

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	外来遺伝子を残さない遺伝子工学的手法による ALA 高生産光合成細菌の構築
Title(English)	
著者(和文)	小島拓真
Author(English)	Takuma Kojima
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12561号, 授与年月日:2023年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:増田 真二,和地 正明,福居 俊昭,田中 寛,八波 利恵
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12561号, Conferred date:2023/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

2023 年度

博士学位論文

外来遺伝子を残さない遺伝子工学的手法による
ALA 高生産光合成細菌の構築

東京工業大学 生命理工学院

生命理工学系 生命理工学コース

博士課程 小島 拓真

指導教官 増田 真二

目次

要約	3
Abstract	4
第 1 章 緒言	5
1.1 5-アミノレブリン酸 (ALA)	5
1.2 ALA 生合成経路	5
1.3 ヘム合成経路	6
1.4 ALA の用途開発	6
1.4.1 ヒトへの応用	6
1.4.2 動物への応用	8
1.4.3 植物への応用	8
1.5 光合成細菌	9
1.5.1 ALA 合成酵素 (ALAS)	9
1.5.2 PrrA/PrrB 二成分制御系	9
1.5.3 rRNA オペロン	10
1.5.4 プロモーター	10
1.6 ALA 生産菌の研究開発	11
1.6.1 ALA 工業生産菌の開発	11
1.6.2 突然変異誘発による育種の弊害	12
1.7 リン酸化模倣体	13
1.8 遺伝子組換えとセルフクローニング	13
1.9 本研究の目的	13
第 2 章 PrrA/PrrB 二成分制御系への点変異の導入	25
2.1 導入	25
2.2 実験方法	25
2.2.1 <i>C. sphaeroides</i> のゲノムの組換え方法	25
2.2.2 点変異株の作製用プラスミドの作製	26
2.2.3 点変異株の作製	26
2.2.4 吸光スペクトルの測定	27
2.2.5 ALA 発酵試験	27
2.3 結果	28
2.3.1 バクテリオクロロフィル <i>a</i> の合成確認	28
2.3.2 ALA 生産性評価	28
2.4 考察	29
2.4.1 光合成遺伝子の活性化の確認	29
2.4.2 ALA 低生産性の原因	29

2.5 まとめ.....	30
第3章 ALAS 遺伝子上流への高活性プロモーターの挿入.....	40
3.1 導入.....	40
3.2 実験方法.....	40
3.2.1 プロモーター挿入株の作製.....	40
3.2.2 遺伝子発現定量.....	41
3.2.3 ALAS 活性測定.....	41
3.2.4 ALA 発酵試験.....	41
3.3 結果.....	41
3.3.1 プロモーターの機能確認.....	41
3.3.2 ALAS 活性測定.....	42
3.3.3 ALA 生産性評価.....	43
3.4 考察.....	43
3.4.1 プロモーター機能の確認.....	43
3.4.2 ALAS 低活性の原因.....	44
3.4.3 ALA 生産性の向上.....	44
3.4.4 ALA 生産中の ALAS 活性の向上.....	45
3.5 まとめ.....	46
第4章 結言.....	61
参考文献.....	64
略語等一覧.....	74
謝辞.....	75

要約

5-アミノレブリン酸(ALA)は生体内で合成される天然のアミノ酸である。ALA は ATP 合成に必要なヘムの必須の前駆体であるため、ほぼ全ての生物の細胞内で合成される。また、ヘム合成経路では ALA 合成が律速段階となっているため、細胞外から ALA を供給することでヘム合成経路を活性化することができる。現在、ALA はヒト向けのがんの診断や光線治療のほか、サプリメントや化粧品にも利用されている。その他、ALA は動物向けの飼料や植物向けの肥料など幅広い分野で利用されている。現在、ALA は人工的な突然変異誘発により育種された光合成細菌 *Cereibacter sphaeroides* を用いた発酵によって工業的に製造されている。その安全性から、日本国内においては光合成細菌によって作られた ALA のみが食品として認められている。食品等の製造、販売に際しては安全性の厳密な評価が義務付けられており、遺伝子組換え体による ALA の工業的生産系の構築はハードルが高い。そこで本研究では更なる ALA の生産性向上のため、最終的に得られた株が法律上は遺伝子組換え体とは見做されない 2 つの異なるアプローチで新規 ALA 生産菌の開発を試みた。*C. sphaeroides* の ALA 合成は ALA 合成酵素(ALAS)によって触媒される。そこで ALAS を高発現させることで *C. sphaeroides* の ALA 生産性を向上させることができると考えた。*C. sphaeroides* の ALAS は *hemA* 及び *hemT* 遺伝子にコードされている。*hemA* 遺伝子の発現は酸化還元センサーである PrrA/PrrB 二成分制御系に制御されているのに対し、*hemT* 遺伝子はサイレントで、ほとんど転写されていない。そこで PrrA 及び PrrB が恒常的に活性化になる点変異を導入し、HemA を高発現させることで、ALA 生産量の増加を試みた。細胞粗抽出物の吸光スペクトルを測定することで点変異を導入した株の光合成遺伝子の発現の活性化状態を確認した。通常、光合成遺伝子の発現が活性化する好気条件においても、PrrA 点変異株ではカロテノイドやバクテリオクロロフィルの合成が抑制されていた。PrrA の恒常的活性化を引き起こすと考えられる点変異は近縁種である *Rhodobacter capsulatus* を用いた研究が土台となっていたため、*C. sphaeroides* ではこの点変異の影響が作用しなかった可能性が考えられた。一方 PrrB の恒常的活性化を引き起こすと考えられる点変異株では、通常、光合成遺伝子の発現が抑制される好気条件でもカロテノイドとバクテリオクロロフィルが合成された。しかし、ALA 蓄積量は WT 株よりも低かった。PrrB レギュロンにはヘム合成経路で機能する他の遺伝子も含まれるため、PrrB 点変異株では、ヘム合成経路全体が活性化し、ALA 代謝も活性化してしまった可能性が考えられた。そこで、より直接的に ALAS 遺伝子の転写量を増加させるため、2 種類の高発現プロモーターを ALAS 遺伝子上流に挿入した株を作製した。*C. sphaeroides* 内で 2 番目に高活性なプロモーターである P_{rsp_7571} を挿入した株では、期待に反し遺伝子発現量が増加しなかった。菌株のバックグラウンドや培地成分等の違いにより、本研究においては低活性であったと考えられた。対してリボソーム RNA のプロモーターの一つである P_{rrnB} を挿入した株では挿入した全ての遺伝子の発現量が増加した。しかし P_{rrnB} を *hemA* 遺伝子に挿入した株では、おそらく *hemA* 下流の遺伝子の高発現により代謝の変化が生じたため、ALA 蓄積量は期待に反して WT 株よりも低下していた。対して P_{rrnB} を *hemT* 遺伝子に挿入した株では ALA 生産中の ALAS 活性が低下することなく増加し続け、培地中の ALA 蓄積量は WT 株の 12 倍に向上し、新規 ALA 高生産菌の開発に成功した。

Abstract

5-Aminolevulinic acid (ALA) is a precursor of heme and a natural amino acid synthesized in the cells of most living organisms. Since ALA is an essential precursor for heme, which is necessary for cellular energy production, it is synthesized in the cells of almost all organisms. The ALA synthesis is the rate-limiting step in the heme synthesis pathway; thus, heme synthesis can be activated by adding ALA from outside of the cells. Currently, ALA is utilized and consumed as an ingredient in pharmaceuticals, supplements, cosmetics, feed, fertilizers, and other products. ALA is mainly produced by industrial fermentation by the photosynthetic bacterium *Cereibacter sphaeroides*. In this study, two genetic strategies were used to improve ALA production by *C. sphaeroides* in a method that does not leave exogenous genes in the final strain for use in the food industry.

In one strategy, we introduced dominant-positive point mutations in the response regulator PrrA and the sensor kinase PrrB that positively regulate expression of ALA synthases (ALAS). We first checked whether photosynthetic genes in the point mutant strains were activated by measuring the absorbance spectra of crude cell extracts to confirm the synthesis of the photosynthetic apparatus harboring carotenoids and bacteriochlorophylls. Under semi-aerobic growth conditions, where photosynthetic genes are activated, carotenoids and bacteriochlorophylls were synthesized only in the WT and PrrB point mutants, but were suppressed in the PrrA point mutant. Even under aerobic conditions, where photosynthetic genes are normally suppressed, carotenoids and bacteriochlorophylls were synthesized in the PrrB mutant. However, when ALA productivity was evaluated, neither point mutant accumulated higher levels of ALA than those in the WT. The PrrA point mutation may not let it be in the dominant active form in *C. sphaeroides*, not as in the closely related species *Rhodobacter capsulatus*; the corresponding point mutation in *R. capsulatus* PrrA homolog let it be in the dominant active form. On the other hand, the PrrB point mutation results in activated not only ALA synthesis, but also heme synthesis pathway itself, so that ALA could not be accumulated.

In the other strategy, we inserted a constitutive promoter (P_{rrnB} or P_{rsp_7571}) upstream of genes encoding ALAS (*hemA* and/or *hemT*) to construct strains that constitutively express ALAS. The highest transcript levels of *hemA* were observed in the strain in which P_{rrnB} was inserted into the *hemA* promoter region; the strain showed 3.5-fold higher levels of *hemA* transcripts than those in the WT. The highest transcript levels of *hemT* were observed in the strain in which P_{rrnB} was inserted into the *hemT* promoter region; the strain showed 46-fold higher levels of *hemT* transcripts than those in the WT. The maximum ALAS activity was observed in crude cell extracts of the strain in which P_{rrnB} was inserted into the *hemT* promoter region under optimized growth conditions that was 2.7-fold higher than that in the WT. This strain showed 12-fold accumulation of ALA compared to the WT. Thus, we improved ALA productivity without using exogenous DNA sequences. In the future, this strain will be studied in fermenter-based trials to optimize ALA production.

第1章 緒言

1.1 5-アミノレブリン酸(ALA)

5-アミノレブリン酸(ALA)は細胞内で合成される天然のアミノ酸である(図 1-1). 細胞のエネルギー生産に必要なヘムに必須の前駆体であることから, ほぼ全ての生物の細胞内で合成されている. ALA の合成はヘム合成経路の初期段階の反応であり, この ALA 合成がヘム合成経路において律速段階である(Li et al., 1989). ヘム合成経路において計 8 分子の ALA からテトラピロールが合成される. このテトラピロールの中心にマグネシウムイオンが配位して代謝されるとクロロフィルになり, 主に光合成で光エネルギーを吸収する光アンテナとして働く. また, テトラピロールの中心に鉄イオンが配位して代謝されるとヘムになり, 主に電子伝達系でシトクロムの補因子として働く. 全ての生物の細胞は電子伝達系により細胞内エネルギー通貨である ATP を合成するため, 電子伝達系に必須の補因子であるヘムの必須の前駆体である ALA は生物の生育に必要なアミノ酸である. ヘム合成経路において ALA の合成が律速であることから, 細胞外から ALA を投与することでヘム合成能を向上させることができ, これによる様々な効果を期待してヒト, 動物, 植物向けに製品として利用されている. ALA は全ての細胞内に存在する天然アミノ酸であることから細胞毒性が低く, 安全なアミノ酸として利用されている.

1.2 ALA 生合成経路

生物における ALA の生合成は大きく 2 つの ALA 生合成経路に大別される(図 1-2). グルタミン酸を基質とする C5 経路と, グリシンを基質とする C4 経路(Shemin 経路)が知られている.

多くの細菌や古細菌, 真核生物の中でも植物細胞のプラスチド内で保存されている C5 経路では炭素数が 5 つのグルタミン酸を基質として 3 段階の反応で ALA を合成する(Mayer and Beale, 1990)(図 1-2). まずグルタミル tRNA シンターゼがグルタミン酸を基質とし, ATP を消費してグルタミル tRNA を合成する. 次にグルタミル tRNA レダクターゼがグルタミル tRNA を tRNA とグルタミン酸-1-セミアルデヒドに分解する. 最後にグルタミン酸-1-セミアルデヒドアミノムターゼがグルタミン酸-1-セミアルデヒドのアミノ基を転移し, ALA を合成する.

プラスチドを持たない真核生物のミトコンドリアや, 真核生物のミトコンドリアの祖先であると考えられている α -プロテオバクテリアでのみ保存されている C4 経路(Shemin 経路)では ALA 合成酵素(ALAS)が, 炭素数が 4 つのスクシニルコエンザイム A (CoA)とグリシンを縮合して 1 段階の反応で ALA を合成する(Shemin and Russell, 1953). 一説によると, ALA と類似した構造を持ち, ポルフォビリノーゲン(PBG)合成酵素(PBGS)を阻害する抗生物質であるアラレマイシンの合成酵素 Alma が ALAS の進化の起源であると考えられている(Kawaguchi et al., 2022). α -プロテオバクテリアに属する光合成細菌はこの C4 経路で ALA を合成している.

尚, 動物細胞に植物細胞(藻類)が共生して誕生したと考えられているミドリムシ(*Euglena* 属)ではミトコンドリア内に C4 経路が, プラスチド内に C5 経路が保存されている.

1.3 ヘム合成経路

ALA 合成以降のヘム合成経路は全ての生物において高度に保存されている(図 1-3). C4 経路又は C5 経路で合成された 2 分子の ALA は, PBGS によりピロール環構造を持つ PBG に不斉縮合される. 以降は 5 段階の反応によりプロトポルフィリン IX (PpIX) が合成され, フェロキターゼにより鉄が配位することでヘムに, マグネシウムキターゼによりマグネシウムが配位することでクロフィルの前駆体であるマグネシウム PpIX になる. 尚, 中間体であるウロポルフィリノーゲン III からはシステイン合成に関与するシロヘムやビタミン B12 が生合成される. 細胞内で不要になったヘムはヘムオキシゲナーゼにより分解されビリベルジンになり, 更にビリベルジンレダクターゼによりビリルビンに還元される. ビリルビンは抗酸化作用を持つウロビリノーゲンへと還元される.

1.4 ALA の用途開発

ALA の用途開発研究は除草剤に始まった (Rebeiz et al., 1984). マグネシウム制限下において ALA を植物に投与すると, 細胞内で代謝され PpIX として蓄積する. PpIX に光が当たることによって活性酸素が生じ, これによる酸化損傷により植物を枯死に至らす. ALA そのものは生物由来の天然アミノ酸であるため生分解性が高く, 毒性がないため, 土壌中に残存しない安全な農薬として研究されていた. 同様のメカニズムで殺虫剤の研究開発や (Rebeiz et al., 1988), がん細胞に ALA を塗布し, 光を当ててがん細胞を死滅させる光線力学治療が開発された (Kennedy et al., 1990). その後, ALA の研究が進むにつれその多様な機能と安全性が認知されるとともに, ALA の発酵生産方法の確立により広い分野で様々な製品として ALA は利用されている.

1.4.1 ヒトへの応用

がん細胞の特殊な代謝により, がん細胞に投与された ALA はヘムまで代謝されずに前駆体である PpIX として蓄積することが知られている (Fukuda et al., 1992). PpIX は紫色の光を当てることで赤色蛍光を発するため, これを利用してがん細胞のみを蛍光標識する光線力学診断薬として日本でも上市され, 様々ながんに対して利用されている (Fujino et al., 2016). この手法は肉眼では一見がん細胞には見えないがん細胞も蛍光標識するため, がん細胞の取り残しを防ぎ, 膀胱がんの手術後の無再発生存率を 26%も改善させた (Inoue et al., 2012). さらに PpIX に光を照射すると活性酸素種が発生し, 細胞に酸化ダメージを与えることを利用して皮膚がんなどの光線力学的治療薬としても利用されている (Bhanja et al., 2023). この治療法はがん細胞のアポトーシスを誘導するため (Sugiyama et al., 2014), 病変部位の外科的切除に比べ, 完治後の病変部位が綺麗に治るメリットもあり, 美容上優れた治療法としても注目されている.

ALA は呼吸鎖複合体のシトクロムの補因子であるヘムの前駆体である. ALA の投与によりミトコンドリアの呼吸鎖複合体の活性が向上し (Ogura et al., 2011), 更にはミトコンドリアそのものも増殖する (Fujii et al., 2017). これらの機能からミトコンドリアの機能不全による指定難病であるミトコンドリア病の治療薬としての研究も進んでいる (Shimura et al., 2019). 特に発症後に数年で亡くなってしまいう小児期ミトコンドリア病の Leigh 脳症に対する治験も進行中である (Ogawa et al., 2020). 同様に

ミトコンドリアの機能不全に由来するミトコンドリア糖尿病の治療薬としても研究されている (Nakamura et al., 2023). また、ミトコンドリアは細胞エネルギーの合成の場であることから、ALA を投与することで高齢者の運動負荷試験において運動効率が上昇し、運動中の酸素消費量、二酸化炭素排出量、血漿中乳酸値が減少した (Masuki et al., 2016). 同様に ALA の投与により仕事による疲労感が改善したとの報告もある (Higashikawa et al., 2020). さらにショウジョウバエへの投与実験では加齢に伴う運動機能低下の緩和及び寿命の延伸も確認された (Nozawa et al., 2022). さらにアルツハイマー病に対してはミトコンドリアの機能維持によるアミロイド β ペプチドの減少が確認された (Omori et al., 2017). また、ALA の投与により肌細胞の増殖率が増加し、水分量、弾力性が向上したことから (Suzuki et al., 2019), ALA は化粧品や美容サプリメントにも配合されている.

ALAS をコードする遺伝子の内、主に全ての細胞で発現している ALAS1 遺伝子をヘテロノックアウトし、ALA 合成能を低下させたマウスでは耐糖能の低下等の糖尿病様症状が見られ、さらに ALA の投与によりこれら症状の改善も確認された (Saitoh et al., 2018). ミトコンドリアの電子伝達系の活性は加齢と共に減少し (Hayashi et al., 1994), これに伴い二型糖尿病の発症が増加する. グルコースは ALAS の発現を抑制し (Handschin et al., 2005), ALAS の細胞質からミトコンドリアへの移行を阻害する (De Loskey and Beattie, 1984). 従って慢性的にグルコース濃度が高い糖尿病患者では、ALA 合成が阻害され、ミトコンドリアの電子伝達系の活性が低下し、ATP が不足することで更にグルコースの消費が停滞するという悪循環に陥る. ALA を糖尿病患者へ投与すると電子伝達系が活性化し、グルコースを消費しやすくすることで血糖値が改善するという報告があり、二型糖尿病薬としての臨床研究が進んでいる (Rehani et al., 2019). これらの機能から、ALA は食後の血糖値の上昇を穏やかにする機能性表示食品としてサプリメントにも配合され、販売されている.

ALA の投与により細胞内で過剰に生成したヘムはヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) によって分解される. このとき、強力な抗酸化作用を持つビリルビンが生じるため、ALA の投与により抗酸化作用が誘導されることが示された (Hou et al., 2013). ALA の投与により誘導されるこの抗酸化作用により、リウマチ性自己免疫疾患の炎症を抑え、進行を抑制した (Liu et al., 2018). また、パーキンソン病モデルマウスに対してはこの抗酸化効果によって神経保護作用が確認された (Hijioka et al., 2020). また、HO-1 は自己免疫系の活性化に重要であるため (Tzima et al., 2009), ALA の投与により自己免疫系を活性化することができ、インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス効果を誘導する (Ma et al., 2019).

DNA や RNA のグアニンが、グアニン四重鎖構造という特殊な構造をとることがあり、これが遺伝子発現に関与している (Balasubramanian et al., 2011). ALA が代謝されて生じるポルフィリンがグアニン四重鎖構造と親和性が高く、結合することで下流の遺伝子発現を阻害することから、ヒトでこのグアニン四重鎖構造が関与する遺伝子発現異常を伴う難病 (ATR-X 症候群) に対し、ALA が治療薬となることが見出された (Shioda et al., 2018).

また、ALA の投与により生じた PpIX がウイルスエンベロープに結合し、ウイルスの感染を阻害するため、デング熱ウイルス及び黄熱病ウイルス (Assunção-Miranda et al., 2016), ジカウイルス及びチクングニア熱ウイルス (Neris et al., 2018) の感染を抑制する. また、ヒト培養細胞を用いた試験

管内ウイルス感染試験において、ALA の投与により濃度依存的に新型コロナウイルスの感染が抑制された (Sakurai et al., 2021). 同様に変異株に対しても同様の感染抑制効果が報告されている (Ngwe Tun et al., 2022). また、新型コロナウイルス感染後の後遺症の一つである疲労感及び不安やふさいだ気分に関する状態に関して ALA の投与により症状の改善効果が報告されている (Imamura et al., 2021).

その他にはヘム中間代謝産物が蓄積することでマラリアの生育を阻害することから ALA は抗マラリア薬としても研究されている (Komatsuya et al., 2013). また、ALA がヘモグロビンの合成を活性化することから、遺伝性の貧血病である鎌状赤血球症に対する治療薬としても研究されている (Liu et al., 2019). さらに ALA は睡眠の質を向上させるため (Perez et al., 2013), 機能性表示食品としてサプリメントにも配合され、販売されている.

尚、日本国内においては ALA 塩酸塩が医薬品成分として、そして光合成細菌 *C. sphaeroides* により生成された ALA リン酸塩のみが食品として認められている (厚生労働省, 2012, <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002kjhr.html>).

1.4.2 動物への応用

ALA を乳牛に与えると牛乳中のタンパク質含量及びカゼイン含量が増加し、高い栄養価の乳を得ることができ (Hendawy et al., 2019), さらに卵母細胞の発育に対する熱ストレスの影響を緩和する (Elgendy et al., 2022). 食用鶏に ALA を与えると産卵数の増加及び卵の品質を向上させる (Wang et al., 2011). 雌豚に ALA を給餌すると、離乳時の子豚の体重が増加する (Wang et al., 2009). これらの機能を期待して ALA が配合された家畜用飼料が販売されている.

また、ALA の猫への投与により、猫コロナウイルスに対する抗ウイルス効果が生じる (Takano et al., 2021). さらに、高脂血症を患う犬に ALA を投与することでその症状が改善する (Sakai et al., 2020). ペットの健康の維持を目的としたペット向けの ALA 入りサプリメントも販売されている.

食品として養殖されているバナメイエビに ALA を投与したところ、細菌感染への抵抗力の増強及び成長の促進が確認された (Pedrosa-Gerasmio et al., 2019). また、ALA をシラスウナギの稚魚に与えるとその体重及び全長が増加する (Yasumoto et al., 2012). 感染症予防及び生育促進を目的とした、ALA が配合された水産飼料も販売されている.

1.4.3 植物への応用

クロロフィルの前駆体である ALA を植物に投与することでクロロフィルの生合成を促し、光合成を改善する (Hotta et al., 1997). また、ALA は気孔を開放することで CO₂ の葉肉細胞への取り込みを促進し、光合成を促進する (Wang et al., 2004). さらに ALA はオーキシシン生合成を誘導することで根の成長を促進する (An et al., 2019). これらの作用により ALA は農作物の収量を増加させたり、果実の糖度や色味、栄養素などを増強したりする.

