

論文の内容の要旨

論文題目 好熱性シアノバクテリアにおけるセルロース合成の実証とセルロース大量生産系構築の試み

氏名 河野 祐介

緒言

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* strain RKN は低温光条件 (31 °C) で細胞凝集を生じる (Hirano et al. 1997)。凝集体では表面細胞のみが光を受け、細胞全体が感知する光量が減少する。そのため、細胞凝集は低温での光阻害を回避する応答と考えられている。また、この細胞凝集はセルラーゼ処理により解消されることが分かっている (Saotome 2005)。実際に、*T. vulcanus* には、セルロース合成酵素遺伝子の候補が 3 つ存在する (*Tvtll0007*, *Tvtlr1795*, *Tvtlr1930-33*)。 *Tvtlr1795* や *Tvtlr1930-33* を破壊しても低温光条件での細胞凝集への影響はなかったが、 *Tvtll0007* を破壊するとこの表現型が消失した。ゆえに、低温光条件で誘導される細胞凝集は、セルロースの蓄積により生じることが示唆されている。一般的に考えても、バクテリアの細胞凝集には、セルロースをはじめとする細胞外マトリックス構造体が細胞間ネットワークを形成している例は多い。本研究では、低温光凝集、セルロース蓄積、セルロース合成酵素遺伝子の関係を明らかにする目的で、*T. vulcanus* におけるセルロースの定量法を確立し、各セルロース合成酵素様遺伝子の破壊株における蓄積量の定量を試みた。

さらに、私は本研究の過程で、*T. vulcanus* が低温光条件でグリコーゲンを大量に蓄積することも発見した。そこで私は、このグリコーゲン蓄積を遺伝子工学的にセルロース蓄積に転化させ、セルロースの大量生産系を構築することを本研究の応用面の目的とした。この系は、バイオマスエタノールの原料である植物体セルロースの代替を目指している。今回、グリコーゲン合成系遺伝子の破壊によりセルロースの蓄積が増加するかを検証した。また、さらなる遺伝子工学デザインのために、この株の炭素プールの変動、細胞状態の変化についても検討した。

結果・考察

好熱性シアノバクテリアにおけるセルロース生合成の実証

最初に、*T. vulcanus* におけるセルロース定量法の検討を行った。セルロース定量は、セルラーゼ処理により遊離するグルコース当量として測定した。このグルコース定量の特異性は、類似の糖（ガラクトース、マルトース、セロビオース）がほとんど検出されないことで確認された。*T. vulcanus* のセルロース蓄積は極微量であったため、共存する他の多糖類などによる定量への影響が生じる可能性があった。したがって、細胞から粗精製したセルロース画分をセルロース検出に供した。粗精製は、細胞破碎、界面活性剤に可溶性物質の除去、タンパク質の除去、グリコーゲンの除去の順ですすめ、残った不溶物を遠心回収して行った。この方法で、低温光凝集した細胞をセルラーゼ処理すると遊離グルコースが検出された。この反応は 96 時間で完了を確認したので、これを定量法の処理時間とした。なお、一般にセルロース粗精製で利用される酢酸硝酸処理（結晶性セルロース以外のほとんどの多糖類を除去する一方で非結晶性セルロースも同時に除去してしまう）を今回の手順に導入すると、セルロース定量値は約 70% も減少した。これは、シアノバクテリアの合成するセルロースが非結晶もしくは低結晶性であることを示唆しているが、未検証である。今回は、非結晶性セルロースを含めた総量を測定する目的で、酢酸硝酸処理は採用しなかった。

T. vulcanus のセルロース蓄積量は、通常条件（45 °C、光）では $5 \mu\text{g cells}^{-1}$ (4×10^9) で細胞乾重量の約 0.01% であった。一方、低温光条件では 8 時間で既にセルロース蓄積が誘導され、24 時間で 2 倍に達し、以降はそのレベルを保った。この誘導は細胞凝集の誘導より先行していた。近縁種 *T. elongatus* の場合、通常条件では *T. vulcanus* と同等の蓄積であったが、低温光条件での誘導がみられなかった。これは、*T. elongatus* がこの条件で細胞凝集を生じない表現型と一致している。すなわち、低温光条件でのセルロース蓄積の誘導が、*T. vulcanus* の細胞凝集の要因であることが強く示唆された。セルロース合成酵素様遺伝子破壊株では、*Tvtll0007* 破壊株もしくはセルロース合成酵素様遺伝子の三重破壊株は低温光条件でのセルロースの蓄積誘導が消失した（図 1）。逆に、*Tvtlr1795* や *Tvtlr1930-33* 破壊株での蓄積誘導は野生株とほぼ同様のままであった。結論として、*Tvtll0007* がセルロース合成酵素遺伝子であること、そのセルロース合成が低温光条件での細胞凝集の主要な要因であることが示された。なお、プロテオバクテリア以外のバクテリアでのセルロース合成酵素遺伝子の実験的な同定は、本研究が初めての報告である。

