

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	第	号
------	---	---

氏 名 吉田 稜

論 文 題 目

超好熱性アーキアが生産する長鎖アーキア膜脂質に関する研究

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	邊見 久
委 員	名古屋大学教授	吉村 徹
委 員	名古屋大学教授	浅川 晋
委 員	名古屋大学准教授	岩崎雄吾
委 員	名古屋大学教授	堀 克敏

論文審査の結果の要旨

アーキアは、バクテリアや真核生物と並ぶ第三の生物ドメインを形成する微生物群であり、その多くが、高温や、酸性、高塩濃度といった極限環境から単離される。アーキアをその他の生物と区別する顕著な特徴が、アーキアが生産する膜脂質の構造である。最も典型的なアーキア膜脂質である C20, C20 アーキア膜脂質は、二本の完全還元された炭素数 20 (C20) のイソプレノイド鎖が疎水部としてグリセロール骨格にエーテル結合している。アーキア膜脂質は酸に分解されにくいという特徴や、極限環境でも高いバリアー機能を発揮する細胞膜を形成するという性質を有しており、アーキア膜脂質の生産はアーキアの極限環境への重要な適応機構の一つであると思われる。さらに、アーキア膜脂質は種によって合成される構造が異なっており、それぞれが、その種の生育環境に対する適応機構として働いていると考えられる。例えば、超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* は C20, C20 アーキア膜脂質よりも長い C25 の疎水鎖を二本持つ、所謂 ”長鎖アーキア膜脂質”、C25, C25 アーキア膜脂質を生産する。この厚い細胞膜を形成する膜脂質の生産は、同菌が高温環境に生育するために重要であると思われる。しかし、C25, C25 アーキア膜脂質の生合成経路や、細胞に与える影響はほとんど分かっていなかった。本論文は、未解明である C25, C25 アーキア膜脂質の生合成経路を明らかにし、さらに同経路を大腸菌に導入して同脂質を大量に生産する大腸菌株を構築し、同株の表現型の試験を通して、長鎖アーキア膜脂質の生産が細胞に与える影響を解明することを目指し、以下の章立てで実施された研究をまとめたものである。以下に各章において得られた成果を要約する。

第 2 章 C25, C25 アーキア膜脂質の生合成経路の解明および大腸菌での合成

最も典型的なアーキア膜脂質と言える C20, C20 アーキア膜脂質の生合成経路はすでに解明されており、二本の C20 のプレニル基が 2 種類のプレニル転移酵素によってグリセロール-1-リン酸 (G1P) に転移された後、還元酵素によって二重結合が完全に還元される。未解明であった C25, C25 アーキア膜脂質も類似のメカニズム、つまり C20 の代わりに C25 のプレニル基が転移され、還元されて合成されると推測した。そこで、*A. pernix* のゲノムから、C20, C20 アーキア膜脂質の生合成に関わる 2 種類のプレニル転移酵素のホモログ遺伝子を探索した。それぞれの遺伝子を、大腸菌を用いて組換え発現させ、精製した。それぞれの酵素の基質特異性を、放射性基質を用いた *in vitro* アッセイによって検証し、どちらの酵素も C25 のプレニル基をグリセロール骨格に転移することを明らかとした。さらに、二重結合が残る C25, C25 アーキア膜脂質の生合成経路を大腸菌に導入して、同脂質を生産する大腸菌株を構築した。同株に、既知の C20, C20 アーキア膜脂質還元酵素の *A. pernix* におけるホモログ遺伝子を導入した。同株の脂質を分析することで、*A. pernix* における還元酵素の還元活性を *in vivo* で検証した。結果、大腸菌内では完全還元された C25, C25 アーキア膜脂質が

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

生産されており、同酵素が C25 のプレニル基を完全に還元する酵素であることが明らかとなった。

第 3 章 大腸菌へのアーキア型メバロン酸経路の導入

第 2 章で構築した C25, C25 アーキア膜脂質を生産する大腸菌株は、同脂質の生産が細胞に与える影響を調べるための基盤となることが期待された。しかしながら、その生産量は微量であり、その生産が大腸菌に与える影響が確認できなかった。その理由として、大腸菌において非メバロン酸経路を通して作られるイソプレノイド前駆体、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) とイソペンテニルニリン酸 (IPP) の生産量が不足していることが考えられた。そこで、近年新たに見つかったイソプレノイド前駆体の生合成経路であるアーキア型メバロン酸 (MVA) 経路を大腸菌に導入することで、大腸菌のイソプレノイド生産を増加させることを目指した。そこで、常温性アーキア *Methanosarcina mazei* 由来、または超好熱性アーキア *A. pernix* のアーキア型 MVA 経路における MVA 以降の遺伝子を発現させるプラスミドを構築した。構築したプラスミドを定量が簡便なイソプレノイドである赤色色素のリコペンを生産する大腸菌株に導入し、そのリコペン生産量を測定することで、同株のイソプレノイド生産を評価した。アーキア型 MVA 経路の MVA 以降の反応を大腸菌内で進行させるため、菌体に取り込まれ MVA を与えるメバロノラクトン (MVL) を添加した培地で、これらの株を好気培養した。結果、各株のリコペン生産量は、MVL を加えない培地で培養した株の生産量とほとんど変わらなかった。この結果は、アーキア型 MVA 経路は好気条件では機能しないことを示唆している。そこで次に、各株を準嫌気条件で培養し、リコペン生産量を測定した。その結果、常温性アーキア *M. mazei* のアーキア型 MVA 経路を発現するプラスミドを持つ大腸菌株の、MVL 添加培地でのリコペン生産量は、MVA 非添加培地での生産量と比べて大幅に向上した。これは、大腸菌内で再構築された *M. mazei* のアーキア型 MVA 経路によって大腸菌のイソプレノイド生産が強化されたことを示している。そこで、同経路を C25, C25 アーキア膜脂質生産株に導入し、同脂質の増産を試みた。しかし、その生産量はわずかにしか増加しなかった。