また、ALA は寒冷 (Anwar et al., 2018), 塩害 (Wang et al., 2005), 高温 (Wang et al., 2005), 強光 (Ma et al., 2015), UV-B (Liu et al., 2006), 弱光 (Aksakal et al., 2017), 乾燥 (Cai et al., 2020),

湛水 (An et al., 2016), アルカリ土壌 (Liu et al., 2017), 窒素欠乏 (Wei et al., 2012), 都市部の大気汚染 (Yang et al., 2021), 重金属 (Singh et al., 2020), 殺虫剤 (Taspinar et al., 2017), 除草剤 (Ling et al., 2018), 真菌感染症 (Elansary et al., 2019) 等の様々なストレスに対して植物の耐性を向上させることができる。

これら作物の生育促進等を目的とし, ALA が配合された機能性肥料が販売されている。

1.5 光合成細菌

光合成細菌 *Cereibacter sphaeroides* (旧名 *Rhodobacter sphaeroides*) (Hördt et al., 2020) は非病原性の紅色非硫黄光合成細菌であり, 酸素非発生型光合成を研究するための基礎研究のモデル生物としてよく研究されてきた。代謝の理解も進んでいたことから, ファルネソール及びコエンザイム Q10 (Zhu et al., 2017), ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) (Luongo et al., 2017), 水素 (Yigit et al., 1999), バレンセン (Beekwilder et al., 2013), β -カロテン (Qiang, et al., 2019), テルペノイド (Schempp et al., 2017), リコピン (Su et al., 2018) 及び, ALA (Tanaka et al., 1994) 等の物質生産菌として研究開発されている。 *C. sphaeroides* は好気呼吸, 嫌気呼吸又は光合成で生育することができ (Mackenzie et al., 2007), 光合成条件では内膜の構造が変化する (Chory et al., 1984)。特に, よく研究されている株の一つである *C. sphaeroides* 2.4.1 株のゲノムは 2 本の染色体と 5 つのプラスミドから構成される (Mackenzie et al., 2001)。尚, 本論文に出てくる内在性遺伝子の内, *hemA*, *prpA*, *prpB*, *rsp_7571* は染色体 I にコードされ, *hemT*, *rrnB* は染色体 II にコードされている。

1.5.1 ALA 合成酵素 (ALAS)

C. sphaeroides 2.4.1 株の ALAS は *hemA* と *hemT* にコードされている (Tai et al., 1988) (図 1-4)。*hemA* の発現は *PrrA* 及び, *FnrL* によって代謝の切り替えに応じて厳密に制御されている (Ranson-Olson et al., 2008) (図 1-5)。これに対し, *hemT* はサイレント遺伝子でほとんど転写されていない (Stoian et al., 2018)。ALAS はピロドキサルリン酸 (PLP) を補因子とし (Nandi et al., 1978), グリシンとスクシニル CoA を ALA と二酸化炭素に縮合する反応を触媒する (Warnick, et al., 1971)。また, ALAS はヘム合成経路の産物であるヘムから直接的にフィードバック阻害を受ける (Burnham and Lascelles, 1963)。*C. sphaeroides* 2.4.9 株の *HemA* 及び *HemT* においては, *HemA* より *HemT* の方が 10 倍以上ヘミンによるフィードバック阻害を受け難い (Stoian et al., 2018)。細胞粗抽出物中の ALAS はグルタチオンやシステイン等の硫黄化合物の添加によって活性化され (Tuboi and Hayasaka, 1972, Neuberger et al., 1973), 細胞内でもこういった硫黄化合物を介した翻訳後レベルでの活性調節を受けている。尚, ALAS ホモログにおいてアミノ酸基質の選択性に関与している 5 つのアミノ酸残基 (Shoolingin-Jordan et al., 2013, Kawaguchi et al., 2022) は *HemA*, *HemT* どちらも全て ALAS 型である (図 1-4)。

1.5.2 PrrA/PrrB 二成分制御系

C. sphaeroides において *hemA* は *PrrA/PrrB* 二成分制御系に制御されている (Ranson-Olson et

al., 2006) (図 1-5). 内膜上に存在するセンサーキナーゼ PrrB が電子伝達で酸素を還元する *cbb3* オキシダーゼの働きを感知し、酸素が不足したときに細胞質の ATP を消費して自己リン酸化する。リン酸化した PrrB は細胞質のレスポンスレギュレーター PrrA をリン酸化し、PrrA はそのリン酸化の有無により DNA との結合親和性が変化することでそのレギュロン遺伝子の発現を制御する。 *C. sphaeroides* 2.4.1 株の PrrA レギュロンには集光性バクテリオクロフィルタンパク質複合体の遺伝子をコードする *puf* オペロン、*puc* オペロン、バクテリオクロフィル合成遺伝子をコードする *bch* オペロン、カロテノイド合成遺伝子をコードする *crtA*, *crtB*, *crtC*, *crtD*, *crtE*, *crtF*, *crtI*, 光合成に関連する転写因子 *ppaA*, ヘム合成経路の *hemE* (図 1-3) 等が含まれる (Imam et al., 2014)。

C. sphaeroides において、通常光合成遺伝子が抑制される好気条件においても光合成遺伝子の発現が活性化し、バクテリオクロフィル *a* が合成される変異株が発見された (Eraso and Kaplan, 1995) (図 1-6)。この変異株では *prrB* の 233 番目のチミンからシトシンへの置換により、PrrB の 78 番目のロイシン残基がプロリン残基に置換されていた。また、近縁種の *Rhodobacter capsulatus* において PrrB ホモログである RegB の欠損株に人工的に突然変異を誘発し、RegB が欠損しているにもかかわらず光合成遺伝子の発現が活性化している RegB サプレッサーミュータントが単離された (Du et al., 1998)。この変異株では、*prrA* ホモログである *regA* の 289 番目のグアニンからチミンへの置換により、RegA の 97 番目のアラニン残基がセリン残基に置換していた (図 1-7, 1-8)。この RegA (A97S) 点変異株では *hemA* を含むレギュロンの光合成遺伝子の発現がリン酸化に因らず恒常的に活性化していた (Bird et al., 1999)。

1.5.3 rRNA オペロン

リボソーム RNA (rRNA) の遺伝子発現量は一般に強力であり、タンパク質発現などにも利用されている (Qiang et al., 2019)。 *C. sphaeroides* 2.4.1 株には rRNA オペロンが 3 つ存在し、第一染色体上に *rrnA* が、第二染色体上に *rrnB* 及び *rrnC* がコードされている。中でも *rrnB* のプロモーターの転写活性が最も高く (Dryden and Kaplan, 1993)、対数増殖期に最も活性化する (Henry et al., 2020)。

1.5.4 プロモーター

光合成細菌でのカロテノイド合成研究において網羅的遺伝子発現解析により、内在性の高発現プロモーターが探索された (Shi et al., 2021)。いくつかの高発現遺伝子のプロモーター領域をプラスミド上にクローニングし、その転写活性を比較したところ、 P_{rsp_6124} が最も転写活性が高いプロモーターとして見出された。しかしこの P_{rsp_6124} が挿入されたプラスミドを持つ *C. sphaeroides* では生育阻害が観察された。2 番目に転写活性が高い P_{rsp_7571} には生育阻害は無く、その *C. sphaeroides* 内での転写活性は、大腸菌でタンパク質発現に用いられている人工的高活性プロモーター P_{tac} の約 6 倍も高かった。

1.6 ALA 生産菌の研究開発

ALA を安全に安価に大量生産するため、ALA 発酵生産技術が光合成細菌、藻類、ラン藻、大腸菌、コリネ型細菌、土壌細菌、好熱菌、メタン生成菌等で研究されてきた (Sasaki et al., 2002, Su et al., 2021). 現在までに最も多くの ALA を蓄積したのは、*C. sphaeroides* IFO12203 株由来の *hemA* 遺伝子をプラスミドにより高発現させ、C4 経路での ALA 合成を可能にしたコリネ型細菌で、培地中に 40.6 g/L の ALA を蓄積した (特開 2005-333907). 次点で Pu ら (2023) の開発した大腸菌が 30.7 g/L の ALA を培地中に蓄積した. この大腸菌は光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* 由来の ALAS を発現することで C4 経路での ALA 合成を可能にしている. さらに RNAi による ALA の代謝及び基質スクシニル CoA の代謝の抑制や、TCA サイクルへの代謝経路の補強によるスクシニル CoA の供給量の増加により、代謝経路の最適化が図られている. さらには ALAS のアミノ酸置換により、ヘムによる ALAS のフィードバック阻害を解消したり、ALA 排出ポンプ及び酸化ダメージ修復遺伝子の発現により ALA 耐性を向上させたりしている.

1.6.1 ALA 工業生産菌の開発

コスモ石油株式会社において、光合成細菌を用いた ALA の生産研究が行われてきた (表 1-1). 光合成細菌は光合成も行うため、呼吸に必要なヘムだけでなくクロロフィルの前駆体としても ALA を必要とする. 従って光合成細菌は ALA 生産能力のポテンシャルが高いと考えられ、ALA 生産菌の候補に挙げられた. 育種に先んじた親株の選定として、9 種の光合成細菌 *C. sphaeroides* (5 株), *R. capsulatus*, *R. palustris*, *Rhodocyclus gelatinosus*, *Rhodospirillum rubrum* を光照射条件かつ嫌気条件で培養し、PBGS 阻害剤であるレブリン酸の添加による培養液中の ALA 蓄積量を比較した. その結果 *C. sphaeroides* IFO12203 株の ALA 蓄積量が最も高かったことから (最大 2 mM), 育種の親株として選定された (Sasaki et al., 1987).

ALA 生産時に PBGS を競合阻害するレブリン酸を ALA 蓄積量の 10 倍程度加えていたが、このプロセスは実用的ではなかった. そこで IFO12203 株を親株とし、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNG) 処理による突然変異誘発により PBGS 低活性株の取得を試みた. PBG 要求株を十数株分離し、PBGS 活性を測定したところ、親株の 1/3 程度に低減されている CR-105 株を得た (Tanaka et al., 1994).

CR-105 株は最小培地では ALA を蓄積したが、酵母エキス存在下では ALA を蓄積しなかった. そこで酵母エキス存在下でも ALA を蓄積できる変異株の取得を試みた. ALA 要求性大腸菌を用いたスクリーニングにより、約 5000 株の変異株の中から、酵母エキス存在下でも ALA を蓄積する CR-286 株の取得に成功した. CR-286 株は 150 時間の光照射培養により約 15 mM の ALA を蓄積した (Tanaka et al., 1994).

ここで、有効な光の到達距離が菌体濃度に反比例して減少するため、光照射培養による工業的な ALA 生産には物理的な限界があることが判明した. 尚、生産する ALA の代謝物であるポルフィリンに光が当たると、活性酸素種が生じて生産菌が死滅してしまうことも光照射培養の障害となった. そこで暗好気条件下で ALA を蓄積する変異株の育種を目指した. 好気培養後の培養液上清を

96 穴マイクロタイタープレートに移し、エーリッヒ比色反応を行うハイスループットな選抜方法を用いたところ、約 10,000 株の変異株の中から、好気条件でも 1.5 mM の ALA を蓄積する CR-386 株を得ることに成功した (Nishikawa et al., 1999)。

エーリッヒ比色反応を用いた変異株選抜においてアミノアセトン蓄積株が擬陽性を示すことが問題となり、アミノアセトン非蓄積株の取得を試みた。薄層クロマトグラフ法により選抜したところ、3.8 mM の ALA を蓄積するアミノアセトン非蓄積株 CR-450 株を得た。CR-450 株は添加するレブリン酸濃度を下げた場合でも ALA 蓄積量はあまり低下しなかった (Nishikawa et al., 1999)。

グルコースからのスクシニル CoA 供給には酸素が必要であるが、一方で ALAS の発現を抑制する。更なる ALA 蓄積株の取得を目指し、レブリン酸添加濃度を下げ、かつ培養の振盪数を上昇させた条件でのスクリーニングを試みた。その結果、約 15,000 株の変異株の中から、さらに低濃度のレブリン酸添加でも 8.1 mM の ALA を蓄積する CR-520 株を得た。CR-520 株の PBGS の ALA に対する K_m 値は野生株の 4 倍に上昇し、レブリン酸に対する K_i 値は 1/5 に低下していた (Kamiyama et al., 2000)。

CR-520 株の生産条件を検討している過程で、生育至適温度に対して ALA 蓄積の至適温度がやや低温側にシフトしていることが観察された。そこで培養条件を生育至適温度の上限側に設定したスクリーニングを行うことで、約 15,000 株の変異株の中から、生育と ALA 蓄積の至適温度が一致した CR-606 株を得た。CR-520 株の最大 ALA 蓄積を実現するには通気するガスの酸素分圧を 3%程度に抑える必要があるが、CR-606 株は通常の空気による ALA 生産が可能であり、通常の空気でも 17.0 mM の ALA を蓄積した。CR-606 株の *hemA* の発現量は野生株と大差は無く、ALAS 活性だけが数倍に上昇していた。従って CR-606 株の溶存酸素に対する ALAS 活性の不感受性は翻訳後のタンパク質レベルで起きていることが示唆された (Kamiyama et al., 2000)。

CR-606 株はグリシン添加量を一定濃度以下にすると ALA の蓄積量が顕著に低下した。そこで低濃度のグリシン添加条件でのスクリーニングにより、最終的に 27.5 mM の ALA を蓄積する CR-720 株を得た (Kamiyama et al., 2000)。CR-720 株は培地、培養方法に更なる改良が加えられ、安全な ALA 生産菌として現在も工業的生産に用いられている。

1.6.2 突然変異誘発による育種の弊害

人工的な突然変異誘発による育種では、通常、1 回の実験操作で生じる遺伝子変異個所は 1 つにとどまらない。これらいくつか生じた変異のうち 1 つでも有用な表現型をもたらす変異が含まれていればその段階のスクリーニングでは有用株の候補として得られる。こうした育種を重ねることで、その株には潜在的に有害な二次突然変異が蓄積していく。この問題に対し、遺伝子解析により抽出した代謝経路に存在する有用な遺伝子変異のみを突然変異が誘発される前の親株に導入することで、二次突然変異が解消され、生育速度が回復する例も報告されている (Ohnishi et al., 2002)。この報告では代謝経路の遺伝子に変異があったため、有用な遺伝子変異として抽出することができたが、有用な変異が機能未知の遺伝子に生じていて、未知のメカニズムにより有用な表現型が得られた場合は、有用な遺伝子変異を特定するのは困難である。ALA 生産菌として開発された

CR-720 株は 7 回もの突然変異誘発処理が施されており、これまでに導入された二次突然変異の数は計り知れず、その悪影響は少なくないことが予想される。

1.7 リン酸化模倣体

プロテインキナーゼによるタンパク質のリン酸化は細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たしている。真核生物ではセリン、スレオニン及びチロシン残基がリン酸化を受けるアミノ酸残基として知られている(図 1-9)。これらアミノ酸残基をグルタミン酸又はアスパラギン酸残基に置換することで、リン酸化型模倣体となり、恒常的な活性体が得られることがある(Raingaud et al., 1996, Brunet et al., 1994)。対して *C. sphaeroides* をはじめとした原核生物は、セリン、スレオニン及びチロシン残基のリン酸化が関与するシグナル伝達系は限られており、代わりにヒスチジン残基やアスパラギン酸残基のリン酸化が通常利用されている(Stock et al., 1989)。実際 PrrB ではヒスチジン残基が、PrrA ではアスパラギン酸残基がリン酸化される。

1.8 遺伝子組換えとセルフクローニング

遺伝子組換え技術は生物に新しい形質を付与することができるため、様々な課題解決手段として用いられている。一方、得られた新たな形質次第では生物の多様性に影響を与える可能性が危惧されており、国際的な生物の多様性の確保に関する取り決めとしてカルタヘナ法が制定された。日本においても「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」として、遺伝子組換え生物の使用が規制されている。この法律に従い、日本国内で遺伝子組換え菌を産業利用しようとする場合、厳密な安全性の評価を受けなければならない、そのハードルは高い。また、食品においては遺伝子組換え食品はその旨の表示の義務があり、一般の「遺伝子組換え」に対する漠然とした悪いイメージによる風評被害を避けることは難しい。

一度遺伝子組換え技術を用いても、最終的に得られた生物に外来遺伝子が残っていない場合、その構成遺伝子は全て元の生物に由来することから、自然界において遺伝子構成が変化すると同等の安全性であると解釈され、法律上はこれをセルフクローニングとして、遺伝子組換え体とは見做さない(図 1-10)。遺伝子組換えの利用のハードルの高さを回避するため、食品産業においてセルフクローニングの範疇で有用な菌株が開発されている(Akada et al., 1999, Sofyanovich et al., 2011)。

1.9 本研究の目的

現在の最大 ALA 蓄積は遺伝子組換えコリネ型細菌で達成されている。対して食品産業でも既に利用されている、人工的な突然変異誘発により育種された光合成細菌での ALA 蓄積量はこれよりも低い。そして食品産業でも利用可能なセルフクローニングやナチュラルオカレンスに相当する遺伝子工学的手法を用いた育種による ALA 生産菌の研究開発はこれまでに報告されていない。そこで、本研究では食品産業でも利用可能な ALA 生産菌の開発を目的とし、セルフクローニングにより ALA 高生産光合成細菌の開発を試みた。

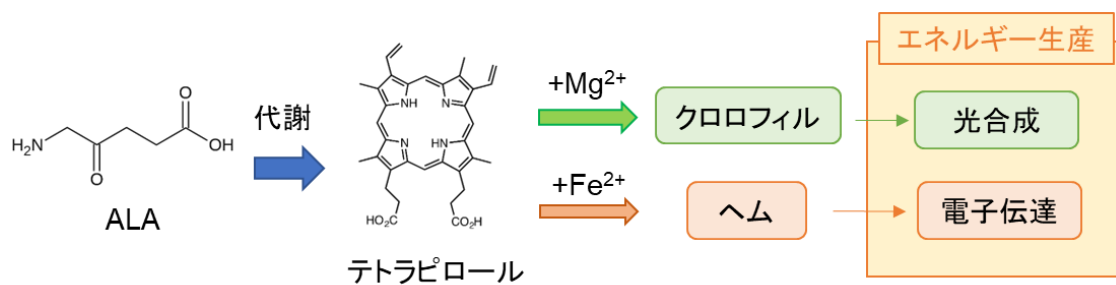
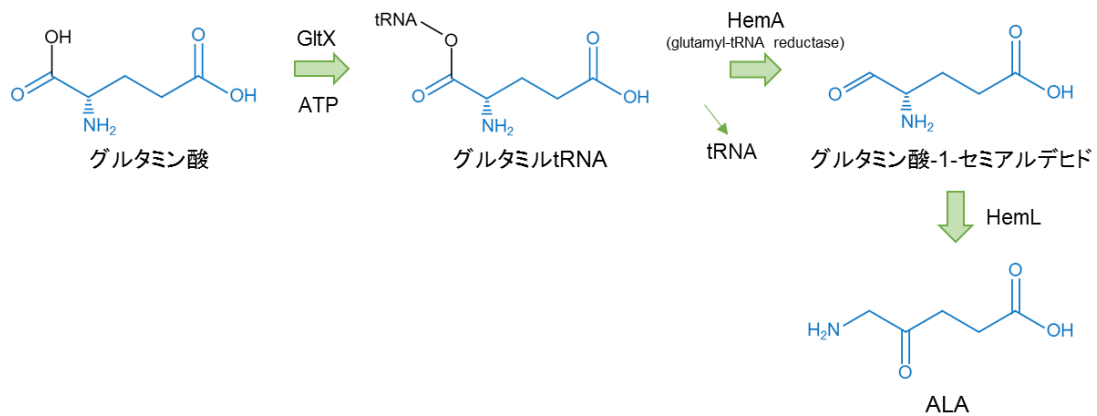


図 1-1 ALA とエネルギー生産

ALA はヘム合成経路で代謝されてテトラピロールを構成する。中心にマグネシウムイオンが配位して代謝されるとクロロフィルとなり、光合成で光エネルギーを集約する。また、テトラピロールの中心に鉄イオンが配位するとヘムになり、電子伝達系でシトクロムの補因子となる。ALAはこれら細胞のエネルギー生産に必須の前駆体である。

C5経路

古細菌, 細菌, 植物(プラスチド)



C4経路 (Shemin経路)

動物(ミトコンドリア), α -プロテオバクテリア

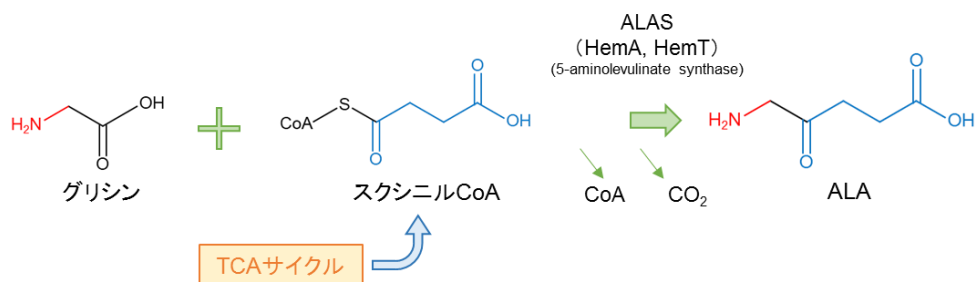


図 1-2 ALA 生合成経路

グルタミン酸を初発物質とする C5 経路では 3 段階の反応により ALA を合成する。対して C4 経路ではグリシン及びスクシニル CoA を ALAS が一段階の反応で縮合して ALA を合成する。尚, C5 経路の *hemA* 遺伝子はグルタミル tRNA レダクターゼをコードし, α -プロテオバクテリアにおける C4 経路の *hemA* 遺伝子は ALAS をコードしている。

