P-C, Ghirardi M, Yu J. (2015b)
2260 Phosphoketolase pathway contributes to carbon metabolism in cyanobacteria. *Nat. Plants.* 2,
2261 15187. doi: 10.1038/nplants.2015.187.
2262
2263 Yin Y, Kirsch JF. (2007) Identification of functional paralog shift mutations: conversion of
2264 *Escherichia coli* malate dehydrogenase to a lactate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
2265 104, 17353–17357. doi: 10.1073/pnas.0708265104.
2266
2267 Yoshikawa K, Hirasawa T, Ogawa K, Hidaka Y, Nakajima T, Furusawa C, Shimizu H. (2013)
2268 Integrated transcriptomic and metabolomic analysis of the central metabolism of *Synechocystis* sp.
2269 PCC 6803 under different trophic conditions. *Biotechnol. J.* 8:571–580. doi:
2270 10.1002/biot.201200235.
2271
2272 Yoshikawa K, Hirasawa T, Shimizu H. (2015) Effect of malic enzyme on ethanol production by
2273 *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biosci Bioeng.* 119:82–84. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.001.
2274

2275 You L, He L, Tang YJ. (2015) Photoheterotrophic fluxome in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and
2276 its implications for cyanobacterial bioenergetics. *J. Bacteriol.* 197, 943–950. doi:
2277 10.1128/JB.02149-14.
2278
2279 Young JD, Shastri AA, Stephanopoulos G, Morgan JA. (2011) Mapping photoautotrophic
2280 metabolism with isotopically nonstationary ¹³C flux analysis. *Metab. Eng.* 13:656–665. doi:
2281 10.1016/j.ymben.2011.08.002.
2282
2283 Yu Y, You L, Liu D, Hollinshead W, Tang YJ, Zhang F. (2013) Development of *Synechocystis* sp.
2284 PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Mar Drugs.* 11:2894–2916. doi: 10.3390/md11082894.
2285
2286 Zhang S, Bryant D.A. (2015) Biochemical validation of the glyoxylate cycle in the cyanobacterium
2287 *Chlorogloeopsis fritschii* strain PCC 9212. *J. Biol.Chem.* 290, 14019–14030. doi:
2288 10.1074/jbc.M115.648170.
2289
2290 Zhang S, Bryant D.A. (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science.* 334:1551–
2291 1553. doi: 10.1126/science.1210858.
2292
2293 Zhang Y, Beard KFM, Swart C, Bergmann S, Krahnert I, Nikoloski Z, Graf A, Ratcliffe RG,
2294 Sweetlove LJ, Fernie AR, Obata T. (2017) Protein-protein interactions and metabolite channelling
2295 in the plant tricarboxylic acid cycle. *Nat Commun.* 8:15212. doi: 10.1038/ncomms15212.
2296
2297 Zhou J, Zhang F, Meng H, Zhang Y, Li Y. (2016) Introducing extra NADPH consumption ability
2298 significantly increases the photosynthetic efficiency and biomass production of cyanobacteria.
2299 *Metab Eng.* 38:217-227. doi: 10.1016/j.ymben.2016.08.002.
2300
2301 Zhu T, Xie X. M, Li Z. M, Tan X. M, Lu X. F. (2015) Enhancing photosynthetic production of
2302 ethylene in genetically engineered *Synechocystis* sp PCC 6803. *Green Chem.* 17, 421–434. doi:
2303 10.1039/C4GC01730G
2304
2305 Ziegler I. (1974) Malate dehydrogenase in *Zea mays*: properties and inhibition by sulfite. *Biochim*
2306 *Biophys Acta.* 364:28–37. doi: 10.1016/0005-2744(74)90129-6.
2307

- 2308 経済産業省 資源エネルギー庁 「石油統計速報 令和3年6月分」
2309 <https://www.meti.go.jp/statistics/tyo/sekiyuso/result/pdf/h2j581011j.pdf>
2310
2311 製品評価技術基盤機構 HP 「リグノセルロース系バイオマスの酵素糖化」 2021年8月
2312 15日にアクセス
2313 https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/other/biomass/knowledge/ligno_glucohydratase.html
2314
2315 日本原子力文化財団 HP 「原子力・エネルギー図面表」 2021年8月13日にアクセス
2316 <https://www.ene100.jp/zumen>
2317
2318 山下慶洋 「第二世代バイオ燃料の可能性～食料問題とエネルギー問題の解決に向けて～」
2319 https://www.sangiin.go.jp/japanese/annai/chousa/rippou_chousa/backnumber/2009pdf/20090801075
2320 .pdf
2321
2322

2323 謝辞

2324 本研究の遂行にあたり、明治大学農学研究科農芸化学専攻の小山内崇准教授には、学部生
2325 の頃から合わせて 6 年間にわたり、実験やデータ解析の手法から最終的な原著論文の作成
2326 に至るまで、手厚くご指導いただきました。博士後期課程進学後は、学生への責任著者とし
2327 ての研究指導、日本学術振興会育志賞への応募、共同研究先とのミーティングへの参加な
2328 ど、今後研究者として自立していくために必要な沢山の経験を積ませていただきました。今
2329 日に至るまで、自身の能力を存分に発揮し、心置きなく研究を進められてこられたのは、小
2330 山内崇准教授の支えがあったからにほかなりません。厚く御礼申し上げます。また、明治大
2331 学農学部農芸化学科中島春紫教授および鈴木博実准教授には、博士論文の副査を快く引き
2332 受けてくださり、ご指導、ご助言賜りました。副指導教員も務めてくださった鈴木博実准教
2333 授には、第 4 章における酵素の BLAST 解析や系統解析の手法を、ご教示いただきました。
2334 お二人の先生方に、改めて心より御礼申し上げます。明治大学農学部農芸化学科の先生方に
2335 は、大学、大学院における講義や学生実験だけでなく、博士後期課程の早期卒業の審査など
2336 においても、大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。早期卒業の審査に向けた
2337 発表練習会において、発表方法や研究方針についてご指導くださった理化学研究所環境資
2338 源科学研究センターの白井智量博士に、深く感謝いたします。また、学部生の頃から 3 年間
2339 にわたり、私の直属の先輩として、実験手法や論文の執筆方法をご教示くださった 1 期生の
2340 竹屋壮浩氏に、厚く感謝いたします。最後に、この 6 年間研究を進めていくにあたり、あら
2341 ゆる面でサポートしてくださった環境バイオテクノロジー研究室の学生、スタッフの皆さま
2342 にも、深く感謝いたします。どうもありがとうございました。