

氏名（本籍）	JUNAID MUHAMMAD		
学位の種類	博 士（ 学 術 ）		
学位記番号	博 甲 第 9877 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 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	Development of a reversible regulatory system for gene expression in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 by quorum-sensing molecules <i>N</i> -Acyl-homoserine lactones (AHLs) (アシルホモセリンラクトンを用いたシアノバクテリアの可逆的な遺伝子発現制御系の開発)		
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	筑波大学准教授	博士（理学）	中山 剛
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	豊福 雅典

論 文 の 要 旨

微細藻類は、油脂生産性が陸上植物より高いので、微細藻類由来の油脂・脂肪酸を用いたバイオ燃料生産による持続可能な社会の創造を目指した研究が注目を集めている。しかしながら、標的有用物質の生産とそれを生産する藻類細胞の増殖はトレードオフの関係にあり、生産性を増やす改変は細胞増殖を著しく抑制し、生育を改善すると標的物質の生産性は低下する。微細藻類の物質生産において、光合成による炭素固定の能力（インプット）が一定である限り、生産と増殖（アウトプット）はこの制約から逃れられない。最適な細胞増殖と生産性を維持するためには、遺伝子発現を制御して細胞増殖と物質生産のフェーズを切り替える必要があり、そのための人工的な遺伝子発現制御の仕組みの構築が必要である。これまでシアノバクテリアの中でいくつかの遺伝子発現制御系が構築されてきたが、可逆的な発現制御が可能な系はほとんどない。本論文で著者は、一部の真正細菌に見られるクオラムセンシングのシグナル分子であるアシルホモセリンラクトン（AHL）を感知するセンサータンパク質と、AHL を特異的に分解する酵素を用いてシアノバクテリア細胞で可逆的な発現制御系の開発を行った。

クオラムセンシングは、細胞外に分泌される自己誘引物質による細胞間コミュニケーション機構である。グラム陰性細菌では自己誘引物質として主にアシルホモセリンラクトンが使われ、海洋性グラム陰性細菌 *Vibrio harveyi* では細胞膜局在性センサータンパク質（LuxN）によって、*N*-3-hydroxybutanoyl-L-homoserine lactone (OHC4-AHL)が検知される。一方、*Vibrio anguillarum* ではLuxN のホモログの VanN が、*N*-3-hydroxyhexanoyl-L-homoserine lactone (OHC6-AHL)を検知する。LuxN と VanN は、二成分制御系のヒスチジンキナーゼと呼ばれるタイプのセンサータンパク質で、N 末端側の膜貫通ドメインで AHL を検知すると C 末端側のキナーゼドメインの活性が変化する。キナーゼドメインの構造はヒスチジンキナーゼの間で高く保存されており、別のヒスチジンキナーゼのキナーゼドメインと交換することで、応答するシグナルを交換したキメラセンサーを作製できることがわかっている。

著者は、本論文でシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 のリン酸欠乏センサーの SphS のシグナル検知ドメインを、LuxN、VanN のそれと交換したキメラ型の遺伝子を *Synechocystis* の細胞で発現させた。SphS はリン酸欠乏条件で、リン酸の高親和性輸送体やアルカリホスファターゼの発現を誘導する。LuxN と VanN の SphS とのキメラタンパク質が AHL に応答すれば、内在性のアルカリホスファターゼの発現が制御されると考えられる。LuxN とのキメラセンサーを導入した株は調べたどの条件においても、アルカリホスファターゼの活性は見られなかった。一方、VanN の SphS とのキメラタンパク質を発現した株では、アルカリホスファターゼの活性が常に発現しており、調べた6種の構造の異なる AHL のうち本来 VanN が検知する OHC6-AHL を培地に添加した時にだけ、アルカリホスファターゼの活性は有意に低下した。アルカリホスファターゼの活

性の抑制には 10 μ M の OHC6-AHL が必要であった。さらに著者は、アルカリホスファターゼをコードする *phoA* 遺伝子の転写産物量を逆転写 PCR 法で定量し、OHC6-AHL の添加後 60 分で *phoA* mRNA 量は 1/10 程に低下することを示し、VanN の SphS とのキメラタンパク質は遺伝子発現を速やかに制御できることを示した。

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 には内在性の AHL 分解系を有しないので、著者は海洋性 *Bacillus* 属の AHL の分解酵素 Aii20J 遺伝子を VanN の SphS とのキメラタンパク質を発現する株に導入した。Aii20J は多様な AHL 分子を基質として作用でき、極めて安定な酵素であることから選択した。この株では、添加する OHC6-AHL によりアルカリホスファターゼの発現が停止されるが、OHC6-AHL が時間とともに分解され失活するので、再度 *phoA* 遺伝子の活性化が起こり、活性の回復が見られると期待した。ところが通常の培養条件ではその回復が見られなかったので、筆者は毎日細胞濁度を一定になる様に調整し、細胞に十分な光照射量が得られる様な培養を行ったところ、OHC6-AHL の添加後 2 日後からアルカリホスファターゼの活性の回復が見られ、7 日後には元のレベルまで回復した。

本論文で著者は、クオラムセンシングのセンサーとそのシグナルである AHL、および AHL の分解酵素をシアノバクテリア細胞で組み合わせ、内在性遺伝子の発現を ON/OFF 制御する手法を構築した。シアノバクテリア細胞で AHL を用いた遺伝子発現制御系の構築は初めての試みである。将来的に、こういった仕組みを用いて物質生産に関わる遺伝子の発現を制御することで、細胞の増殖と物質生産のフェーズを制御することにより生産性の向上に発展できることが期待している。

審 査 の 要 旨

本論文で著者は、海洋性のバクテリアのクオラムセンシングのシグナル分子である AHL を認識するヒスチジンキナーゼと、シアノバクテリアのリン酸欠乏センサーである SphS とのキメラタンパク質を作製し、培地中への OHC6-AHL の添加によって、内在性のアルカリホスファターゼ遺伝子の発現を制御する系を構築した。さらにこの株に、AHL の分解に関わるラクトナーゼ遺伝子を導入し、OHC6-AHL で抑制された遺伝子発現が、一定時間後には OHC6-AHL が分解されて活性が回復する仕組みを構築した。これまでに構築されている人工的な発現制御系では一度シグナル分子を培養液に投与すると、その回収除去が困難で、培養期間中一度しか発現の制御ができずまた培養液の再利用も困難であった。本研究で著者が構築したシステムは、シグナル分子が細胞により分解され活性が回復するので、添加するシグナルの濃度によって制御する時間を自由に調節可能なシステムである。本研究の成果は、微細藻類による物質生産の効率の向上に貢献することが大いに期待できる。

令和 3 年 2 月 9 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。