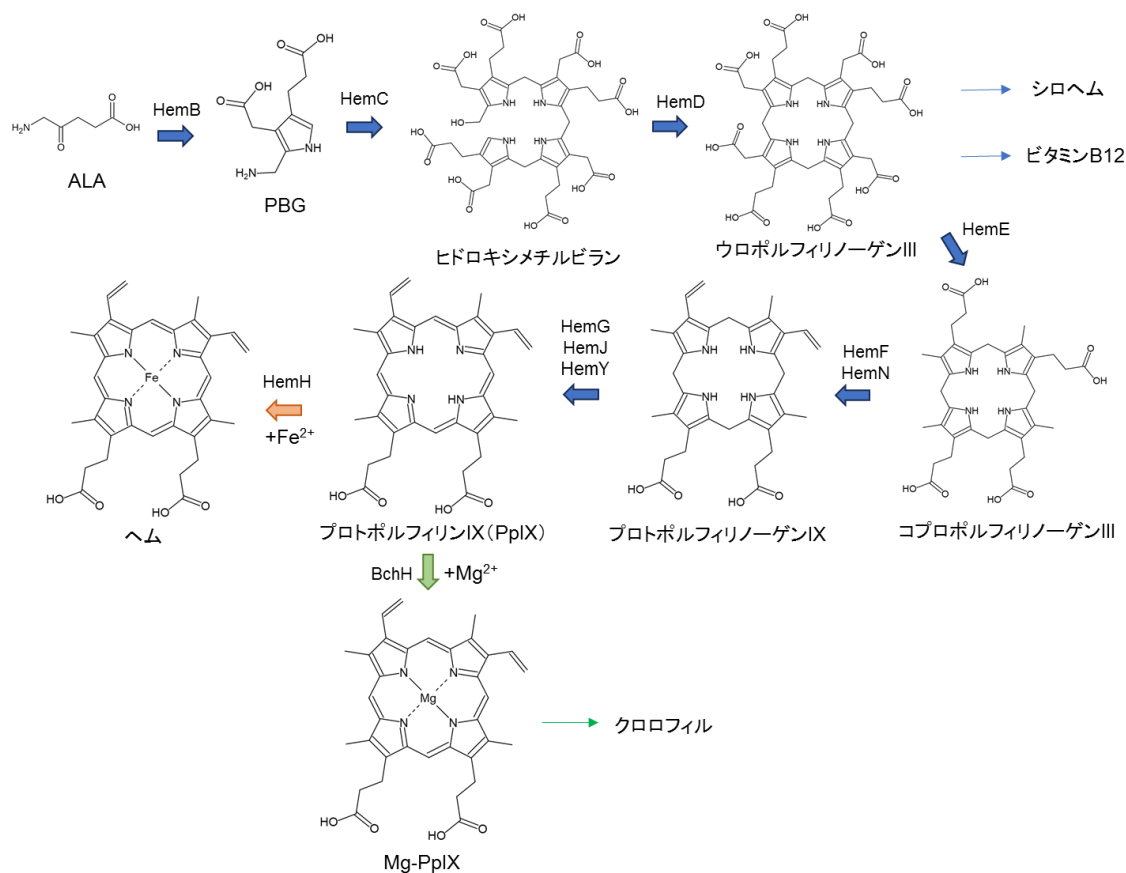


図 1-3 光合成細菌のヘム合成経路

C5 又は C4 経路で合成された 2 分子の ALA は PBGS (HemB) により縮合され、PBG になる。次にポルフォビリノーゲンデアミナーゼ (HemC) が 4 分子の PBG を縮合し、ヒドロキシメチルビランを合成する。ウロポルフィリノーゲン III シンターゼ (HemD) がヒドロキシメチルビランを環化することでウロポルフィリノーゲン III が合成される。ウロポルフィリノーゲン III デカルボキシラーゼ (HemE) により 4 つの酢酸基が脱炭酸されてコプロポルフィリノーゲン III が合成される。コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ (HemF, HemN) により 2 つのプロピオン酸基がビニル基に酸化されてプロトポルフィリノーゲン IX が合成される。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (HemG, HemJ, HemY) により共役したポルフィリン環が形成されてプロトポルフィリン IX (PpIX) になる。フェロキラーターゼ (HemH) により二価鉄が配位し、ヘムになる。尚、ウロポルフィリノーゲン III からはシロヘム及びビタミン B12 が合成され、PpIX からはクロロフィルが合成される。

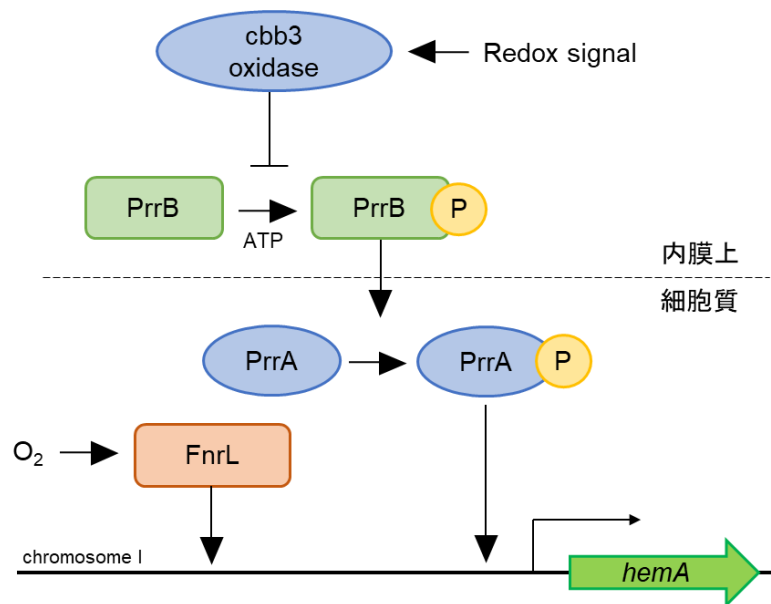


図 1-5 *hemA* の発現制御機構

酸化還元センサーキナーゼ *PrrB* は内膜上で酸化型ユビキノンと結合する。細胞が嫌気条件になると内膜上で酸素を還元する *cbb3* オキシダーゼの活性が低下し、内膜上にユビキノンが還元されたユビキノールが蓄積する。これを還元シグナルとして *PrrB* が感知し、細胞質の ATP を利用して自己リン酸化する。自己リン酸化した *PrrB* は細胞質のレスポンスレギュレーター *PrrA* をリン酸化する。*PrrA* はリン酸化の有無により認識配列の結合親和性が変化し、レギュロンの遺伝子発現を変化させる。また、*hemA* の発現制御には *FnrL* も関与している。

RegA MAEEFAELGSDRSLLL**VDD**NAFLTRLARAMEKRGFQTEIAETVSAGKAI VQNRAPAYA
 PrrA MAEDLVFELGADRSLLL**VDD**DEPFLKRLAKAMEKRGFVLETAQSVAEGKAI AQARPPAYA
 : . ***:**: **. ***:***** * *: *: *****. * *. *****
 S
 ↑
 Phosphorylation site Acid Box
 RegA **VI**DLRLLEDGNGLEVVEALRERRPEARIVVLTGYGAI**A**TAVAAVKMGATDYLS**K**PADANDI
 PrrA **VV**DLRLLEDGNGLDVVEVLRRRPDCRIVVLTGYGAIATAVAAVKIGATDYLS**K**PADANEV
 *:*****:***. *****: *****:*****:*****:*****: :
 Hinge α6 Helix- turn- Helix α7 α8
 RegA TNALLAKGEAL**PPPP**EN**MSADRV**WEHI**QR**VE**LC**DRNV**SETAR**RLNMHRRTL**QR**ILAK
 PrrA THALLAKGESL**PPPP**EN**MSADRV**WEHI**QR**IY**MC**DRNV**SETAR**RLNMHRRTL**QR**ILAK
 *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****: :
 RegA RSPR
 PrrA RSPR

図 1-7 PrrA ホモログのアミノ酸配列比較

C. sphaeroides 2.4.1 株の PrrA と *R. capsulatus* SB 1003 株の RegA のアミノ酸配列比較. RegA の 97 番目のアラニンは恒常的に活性型になった点変異体ではセリンに置換されている.

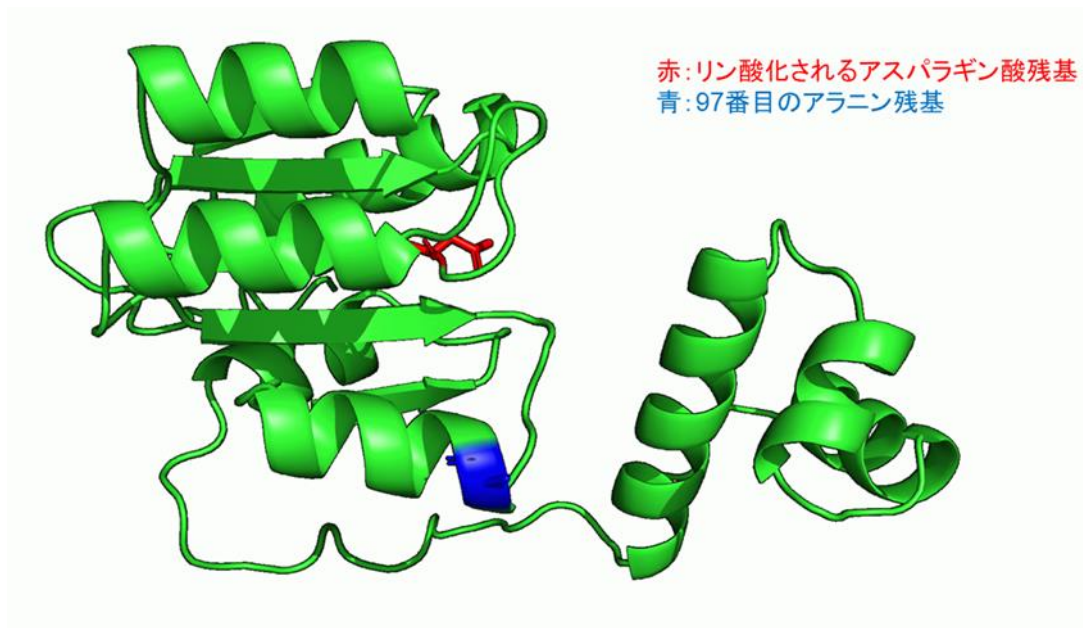


図 1-8 予測された PrrA の結晶構造

リン酸化されるアスパラギン酸残基と RegA で恒常的に活性化した点変異箇所と同じ 97 番目のアラニン残基は比較的離れた箇所に存在する. PrrA 三次元構造は AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) から得た.

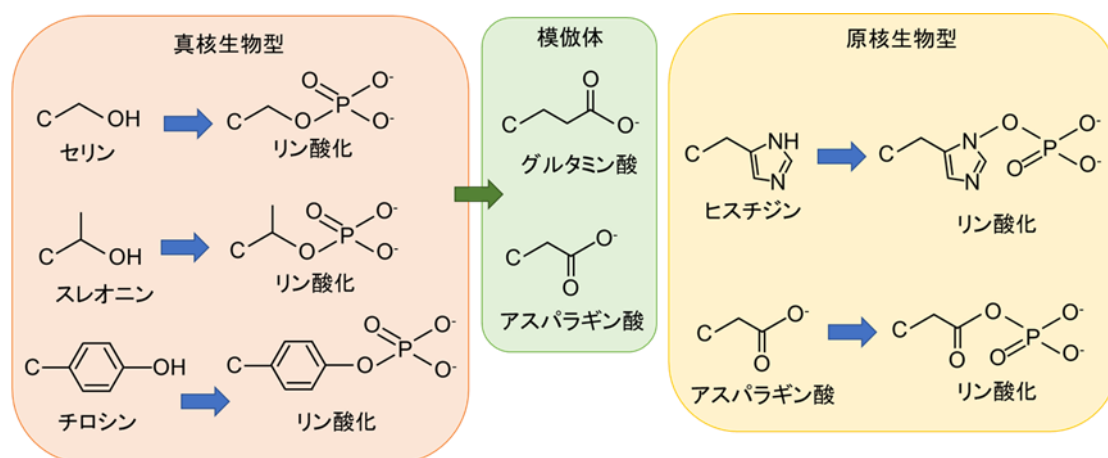
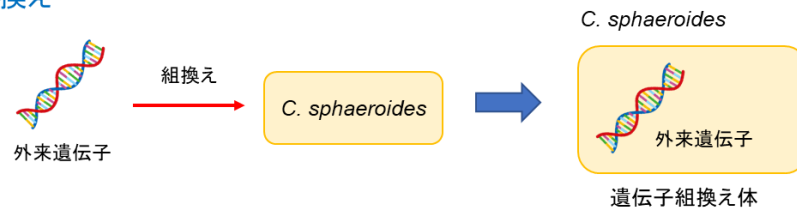


図 1-9 リン酸化タンパク質のリン酸化アミノ酸残基

C はアミノ酸残基の α 炭素を表す. 真核生物では主にタンパク質のセリン, スレオニン及びチロシン残基のヒドロキシ基がリン酸化される. これらのリン酸化型模倣体としてグルタミン酸やアスパラギン酸残基に置換することで恒常的な活性体を得られることがある. 対して原核生物である *C. sphaeroides* の PrrB ではヒスチジン残基が, PrrA ではアスパラギン酸残基がリン酸化される.

遺伝子組換え



セルフクローニング(遺伝子組換えでない)

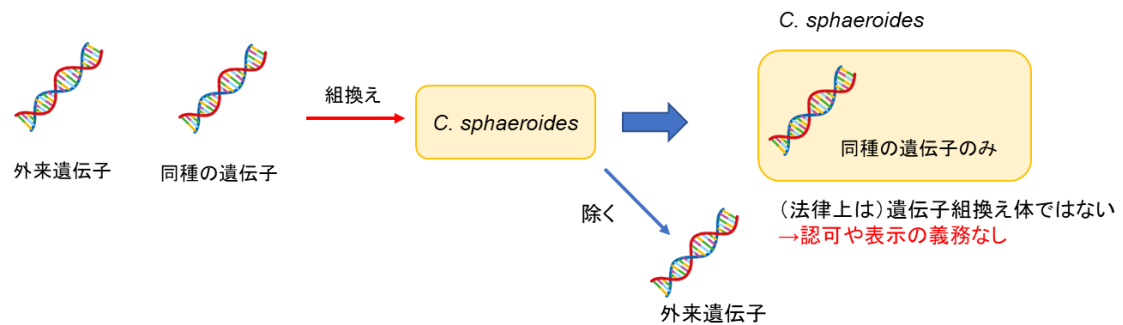


図 1-10 セルフクローニング概略図

遺伝子組換えとは外来遺伝子を挿入することで、外来遺伝子により形質転換された組換え体を得る技術である。対してセルフクローニングとは、一度外来遺伝子を挿入するものの、その過程で全ての外来遺伝子を取り除くことにより、一切の外来遺伝子が残っていない最終産物を得る技術である。得られた株には一切の外来遺伝子が残っていないため、法律上は遺伝子組換え体としては見做されない。

表 1-1 ALA 工業生産菌の開発

7 段階の変異導入及びスクリーニングにより得られた ALA 生産菌とその ALA 蓄積量の一覧.
ALA 生産試験は暗微好気条件で行われた.

Strain	ALA [mM]	Scale
IFO012203	-	-
CR-105	-	-
CR-286	0.25	Flask
CR-386	1.5	Flask
CR-450	3.8	Flask
CR-520	8.1 / 14	Flask / 2 L Jar
CR-606	11.2 / 20	Flask / 2 L Jar
CR-720	27.5	2 L Jar

第2章 PrrA/PrrB 二成分制御系への点変異の導入

2.1 導入

C. sphaeroides で ALAS をコードする *hemA* 遺伝子の発現は PrrA/PrrB 二成分制御系が制御している。PrrA/PrrB 二成分制御系は、細胞の酸化還元状態を感知し、代謝を制御する。PrrB では 78 番目のロイシン残基がプロリン残基に置換されると恒常的に活性型となり、レスポンスレギュレーターである PrrA がリン酸化され、通常抑制される好気条件においても PrrA レギュロンが活性化する (Eraso and Kaplan, 1995)。また、近縁種である *R. capsulatus* の PrrA ホモログである RegA においては 97 番目のアラニン残基がセリン残基に置換されるとリン酸化の有無にかかわらず恒常的に活性型となり、通常抑制される好気条件においても RegA レギュロンを活性化する (Du et al., 1998)。本章では *hemA* の発現を制御する遺伝子における恒常的に活性型となるこれらの変異を *C. sphaeroides* 2.4.1 株のゲノムに導入することで、*hemA* 発現量を増加させ、細胞内 ALAS 量を増加させることで ALA 生産性の向上を試みた。

2.2 実験方法

2.2.1 *C. sphaeroides* のゲノムの組換え方法

C. sphaeroides のゲノムの組換えに自殺ベクター pZJD29A (Swem et al., 2003) を用いた。この pZJD29A 上には抗生物質耐性マーカー遺伝子としてゲンタマイシン耐性遺伝子、複製開始点として *pir* 遺伝子を必要とする R6K ori, 接合伝達に必要な mob RP4 領域, スクロース選択に必要な *sacB* 遺伝子, そして CDS 中にマルチクローニングサイトを持つ *lacZ* 遺伝子がコードされている (図 2-1)。このプラスミドの複製開始には *pir* 遺伝子から発現する π タンパク質の結合が必要なため、このプラスミドは *E. coli* JM109 λ pir 株の様な *pir* 遺伝子を持つ特定の菌株でしか複製、保持されない。つまり *C. sphaeroides* 中ではプラスミドとしては複製、保持されない。これを利用し、*C. sphaeroides* のゲノムの標的配列をクローニングした pZJD29A を *C. sphaeroides* に接合伝達し、ゲンタマイシン含有プレートでセレクションすることで、ゲノム上の標的配列と相同組換えが生じ、このプラスミドがゲノム上に組込まれた株のみを得ることができる。このプラスミドは接合伝達されただけでは複製、保持されないため接合伝達された株から分裂してこのプラスミドを保持しない細胞はゲンタマイシン感受性であるが、このプラスミドがゲノムに組込まれた株はゲノムの複製と同時にプラスミド由来のゲンタマイシン耐性遺伝子を複製することができるため、分裂した細胞も全てゲンタマイシン耐性となり、コロニーを形成し、セレクションすることができる。さらにこのプラスミド上にはスクロース存在下でスクロースを重合し、グラム陰性菌を溶菌させる *sacB* 遺伝子がコードされている。よってスクロース存在下ではこのプラスミド由来の配列を保持する組換え体は溶菌するため、このプラスミドがゲノムに組込まれた株をスクロースでセレクションすることで標的配列でもう一度相同組換えが生じてプラスミド由来の配列がゲノムから抜け落ちた株を得ることができる (図 2-2)。このとき、ゲノム上の組込み箇所の上流及び下流に相同な配列の間に組込みたい配列をクローニングした pZJD29A を用いることで理論上はゲノム上の任意の (どこでも自由にその都度選択した) 箇所に任意の (その都度自由に選択したあらゆる) 配列を組込むことができる。

2.2.2 点変異株の作製用プラスミドの作製

まずは *prpA* 欠損株作製用プラスミドを構築した。 *C. sphaeroides* WT 株のゲノムを鋳型にし、 *prpA* の CDS の上流及び下流 600 bp を TaKaRa bio PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いて PCR 増幅した。 欠損株作製時のマーカーとしてスペクチノマイシン耐性遺伝子 *aadA* を Ω フラグメント (Prentki and Krisch, 1984) を鋳型に同様に PCR 増幅した。 これら 3 断片を *Bam*H I で制限処理した pZJD29A の MCS 間に上流と下流の間にスペクチノマイシン耐性遺伝子が構成されるように TaKaRa bio In-Fusion HD Cloning Kit を用いてクローニングした。 シーケンスを確認し、 *prpA* 欠損株作製用プラスミド pZJD29A- $\Delta prpA$ とした。

同様に *prpA* (G289T) 点変異導入用プラスミドを構築した。 *prpA* の 289 番目のグアニン塩基をチミン塩基に置換した配列にアニーリングするプライマーを用いて *prpA* の CDS の上流 600 bp を含む点変異から上流の配列と、 *prpA* の CDS の下流 600 bp を含む点変異から下流の配列を WT 株のゲノムを鋳型に PCR 増幅した。 この 2 断片を *Bam*H I で制限処理した pZJD29A の MCS 間に挿入し、シーケンスを確認し、 *prpA* 点変異導入用プラスミド pZJD29A-*prpA** とした。

同様に *prpB* 欠損株作製用プラスミドを構築した。 *prpB* の CDS の上流及び下流 600 bp を WT 株のゲノムを鋳型に PCR 増幅し、これらの間にスペクチノマイシン耐性遺伝子 *aadA* を挿入した配列を *Bam*H I で制限処理した pZJD29A の MCS 間に挿入し、シーケンスを確認し、 *prpB* 欠損株作製用プラスミド pZJD29A- $\Delta prpB$ とした。

同様に *prpB* (T233C) 点変異導入用プラスミドを構築した。 *prpB* の 233 番目のチミン塩基をシトシン塩基に置換した配列にアニーリングするプライマーを用いて *prpB* の CDS の上流 600 bp を含む点変異から上流の配列と、 *prpB* の CDS の下流 600 bp を含む点変異から下流の配列を WT 株のゲノムを鋳型に PCR 増幅した。 この 2 断片を *Bam*H I で制限処理した pZJD29A の MCS 間に挿入し、シーケンスを確認し、 *prpB* 点変異導入用プラスミド pZJD29A-*prpB** とした。

尚、実験に用いた菌株は表 2-1 に、作製に用いたプライマーは表 2-2 に示した。

2.2.3 点変異株の作製

まずは *prpA* 欠損株を作製した。 *prpA* 欠損株作製用プラスミド pZJD29A- $\Delta prpA$ で接合伝達用大腸菌 *E. coli* S17-1 λpir 株を形質転換した後、接合伝達によりこのプラスミドを *C. sphaeroides* WT 株に導入した。 具体的には pZJD29A- $\Delta prpA$ で形質転換した S17-1 λpir 株の前培養液 100 μ L を新しい LB 培地 1 mL に加え、37°C、1 hour 振盪培養した。 培養液を室温、5,000 $\times$ g、5 min 遠心して菌体を回収し、菌体ペレットを新しい LB 培地 1 mL で懸濁して再度遠心集菌することで洗浄した。 もう一度洗浄を繰り返し、菌体ペレットを 50 μ L の新しい LB 培地で懸濁した。 *C. sphaeroides* WT 株は 2 日間前培養した培養液 10 mL から同様に遠心集菌して得た。 LB 培地で 1 回洗浄した後に、菌体ペレットを 50 μ L の新しい LB 培地で懸濁した。 これら *E. coli* と *C. sphaeroides* の懸濁液を混合し、LB プレート上に滴下した。 滴下後、10 分程度静置し、菌液が乾燥したことを確認してから 30°C で数時間静置し、接合伝達させた。 プレート上の菌体を掻き取り、新しい LB 培地 100 mL で懸濁し、10% スクロース、リファンピシン (100 μ g/mL)、スペクチノマイシン (50 μ g/mL) 含有プレ

ートに撒いた. ここで *C. sphaeroides* WT 株はリファンピシン耐性であるが, 接合伝達に用いた大腸菌はリファンピシン耐性遺伝子を持たないため生えない. また, スペクチノマイシン耐性遺伝子は接合伝達したプラスミド上にあるため, このプラスミドが WT 株のゲノム上に組込まれた株でのみスペクチノマイシン耐性となるが, 同時にスクロースも存在するため, 2 回の相同組換えが生じ, *prpA* とスペクチノマイシン耐性遺伝子が置き換わり, プラスミド由来の配列が抜け落ちた株のみが生育することができる. 生えてきたコロニーを単離し, ゲノムのシーケンスを確認して *C. sphaeroides* $\Delta prpA$ 株を得た.

次に *prpA* (G289T) 点変異導入株 (PrpA*株) を作製した. $\Delta prpA$ 株に *prpA* 点変異導入用プラスミド pZJD29A-*prpA** を接合伝達し, リファンピシン (100 $\mu\text{g/mL}$) 及びゲンタマイシン (10 $\mu\text{g/mL}$) 含有プレートでセレクションし, このプラスミドがゲノム上に組換えられた 1 回組換え体を得た. 1 回組換え体を LB 培地で培養し, この培養液を 10%スクロース含有プレートに撒いて, 2 回目の組換えが生じてプラスミドが抜け落ちた株をセレクションした. ここでは目的の PrpA*株だけでなく $\Delta prpA$ 株も生育することができるため, 単離してゲノムのシーケンスを確認することで PrpA*株を得た.

同様に WT 株及び PrpA*株に *prpB* 欠損株作製用プラスミド pZJD29A- $\Delta prpB$ を接合伝達してそれぞれ $\Delta prpB$ 株, PrpA*- $\Delta prpB$ 株を得た.

同様に $\Delta prpB$ 株に *prpB* (T233C) 点変異導入用プラスミド pZJD29A-*prpB** を接合伝達し, PrpB*株を得た.

