

Study on Biosynthesis of the Novel Fatty Acids in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

著者	MACHIDA Shuntaro
著者別名	町田 峻太郎
発行年	2018
その他のタイトル	シアノバクテリアにおける新規修飾脂肪酸の合成に関する研究
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2017
報告番号	12102甲第8579号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00152800

氏名	町田 峻太郎		
学位の種類	博士（学術）		
学位記番号	博 甲 第 8 5 7 9 号		
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 3 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Study on Biosynthesis of the Novel Fatty Acids in the Cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (シアノバクテリアにおける新規修飾脂肪酸の合成に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士（農学）	鈴木 石根
副査	筑波大学教授	博士（理学）	石田 健一郎
副査	筑波大学教授（連携大学院）	農学博士	中嶋 信美
副査	静岡大学教授	博士（農学）	小川 直人

論 文 の 要 旨

微細藻類や陸上植物の光合成機能を利用したバイオマス・油脂の生産は、カーボンニュートラルな材料・燃料の供給源と考えられ近年注目を集めている。光合成生物の生産する油脂は、主に炭素数16から22の多価不飽和脂肪酸を含むトリアシルグリセロールからなる。多価不飽和脂肪酸は、分子内に共役二重結合を複数もち大気中の酸素により容易に酸化を受ける。また、炭素数16以上の飽和脂肪酸は常温で固体であり、液体燃料を生産するには不適當な脂肪酸である。新規な構造をもち酸化安定性に優れ且つ流動性の高い脂肪酸を合成する光合成生物を、天然から単離できる可能性は低く、遺伝子の改変によって新規脂肪酸を合成する光合成生物の作製が期待されている。

本論文で著者は、光合成モデル微生物のシアノバクテリアを用い、生産された不飽和脂肪酸をメチル化修飾し、シクロプロパン構造を分子内にもつシクロプロパン型脂肪酸を合成することに初めて成功した（第1章）。シクロプロパン型脂肪酸は、大腸菌や乳酸菌など身近なバクテリアに普遍的に存在する脂肪酸で、炭素・炭素二重結合をもつ脂肪酸に比べて酸化安定性に優れる。ただ、酸素発生型の光合成器官の膜脂質にシクロプロパン型脂肪酸を含む生物は報告されていない。著者は、大腸菌のシクロプロパン型脂肪酸合成酵素遺伝子 (*cfa*) をシアノバクテリアで発現し、膜脂質に含まれるオレイン酸がCfaにより炭素数19のシクロプロパン型脂肪酸に変換されることを見出した。さらに、シアノバクテリア内在性の脂肪酸不飽和化酵素の改変を施し、シクロプロパン型脂肪酸の含量を増加させることに取り組んだ。その結果、2つの*sn*-1位特異的な不飽和化酵素遺伝子 (*desA*, *desD*) の欠損と*sn*-2位特異的な不飽和化酵素 (*desC2*) の導入によって、細胞の全脂肪酸の3割を超えるシクロプロパン型脂肪酸を生産する細胞の作製に成功した。その過程で、導入し

たDesC2不飽和化酵素がsn-1位に結合する脂肪酸の構造を認識した上で、基質となるsn-2位の脂肪酸を不飽和化することを示唆する結果を得た。これらの結果は、脂肪酸不飽和化酵素の反応機構に新たな側面を提案するものであり、生化学的に貴重な情報である。

著者はまた、シクロプロパン型脂肪酸よりさらに安定なメチル化分岐脂肪酸の合成にも取り組んだ（第2章）。一部のバクテリアは、オレイン酸の $\Delta 9$ 位の二重結合にメチル基を転位し10位にメチル基が分岐した飽和脂肪酸10-メチルステアリン酸を合成する。10-メチルステアリン酸合成に関わるとして報告されていたメチル化酵素を大腸菌で異種発現しオレイン酸を与えて培養したが、目的の脂肪酸が得られなかったことから、新規修飾酵素の探索を試みた。ゲノム配列情報が公開されている様々なバクテリアのメチル化修飾脂肪酸と脂肪酸メチル化酵素遺伝子の系統的関係の解析から、候補遺伝子を推定した。病原性がなく微生物のナショナルバイオリソースから入手可能な*Mycobacterium chlorophenolicus*から、候補遺伝子をクローニングし大腸菌で異種発現しオレイン酸を与えて培養を試みたが、目的の10-メチルステアリン酸は生産できなかった。しかしながら、メチル化酵素遺伝子上流に酸化還元に関わると推定される機能未知の遺伝子が存在することに着目し、その機能未知タンパク質と当該メチル化酵素を共発現すると10-メチルステアリン酸が合成できることを示した。これまでの研究から10-メチルステアリン酸は、10-メチレンステアリン酸を中間体として二段階の反応で合成されることが示唆されており、当該メチル化酵素のみの異種発現では、中間体の10-メチレンステアリン酸が合成されることも明らかとした。これらの新規な10-メチルステアリン酸合成に関わる遺伝子群の発見とその機能解析は、メチル化修飾脂肪酸の合成に関する研究分野の発展に大いに貢献したと言える。また、著者は自らが同定した10-メチルステアリン酸の合成系をシアノバクテリアにも導入し、*in vivo*で合成されるオレイン酸から10-メチルステアリン酸を生産できることを示した（第3章）。この時、分岐鎖脂肪酸合成の中間体である10-メチレンステアリン酸の蓄積が生育を抑制したが、光合成や呼吸の活性は変化していなかった。これらの結果は、中間体の蓄積量を制御することにより生育の阻害を回避できる可能性を示すものである。

審 査 の 要 旨

本博士論文で著者は、光合成モデル生物のシアノバクテリアに外来の脂肪酸メチル化酵素遺伝子を導入し発現させることにより、新規なメチル化修飾脂肪酸（シクロプロパン型脂肪酸および分岐鎖脂肪酸）を *in vivo*で合成できること、またその時光合成機能が阻害されなかったことを示した。これらの結果は、天然に生育する光合成生物が生産しない高機能・高利用性の新規修飾脂肪酸を、光合成生物を用いて生産できる可能性を示したものであり、今後の当該分野の研究の発展に重要な示唆を与えたと言える。

平成30年1月15日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。