好熱性シアノバクテリアにおけるセルロース大量生産系構築への試み

低温光条件の *T. vulcanus* では上記セルロース生合成の活性化に加え、このセルロースの 1000 倍以上に達するグリコーゲン蓄積の誘導も生じていた。この誘導は、低温光条件下で生育が制限された結果として、過剰になった光合成産物の貯蔵機能であると考えられている。私は、このグリコーゲン蓄積をセルロース蓄積へと転化する目的で、グリコーゲン合成系遺伝子 *glgC*（グルコース 1-リン酸から ADP グルコースを生成、図 2）の破壊株を作製した。*glgC* 破壊株では、野生株が低温光条件で生じるグリコーゲン蓄積が消

失っていた。すなわち、グリコーゲンへの大量の炭素フローを遮断することができた。

しかし、*glgC*破壊株では、低温光条件での生育が著しく阻害されてしまう問題が生じた。この株は、この条件で細胞凝集は生じていたが、野生株で生じる細胞の黄化（ブリーチング）がほとんど生じなかった。ブリーチングは、一般的に環境中の栄養（例えば窒素源）の制限時に起こる現象である。その意義は、細胞内に大量に存在する集光性色素タンパク質であるフィコビリソームを分解し、得られるアミノ酸を生育へ転用することであると考えられている。*glgC*破壊株では、この窒素制限条件下でも同様に生育阻害が起こったため、フィコビリソームの分解あるいはその後の窒素代謝の欠陥が示唆される。そこで、培養窒素源を硝酸化合物からアンモニウム塩にすると、*glgC*破壊株の低温光条件での生育はやや回復した。

この条件での *glgC* 破壊株のセルロース蓄積は野生株と比較して増加していた。これは、*glgC* 破壊によりグルコース 1-リン酸から UDP グルコースを経由したセルロース合成経路の代謝フローが増加したことを示唆する。ただし、このセルロース増加量は野生株で蓄積するグリコーゲン量を基準とすると少量であった。すなわち、グリコーゲン合成の遮断による潜在的な代謝フローが十分にセルロースまで達しなかったことを意味する。UDP グルコース経由で蓄積がありそうなスクロースは、*glgC* 破壊株でも大量には蓄積していなかった。よって、この潜在的な代謝フローは未知の経路へと流れてしまった可能性がある（図 2 の?）。セルロースのさらなる増産には、この未知の代謝フローの探索・遮断と同時に、UDP グルコースピロホスホリラーゼ（Ugp）やセルロース合成酵素の強制発現や活性化も検討する必要がある。

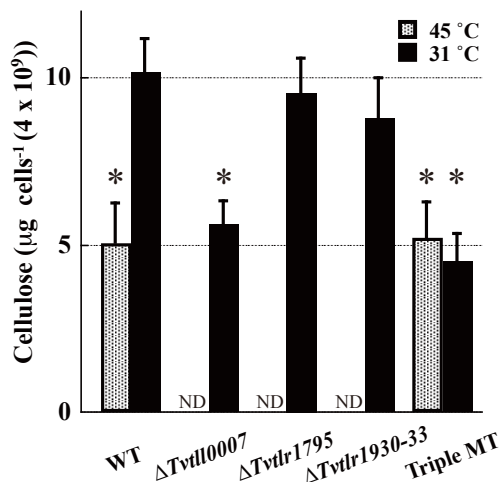


図 1 *T. vulcanus* の各セルロース合成酵素遺伝子破壊株のセルロース蓄積
45 °C もしくは 31 °C で 72 時間培養時の平均値 (n > 4)
誤差は標準誤差
*: WT, 31 °C と有意差あり ND; 未測定

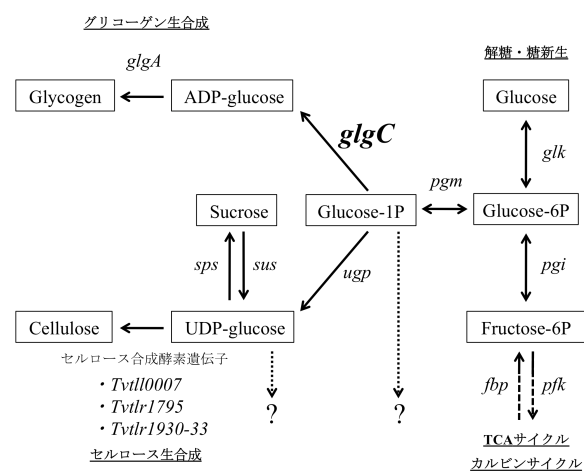


図 2 セルロースとグリコーゲンの生合成代謝経路

参考文献

- Hirano, A., Kunito, S., Inoue, Y. and Ikeuchi, M. (1997) Light and low temperature induced cell flocculation of thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiol* 38: s37.
- Saotome, T. (2005) シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* RKN におけるセルロース合成酵素様遺伝子の解析. *Master thesis*.