尚, 実験に用いた菌株は表 2-1 に示した.

2.2.4 吸光スペクトルの測定

好気条件でのサンプルは PYS 培地 (0.3% bacto peptone, 0.3% bacto yeast extract, 2 mM CaCl_2 , and 2 mM MgSO_4) (Young et al., 1989) で前培養した培養液 30 μL を 100 mL 三角フラスコ中の 10 mL PYS 培地に加え, 30°C, 200 rpm で培養し, O.D. 660 nm が 0.5 未満 (24-36 時間) で回収した. 微好気条件のサンプルは PYS 培地で前培養した培養液 100 μL を 100 mL 三角フラスコ中の 100 mL PYS 培地に加え, 30°C, 100 rpm で培養し, O.D. 660 nm が 0.5 未満 (48-60 時間) で回収した. 回収した培養液を遠心して菌体を回収し, 10 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5 で懸濁し, 菌体を超音波破碎した. 破碎液上清のタンパク質濃度を測定し, 全てのサンプルのタンパク質量を揃えて 300–900 nm の吸光スペクトルを測定した.

2.2.5 ALA 発酵試験

試験方法は Nishikawa ら (1999) の方法を参考にした (図 2-3). Glucose-Glutamic acid-Yeast extract-2 (GGY2) 培地 (50 mM glucose, monosodium L-glutamate monohydrate [3.8 g/L], bacto yeast extract [2.0 g/L], $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ [1.13 g/L], $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1.07 g/L], $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ [0.8 g/L], $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [0.2 g/L], $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [53 mg/L], MnSO_4 [1.2 mg/L], nicotinic acid [1.0 mg/L], thiamin hydrochloride [1.0 mg/L], and biotin [0.01 mg/L]) で前培養した培養液を 300 mL バッフル付き三角フラスコ中の新しい GGY2 培地 120 mL に 2.4 mL 加え, 30°C, 170 rpm, 48 hour 培養した. 培養

液を室温, $5,000 \times g$, 5 min 遠心し, 湿菌体重量 1.0 g 当たり 20 mL の, 基質 (60 mM グリシン) と代謝阻害剤 (30 mM レブリン酸) を含む新しい GGY2 培地で懸濁した. 各株について, 3 本の試験管に 3 mL ずつ分注し, 30°C , 150 rpm で往復振盪培養した. 培養開始 0, 12, 18, 24, 36, 42, 48 時間後に回収した培養液を 4°C , $10,000 \times g$, 5 min 遠心し, 上清を 0.1 M HCl で 5 倍希釈したものをサンプルとして回収した.

各反応液中の ALA 濃度は Mauzerall ら (1956) の方法を用いて測定した (図 2-4). 各試料中の ALA を 2 M 酢酸緩衝液 (pH4.6) 中で 1.0% アセチルアセトンと 100°C , 15 min 煮沸して反応させ, ピロール化合物を生成した. 反応液に対し 175% のエーリッヒ試薬 (20 g/L p-ジメチルアミノベンズアルデヒド, 12% 過塩素酸, 60% 氷酢酸) を加えて 553 nm の吸光度を測定することでこのピロール化合物を比色定量した.

2.3 結果

2.3.1 バクテリオクロロフィル *a* の合成確認

光合成遺伝子の発現を制御している *prpA* 及び *prpB* に導入した点変異が実際に光合成遺伝子の発現を活性化しているかどうかを細胞破碎液上清の吸光スペクトルを測定しバクテリオクロロフィル *a* の合成を検出することで確認した. まず通常, 光合成遺伝子の発現が活性化する微好気条件で培養した細胞の破碎液上清の吸光スペクトルを測定したところ (図 2-5), WT 株では 500 nm 付近及び 800–850 nm 付近に吸光ピークが観察できた. 500 nm 付近の吸光ピークはカロテノイドに由来し, 800–850 nm の吸光ピークは光捕集系色素タンパク質複合体に結合しているバクテリオクロロフィル *a* に由来するため, WT 株では微好気条件において光合成遺伝子の発現が活性化し, カロテノイドやバクテリオクロロフィル *a* の合成を確認できた. PrrB*株においても同様に 500 nm 付近及び 800–850 nm 付近に吸光ピークが観察できたことから, 微好気条件で光合成遺伝子の発現が活性化し, カロテノイドやバクテリオクロロフィル *a* の合成されていた. 対して PrrA*及び PrrA*- $\Delta prpB$ 株では 500 nm 付近及び 800–850 nm 付近の吸収が WT 株に比べ低かったことから, これらの株では微好気条件においても光合成遺伝子の発現が活性化していなかったと考えられる.

次に通常, 光合成遺伝子が抑制される好気条件で培養した細胞の破碎液上清の吸光スペクトルを測定した (図 2-5). WT 株では微好気条件で見られたカロテノイドやバクテリオクロロフィル *a* に由来するそれぞれ 500 nm 付近及び 800–850 nm 付近の吸光ピークが観察されず, 光合成遺伝子の発現が抑制されていることが確認できた. 対して PrrB*株では 500 nm 付近及び 800–850 nm 付近に若干の吸光ピークが観察され, 好気条件にも関わらず光合成遺伝子の発現が活性化し, カロテノイドやバクテリオクロロフィル *a* の合成が確認できた. PrrA*及び PrrA*- $\Delta prpB$ 株では WT 株と同様に光合成遺伝子の発現が抑制されていた.

2.3.2 ALA 生産性評価

点変異を導入した株で光合成遺伝子が活性化していれば *hemA* 発現量が増加し, これにより ALA 生産性が向上すると考えた. これを確かめるために試験管による簡易的な ALA 発酵試験で

ALA 生産性を評価した。前培養した各株の細胞を、ALA の基質であるグリシン及び、ALA 代謝の競合阻害剤としてレブリン酸を含む新しい生産培地に懸濁し、微好気条件で 48 時間後まで培養して 0, 12, 18, 24, 36, 42, 48 時間後の培養液に蓄積した ALA を定量した(図 2-6)。WT 株では 24 時間後 (0.6 mM) まで ALA 蓄積量が増加し、その後 ALA が代謝されて 48 時間後まで減少した。対して PrrA* 及び PrrB* 株では 18 時間後まで ALA 蓄積量が増加したものの、その蓄積量は WT 株の半分にも満たなかった。PrrA* 及び PrrB* 株のどちらの培地中にも ALA は WT 株に比べてあまり蓄積しなかった。

2.4 考察

2.4.1 光合成遺伝子の活性化の確認

WT, PrrA*, PrrA* Δ prrB, PrrB* 株を光合成遺伝子の発現が通常活性化する微好気条件及び抑制する好気条件で培養し、対数増殖期における細胞粗抽出物の吸光スペクトルを測定した(図 2-5)。その結果、同種である *C. sphaeroides* 2.4.1 株で報告のあった PrrB の点変異(L78P)を導入した PrrB* 株では通常光合成遺伝子の発現が活性化する微好気条件において WT 株と同様にカロテノイドやバクテリオクロロフィル *a* に由来する吸収ピークを確認することができた。さらに通常光合成遺伝子の発現が抑制される好気条件においてもカロテノイドやバクテリオクロロフィル *a* に由来する吸収ピークが確認できた。これは報告の通り、導入した点変異によって PrrB が恒常的に活性型となったため、PrrA/PrrB レギュロンが活性化し、カロテノイドやバクテリオクロロフィル *a* が合成されたためだと考えられる。これらの結果から、当初の目的通り、光合成遺伝子の発現が恒常的に活性型となる点変異株の作製に成功した。

対して PrrA* 株では通常光合成遺伝子の発現が活性化する微好気条件においても光合成遺伝子の発現が活性化することはなかった。今回 *prrA* に導入した活性型の点変異(A97S)は近縁種の *R. capsulatus* の *regA* で報告されたものである。この報告では *regB* 欠損株のサプレッサーミュータントとして得られた点変異株であるため、フィードバック阻害等の機構が存在し、*regA** の光合成遺伝子の活性化には *regB* 欠損が重要である可能性があった。そこで PrrA* 株にさらに *prrB* を欠損させた PrrA* Δ prrB 株でも同様に吸光スペクトルを測定したが、微好気条件において光合成遺伝子の発現が活性化することはなかった。好気条件では光合成遺伝子の発現は通常抑制されているので、PrrA* 株及び PrrA* Δ prrB 株においてもこれらは抑制されたままであった(図 2-5)。

2.4.2 ALA 低生産性の原因

作製した点変異株の ALA 生産性を、試験管での簡易的な ALA 発酵試験により評価した。まず光合成遺伝子の活性化を確認することができなかった PrrA* 株では ALA は WT 株に比べほとんど蓄積しなかった。これは光合成遺伝子が活性化するどころかむしろ抑制されていたため、PrrA/PrrB レギュロンの一つである *hemA* も抑制され、ALAS が不足していたためだと考えられる。

光合成遺伝子の発現が活性化していることが確認された PrrB* 株でも ALA は WT 株に比べあまり蓄積しなかった。PrrA/PrrB レギュロンには ALAS をコードする *hemA* だけでなく、ヘム合成経

路のウロポルフィリノーゲンデカルボキシラーゼをコードする *hemE* (図 1-3) も含まれているため、PrrA/PrrB レギュロンが活性化したことでヘム合成経路全体が活性化してしまい、その結果 ALA の代謝も活性化してしまったため、合成された ALA が速やかに代謝されてしまい、ALA としては蓄積しなかった可能性が考えられる。培養終了時の培養液を希釈したサンプル上清の色を見ると WT 株ではピンク色に見え、PrrA*株は無色、PrrB*株は淡いピンク色に見える(図 2-7)。この色はヘム合成経路の産物であるポルフィリン類に由来すると考えられるため、ALA を生産し代謝した WT 株ではピンク色に見える。対して培地中の蓄積量はそれほど大差が無い PrrA*及び PrrB*株においては PrrB*株の方が色は濃く見える。これはやはり細胞内で合成された ALA 量は PrrB*株の方が多く、ALA の代謝産物であるポルフィリン類が多く蓄積しているためだと考えられる。

2.5 まとめ

本章では光合成遺伝子の発現を恒常的に活性化する点変異を導入することで ALA 高生産菌の作製を試みた。実際に光合成遺伝子の発現が恒常的に活性化した PrrB*株を得ることに成功したが、その ALA 蓄積量は WT 株に比べ低かった。これはヘム合成経路全体が活性化した結果、ALA 合成だけでなく ALA 代謝も活性化してしまい、ALA として蓄積しなかったと考えられる。PrrB*株に ALA を高蓄積させるためには ALA の代謝を阻害する必要がある。ALAS の発現量の向上のためだけに PrrA/PrrB レギュロン全体を活性化するのは代謝リソースの観点からも効率が悪い可能性があることが判明した。

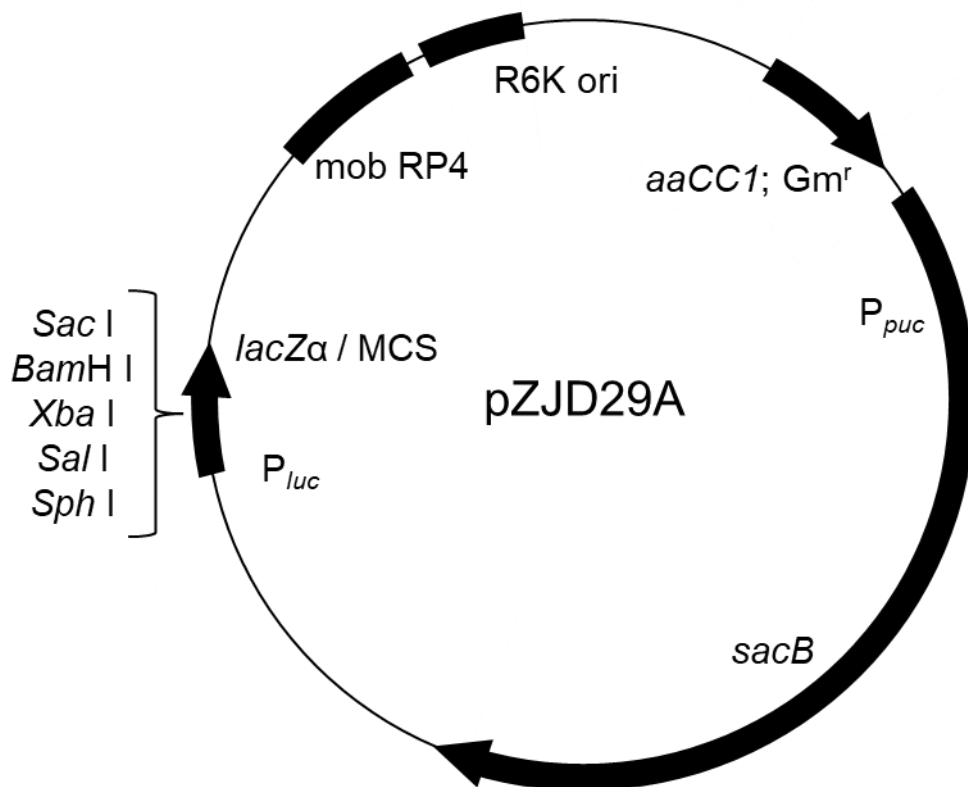


図 2-1 自殺ベクターpZJD29A

ベクターサイズ: 5929 bp. 自殺ベクターpJP5603 のカナマイシン耐性カセットを *Pseudomonas aeruginosa* plasmid R1033 由来のゲンタマイシン耐性カセットに置換し, *R. capsulatus* 由来の *puc* プロモーター下流に *Bacillus subtilis* 由来の *sacB* 遺伝子を挿入して作られた. R6K ori の複製開始には *pir* 遺伝子由来の π タンパク質の結合が必要のため, このベクターを複製するには *pir* 遺伝子を持つ大腸菌を用いる必要がある. *lac* プロモーター下流に (pUC19 と相同な) MCS を保有するため, インサートの挿入の有無を X-gal 及び JM109 λ *pir* 株等を用いることで青白選択によって判別することが可能である. 尚, MCS には 1 カ所でのみ切断することのできる制限酵素を表記した. (Swem et al., 2003)

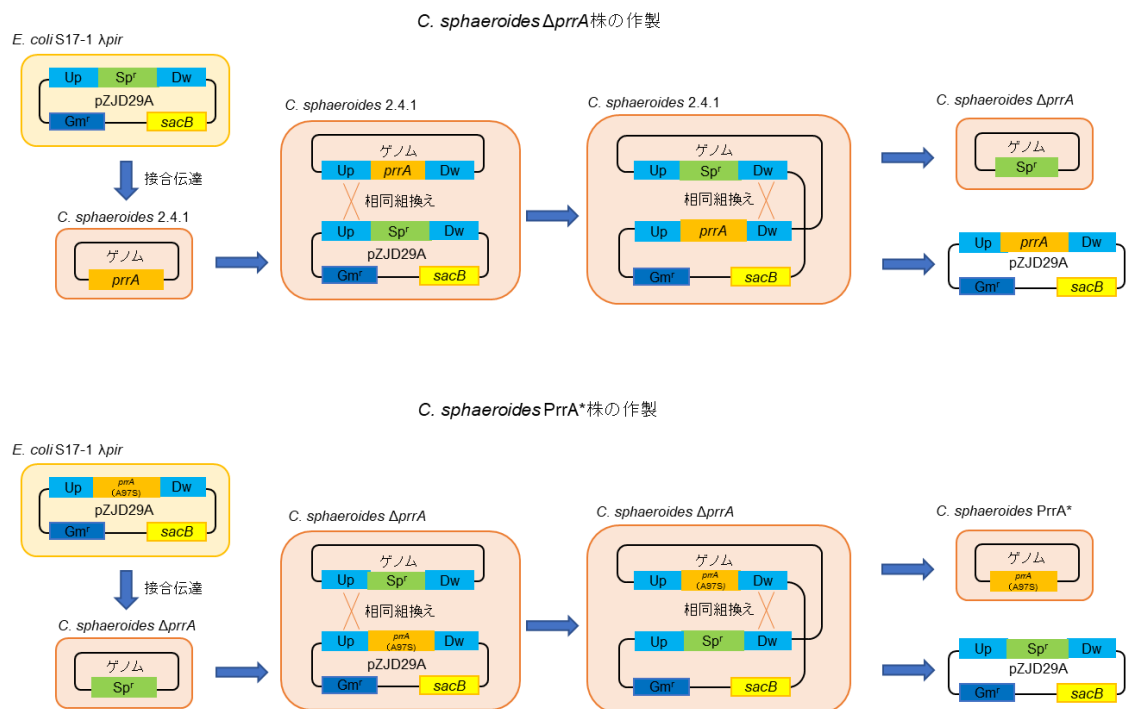


図 2-2 自殺ベクター用いた点変異の導入方法

まずは点変異を導入する遺伝子を抗生物質耐性遺伝子と置換することで欠損させた(上). 導入する遺伝子の CDS の上流及び下流の間に抗生物質耐性遺伝子を挿入した配列をプラスミド上に構築し, このプラスミドを光合成細菌に接合伝達した. 光合成耐性遺伝子上流及び下流で 2 回の相同組換えが生じた株を得ることで遺伝子が欠損した株を得た. 同様に点変異を導入した配列を再度ゲノムに組み替えることで, 点変異のみが挿入された株を得た(下).

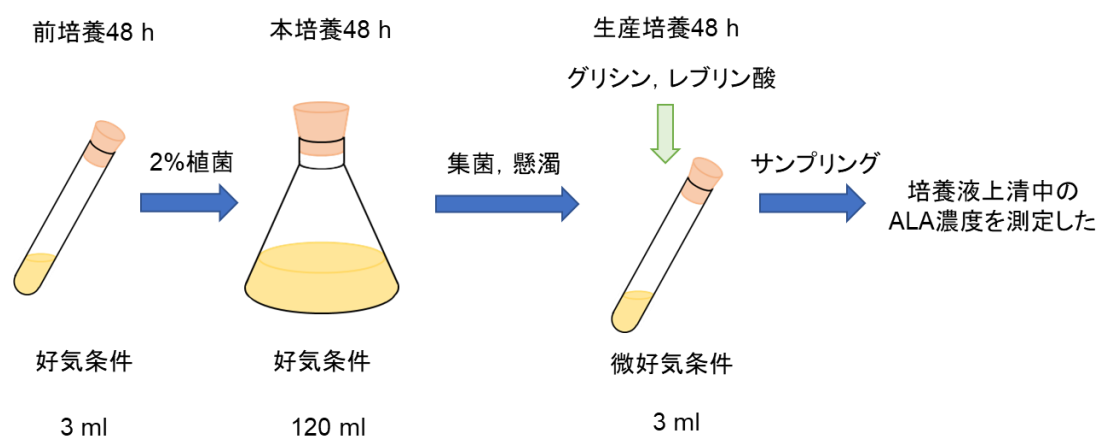


図 2-3 試験管による簡易的な ALA 発酵試験

三角フラスコで好氣的に培養した菌体を集菌した. ALA の基質であるグリシン及び代謝阻害剤であるレブリン酸を含む新しい生産培地で懸濁し, 微好気条件で培養することで ALA 生産を開始した.

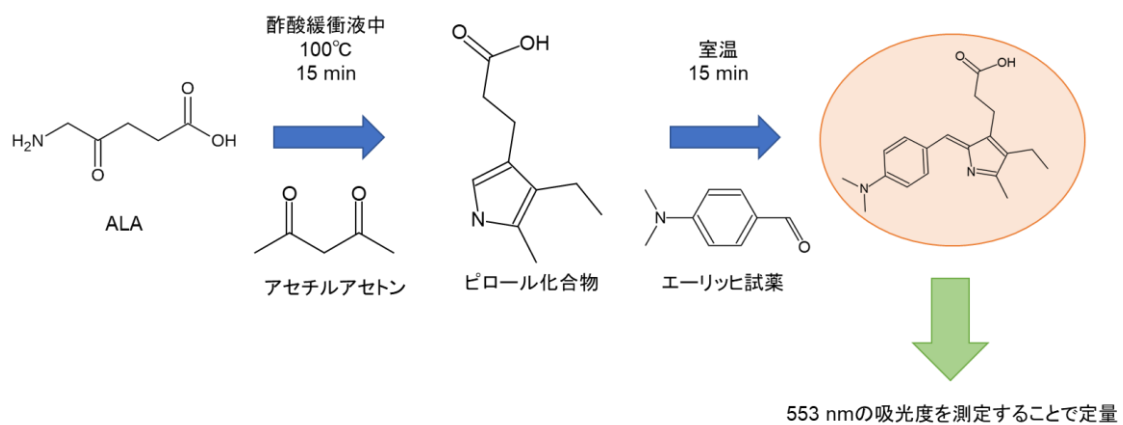


図 2-4 培養液中 ALA の定量方法

培養液上清中の ALA をアセチルアセトンと反応させ、ピロール化する。このピロール化合物をエーリッヒ試薬と反応させることでできた化合物を 553 nm の吸光度を測定することで比色定量し、培養液中の ALA 濃度を算出した。

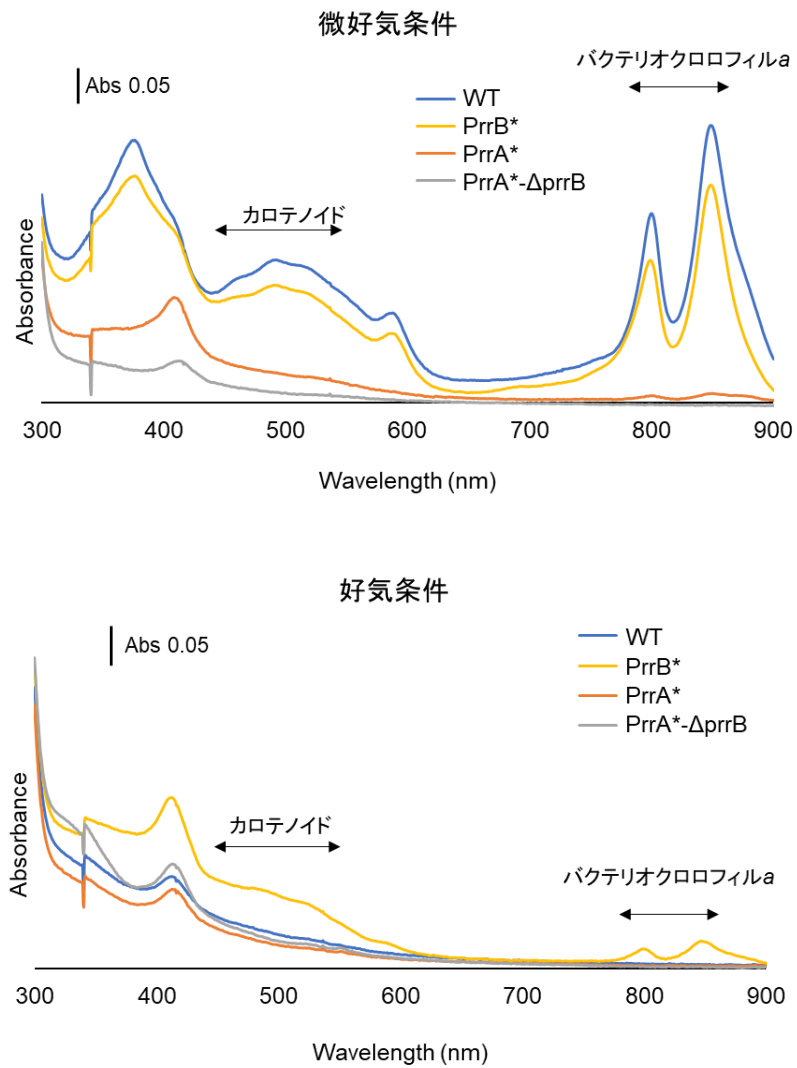


図 2-5 カロテノイド及びバクテリオクロロフィル *a* の検出

微好気条件(上)又は好気条件(下)で培養した対数増殖期の細胞の粗抽出物の 300–900 nm の吸光スペクトルを測定した. 各サンプルは総タンパク質濃度でノーマライズした. カロテノイドは 450–550 nm に吸収極大を持ち, バクテリオクロロフィル *a* は 800–850 nm に吸収極大を持つ.

