

論文提出者：河野祐介

光合成のバイオマス生産の改良は、エネルギー問題、食糧問題やグローバルウォーミングなどの環境問題などを根本的に解決するための重要な課題であり、昨今、様々なアプローチで研究されている。本研究では、シアノバクテリアにおいて初めてセルロース合成酵素の同定に成功し、これを利用してセルロース生産に向けた試みを行った。セルロースは植物の細胞壁成分として、地球上でもっとも多く存在する有機物であるが、多くの細菌や一部の動物（ホヤなど）にも分布しており、バイオフィルムや細胞骨格などとして多様な役割を果たしている。セルロースには、結晶性があり、親水性と疎水性を合わせもち、紙や布などの素材として幅広く利用されている。本研究では、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* strain RKN が低温・光条件で細胞凝集すること、この凝集体がセルラーゼで解消されること、セルロース合成酵素様遺伝子 *Tvtll0007* の破壊株では凝集体を形成できないことなど、所属研究室の先行研究に基づいて、セルロース合成の実証と増産の研究を行った。論文の第1章では、全体の背景を概説し、第2章ではセルロース生合成の実証を行い、第3章ではセルロースの増産を試行し、第4章で全体のまとめと展望について述べている。研究の詳細は以下の通りである。

第2章「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」について。微量セルロースの定量法を、粗精製法とセルラーゼ処理、酵素的グルコース定量法を組み合わせ、確立した。この方法によって、凝集細胞と非凝集細胞には、それぞれ約 $10 \mu\text{g}/4 \times 10^9 \text{ cells}$ と $5 \mu\text{g}/4 \times 10^9 \text{ cells}$ のセルロースが蓄積していることを示した。また、凝集のタイムコースを調べ、処理開始8時間で蓄積の増加が認められ、約24時間で完了すること、つまり、凝集のタイムコースにやや先行することを示した。3種のセルロース合成酵素様遺伝子の破壊株の細胞を 31°C 光 72 時間処理後に分析し、凝集能を失った *Tvtll0007* 破壊株ではセルロース蓄積は完全に抑えられたが、*Tvtlr1795* 破壊株や *Tvtlr1930-33* 破壊株ではセルロース蓄積は野生株と同様に進行した。また、これらの3重破壊株でもセルロース蓄積は *Tvtll0007* 破壊株と同様であった。この結果から、

TvtII0007 はセルロース合成酵素をコードする遺伝子であると結論した。一方、他の2種はこれと相同性は高いが、その機能はまだ不明である。*TvTII0007* タンパク質は、酢酸菌のセルロース合成酵素に保存されたモチーフや酵素活性を活性化する *PilZ* ドメインをもつが、従来知られているグループとは異なるグループに属する初めてのものであり、シアノバクテリアや藻類において初めて同定されたものである。また、蓄積したセルロースを *calcofluor* 染色や走査型電子顕微鏡観察によって確認した。これらに結果から、*TvTII0007* が低温・光条件で合成するセルロースが細胞凝集を引き起こしていることが明らかになった。

第3章「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の試み」について。セルロース定量と平行して、簡便なグリコーゲン定量法を確立し、セルロースが蓄積する条件で、大量にグリコーゲンも蓄積していることを見出した。その量は約 $35 \text{ mg}/4 \times 10^9 \text{ cells}$ であった。このグリコーゲン蓄積をセルロース蓄積に転用することを目指して、グリコーゲン合成の基質 ADP-グルコースを合成する酵素 *GlgC* の遺伝子を破壊した。この破壊株は全くグリコーゲンを蓄積せず、代わりにセルロース蓄積が約2倍に増加した。また、有力な有機炭素であるスクロースは破壊株では全く検出されなかった。このことは、細胞内の炭素フローのごく一部をセルロース蓄積に転用できたが、大半は回収できていないことを示す。また、*glgC* 破壊株 31°C での増殖が非常に遅かった。窒素源となる硝酸イオンの取り込みが悪いためといわれているため、尿素やアンモニアを供給して、増殖がわずかに回復することを確かめた。また、 45°C であっても、窒素分の供給を止めると、*glgC* 破壊株の増殖が停止すること、細胞のクロロフィルやフィコビリ色素含量が低下しなかったことが示された。これは、*glgC* 破壊株の代謝調節に異常が出ていることを示している。

なお、第1章の約半分は、早乙女敏行、落合有里子、片山光徳、成川礼、池内昌彦との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究の立案、遂行を行っており、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上の結果は、シアノバクテリアにおいて初めてセルロース合成酵素の同定に成功し、これを利用してセルロース生産に向けた試みを行った点で、光合成の基礎研究と応用研究の両面で大きな貢献をするものと認められる。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。