第 4 章 C25, C25 アーキア膜脂質の生産が引き起こす大腸菌表現型の調査

第 3 章では、アーキア型 MVA 経路を大腸菌に導入することで大腸菌のリコペン生産の増強には成功したものの、C25, C25 アーキア膜脂質の大幅な増産には至らなかった。その理由として、アーキア型 MVA 経路は準嫌気状態でしか機能せず、大腸菌の培養条件の制御が極めて難しいことや、アーキア型 MVA 経路を大腸菌内で構築するには多くの遺伝子を過剰発現させる必要があり、大腸菌細胞に大きなエネルギー的負荷がかかることなどが考えられた。そんな中、培地に添加されたイソプレノールと

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

プレノールから、わずか2つのリン酸化酵素によってイソプレノイド前駆体を合成する経路、イソプレノール利用 (IU) 経路が開発された。この経路は、たった2種類のキナーゼの遺伝子導入によって大腸菌内で構築することができ、大腸菌にかかる異種発現の負荷を大幅に抑制できると期待される。そこで、これらの2種類のキナーゼの遺伝子を C25, C25 アーキア膜脂質生合成経路発現プラスミドに挿入し、大腸菌を形質転換した。同株をイソプレノール・プレノール添加培地で培養し、脂質を分析した結果、同脂質の生産量はイソプレノール・プレノール非添加培地で培養したものの生産量と比べて約 10 倍向上した。さらに、同株の C25, C25 アーキア膜脂質が大腸菌脂質全体に占める割合を換算すると、約 11%を占めるまでに向上していた。そこで、同脂質の生産が大腸菌の表現型に何かしらの影響を与えている可能性があると考え、同株の有機溶媒耐性試験を実施した。その結果、C25, C25 アーキア膜脂質生産株は、1-ブタノールや 1-ペンタノールに対して高い耐性を示し、同脂質の生産が大腸菌の有機溶媒耐性の向上に寄与していることが明らかとなった。また、そのメカニズムを解明するべく、同株の細胞膜の流動性や透過性といった物理的な性質を調査した。その結果、同株の細胞膜の流動性は C25, C25 アーキア膜脂質を生産しない株のものとほとんど差は見られなかった。一方で、1-ブタノール存在下での同株の細胞膜の透過性は、同脂質を生産しない株のものよりも有意に低下していた。つまり、同株の有機溶媒耐性が向上した理由は、C25, C25 アーキア膜脂質によって大腸菌の細胞膜が有機溶媒存在下でも透過性を低く保ち続けられるように " 強化 " されたためであると示唆された。

第 5 章 非天然型 C25, C30 アーキア膜脂質の人工生合成経路の構築

第 5 章では、更に高いバリアー機能を有し、高い有機溶媒耐性を付与する可能性のあるアーキア膜脂質を生合成することを目標に、C25, C25 アーキア膜脂質よりも、さらに長鎖の疎水部を持つアーキア膜脂質の人工生合成経路の構築を目指した。同経路を構築するため枯草菌 *Bacillus subtilis* が持つ PcrB と呼ばれるプレニル基転移酵素に着目した。同酵素は C30 及び C35 のプレニル基を G1P に転移することが知られている。そこで、同酵素を用いて放射標識した C30 や C35 のプレニル基が G1P に転移された化合物を合成し、それらを用いて、本来 C25 のプレニル基を転移する酵素が C30 基質を受け入れるかを *in vitro* アッセイで検証した。その結果、同酵素は C30 基質を受け入れて、非天然型の C25, C30 アーキア膜脂質を合成できることが明らかとなった。さらに、この非天然型脂質の生合成経路を人工的に設計し、同経路を組み込んだプラスミドで大腸菌を形質転換した。同株の脂質を分析したところ、期待通り、C25, C30 アーキア膜脂質が検出され、非天然型長鎖アーキア膜脂質を生産する大腸菌株の構築に成功していることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、C25, C25 アーキア膜脂質の生合成経路を解明し、同脂質を大量に生産する大腸菌株を構築することにより、同大腸菌株が野生株よりも高い有機溶媒耐性を有することを示した。また、より高い有機溶媒耐性を付与する可能性のある非天然型長鎖アーキア膜脂質を生産する大腸菌株の構築にも成功した。これらは長鎖アーキア膜脂質が生細胞に与える影響を解明した初めての研究であり、アーキアの極限環境への適応メカニズムを解明する重要な基盤となるだろう。また、本研究で得られた知見は、バイオ燃料や医薬品といった疎水性有用化合物の微生物生産において、疎水性化合物によって宿主微生物の細胞膜が破壊されるという細胞毒性を緩和する新たな方法の開発につながると期待される。上記の高い新規性と独自性を有する成果を含むことから、本論文は高度の学術的価値を有し、かつ農学分野に関する学術研究に大きく貢献するものであり、博士（農学）の学位にふさわしい内容と認められる。