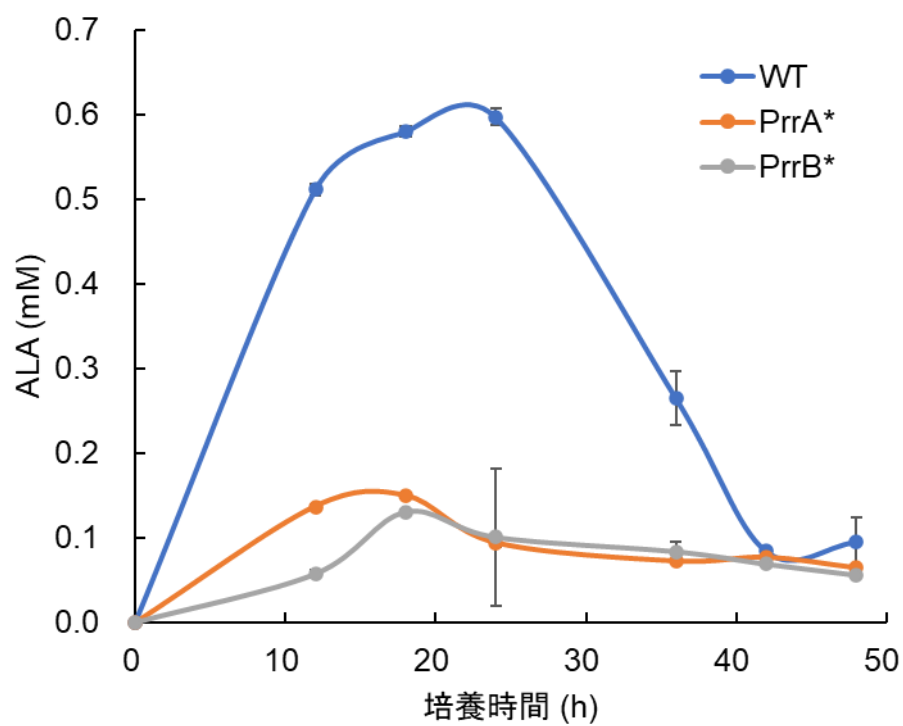


図 2-6 ALA 生産性評価

各株を微好気条件に移して ALA 生産開始後 0, 12, 18, 24, 36, 42, 48 時間後の培地中に蓄積した ALA を定量した。

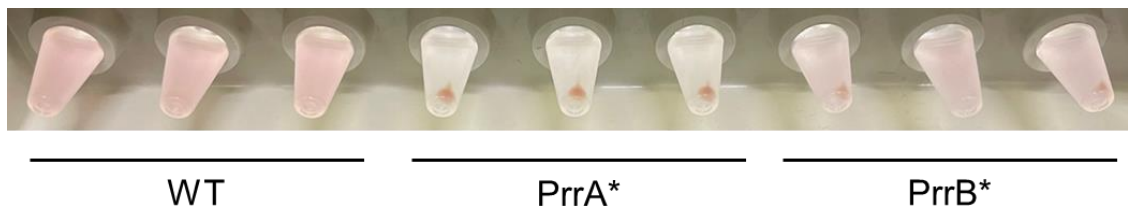


図 2-7 培養終了時の培養液を 5 倍希釈したもの

培養終了時の培養液上清を 0.1 M HCl で 5 倍希釈し、遠心したもの。ペレットは塩酸処理により生じた。

表 2-1 菌株及びプラスミドリスト

Strain	Characteristic(s)	Source or reference
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>endA1, gyrA96, hsdR17</i> (rk-mk+), <i>recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ (lac-proAB)</i> , F' [<i>traD36, proAB, lacIqZΔM15</i>]	Yanisch-Perron et al., 1985
JM109 λ pir	JM109 lysogenized with λ pir bacteriophage	Penfold and Pemberton, 1992
S17-1	F-, <i>thi, pro, hsdR</i> , [RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 (Tp Sm)]	Simon et al., 1983
S17-1 λ pir	S17-1 lysogenized with λ pir bacteriophage	De Lorenzo et al., 1990
<i>C. sphaeroides</i>		
2.4.1	Wild Type	W. R. Sistrom
WT	Rifampicin-resistant strain obtained by spontaneous mutagenesis from 2.4.1.	This study
$\Delta prrA$	$\Delta prrA::aadA$ (Spcm ^r)	This study
PrrA*	<i>prrA</i> (G289T)	This study
$\Delta prrB$	$\Delta prrB::aadA$ (Spcm ^r)	This study
PrrA* $\Delta prrB$	<i>prrA</i> (G289T), $\Delta prrB::aadA$ (Spcm ^r)	This study
PrrB*	<i>prrB</i> (T233C)	This study
Plasmid		
Ω fragment	<i>aadA</i> (Spcm ^r)	Prentki and Krisch, 1984
pZJD29A	Suicide vector, <i>sacB, aacC1</i> (Gm ^r), mob RP4	Swem et al., 2003
pZJD29A- $\Delta prrA$	<i>aadA</i> (Spcm ^r) on pZJD29A	This study
pZJD29A- <i>prrA</i> *	<i>prrA</i> (G289T) on pZJD29A	This study
pZJD29A- $\Delta prrB$	<i>aadA</i> (Spcm ^r) on pZJD29A	This study
pZJD29A- <i>prrB</i> *	<i>prrB</i> (T233C) on pZJD29A	This study

表 2-2 プライマーリスト

点変異導入用プラスミドの作製に用いたプライマー. In-Fusion 反応に用いた付加配列は下線で示した.

Primer	Sequence (5'→3')	Amplification target
MCSprAUP-F	<u>CGGTACCCGGGGATC</u> TATACCGCCCGGCACCAG	Upstream of <i>prpA</i>
SpRprAUP-R	<u>AATCAATC</u> ACCAGTCGCACCGGCGGAAC	Upstream of <i>prpA</i>
SpRprADW-F	<u>ATGCACTAGATTGTCG</u> CCCATCTGCTTTCCC	Downstream of <i>prpA</i>
MCSprADW-R	<u>CGACTCTAGAGGATCA</u> AGAGCGGTTCCGCGGTTGC	Downstream of <i>prpA</i>
prpAUPSpR-F	<u>GACTGGTGATTGATTG</u> AGCAAGCTTTATGCTTGTAAC	Spec ^r
prpADWSpR-R	<u>GACAATCTAGTGCATCTA</u> ACGCTTGAGTTAAGCC	Spec ^r
prpA-G289T-F	GCCGTCGAAATGGCGCCGTAGCCCGTCAG	<i>prpA</i>
prpA-G289T-R	CGCCATTTGACGGCGGTCGCCGCCGTG	<i>prpA</i>
MCSprBUP-F	<u>CGGTACCCGGGGATCA</u> AGGTCGAATGGTCGATGAGGTAATAG	Upstream of <i>prpB</i>
SpRprBUP-R	<u>AATCAATCTGCAGCTCAT</u> GTCACTTTGCC	Upstream of <i>prpB</i>
SpRprBDW-F	<u>ATGCACTATCCGCGCCGGATG</u> CCGCGTCCGACC	Downstream of <i>prpB</i>
MCSprBDW-R	<u>CGACTCTAGAGGATCGC</u> GCAACTGGTCGAGCTCTTC	Downstream of <i>prpB</i>
prpBUPSpR-F	<u>AGCTGCAGATTGATTG</u> AGCAAGCTTTATGCTTGTAAC	Spec ^r
prpBDWSpR-R	<u>CGCCGGATAGTGCATCTA</u> ACGCTTGAGTTAAGCC	Spec ^r
prpB-T233C-F	CGCCGCCCCGACCGAGTTCCAGG	<i>prpB</i>
prpB-T233C-R	CTCGGTCGGGCGGCGGTTCTGCG	<i>prpB</i>

第3章 ALAS 遺伝子上流への高活性プロモーターの挿入

3.1 導入

第2章では光合成遺伝子の発現を活性化することで ALA 蓄積量の向上を試みたが、この手法では *hemA* 以外の遺伝子の発現までも活性化してしまい、非効率的であると考えられた。本章ではより選択的に ALAS 遺伝子のみを高発現させる手法に取り組んだ。具体的には内在性の高活性プロモーター (P_{rrnB} , P_{rsp_7571}) を ALAS 遺伝子 (*hemA*, *hemT*) 上流に挿入することで直接 ALAS 遺伝子を高発現させ、ALA 合成能を向上させた株を作製し、ALAS 遺伝子の発現定量、ALAS 活性測定、ALA 発酵試験により評価した。

3.2 実験方法

3.2.1 プロモーター挿入株の作製

第2章 2.2.1 *C. sphaeroides* のゲノムの組換え方法で記述した方法と同様に、自殺ベクター pZJD29A を用いて *C. sphaeroides* WT 株のゲノムを組換えて各プロモーター (P_{rrnB} , P_{rsp_7571}) を ALAS 遺伝子 (*hemA*, *hemT*) 上流に挿入した(図 3-1)。

rrnB 遺伝子は rRNA オペロンの一つであるため、転写開始点下流にリボソーム結合配列である SD 配列を持たない。よって *rrnB* の転写開始点上流の 195 bp (Dryden and Kaplan, 1993) を P_{rrnB} として ALAS 遺伝子 (*hemA*, *hemT*) の転写開始点上流に挿入した(図 3-2, 3-3)。 P_{rrnB} 挿入用プラスミドは *hemA* 又は *hemT* の転写開始点 (Neidle and Kaplan, 1993) の上流及び下流 600 bp の間に P_{rrnB} を挿入した配列を *Bam*H I で制限処理した pZJD29A の MCS に挿入して構築した。 P_{rrnB} を *hemA* 転写開始点上流に挿入するためのプラスミドを pZJD29A- P_{rrnB} -*hemA*, *hemT* 転写開始点上流に挿入するためのプラスミドを pZJD29A- P_{rrnB} -*hemT* とした(表 3-1)。これらプラスミドを用いて P_{rrnB} を *hemA* のみに挿入した株を BA, *hemT* のみに挿入した株を BT, *hemA* 及び *hemT* に挿入した株を BAT 株とした(表 3-1)。

rsp_7571 遺伝子は CDS を持ち、転写開始点下流に SD 配列を持つ。Shi ら(2021)による GusA 活性の測定による転写活性測定試験においても SD 配列を含む CDS の開始コドン上流の配列を P_{rsp_7571} として扱っていたため、本研究においても rsp_7571 の CDS の開始コドン上流の 498 bp の配列を高活性 P_{rsp_7571} として ALAS 遺伝子の CDS の開始コドンの上流に挿入した。 P_{rsp_7571} 挿入用プラスミドは *hemA* 又は *hemT* の CDS の開始コドン上流及び下流 600 bp の間に P_{rsp_7571} を挿入した配列を *Bam*HI で制限処理した pZJD29A の MCS に挿入して構築した。 P_{rsp_7571} を *hemA* 開始コドン上流に挿入するためのプラスミドを pZJD29A- P_{rsp_7571} -*hemA*, *hemT* 開始コドン上流に挿入するためのプラスミドを pZJD29A- P_{rsp_7571} -*hemT* とした(表 3-1)。これらプラスミドを用いて P_{rsp_7571} を *hemA* のみに挿入した株を 7A, *hemT* のみに挿入した株を 7T, *hemA* 及び *hemT* に挿入した株を 7AT 株とした(表 3-1)。

尚、実験に用いた株は表 3-1 に示した。

3.2.2 遺伝子発現定量

プロモーター挿入株の挿入したプロモーターが機能しているかを確認するために、生育培地 (PYS) で好気条件又は微好気条件で培養した対数増殖期の菌体の ALAS 遺伝子発現量を定量した。サンプルから QIAGEN RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し、これを鋳型に TaKaRa bio PrimeScript RT reagent Kit を用いて逆転写により cDNA を合成した。この cDNA 中の各遺伝子 (*rpoZ*, *hemA*, *hemT*) を TaKaRa bio TB Green Premix Ex Taq II と TaKaRa bio Thermal Cycler Dice Real Time System III を用いて定量した。定量に用いたプライマーは表 3-3 に示した。各サンプル 3 回測定し、各遺伝子の Ct(threshold cycle) 値は 2DM(2nd Derivative Maximum) 法を用いて算出し、 Δ Ct 値は内在性コントロールとして RNA ポリメラーゼの ω サブユニットをコードする *rpoZ* 遺伝子の定量値から算出した。各遺伝子の $\Delta\Delta$ Ct 値は好気条件で培養した WT 株の Δ Ct 値を基準として算出した。各サンプルの *hemA* 及び *hemT* の $\Delta\Delta$ Ct 値を遺伝子発現量としてグラフに示した(図 3-4)。

3.2.3 ALAS 活性測定

ALAS 遺伝子発現量の変化により ALAS 活性が変化しているかを確認するために、細胞粗抽出物の ALAS 活性を測定した。生育培地(PYS)で好気条件又は微好気条件で培養し、対数増殖期にある細胞と、ALA 生産培地(GGY2)で ALA 生産開始後 0, 6, 12 時間後の細胞をサンプルとして回収した。ALAS 活性の測定方法は Yubisui ら(1972)の方法を参考にした。各培養液を 4°C, 8,000 × g, 5 min 遠心して得た菌体ペレットを 0.9% NaCl 水溶液で懸濁して洗浄し、もう一度集菌と懸濁を繰り返して洗浄した。再度遠心して得られた菌体ペレットを 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)で懸濁し、超音波破碎した。4°C, 10,000 × g, 5 min 遠心して得られた上清のタンパク質濃度をブラッドフォード法で測定した。酵素溶液(95%細胞粗抽出物, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.35 mM ピリドキサルリン酸)と基質溶液(0.5 M グリシン, 1.0 mM スクシニル CoA)を 37°C で 5 min 保温した。酵素溶液に 25%の基質溶液を添加して 37°C で反応を開始した。5 min 後、10%トリクロロ酢酸を加えて氷上に静置し、反応を停止した。酵素反応液中の ALA 濃度は第 2 章 2.2.5 ALA 発酵試験で記述した方法と同じ方法で比色定量した。時間当たりの ALA 生産量を各細胞粗抽出物中の総タンパク質量で除して ALAS の比活性とした(図 3-5)。

3.2.4 ALA 発酵試験

プロモーター挿入株で ALAS 発現量が向上し、ALA 生産性が向上しているかを確認するため、試験管での簡易的な ALA 発酵試験で ALA 生産性を評価した。具体的な方法は第 2 章 2.2.5 ALA 発酵試験と同じ方法で評価した(図 2-3)。

3.3 結果

3.3.1 プロモーターの機能確認

プロモーター挿入株でプロモーターが機能し、プロモーターを挿入した ALAS 遺伝子の発現が

活性化しているかどうかを遺伝子発現の定量により確認した(図 3-4). 生育培地(PYS)で好気条件及び微好気条件で培養し、対数増殖期の細胞から RNA を抽出し、各遺伝子の mRNA 量を定量した. まず WT 株において *hemA* 遺伝子は好気条件で抑制されているが、微好気条件で活性化し、その発現量は 1.8 倍に増加した(図 3-4). また、*hemT* 遺伝子はサイレント遺伝子であるため、微好気条件において転写が活性化することはなかった(図 3-4).

P_{rrnB} を *hemA* 上流に挿入した BA 及び BAT 株では好気条件における *hemA* 遺伝子の mRNA 量が WT 株に比べそれぞれ 3.5, 2.4 倍に増加した(図 3-4). また、WT 株で *hemA* 遺伝子の発現が活性化する微好気条件においても、BA 及び BAT 株の *hemA* 遺伝子の mRNA 量は WT 株に比べそれぞれ 1.3 倍に増加した(図 3-4). 以上より P_{rrnB} は WT 株の微好気条件で活性化した *hemA* プロモーターよりも高活性なプロモーターとして機能することが確認できた. P_{rrnB} を *hemT* 上流に挿入した BT 及び BAT 株では好気条件において *hemT* 発現量が WT 株に比べそれぞれ 24, 41 倍に増加した(図 3-4). また、微好気条件においても *hemT* 発現量が WT 株に比べそれぞれ 37, 46 倍に増加した(図 3-4). 以上より、 P_{rrnB} は WT 株の *hemT* プロモーターよりも高活性なプロモーターとして機能することが確認できた. また、BT 株の *hemA* 発現量は WT 株と同程度であった(図 3-4).

P_{rsp_7571} を *hemA* 上流に挿入した 7A 及び 7AT 株では好気条件、微好気条件に関わらず *hemA* 遺伝子の mRNA 量は WT 株に比べ増加することはなかった(図 3-4). 従って P_{rsp_7571} は生育培地(PYS)での対数増殖期においては WT 株の *hemA* プロモーターよりも高活性なプロモーターとしては機能しないことが判明した. P_{rsp_7571} を *hemT* 上流に挿入した 7T 及び 7AT 株でも好気条件、微好気条件に関わらず *hemT* 遺伝子の mRNA 量は WT 株に比べ増加することはなかった(図 3-4). 従って P_{rsp_7571} は生育培地(PYS)での対数増殖期においては WT 株の *hemT* プロモーターよりも高活性なプロモーターとしては機能しないことが判明した.

3.3.2 ALAS 活性測定

プロモーター挿入株で ALAS 遺伝子の発現量が向上し、ALAS 活性が増加したか確認するために、生育培地(PYS)で培養し対数増殖期にある細胞の破砕液上清中の ALAS 活性を測定した(図 3-5). WT 株においては通常光合成遺伝子が抑制される好気条件に比べ、微好気条件ではそれらが活性化し、ALAS 活性が 15 倍に増加した. その他プロモーターを挿入した株においても好気条件では ALAS 活性が低く(1.1 nmol/min/mg-protein 未満)、微好気条件で活性化していた(1.5 nmol/min/mg-protein 以上). 好気条件及び微好気条件において WT 株よりも ALAS 遺伝子発現量が向上していた P_{rrnB} 挿入株(BA, BT, BAT)の ALAS 活性は予想外に好気条件及び微好気条件において WT 株の ALAS 活性より増加することはなかった. また、好気条件及び微好気条件において WT 株よりも ALAS 遺伝子発現量が増加することはなかった P_{rsp_7571} 挿入株(7A, 7T, 7AT)では全ての条件で WT 株よりも ALAS 活性が低かった.

P_{rrnB} 挿入株(BA, BT, BAT)の ALA 発酵生産初期における ALAS 活性を測定した(図 3-6). 通常光合成遺伝子が抑制される好気条件で前培養したため、WT 株の ALA 生産開始前の ALAS 活性は低い、微好気条件に移して ALA 生産を開始して 6 時間後にはその活性が増加した. さ

らに生産開始 12 時間後にはその活性が低下していた(図 3-6). BT 株では 6 時間後までは WT 株と同程度の ALAS 活性を示したが, 12 時間後でも ALAS 活性が低下することなく増加し続けた(図 3-6). BAT 株では 6 時間後までは WT 株と同程度の ALAS 活性を示したが, 12 時間後に増加することも減少することなくその活性を維持し続けた(図 3-6). BA 株では ALA 生産中も ALAS が活性化しなかった(図 3-6).

3.3.3 ALA 生産性評価

プロモーター挿入株の ALA 生産性を試験管での簡易的な ALA 発酵生産試験により評価した(図 3-7, 3-8). WT 株では生産開始 18 時間後まで培養液中の ALA 蓄積量が増加し, その後は代謝されて 48 時間後まで減少した(図 3-7, 3-8). P_{rsp_7571} を *hemA* に挿入した 2 株(7A, 7AT)では WT 株に比べ培養液中にほとんど ALA を蓄積しなかった(最大 0.2 mM 未満)(図 3-7). 7T 株では WT 株と同様に ALA 蓄積量が増加し(最大 0.67 mM), その後 ALA は代謝されて減少した(図 3-7). BT 株では生産開始 24 時間後に最大 9.2 mM の ALA を蓄積し(図 3-8), WT 株の最大蓄積量(0.78 mM)の 12 倍の ALA を培養液中に蓄積した. 対して P_{rrnB} を *hemA* に挿入した株(BA, BAT)では WT 株に比べほとんど ALA を蓄積しなかった(最大 0.2 mM 未満)(図 3-8).

3.4 考察

3.4.1 プロモーター機能の確認

P_{rrnB} を挿入した株において P_{rrnB} を挿入した遺伝子の発現量が全ての条件で WT 株の発現量よりも増加した(図 3-4). 従って P_{rrnB} は好気条件又は微好気条件において WT 株の *hemA* プロモーターや *hemT* プロモーターよりも高活性なプロモーターとして機能していることが判明した. 尚, *hemT* 遺伝子はサイレント遺伝子であり通常発現量が低いため, WT 株の *hemT* 発現量を基準とすると P_{rrnB} 挿入による *hemA* 発現の増加量と比べ相対的に数字が大きく見えるが, 今回の測定は絶対定量ではないため, これらの数字を一概に比較することはできない. また, *hemT* の発現量が増加した BT 株の *hemA* 発現量は全ての条件において WT 株と同程度であった(図 3-4). これは, *hemT* の高発現による影響が野生型 *hemA* プロモーターの活性に影響を与えないことを表している.

対して P_{rsp_7571} は好気条件又は微好気条件において WT 株の *hemA* プロモーターや *hemT* プロモーターよりも高活性ではなかった. P_{rsp_7571} は Shi らの報告(2021)によると *C. sphaeroides* 2.4.1 株内で調べたプロモーターの中で 2 番目に転写活性が高かったが, 本研究ではサイレント遺伝子である *hemT* プロモーターの活性を超えることがなかったため, 高活性どころか低活性であった. これは親株のバックグラウンドの違いや培地成分の違い, 更に言うと例えば酵母エキスのメーカーの違いなどに由来する可能性が考えられる. また, Shi らの研究ではプラスミド上にプロモーターを載せて転写活性を測定していたが, 本研究においてはゲノム上にクローニングしたため, これらのコピー数等の違いが転写活性に影響した可能性も考えられる.

3.4.2 ALAS 低活性の原因

遺伝子発現定量と同じ条件でプロモーター挿入株の ALAS 活性を測定した。その結果 WT 株では好気条件と微好気条件の *hemA* 遺伝子発現量は 1.8 倍しか変わらず、*hemT* 遺伝子発現量も変化しなかったのに対し、ALAS 活性は微好気条件で好気条件の 15 倍に増加した。これは単純に *hemA* 遺伝子が翻訳されて ALAS 量が増加したこと由来するのではなく、ALAS のタンパク質レベルでの抑制及び活性化が機能したためだと考えられる。具体的には好気条件では ALAS は不活性型として存在しており、微好気条件において活性型となっていると考えられる (Tuboi and Hayasaka, 1972)。P_{rrnB} の挿入により *hemA* 又は *hemT* 発現量が増加した P_{rrnB} 挿入株においても、好気条件の ALAS 活性は全て 1.1 nmol/min/mg-protein 以下に抑制されていることから、これが示唆された。また、ALAS が活性化される微好気条件においても P_{rrnB} 挿入株の ALAS 活性は WT 株のそれを超えることがなかった。P_{rrnB} 挿入株では常に ALAS が高発現しているため、細胞内にヘムが多く存在し、これによって ALAS の活性化がフィードバック抑制されている可能性が考えられる。また、細胞内遊離ヘムによって直接 ALAS はその活性が抑制されるため (Burnham and Lascelles, 1963)、ヘムにより抑制された ALAS の活性を測定している可能性も考えられる。

3.4.3 ALA 生産性の向上

プロモーター挿入株の ALA 生産性を ALA 発酵試験により評価した。WT 株では生産開始 18 時間後までは ALA 蓄積量が増加したが、その後減少した。本試験では基質であるグリシンやグルコースを途中で追加していないため、ALA の基質が足りなくなることによって ALA 合成速度が減少し、これに対して ALA 代謝の速度が上回ることで ALA 蓄積量が減少する。足りなくなった基質を添加することで ALA の減少を抑制し、更に ALA を高蓄積させることはできると考えられるが、ALA 代謝に対して ALA 生産速度が早ければ早いほど ALA が高蓄積するため、本試験においては ALA 生産の初期速度の指標として最大蓄積量を測定している。

P_{rsp_7571} は高活性プロモーターとして機能しなかったため、これを *hemA* に挿入した 7A 及び 7AT 株では WT 株に比べ ALA がほとんど蓄積しなかった。これは WT 株の ALA 合成が主に *hemA* 遺伝子の発現調節により制御されており、低活性である P_{rsp_7571} の挿入により *hemA* が活性化能を失ったためだと考えられる。対して P_{rsp_7571} を *hemT* にのみ挿入した 7T 株は WT 株と同程度の ALA を蓄積した。これはこの株において *hemA* 遺伝子は野生型であるため WT 株と同様に微好気条件で活性化したためだと考えられる。

高活性プロモーターとして機能した P_{rrnB} を *hemT* のみに挿入した BT 株は WT 株の 12 倍の ALA を蓄積した。これは P_{rrnB} により *hemT* 遺伝子が高発現し、これにより ALAS 活性が増加して ALA 生産性が向上したためだと考えられる。生育培地 (PYS) における対数増殖期の細胞ではこの株の ALAS 活性は WT 株よりも低下していたが (図 3-5)、生産培地 (GGY2) で生産条件の細胞では ALAS 活性が WT 株よりも向上している可能性が示唆された。

BT 株は WT 株よりも ALA を高蓄積したが、P_{rrnB} を *hemA* に挿入した株 (BA, BAT) では ALAS 遺伝子発現量が増加しているにもかかわらず (図 3-4)、WT 株に比べほとんど ALA が蓄積しなかつ

った。ALA が高蓄積した BT 株とほとんど蓄積しなかった BAT 株の唯一の違いは *hemA* 上流に P_{rrnB} が挿入されているかいないかのみである。 P_{rrnB} の挿入により *hemA* 遺伝子の発現量が増加したが、増加した HemA が HemT の活性を負に制御するとは考えにくい。ため、*hemA* 下流の遺伝子が高発現してしまった影響により代謝が変わり、基質であるスクシニル CoA の供給が不足したのではないかと考えられる。 P_{rrnB} を *hemA* 上流に挿入したことにより BAT 株の生産性が低下したということは、BA 株も同様の理由で ALA をほとんど蓄積しなかったと考えられる。尚、*hemA* 下流には機能未知の *rsp_2983* 及び非メバロン酸経路でカロテノイドの前駆体を合成する *gcpE* が同じ向きに存在するため(図 3-2)、これらはオペロンを構成している可能性がある。*rsp_2983* をアミノ酸配列で相同性検索したところ、大腸菌で細胞骨格形成に関与する膜貫通タンパク質である RodZ と相同性が高いことが判明した(図 3-9)。*C. sphaeroides* では光合成条件で光合成効率を上げるために内膜の構造が変化することが知られており、また、*prpA* 又は *prpB* 欠損によりその形成が抑制される(Fedotova and Zeilstra-Ryalls, 2014)。よってこの *rsp_2983* は光合成条件で内膜の構造の変化に関与している可能性が考えられる。実際に ALA 生産終了時の湿菌体重量当たりの菌体濁度を比較すると BA 株は WT 株、BT 株に比べ 2 倍の菌体濁度を示し(図 3-10)、 P_{rrnB} が *hemA* に挿入された株でのみ菌体が白くなっている(図 3-11)。これは内膜の構造が変化することに由来していると考えられる。以上より、 P_{rrnB} の挿入により *hemA* 下流遺伝子が高発現したことで ALA 生産性が低下している可能性が高いため、これらの株の *hemA* 下流にターミネーター配列を挿入することで ALA を高生産させることができると考えられる。

3.4.4 ALA 生産中の ALAS 活性の向上

BT 株において生育培地(PYS)では ALAS が WT 株よりも低活性であったにもかかわらず(図 3-5)、生産培地(GGY2)での ALA 発酵試験では WT 株よりも多くの ALA を蓄積した(図 3-8)。これらから生育培地(PYS)で対数増殖期にある細胞と生産培地(GGY2)で ALA 生産中の細胞の ALAS 活性は異なる可能性が示唆されたため、 P_{rrnB} 挿入株における ALA 生産中の細胞の ALAS 活性を測定した(図 3-6)。その結果、WT 株の ALAS は微好気条件に移して生産を開始してから 6 時間後に一度活性化するものの、12 時間後にはまた抑制されることが判明した。基質が不足することにより ALA 代謝が ALA 合成を上回ることで ALA が減少すると思っていたが、これは誤りで、ALAS 活性が抑制されることにより ALA 合成速度も減少していたことが判明した。

また、最も多くの ALA を蓄積した BT 株の ALAS 活性は生産開始 6 時間後までは WT 株と同程度であるが、12 時間後も低下することなく増加し続けた(図 3-6)。生産開始 12 時間後の時点で BT 株の ALAS 活性は WT 株の約 7 倍であった。この生産開始 6 時間後以降の ALAS 活性の差が生産開始 20 時間前後の最大 ALA 蓄積量の差に繋がったと考えられる。さらに、ALA をほとんど蓄積しなかった BAT 株の ALAS 活性は生産開始 6 時間後までは WT 株と同程度であり、12 時間後においては WT 株よりも高いことが判明した。ALAS 活性が高いにもかかわらず ALA が蓄積しないのはやはり基質の一つであるスクシニル CoA の供給量が不足しているためだと考えられる。また、BA 株では常に ALAS 活性が低いことから、ALAS が活性化していないと考えられる。

3.5 まとめ

本章では高活性プロモーターを ALAS 遺伝子上流に挿入することで ALA 高生産菌の作製を試みた。高活性プロモーターとして P_{rrnB} 及び P_{rsp_7571} を ALAS 遺伝子上流に挿入した株を作製したが、本研究において P_{rsp_7571} は高活性ではないことが判明した(図 3-4)。対して P_{rrnB} は微好気条件で活性化した *hemA* プロモーターよりも高活性であることが判明し(図 3-4)、これを *hemT* 上流に挿入した BT 株では ALA 生産中の ALAS 活性が生産開始 12 時間後まで減少することなく増加し続け(図 3-6)、これにより WT 株よりも 12 倍の ALA を培養液中に蓄積した(図 3-8)。従って当初の目的通り、高活性プロモーターの挿入により ALA の高生産菌の開発に成功した。

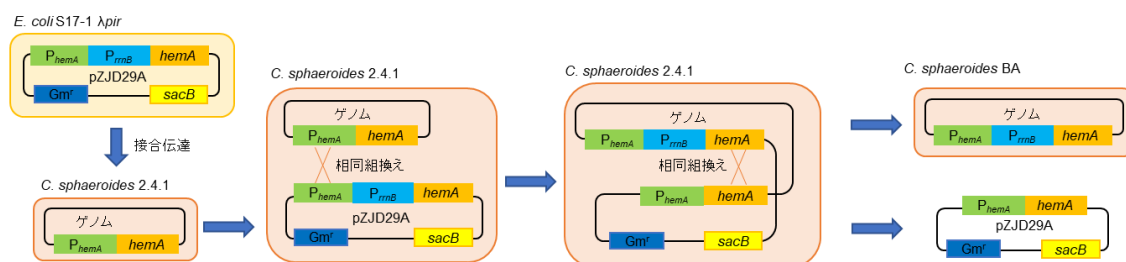
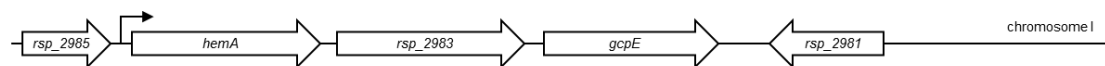


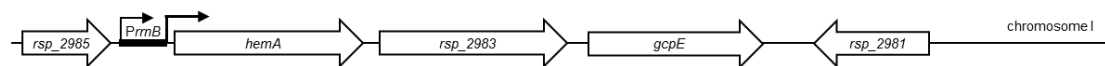
図 3-1 自殺ベクターを用いたプロモーターの挿入方法

プロモーターを挿入した配列をプラスミド上に構築し、光合成細菌に接合伝達して挿入した. 挿入したいプロモーターの上流及び下流で 2 回の相同組換えが生じた株を得ることで, 内在性プロモーターのみがゲノム上に挿入された株を得ることができる.

WT, (BT, 7T) 株



BA, BAT株



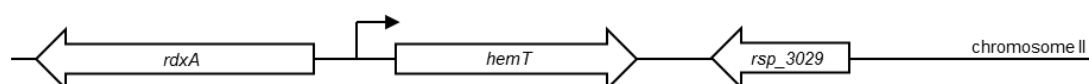
7A, 7AT株



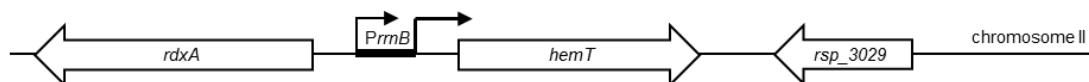
図 3-2 各株の *hemA* 近傍遺伝子の構成

hemA 遺伝子は第一染色体にコードされている。P_{*rmB*} (195 bp) は *hemA* 遺伝子転写開始点下流に挿入した。SD 配列を含む P_{*rsp_7571*} (498 bp) は *hemA* 遺伝子開始コドン上流に挿入した。 *hemA* 下流には同じ方向に機能未知の *rsp_2983*, 及びカロテノイドの前駆体を合成する非メバロン酸経路の *gcpE* 遺伝子がコードされている。さらに下流には相補鎖に機能未知の *rsp_2981* がコードされている。

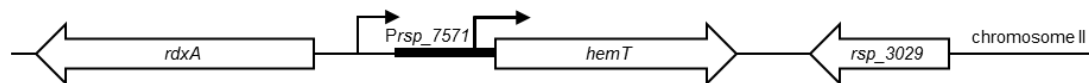
WT, (BA, 7A) 株



BT, 7AT株



7T, 7AT株



500 bp

図 3-3 各株の *hemT* 近傍遺伝子の構成

hemT 遺伝子は第二染色体上にコードされている。 *PrrmB* は *hemT* 遺伝子転写開始点下流に挿入した。 SD 配列を含む *Prsp_7571* は *hemT* 遺伝子開始コドン上流に挿入した。 *hemT* 下流には相補鎖に機能未知の *rsp_3029* がコードされている。

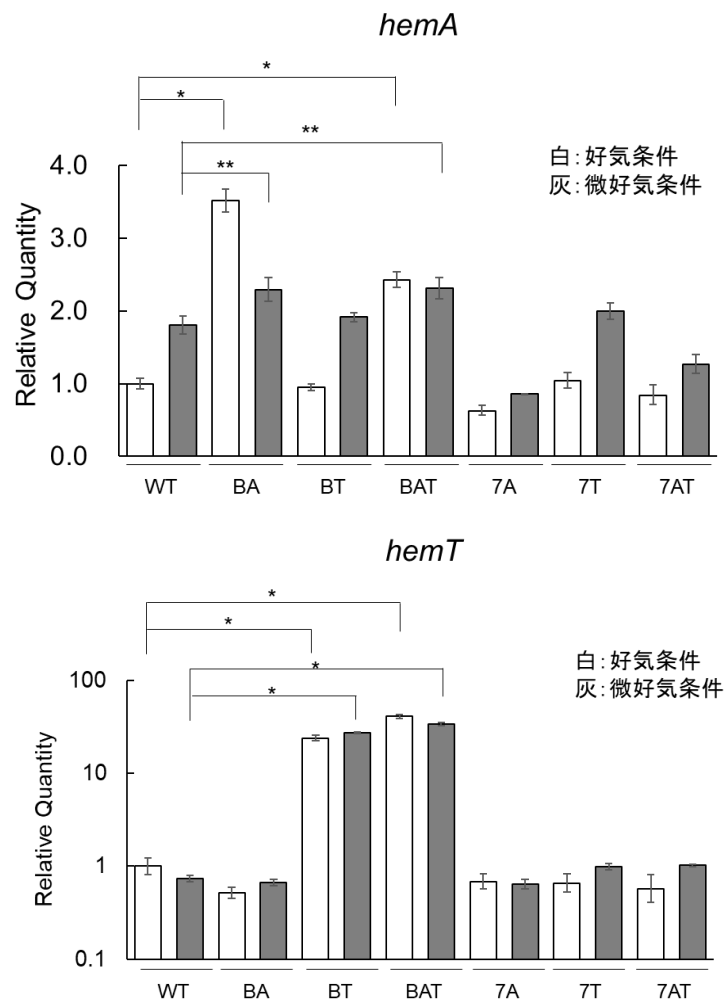


図 3-4 ALAS 遺伝子の発現量

各種細胞を生育培地で、好気条件(白)又は微好気条件(灰)で培養し、対数増殖期にある細胞の *hemA*(上)又は *hemT*(下)発現量を定量した. ハウスキーピング遺伝子である *rpoZ* 遺伝子を内在性コントロールとして用いた. $*p < 0.01$, $**p < 0.015$; two-sided Student's t-test.

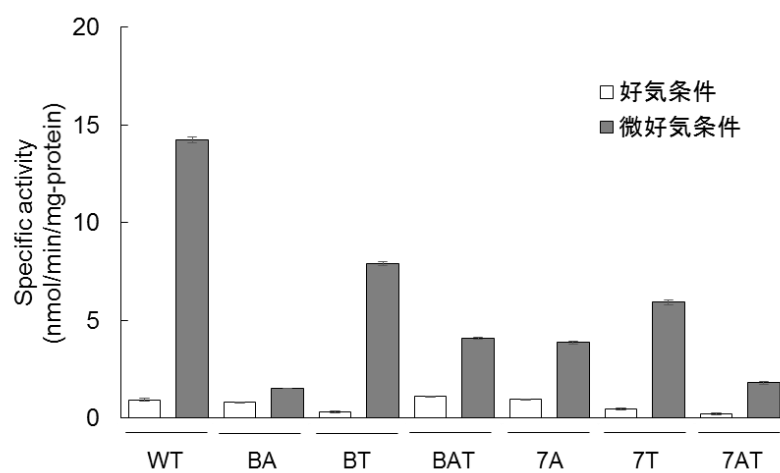


図 3-5 好気条件又は微好気条件における ALAS 活性

各種細胞を生育培地で、好気条件(白)又は微好気条件(灰)で培養し、対数増殖期にある細胞の粗抽出物の ALAS 比活性を測定した。

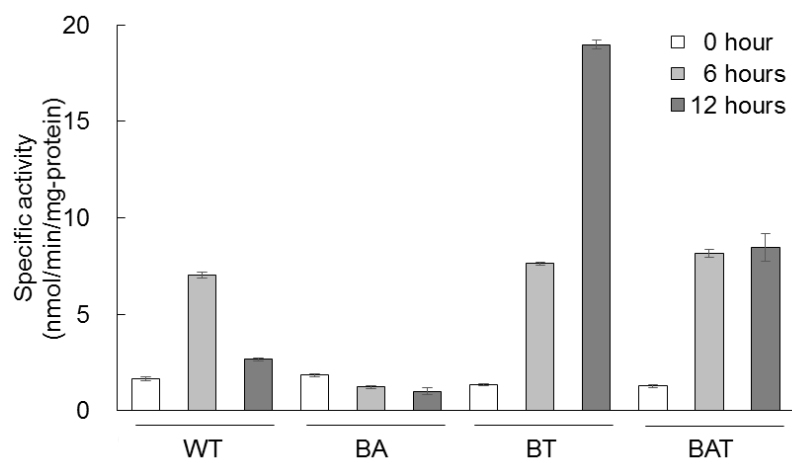


図 3-6 ALA 生産中の細胞の ALAS 活性

ALA 生産開始 0, 6, 12 時間後の各種細胞の粗抽出物中の ALAS 活性を測定した。尚, 前培養した培養液から集菌し, 新しい生産培地に懸濁する前の細胞を 0 時間のサンプルとした。

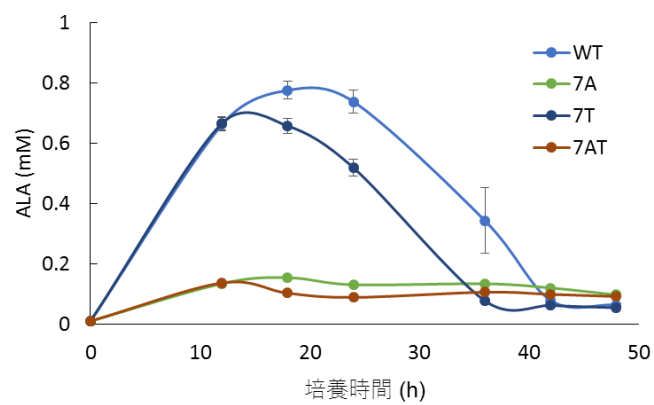


図 3-7 P_{rsp_7571} 挿入株の ALA 生産性

各種細胞を基質であるグリシン及び代謝阻害剤のレブリン酸を含む新しい生産培地に懸濁して微好気条件で培養することで ALA 生産を開始し, 経時的に培養液中の ALA を定量した.

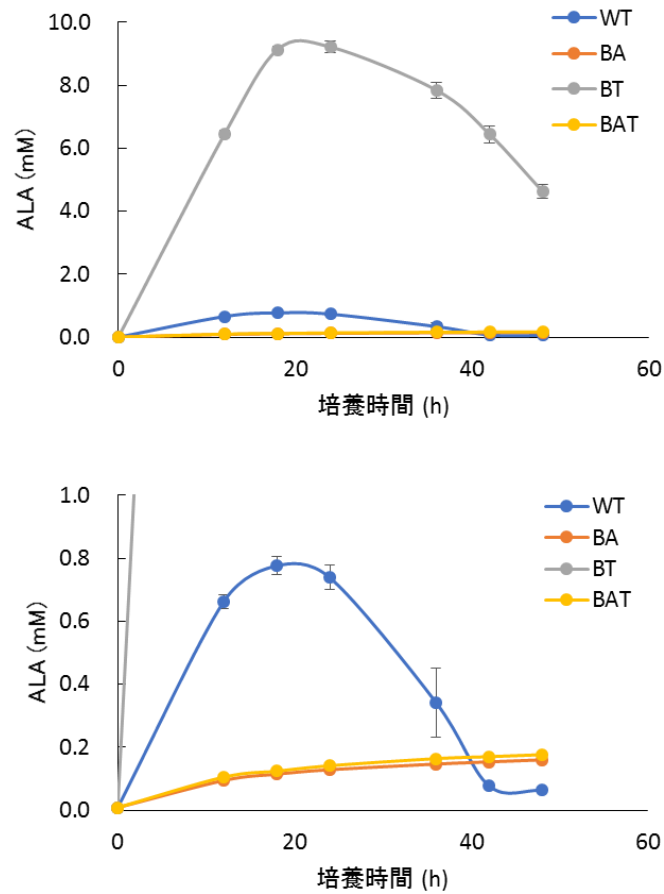


図 3-8 P_{rrnB} 挿入株の ALA 生産性

各種細胞を基質であるグリシン及び代謝阻害剤のレブリン酸を含む新しい生産培地に懸濁して微好気条件で培養することで ALA 生産を開始し，経時的に培養液中の ALA を定量した．縦軸が 0 から 10 mM までのグラフ (上) 及び，0 から 1.0 mM までのグラフ (下)．

EcoRodZ rsp2983	----MNTEATHDQNE-----ALTTGARLRNAREQLGLSQQAVAERLCLKVSTVRDIEE MIWRRTPQSTAEVDKPKGFDDFELRLGDLMRGERATLGKSLLDVQRELKIKATYIAAIEN . : * : : : * * : * * * * * : * : : : * :
EcoRodZ rsp2983	DKAPADLASTFLRGYIRSYARLVHIPEE-----ELLPG ADVSAFETQGFVAGYVRSYARYLGMDPDEAFARFCHEANFTTMHGMASVTGARRDTGPR ... * : . * : ** : ***** : : : : : * :
EcoRodZ rsp2983	LEKQAPLRAAKVAPMQSFS-LGKRRKKRDGWLMTFTWLVLVFI GLSGAWWWQDRKAQQE SRPQGEGRDPLADPNALFVPRGESVLASIEPGAVGSVLVLLALIGGIYGGWAVLQQVQR . * . * . . * * * : . : *** : . ** * * : * .
EcoRodZ rsp2983	EITTMADQSSAELSSNSEQQGSVPLNTSTTTDPAT-----TSTPPASVDTTATNTQTPAV VQVAPVDQAPQVVAEIDPLGSVGTVAPLVRSEPASDTMDLAAADPAQPDLMGRLYRPQAG . : . ** : . : : . * . : . . : *** : : : * . * . : . *
EcoRodZ rsp2983	TAPAPAVDPQQNAVVSPSQANVDTAATPAPTAATTPDGAAPLPTDQAGVTTTPVADPNALV ALDVPVLVSRDGPIAAINPRMNDVQQASLELPAIPATAAAVPVEEEVQVAEAAPP-TVE : . * : . : . : . : . * : . : . : * * * : * : : . : . * * : :
EcoRodZ rsp2983	MNFTADCWLEVTDATGKKLFSGMQRK-DGNLNLTGQAPYKLKIGAPAAVQIQYQGKP--- LLAVRPSWVRVQAADGTVLFEKILDAGERYVVPQMEEPPVL RAGNSGSLYFAVNGETYGP : . . * . * * * * * : : : : : * * * * . : : : : * :
EcoRodZ rsp2983	-----VDLSRFIRTNQVARLTLNAEQSPAQ----- SAPGAQVVKNVALSPEALTGKYAMADLTGDADLARYVTVAQNETR * ** * : * * . : . * :

図 3-9 *rsp_2983* 翻訳産物と *E. coli* RodZ のアミノ酸配列比較

rsp_2983 翻訳産物と相同性の高い *E. coli* RodZ のアミノ酸配列との比較.

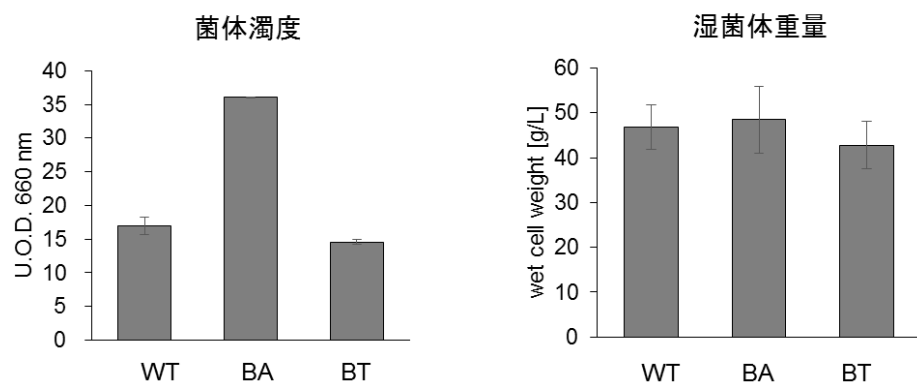


図 3-10 ALA 生産後の菌体濁度及び湿菌体重量

生産開始 48 時間後の菌体濁度(左)及び湿菌体重量(右). 培養液を希釈して測定した O.D.に希釈倍率を乗じたものを, 希釈前の菌体濁度として算出し, これを Unit of Optical Density (U.O.D) とした.

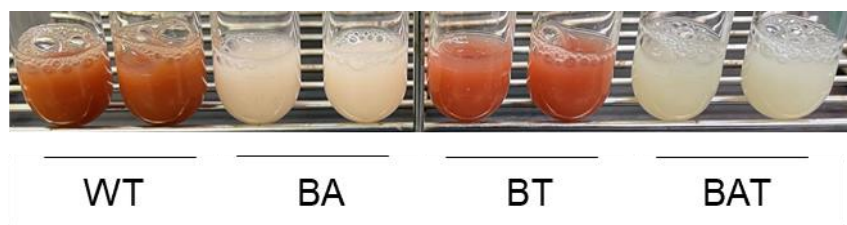


図 3-11 ALA 生産後の菌体
生産開始 48 時間後の培養液.

表 3-1 菌株及びプライマーリスト

Strain	Characteristic(s)	Source or reference
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk+), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIqZAM15</i>]	Yanisch-Perron et al., 1985
JM109 λ pir	JM109 lysogenized with λ pir bacteriophage	Penfold and Pemberton, 1992
S17-1	F-, <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , [RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 (Tp Sm)]	Simon et al., 1983
S17-1 λ pir	S17-1 lysogenized with λ pir bacteriophage	De Lorenzo et al., 1990
<i>C. sphaeroides</i>		
2.4.1	Wild Type	W. R. Siström
WT	Rifampicin-resistant strain obtained by spontaneous mutagenesis from 2.4.1.	This study
BA	The <i>rrnB</i> promoter was inserted upstream of the <i>hemA</i> transcription start site	This study
BT	The <i>rrnB</i> promoter was inserted upstream of the <i>hemT</i> transcription start site	This study
BAT	The <i>rrnB</i> promoter was inserted upstream of both the <i>hemA</i> and <i>hemT</i> transcription start sites	This study
7A	The <i>rsp_7571</i> promoter was inserted upstream of the <i>hemA</i> start codon	This study
7T	The <i>rsp_7571</i> promoter was inserted upstream of the <i>hemT</i> start codon	This study
7AT	The <i>rsp_7571</i> promoter was inserted upstream of both the <i>hemA</i> start codon and <i>hemT</i> start codon	This study
Plasmid		
pZJD29A	Suicide vector, <i>sacB</i> , <i>aacC1</i> (Gm ^r), mob RP4	Swem et al., 2003
pZJD29A- <i>PrrnB-hemA</i>	Sequence to insert P _{<i>rrnB</i>} upstream of the <i>hemA</i> transcription start site on pZJD29A	This study
pZJD29A- <i>PrrnB-hemT</i>	Sequence to insert P _{<i>rrnB</i>} upstream of the <i>hemT</i> transcription start site on pZJD29A	This study
pZJD29A- <i>Prsp_7571-hemA</i>	Sequence to insert P _{<i>rsp_7571</i>} upstream of the <i>hemA</i> coding sequence on pZJD29A	This study
pZJD29A- <i>Prsp_7571-hemT</i>	Sequence to insert P _{<i>rsp_7571</i>} upstream of the <i>hemT</i> coding sequence on pZJD29A	This study

表 3-2 プライマーリスト

プロモーター挿入用のプラスミド構築に用いたプライマー. In-Fusion 反応に用いた付加配列は下線で示した.

Primer	Sequence (5'→3')	Amplification target
MCS _{hemA} UP-F	<u>CGGTACCCGGGGATC</u> GGGATCTTGACGGCGGGGGC	Upstream of <i>hemA</i> transcription start site
P _{rrnB} hemAUP-R	GCGCGACGGATCAAATCCTAAGTCTGGAACCGGC	Upstream of <i>hemA</i> transcription start site
P _{rrnB} hemADW-F	<u>CCGCTTCATTATCAAGGCCATGTTGCGCCGAAAA</u>	Downstream of <i>hemA</i> transcription start site
MCS _{hemA} ADW-R	<u>CGACTCTAGAGGATC</u> CGGTCCCTTGCCGATCGAGGTC	Downstream of <i>hemA</i> transcription start site
hemAUPP _{rrnB} -F	<u>TTTGATCCGTCGCGCGCACCCCTCTGCGGCGGCC</u>	Promotor of <i>rrnB</i>
hemADWP _{rrnB} -R	<u>TTGATAATGAAGCGGTTTCTAGGAGCAGACGGCCCCG</u>	Promotor of <i>rrnB</i>
MCS _{hemT} TUP-F	<u>CGGTACCCGGGGATC</u> ATGATCAGCAACCCGGCGAC	Upstream of <i>hemT</i> transcription start site
P _{rrnB} hemTUP-R	<u>GCGCGACT</u> CGGCCATTTGTATGGCTTACAATCT	Upstream of <i>hemT</i> transcription start site
P _{rrnB} hemTDW-F	<u>CCGCTTCATAGGCGGCTCGGCAATGCCTGCCG</u>	Downstream of <i>hemT</i> transcription start site
MCS _{hemT} TDW-R	<u>CGACTCTAGAGGATC</u> GATCTTCGGGCGCGCCGGATCG	Downstream of <i>hemT</i> transcription start site
hemTUPP _{rrnB} -F	<u>ATGGCCGAGTCGCGCGCACCCCTCTGCGGCGGCC</u>	Promotor of <i>rrnB</i>
hemTDWP _{rrnB} -R	<u>CCGCCTATGAAGCGGTTTCTAGGAGCAGACGGCCCC</u>	Promotor of <i>rrnB</i>
MCS _{hemA} UP-F2	<u>CGGTACCCGGGGATC</u> GAAAGGCCGAGGTGGAGATCCTGC	Upstream of <i>hemA</i> start codon
P7571 _{hemA} UP-R	<u>TGCGGCGCTTCGTCTCCCTGACGCTCGGGCTGCCGAGCAAGC</u>	Upstream of <i>hemA</i> start codon
P7571 _{hemA} ADW-F	<u>AGGCACCATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTG</u>	Downstream of <i>hemA</i> start codon
MCS _{hemA} ADW-R2	<u>CGACTCTAGAGGATC</u> GATCTCCTCGATGCGGCCGAAGTCGC	Downstream of <i>hemA</i> start codon
hemAUPP7571-F	<u>AGACGAAGCGCCGACGCCGATGGTCCAGACCTCG</u>	Promotor of <i>rsp_7571</i>
hemADWP7571-R	<u>TAGTCCATGGTGCCTCCTTCAGATGCAAGC</u>	Promotor of <i>rsp_7571</i>
MCS _{hemT} TUP-F2	<u>CGGTACCCGGGGATC</u> AGGAAGAAGCGTCGGCCGGCAATG	Upstream of <i>hemT</i> start codon
P7571 _{hemT} TDW-F	<u>AGGCACCATGGAGTTCTCTCAGCACTTCCAGAAG</u>	Upstream of <i>hemT</i> start codon
P7571 _{hemT} TUP-R	<u>TGCGGCGGGGATCACCTTCTGTTGGAGCGACAC</u>	Downstream of <i>hemT</i> start codon
MCS _{hemT} TDW-R2	<u>CGACTCTAGAGGATC</u> GATTTCCGGCGATGGGGGCGATGT	Downstream of <i>hemT</i> start codon
hemTUPP7571-F	<u>TGATCCCCCGCCGACCCGATGGTCCAGACCTC</u>	Promotor of <i>rsp_7571</i>
hemTDWP7571-R	<u>AACTCCATGGTGCCTCCTTCAGATGCAAGC</u>	Promotor of <i>rsp_7571</i>

表 3-3 定量 PCR に用いたプライマーリスト

Primer	Sequence (5'→3')	Source or reference
rpoZqRT-F	ATCGCGGAAGAGACCCAGAG	Gomelsky et al., 2003
rpoZqRT-R	GAGCAGCGCCATCTGATCCT	Gomelsky et al., 2003
hemTqRT-F	CCGACCGCATGAACCTCGTC	This study
hemTqRT-R	CTTTCGTCCGTCGATCCGGC	This study
hemAqRT-F	GCTCGGGCACCGAGAAGCAC	This study
hemAqRT-R	TCTCCTCGATGCGGCCGAAG	This study

第4章 結言

ALA は天然のアミノ酸であり、ATP 合成に必要なヘムの必須の前駆体であるためほぼ全ての生物の細胞内で合成されている(図 1-1)。ヘム合成経路において ALA の合成が律速であるため (Li et al., 1997), ALA の供給によりヘム合成経路を活性化することができる。現在, ALA は薬や化粧品, 肥料, 飼料などとして幅広い分野で利用されている。日本国内において ALA は突然変異誘発により育種された光合成細菌 *C. sphaeroides* を用いた発酵によって工業的に製造されており(表 1-1), その安全性から, 光合成細菌によって製造された ALA のみが食品として認められている(厚生労働省, 2012, <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002kjh.html>)。これまでに ALA 高生産菌の研究開発として, コリネ型細菌(特開 2005-333907)や大腸菌(Pu et al., 2023)で ALA の高蓄積が報告されているが, これらの菌は全て遺伝子組換え菌である。食品等の製造, 販売に際しては安全性の厳密な評価が義務付けられているため, これらの菌の実製造への適応ハードルは高い。そこで本研究では更なる ALA の生産性向上のため, *C. sphaeroides* を用いて最終的に得られた株が法律上は遺伝子組換え体とは見做されない 2 つの異なるアプローチで新規 ALA 生産菌の開発を試みた。*C. sphaeroides* 内で ALA は ALAS によって合成されるため(Tai et al., 1988), ALAS を高発現させることで ALA 生産量を増加させることができると考えた。

C. sphaeroides 内で ALAS をコードする *hemA* 遺伝子を含む光合成遺伝子は PrrA/PrrB 二成分制御系によって制御されている(Ranson-Olson et al., 2006)(図 1-5)。そこで PrrA(図 1-7)又は PrrB(図 1-6)に恒常的に活性型となる点変異を導入することで *hemA* の発現を向上させた株(PrrA*, PrrB*株)を構築した(図 2-2)。これらの株で光合成遺伝子の発現が活性化しているかを確認するため, 細胞粗抽出物の吸光スペクトルを測定した(図 2-5)。その結果, PrrA*株では通常光合成遺伝子の発現が活性化する微好気条件においてもカロテノイドやバクテリオクロロフィルに由来する吸光ピークがほとんど確認できなかった。PrrA の恒常的活性化を引き起こすと考えられた点変異は近縁種の *R. capsulatus* を用いた研究(Du et al., 1998)が土台となっていたため, *C. sphaeroides* ではこの点変異の影響が作用しなかった可能性が高い。対して PrrB*株では通常, 光合成遺伝子の発現が抑制されている好気条件においてもカロテノイドやバクテリオクロロフィルに由来する吸光ピークが観察され, 光合成遺伝子の発現が恒常的に活性化していた。しかし PrrB*株の ALA 生産性を評価したところ, WT 株よりも低蓄積であった(図 2-6)。PrrA/PrrB レギュロンはヘム合成経路の *hemE* も含むため, ヘム合成経路全体が活性化した結果, ALA 代謝も活性化してしまったため, ALA としては蓄積しなかったと考えられる。また, *hemA* だけでなく光合成遺伝子全体の発現を活性化してしまうため, 代謝リソースの観点からも非効率的であることが示唆された。

次に, より直接的かつ選択的に ALAS のみを高発現させるため, 内在性の高活性プロモーターである 2 つのプロモーター(P_{rrnB} , P_{rsp_7571})(Dryden and Kaplan 1993, Shi et al., 2021)を, ALAS をコードする *hemA*, *hemT* 遺伝子上流に挿入することで ALAS の発現を向上させた株を構築した(図 3-1, 3-2, 3-3)。挿入したプロモーターが機能しているかどうかを ALAS 遺伝子の発現定量により確認したところ(図 3-4), P_{rsp_7571} 挿入株では挿入した全ての遺伝子で発現量が WT 株を超えることはなかった。今回用いた株や培地成分, 培養方法では P_{rsp_7571} は低活性であることが判明し

た. 対して P_{rrnB} を挿入した株では挿入した全ての遺伝子の発現量が WT 株に比べ増加していたため, P_{rrnB} は恒常的に高活性なプロモーターであることが確認できた. 次に P_{rrnB} を挿入した株で ALA 生産性を評価したところ(図 3-8), P_{rrnB} を *hemA* に挿入した 2 株では WT 株に比べほとんど ALA が蓄積しなかった. *hemA* 下流には同じ向きに機能未知の制御因子である *rsp_2983* がコードされているため(図 3-2), *hemA* の高発現と共に *rsp_2983* も高発現した結果, 代謝が変化して ALA が生産されなかった可能性が高い. また, P_{rrB} *株でも P_{rrB} の活性化により, 同様に *hemA* 下流の遺伝子の高発現によって ALA 生産性が低下していた可能性が示唆された. これらの株で ALA 生産性を向上させるためには, *hemA* 下流にターミネーターを挿入することで下流の遺伝子の発現を抑制することが有効かもしれない.

対して P_{rrnB} を *hemT* のみに挿入した株では ALA 生産中の ALAS 活性が低下することなく増加し続け(図 3-6), 最大で WT 株(0.77 mM)の 12 倍の ALA が蓄積した(9.2 mM). これをもって当初の目的である食品産業で応用可能な, 外来遺伝子を持たない新規 ALA 高生産菌の開発に成功した. 尚, 同様の手法での ALA 蓄積量を突然変異育種株と比較すると(表 1-1), 第 5 段階目(8.1 mM)から第 6 段階目(11.2 mM)の株に相当する ALA 蓄積量だった. P_{rrnB} を *hemT* に挿入した株は, これらの株と同様の水準で ALA の初期生産速度を達成し, かつこれらの株の様な有害な二次突然変異の蓄積が少ないため, 発酵槽で基質を随時添加していく流加培養により ALA 生産性を評価した場合に, これらの株よりも短期間で多くの ALA を蓄積する可能性がある.

本研究により, 高活性プロモーターの挿入によって ALAS 遺伝子の高発現には成功したが(図 3-4), 好気条件では ALAS が不活性化されていることも判明した(図 3-5). 基質の一つであるスクシニル CoA は糖を好氣的に代謝して TCA サイクルから供給されるため, 好気条件で最も供給量が多くなると考えられる. 従って今後更に ALA 生産性を向上させるためには好気条件でも ALAS を活性化することが重要になると考えられる.

大腸菌での ALA 生産菌開発では, ALAS を高発現した後にスクシニル CoA の供給を最適化することで更に生産性を向上させている(Pu et al., 2023). 従って本研究で得られた ALA 高生産菌の ALA 生産性を更に向上させるためには, 同様にスクシニル CoA の供給経路の最適化が課題となる可能性が高い. 食品産業への適用を前提とすると, 菌の作製に外来遺伝子を用いることができないため, スクシニル CoA 合成経路の律速酵素にランダム点変異を導入するなどして合成経路を強化したり, スクシニル CoA の代謝経路の遺伝子のプロモーター領域に点変異を導入するなどして発現量を低下させたりすることが ALA 生産性の向上に有効であると考えられる. 大腸菌での研究を参考にすると, 更にその後の ALA 生産性の向上のためには①PBGS の抑制②ヘムによる ALAS 活性阻害の解除③ALA 排出能の向上④酸化ダメージ修復等が有効であることが予想されるため, これらを内在性遺伝子のみで実現することができれば ALA 生産性を更に向上することができると考えられる.

尚, 菌株構築の後の実製造に向けた研究開発では小スケールでの発酵試験を繰り返しながら, 製造への最適条件を検討していく. この際, 指標となるのは ALA の最大蓄積量だけではなく, 培養時間, 培地成分, 製造の手間等の製造コスト, 新規設備導入や工程変更にかかる導入コスト及

び ALA 類縁物質及び不純物の生成等の安全性等が考慮され、場合によってはこれらがトレードオフの関係にある。実際に ALA 生産時に類縁物質として検出される 5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸 (AHVA) を低減するために生育至適温度よりも低温で発酵生産している (Tanaka et al., 2015)。

本研究では新規 ALA 高生産菌の開発を目的に、ALA の初期生産性を評価することとまった。本研究で得られた候補株は今後ジャーファーマンターを用いた数 L スケールの発酵試験に供され、最適な培地や培養方法が検討される予定である。

参考文献

- Akada, R., Matsuo, K., Aritomi, K., and Nishizawa, Y. (1999) Construction of recombinant Sake yeast containing a dominant FAS2 mutation without extraneous sequences by a two-step gene replacement protocol. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 43–48.
- Aksakal, O., Algur, O. F., Icoğlu Aksakal, F., and Aysin, F. (2017) Exogenous 5-aminolevulinic acid alleviates the detrimental effects of UV-B stress on lettuce (*Lactuca sativa* L) seedlings. *Acta Physiol. Plant.*, **39**, 1–10.
- An, Y., Cheng, D., Rao, Z., Sun, Y., Tang, Q., et al. (2019) 5-Aminolevulinic acid (ALA) promotes primary root elongation through modulation of auxin transport in *Arabidopsis*. *Acta Physiol. Plant.*, **41**, 1–11.
- An, Y., Qi, L., and Wang, L. (2016) ALA pretreatment improves waterlogging tolerance of fig plants. *PloS one*, **11**, e0147202.
- Anwar, A., Yan, Y., Liu, Y., Li, Y., and Yu, X. (2018) 5-Aminolevulinic acid improves nutrient uptake and endogenous hormone accumulation, enhancing low-temperature stress tolerance in cucumbers. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3379.
- Assunção-Miranda, I., Cruz-Oliveira, C., Neris, R. L., Figueiredo, C. M., Pereira, L. P., et al. (2016) Inactivation of Dengue and Yellow Fever viruses by heme, cobalt-protoporphyrin IX and tin-protoporphyrin IX. *J. Appl. Microbiol.*, **120**, 790–804.
- Balasubramanian, S., Hurley, L. H., and Neidle, S. (2011) Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **10**, 261–275.
- Beekwilder, J., van Houwelingen, A., Cankar, K., van Dijk, A. D., de Jong, R. M., et al. (2014) Valencene synthase from the heartwood of Nootka cypress (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene. *Plant Biotechnol. J.*, **12**, 174–182.
- Bhanja, D., Wilding, H., Baroz, A., Trifoi, M., Shenoy, G., et al. (2023) Photodynamic Therapy for Glioblastoma: Illuminating the Path toward Clinical Applicability. *Cancers*, **15**, 3427.
- Bird, T. H., Du, S., and Bauer, C. E. (1999) Autophosphorylation, phosphotransfer, and DNA-binding properties of the RegB/RegA two-component regulatory system in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16343–16348.
- Brunet, A., Pagès, G., and Pouyssegur, J. (1994) Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene*, **9**, 3379–3387.
- Burnham, B. F., and Lascelles, J. (1963) Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feedback mechanism. Studies with preparations of δ -aminolaevulate synthetase and δ -aminolaevulate dehydratase from *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochem. J.*, **87**, 462–472.
- Cai, C., He, S., An, Y., and Wang, L. (2020) Exogenous 5-aminolevulinic acid improves strawberry tolerance to osmotic stress and its possible mechanisms. *Physiol. Plant.*, **168**, 948–962.

- Chory, J., Donohue, T. J., Varga, A. R., Staehelin, L. A., and Kaplan, S. (1984) Induction of the photosynthetic membranes of *Rhodopseudomonas sphaeroides*: biochemical and morphological studies. *J. Bacteriol.*, **159**, 540–554.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K. N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.*, **172**, 6568–6572.
- De Loskey, R. J., and Beattie, D. S. (1984) The effects of insulin and glucose on the induction and intracellular translocation of delta-aminolevulinic acid synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**, 64–71.
- Dryden, S. C., and Kaplan, S. (1993) Identification of cis-acting regulatory regions upstream of the rRNA operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.*, **175**, 6392–6402.
- Du, S., Bird, T. H., and Bauer, C. E. (1998) DNA binding characteristics of RegA. A constitutively active anaerobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18509–18513.
- Elansary, H. O., El-Ansary, D. O., and Al-Mana, F. A. (2019) 5-aminolevulinic acid and soil fertility enhance the resistance of rosemary to *Alternaria dauci* and *Rhizoctonia solani* and modulate plant biochemistry. *Plants*, **8**, 585.
- Elgendy, O., Kitahara, G., Taniguchi, S., and Osawa, T. (2022) 5-Aminolevulinic acid combined with sodium ferrous citrate mitigates effects of heat stress on bovine oocyte developmental competence. *J. Reprod. Dev.*, **68**, 271–277.
- Eraso, J. M. and Kaplan, S. (1995) Oxygen-insensitive synthesis of the photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides*: a mutant histidine kinase. *J. Bacteriol.*, **177**, 2695–2706.
- Fedotova, Y., and Zeilstra-Ryalls, J. (2014) Analysis of the role of PrrA, PpsR, and FnrL in intracytoplasmic membrane differentiation of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 using transmission electron microscopy. *Photosynth. Res.*, **119**, 283–290.
- Fujii, C., Miyashita, K., Mitsuishi, M., Fujii, K., Inoue, H., et al. (2017) Treatment of sarcopenia and glucose intolerance through mitochondrial activation by 5-aminolevulinic acid. *Sci. Rep.*, **7**, 4013.
- Fujino, M., Nishio, Y., Ito, H., Tanaka, T., and Li, X. K. (2016) 5-Aminolevulinic acid regulates the inflammatory response and alloimmune reaction. *Int. Immunopharmacol.*, **37**, 71–78.
- Fukuda, H., Paredes, S., and Battle, A. M. D. C. (1992) Tumour-localizing properties of porphyrins in vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **102**, 433–436.
- Gomelsky, L., Sram, J., Moskvina, O. L., Horne, I. M., Dodd, H. N., et al. (2003) Identification and in vivo characterization of PpaA, a regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol.*, **149**, 377–388.
- Handschin, C., Lin, J., Rhee, J., Peyer, A. K., Chin, S., et al. (2005) Nutritional regulation of hepatic

- heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α . *Cell*, **122**, 505–515.
- Hayashi, J., Ohta, S., Kagawa, Y., Kondo, H., Kaneda, H., et al. (1994) Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. Functional integrity of mitochondrial DNA from aged subjects. *J. Biol. Chem.*, **269**, 6878–6883.
- Hendawy, A. O., Shirai, M., Takeya, H., Sugimura, S., Miyanari, S., et al. (2019) Effects of 5-aminolevulinic acid supplementation on milk production, iron status, and immune response of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **102**, 11009–11015.
- Henry, K. K., Ross, W., Myers, K. S., Lemmer, K. C., Vera, J. M., et al. (2020) A majority of *Rhodobacter sphaeroides* promoters lack a crucial RNA polymerase recognition feature, enabling coordinated transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 29658–29668.
- Higashikawa, F., Kanno, K., Ogata, A., and Sugiyama, M. (2020) Reduction of fatigue and anger-hostility by the oral administration of 5-aminolevulinic acid phosphate: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel study. *Sci. Rep.*, **10**, 16004.
- Hijioka, M., Kitamura, K., Yanagisawa, D., Nishimura, K., Takata, K., et al. (2020) Neuroprotective effects of 5-aminolevulinic acid against neurodegeneration in rat models of Parkinson's disease and stroke. *J. Pharmacol. Sci.*, **144**, 183–187.
- Hordt, A., Lopez, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., et al. (2020) Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of *Alphaproteobacteria*. *Front. Microbiol.*, **11**, 468.
- Hotta, Y., Tanaka, T., Takaoka, H., Takeuchi, Y., and Konnai, M. (1997) New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: The increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 2025–2028.
- Hou, J., Cai, S., Kitajima, Y., Fujino, M., Ito, H., et al. (2013) 5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron induces carbon monoxide generation in mouse kidneys and protects from renal ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **305**, F1149–F1157.
- Imam, S., Noguera, D. R., and Donohue, T. J. (2014) Global analysis of photosynthesis transcriptional regulatory networks. *PLoS Genet.*, **10**, e1004837.
- Imamura, K., Sugihara, H., and Hirahata, K. (2021) Phase 2 randomized clinical trial of 5-Aminolevulinic acid plus sodium citrate chloride vs placebo for Covid-19 infected patients recovered with sequelae. *ALA-Porphyrin Science*, **10**, 15–22.
- Inoue, K., Fukuhara, H., Shimamoto, T., Kamada, M., Iiyama, T., et al. (2012) Comparison between intravesical and oral administration of 5-aminolevulinic acid in the clinical benefit of photodynamic diagnosis for nonmuscle invasive bladder cancer. *Cancer*, **118**, 1062–1074.
- Kamiyama, H., Hotta, Y., Tanaka, T., Nishikawa, S. and Sasaki, K. (2000) Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a photosynthetic bacterium. *Seibutsu-kogaku Kaishi*, **78**, 48–55.

- Kawaguchi, J., Mori, H., Iwai, N., and Wachi, M. (2022) A secondary metabolic enzyme functioned as an evolutionary seed of a primary metabolic. *Mol. biol. evol.*, **39**, msac164.
- Kennedy, J. C., Pottier, R. H., and Pross, D. C. (1990) Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **6**, 143–148.
- Komatsuya, K., Hata, M., Balogun, E. O., Hikosaka, K., Suzuki, S., et al. (2013) Synergy of ferrous ion on 5-aminolevulinic acid-mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*. *J. Biochem.*, **154**, 501–504.
- Li, J. M., Russell, C. S., and Cosloy, S. D. (1989) Cloning and structure of the *hemA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene*, **82**, 209–217.
- Ling, X. U., Islam, F., Zhang, W. F., Ghani, M. A., and Ali, B. (2018) 5-Aminolevulinic acid alleviates herbicide-induced physiological and ultrastructural changes in *Brassica napus*. *J. Integr. Agric.*, **17**, 579–592.
- Liu, C., Yang, X., Zhu, P., Fujino, M., Ito, H., et al. (2018) Combination of 5-aminolevulinic acid and iron prevents skin fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease. *Exp. Dermatol.*, **27**, 1104–1111.
- Liu, L., El-Shemy, H. A., and Saneoka, H. (2017) Effects of 5-aminolevulinic acid on water uptake, ionic toxicity, and antioxidant capacity of Swiss chard (*Beta vulgaris* L.) under sodic-alkaline conditions. *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.*, **180**, 535–543.
- Liu, L., Zhu, X., Yu, A., Ward, C. M., and Pace, B. S. (2019) δ -Aminolevulinate induces fetal hemoglobin expression by enhancing cellular heme biosynthesis. *Exp. Biol. Med.*, **244**, 1220–1232.
- Liu, W. Q., Kang, L., and Wang, L. J. (2006) Effect of ALA on photosynthesis of strawberry and its relationship with antioxidant enzymes. *Acta Bot. Boreal.-Occid. Sin.*, **26**, 57–62.
- Luongo, V., Ghimire, A., Frunzo, L., Fabbicino, M., d'Antonio, et al. (2017) Photofermentative production of hydrogen and poly- β -hydroxybutyrate from dark fermentation products. *Bioresour. Technol.*, **228**, 171–175.
- Ma, L. L., Zhang, P., Wang, H. Q., Li, Y. F., Hu, J., et al., (2019) Heme oxygenase-1 agonist CoPP suppresses influenza virus replication through IRF3-mediated generation of IFN- α/β . *Virology*, **528**, 80–88.
- Ma, N., Qi, L., Gao, J., Chao, K. C., Hu, Q. F., et al. (2015) Effects of 5-ALA on growth and chlorophyll fluorescence of *Ficus carica* cutting seedlings under high temperature. *J. Nanjing Agric. Univ.*, **38**, 546–553.
- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F. W., Predki, P. F., Stilwagen, S., et al. (2001) The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynth. Res.*, **70**, 19–41.

- Mackenzie, C., Eraso, J. M., Choudhary, M., Roh, J. H., Zeng, X., et al. (2007) Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 283–307.
- Masuki, S., Morita, A., Kamijo, Y., Ikegawa, S., Kataoka, Y., et al. (2016) Impact of 5-aminolevulinic acid with iron supplementation on exercise efficiency and home-based walking training achievement in older women. *J. Appl. Physiol.*, **120**, 87–96.
- Mauzerall, D., and Granick, S. (1956) The occurrence and determination of δ -Aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.*, **219**, 435.
- Mayer, S. M. and Beale, S. I. (1990) Light regulation of δ -aminolevulinic acid biosynthetic enzymes and tRNA in *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.*, **94**, 1365–1375.
- Nakamura, Y., Haraguchi, A., Horie, I., Kawakami, A., and Abiru, N. (2023) Pilot trial on the effect of 5-aminolevulinic acid on glucose tolerance in patients with maternally inherited diabetes and deafness. *Diabetes Ther.*, **14**, 447–459.
- Nandi, D. L. (1978) Delta-aminolevulinic acid synthase of *rhodopseudomonas spheroides*. Binding of pyridoxal phosphate to the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 266–271.
- Needle, E. L., and Kaplan, S. (1993) Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* *hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. *J. Bacteriol.*, **175**, 2292–2303.
- Neris, R. L. S., Figueiredo, C. M., Higa, L. M. Araujo, D. F., Carvalho, C. A. M., et al. (2018) Coproporphyrin IX and Sn-protoporphyrin IX inactivate Zika, Chikungunya and other arboviruses by targeting the viral envelope. *Sci. Rep.*, **8**, 9805.
- Neuberger, A., Sandy, J. D., and Tait, G. H. (1973) Control of 5-aminolaevulinate synthetase activity in *Rhodopseudomonas spheroides*. The involvement of sulphur metabolism. *Biochem. J.*, **136**, 477–490.
- Ngwe Tun, M.M., Sakura, T., Sakurai, Y., Kurosaki, Y., Inaoka, D. K., et al. (2022) Antiviral activity of 5-aminolevulinic acid against variants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Trop. Med. Health*, **50**, 6.
- Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y., et al. (1999) *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 798–804.
- Nozawa, N., Noguchi, M., Shinno, K., Tajima, M., Aizawa, S., et al. (2022) 5-Aminolevulinic acid and sodium ferrous citrate ameliorate muscle aging and extend healthspan in *Drosophila*. *FEBS Open Bio*, **12**, 295–305.
- Ogawa, E., Fushimi, T., Ogawa-Tominaga, M., Shimura, M., Tajika, M., et al. (2020) Mortality of Japanese patients with Leigh syndrome: Effects of age at onset and genetic diagnosis. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **43**, 819–826.
- Ogura, S., Maruyama, K., Hagiya, Y., Sugiyama, Y., Tsuchiya, K., et al. (2011) The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome c oxidase activity in mouse liver. *BMC Res. Notes*, **4**, 66.

- Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., et al. (2002) A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 217–223.
- Omori, C., Motodate, R., Shiraki, Y., Chiba, K., Sobu, Y., et al. (2017) Facilitation of brain mitochondrial activity by 5-aminolevulinic acid in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr. Neurosci.*, **20**, 538–546.
- Pedrosa-Gerasmio, I. R., Kondo, H., and Hirono, I. (2019) Dietary 5-aminolevulinic acid enhances adenosine triphosphate production, ecdysis and immune response in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *J. Aquac. Res.*, **50**, 1131–1141.
- Penfold, R. J., and Pemberton, J. M. (1992) An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene*, **118**, 145–146.
- Perez, M. H., Shintani, T. T., Rodriguez, B. L., Davis, J., Harrigan, R. C., et al. (2013) The role of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and sleep. *Int. J. Clin. Med.*, **4**, 1–7.
- Prentki, P., and Krisch, H. M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, **29**, 303–313.
- Pu, W., Chen, J., Zhou, Y., Qiu, H., Shi, T., et al. (2023) Correction: Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for hyper-production of 5-aminolevulinic acid. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.*, **16**, 108.
- Qiang, S., Su, A. P., Li, Y., Chen, Z., Hu, C. Y., et al. (2019) Elevated β -carotene synthesis by the engineered *Rhodobacter sphaeroides* with enhanced CrtY expression. *J. Agric. Food Chem.*, **67**, 9560–9568.
- Raingaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Dérjard, B., and Davis, R. J. (1996) MKK3-and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1247–1255.
- Ranson-Olson, B., Jones, D. F., Donohue, T. J., and Zeilstra-Ryalls, J.,H. (2006) In vitro and in vivo analysis of the role of PrrA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 *hemA* gene expression. *J. Bacteriol.*, **188**, 3208–3218.
- Ranson-Olson, B., and Zeilstra-Ryalls, J. H. (2008) Regulation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 *hemA* gene by PrrA and FnrL. *J. Bacteriol.*, **190**, 6769–6778.
- Rebeiz, C. A., Juvik, J. A., and Rebeiz, C. C. (1988) Porphyrin insecticides: 1. Concept and phenomenology. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **30**, 11–27.
- Rebeiz, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H. J., and Wu, S. M. (1984) Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 390–396.
- Rehani, P. R., Iftikhar, H., Nakajima, M., Tanaka, T., Jabbar, Z., et al. (2019) Safety and Mode of Action of Diabetes Medications in comparison with 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA). *J. Diabetes Res.*, **2019**, 4267357.

- Saitoh, S., Okano, S., Nohara, H., Nakano, H., Shirasawa, N., et al. (2018) 5-aminolevulinic acid (ALA) deficiency causes impaired glucose tolerance and insulin resistance coincident with an attenuation of mitochondrial function in aged mice. *PloS one*, **13**, e0189593.
- Sakai, A., Iwatani, N., and Harada, K. (2020) Improvement effect of 5-aminolevulinic acid on hyperlipidemia in miniature schnauzer dogs: An open study in 5 cases of one pedigree. *Yonago Acta Med.*, **63**, 234–238.
- Sakurai, Y., Ngwe Tun, M. M., Kurosaki, Y., Sakura, T., Inaoka, D. K., et al. (2021) 5-amino levulinic acid inhibits SARS-CoV-2 infection in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **545**, 203–207.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Nishizawa, Y., and Hayashi, M. (1987) Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, **65**, 511–515.
- Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., and Tanaka, T. (2002) Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23–29.
- Schempp, F. M., Drummond, L., Buchhaupt, M., and Schrader, J. (2017) Microbial cell factories for the production of terpenoid flavor and fragrance compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 2247–2258.
- Shemin, D., and Russell, C. S. (1953) δ -Aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4873–4874.
- Shi, T., Zhang, L., Liang, M., Wang, W., Wang, K., et al. (2021) Screening and engineering of high-activity promoter elements through transcriptomics and red fluorescent protein visualization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Synth. Syst. Biotechnol.*, **6**, 335–342.
- Shioda, N., Yabuki, Y., Yamaguchi, K., Onozato, M., Li, Y., et al. (2018) Targeting G-quadruplex DNA as cognitive function therapy for ATR-X syndrome. *Nat. Med.*, **24**, 802–813.
- Shimura, M., Nozawa, N., Ogawa-Tominaga, M., Fushimi, T., Tajika, M., et al. (2019) Effects of 5-aminolevulinic acid and sodium ferrous citrate on fibroblasts from individuals with mitochondrial diseases. *Sci. Rep.*, **9**, 10549.
- Shoolingin-Jordan, P. M., Al-Daihan, S., Alexeev, D., Baxter, R. L., Bottomley, S. S., et al. (2003) 5-Aminolevulinic acid synthase: mechanism, mutations and medicine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1647**, 361–366.
- Simon, R., Priefer, U., and Pthler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat. Biotechnol.*, **1**, 784–791.
- Singh, R., Kesavan, A. K., Landi, M., Kaur, S., Thakur, S., et al. (2020) 5-aminolevulinic acid regulates Krebs cycle, antioxidative system and gene expression in *Brassica juncea* L. to confer tolerance against lead toxicity. *J. Biotechnol.*, **323**, 283–292.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J., and Stock, A. M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **53**, 450–490.

- Sofyanovich, O. A., Nishiuchi, H., Yamagishi, K., Maekawa, K., and Serebryanny, V. A. (2011) A new method for repeated “self-cloning” promoter replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biotechnol.*, **48**, 218–227.
- Stoian, N., Kaganjo, J., and Zeilstra-Ryalls, J. (2018) Resolving the roles of the *Rhodobacter sphaeroides* HemA and HemT 5-aminolevulinic acid synthases. *Mol. Microbiol.*, **110**, 1011–1029.
- Su, A., Chi, S., Li, Y., Tan, S., Qiang, S., et al. (2018) Metabolic redesign of *Rhodobacter sphaeroides* for lycopene production. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 5879–5885.
- Su, A., Yu, Q., Luo, Y., Yang, J., Wang, E., et al. (2021) Metabolic engineering of microorganisms for the production of multifunctional non-protein amino acids: γ -aminobutyric acid and δ -aminolevulinic acid. *Microb. Biotechnol.*, **14**, 2279–2290.
- Sugiyama, Y., Hagiya, Y., Nakajima, M., Ishizuka, M., Tanaka, T., et al. (2014) The heme precursor 5-aminolevulinic acid disrupts the Warburg effect in tumor cells and induces caspase-dependent apoptosis. *Oncol. Rep.*, **31**, 1282–1286.
- Suzuki, T., Katsuhiko, I., and Sumio, K. (2019) Assessing the effects of 5-aminolevulinic acid supplementation on skin properties among middle-aged and older women—A randomized, double-blind, placebo-controlled study – *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **47**, 259–273.
- Swem, L. R., Kraft, B. J., Swem, D. L., Setterdahl, A. T., Masuda, S., et al. (2003) Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *EMBO J.*, **22**, 4699–4708.
- Tai, T. N., Moore, M. D., and Kaplan, S. (1988) Cloning and characterization of the 5-aminolevulinate synthase gene(s) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Gene*, **70**, 139–151.
- Takano, T., Satoh, K., and Doki, T. (2021) Possible antiviral activity of 5-aminolevulinic acid in feline infectious peritonitis virus (feline coronavirus) infection. *Front. Vet. Sci.*, **8**, 647189.
- Tanaka, T., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N., and Nishio, N. (1994) Utilization of volatile fatty acids from the anaerobic digestion liquor of sewage sludge for 5-aminolevulinic acid production by photosynthetic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 677–680.
- Tanaka, T., Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T. Shinkawa, H., et al. (2015) Production of by-products during 5-aminolevulinic acid (ALA) production by a mutant of photosynthetic bacteria (*Rhodobacter sphaeroides* strain CR-720) and industrial ALA production under control of temperature. *Seibutsu-kogaku Kaishi*, **93**, 24–31.
- Tanaka, T., Watanabe, K., Nishikawa, S., Hotta, Y., Sasaki, K., et al. (1994) Selection of a high 5-aminolevulinic acid-producing *Rhodobacter sphaeroides* mutant which is insensitive to yeast extract. *Seibutsu-kogaku Kaishi*, **72**, 461–467.
- Taspinar, M. S., Aydin, M., Arslan, E., Yaprak, M., and Agar, G. (2017) 5-Aminolevulinic acid improves DNA damage and DNA Methylation changes in deltamethrin-exposed *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, **118**, 267–273.
- Tuboi, S., and Hayasaka, S. (1972) Control of δ -aminolevulinate synthetase activity in

- Rhodopseudomonas spheroides*: II. Requirement of a disulfide compound for the conversion of the inactive form of fraction I to the active form. *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 690–697.
- Tzima, S., Victoratos, P., Kranidioti, K., Alexiou, M., and Kollias, G. (2009) Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production. *J. Exp. Med.*, **206**, 1167–1179.
- Wang, J. P., Kim, H. J., Chen, Y. J., Yoo, J. S., Cho, J. H., et al. (2009) Effects of delta-aminolevulinic acid and vitamin C supplementation on feed intake, backfat, and iron status in sows. *J. Anim. Sci.*, **87**, 3589–3595.
- Wang, J. P., Lee, J. H., Jang, H. D., Yan, L., Cho, J. H., et al. (2011) Effects of δ -aminolevulinic acid and vitamin C supplementation on iron status, production performance, blood characteristics and egg quality of laying hens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, **95**, 417–423.
- Wang, L. J., Jiang, W. B., and Huang, B. J. (2004) Promotion of 5-aminolevulinic acid on photosynthesis of melon (*Cucumis melo*) seedlings under low light and chilling stress conditions. *Physiol. Plant.*, **121**, 258–264.
- Wang, L. J., Jiang, W. B., Liu, H., Liu, W. Q., Kang, L., et al. (2005) Promotion by 5-aminolevulinic acid of germination of pakchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee) seeds under salt stress. *J. Integr. Plant Biol.*, **47**, 1084–1091.
- Warnick, G. R., and Burnham, B. F. (1971) Regulation of prophylin biosynthesis. Purification and characterization of -aminolevulinic acid synthase. *J. Biol. Chem.*, **246**, 6880–6885.
- Wei, Z. Y., Zhang, Z. P., Lee, M. R., Sun, Y. P., and Wang, L. J. (2012) Effect of 5-aminolevulinic acid on leaf senescence and nitrogen metabolism of pakchoi under different nitrate levels. *J. Plant Nutr.*, **35**, 49–63.
- Yang H, Zhang J, Zhang H, Xu Y, An Y, et al. (2021) Effect of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) on leaf chlorophyll fast fluorescence characteristics and mineral element content of *Buxus megistophylla* grown along urban roadsides. *Horticulturae*. **7**, 95.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103–119.
- Yasumoto, S., Miyinari, S., Yoshimura, S., Kondo, M., and Takahashi, Y. (2012) Effect of oral administration of 5-aminolevulinic acid in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquacult. Sci.*, **60**, 411–412.
- Yigit, D. O., Gündüz, U., Türker, L., Yücel, M., and Eroglu, I. (1999) Identification of by-products in hydrogen producing bacteria: *Rhodobacter sphaeroides* OU 001 grown in the wastewater of a sugar refinery. *J. Biotechnol.*, **70**, 125–131.
- Young, D. A., Bauer, C. E., Williams, J. C., and Marrs, B. L. (1989) Genetic evidence for superoperonal organization of genes for photosynthetic pigments and pigment-binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 1–12.

- Yubisui, Y., and Yoneyama, Y. (1972) δ -Aminolevulinic acid synthase of *Rhodobacter sphaeroides*: purification and properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 77–85.
- Zhu, Y., Lu, W., Ye, L., Chen, Z., Hu, W., et al. (2017) Enhanced synthesis of Coenzyme Q10 by reducing the competitive production of carotenoids in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem. Eng. J.*, **125**, 50–55.

略語等一覧

AHVA: 5-Amino-4-hydroxyvaleric acid, 5-アミノ-4-ヒドロキシ吉草酸

ALA: 5-Aminolevulinic acid, 5-アミノレブリン酸

ALAS: 5-Aminolevulinic acid synthase, ALA 合成酵素

ATP: Adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸

bp: Base pair, 塩基対

cDNA: Complementary DNA, 相補的 DNA

CDS: Coding sequence, 翻訳領域

CoA: Coenzyme A, 補酵素 A

DMAB: p-Dimethylaminobenzaldehyde, p-ジメチルアミノベンズアルデヒド

DNA: Deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸

Gm^r: Gentamicin resistance, ゲンタマイシン耐性

HO-1: Heme oxygenase-1, ヘムオキシゲナーゼ-1

MCS: Multi cloning site, マルチクローニングサイト

mRNA: Messenger RNA, メッセンジャーRNA

PBG: Porphobilinogen, ポルフォビリノーゲン

PBGS: Porphobilinogen synthase, ポルフォビリノーゲン合成酵素

PCR: Polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応

PHB: Poly- β -hydroxybutyrate, ポリヒドロキシ酪酸

PpIX: Protoporphyrin IX, プロトポルフィリン IX

PLP: Pyridoxal phosphate, ピリドキサーリン酸

RNA: Ribonucleic acid, リボ核酸

RNAi: RNA interference, RNA 干渉

Sp^r: Spectinomycin resistance, スペクチノマイシン耐性

X-gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 用基質

謝辞

本論文は、私が東京工業大学生命理工学院生命理工学系生命理工学コース博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものになります。このような重要な成果を得るにあたり、お世話になった多くの方々への感謝の意をここに表します。

まず初めに、受託研究員として快く受け入れてくださり、直接的なご指導を戴いた東京工業大学生命理工学院生命理工学系生命理工学コース教授、増田真二先生に深謝の意を表します。

また、実験の進捗確認に必要不可欠な DNA シーケンスの確認において、本研究をご支援いただいた東京工業大学オープンファシリティセンター分析部門(すずかけ台)の皆様に感謝の意を表します。

さらに、学部生時代の授業で分子生物学の面白さを教えていただき、私に微生物の研究の道に進むきっかけを与えてくださっただけでなく、学部 4 年の研究室配属から修士課程卒業まで、研究者としての基礎をご指導いただき、博士後期課程に在籍中もお世話になった東京工業大学生命理工学院生命理工学系生命理工学コース教授、和地正明先生に感謝の意を表します。

そして私を受け入れてくださった増田研究室の皆様に感謝の意を表します。

最後に、実験の都合で帰りが遅くなったり、休日も研究室に寄ることがあったりと、様々なご心配、ご迷惑をおかけした妻、小島由貴に謝意を表します。

尚、本研究の研究費の一部及び学位取得にかかる費用は、ネオファーマージャパン株式会社の出資によることを記しておきます。

このように多くの方々に支えられ、助けられて本研究を進めることができたことに心からの感謝を捧げます。ありがとうございました。

以上、謝辞とさせていただきます。