

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	水素細菌による従属栄養条件でのバイオポリエステル生合成における補充経路およびカルビン回路の機能解析
Title(English)	Functional analysis of anaplerotic pathway and Calvin cycle under heterotrophic biopolyester synthesis in H ₂ -oxidizing bacterium <i>Ralstonia eutropha</i>
著者(和文)	清水理恵
Author(English)	Rie Shimizu
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9804号, 授与年月日:2015年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:福居 俊昭,中村 聡,和地 正明,平沢 敬,柘植 丈治
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9804号, Conferred date:2015/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生物プロセス	専攻	申請学位（専攻分野）： 博士 Academic Degree Requested	（ 工学 ） Doctor of
学生氏名： Student's Name	清水 理恵		指導教員（主）： Academic Advisor(main)	福居 俊昭
			指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

化学合成独立栄養生物である水素細菌 *Ralstonia eutropha* は独立・従属栄養条件の双方において高いポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] 生合成能を示す。本研究では糖質からの P(3HB) 生合成における新規知見の取得、および効率的な P(3HB) 生産のための代謝改変を目指して、*R. eutropha* を対象とした RNA-シーケンシング (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析、および補充経路の改変とその影響評価を行った。RNA-seq 解析の結果より、P(3HB) 生合成と本菌の CO₂ 固定経路である Calvin-Benson-Bassham (CBB) サイクルの関連が強く示唆されたことから、従属栄養条件下の P(3HB) 生合成における炭酸固定機能の解明を行った。

R. eutropha H16 株についてフルクトースを炭素源とした際の増殖期、P(3HB) 生合成期および定常期での菌体からトータル RNA を抽出し、rRNA を除去して RNA-seq 解析を行った。増殖期では転写・翻訳など生育に重要な役割を担う遺伝子の転写誘導が非常に高かった一方で、中央代謝に関与する遺伝子は P(3HB) 生合成期において転写量が減少した。興味深いことに、フルクトース生育条件にも関わらず脂肪酸 β-酸化に関わる遺伝子クラスターおよび CBB サイクル遺伝子群 (*cbb* オペロン) の転写が増殖期と比較して P(3HB) 生合成期では顕著に増加していた。

糖質を炭素源とする条件でのオキサロ酢酸の補充経路を遮断することで、増殖を伴わない P(3HB) 蓄積期でのホスホエノールピルビン酸 (PEP) およびピルビン酸からのアセチル-CoA 供給と P(3HB) 生合成へのフラックスが強化されることが考えられた。そこで補充経路酵素遺伝子 3 種について遺伝子破壊を行ったところ、*R. eutropha* ではホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (Ppc) が主要な補充経路酵素、ピルビン酸カルボキシラーゼは *ppc* 破壊株で部分的に機能する補助的な役割を担っていることが示された。興味深いことに親株が P(3HB) をほとんど生合成しない窒素源十分条件において、Ppc 欠損株は P(3HB) を高い蓄積率で生合成した。このことから Ppc 欠損により緊縮応答が常時誘発されていることが推測された。

RNA-seq 解析の結果より、*R. eutropha* H16 株は従属栄養 P(3HB) 生合成条件で CBB サイクルが機能している可能性が示唆された。そこで *R. eutropha* グルコース資化性改変株 H16G 株、CO₂ 固定を担うリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) 遺伝子 *cbbLS* 破壊株、*cbb* オペロン転写制御因子遺伝子 (*cbbR*) 破壊株を対象として、[1-¹³C]-グルコースから生合成された P(3HB) を分析したところ、¹³C 存在比が H16G 株で 5.6% を示し、上記の遺伝子破壊株より顕著に高かった。メタボローム解析により各代謝物への ¹³C 取り込みを測定したところ、代謝物の ¹³C 標識は株によって異なり、特に Rubisco の基質であるリブローズ-1,5-ビスリン酸は *cbbR* 破壊株では検出されず、H16G 株と *cbbLS* 破壊株では検出された。この結果は [1-¹³C]-グルコース由来 ¹³CO₂ が CBB サイクルによって再利用される代謝フラックスを示す強固な証拠である。エネルギー・還元力の収支の考察から、増殖と連動しない条件ではグルコースに由来する CO₂ の固定により P(3HB) の炭素収率は 120% に増加することが推測されたが、H16G 株は *cbbLS* 破壊株と比べて実際に炭素収率が増加していることを明らかにした。

R. eutropha の従属栄養 P(3HB) 生合成条件において“不必要に”活性化された CBB サイクルが機能すれば、*R. eutropha* の糖代謝で唯一機能する Entner-Doudoroff (ED) 経路なしに好氣的従属栄養で生育する可能性が考えられた。そこで ED 経路の鍵酵素 2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸 (KDPG) アルドラーゼ遺伝子 *eda* を破壊したところ、*eda* 破壊株は非常に遅い速度ではあるものの、グルコース炭素源での増殖が可能であり、CO₂ 固定を担う Rubisco との重複破壊によってその生育能を失うことから、CBB サイクルに依存した好氣的従属栄養生育が強く示された。また、この *eda* 破壊株は非常に増殖速度が遅いにも関わらず投入したグルコースを全量消費しつつ P(3HB) を蓄積した。*eda* と PHA シンターゼ遺伝子 *phaC* の二重破壊株もグルコースでの生育能を欠損したことから、P(3HB) 生合成に伴う細胞内 PEP 濃度の減少が CBB サイクル活性化に重要であると考えられた。これにより、好氣的従属栄養条件による CBB サイクル依存的生育という今までに報告例のない代謝が成立することを立証した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	生物プロセス	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名 : Student's Name	清水 理恵		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	福居 俊昭	
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

A Gram-negative facultative chemolithoautotrophic bacterium *Ralstonia eutropha* strain H16 can utilize various organic compounds in the heterotrophic growth. While the autotrophic growth mode, this bacterium can utilize H₂ as the energy source, and fix CO₂ by the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle. This strain has been also known to accumulate poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] as a storage compound under unbalanced growth conditions.

To obtain detailed knowledge for the P(3HB) biosynthesis by this bacterium, this study performed a quantitative transcriptome analysis based on RNA-seq of *R. eutropha* H16. The results showed the transcription of genes for CBB cycle and several genes for β -oxidation were significantly induced even in the P(3HB) production phase on fructose.

The gene disruption analysis demonstrated that phosphoenolpyruvate carboxylase (Ppc) and pyruvate carboxylase (Pyc) had a major and minor anaplerotic roles in *R. eutropha* respectively, under the fructose-grown condition.

The ¹³C-labeling profiles of various metabolites and P(3HB) were investigated in *R. eutropha* incubated with [1-¹³C₁]-glucose. The author clarified that *R. eutropha* strain H16G incorporated ¹³CO₂, emitted by oxidative decarboxylation of [1-¹³C₁]-glucose, into key metabolites of CBB cycle and finally into P(3HB) up to 5.6% ¹³C-abundance. The carbon yield of P(3HB) by the strain H16G was 1.2-times higher than those by the CBB cycle-inactivated mutants, that was agreed with the possible fixation of CO₂ estimated from the balance of energy and reducing equivalents through sugar degradation integrated with CBB cycle. The results proved that the “gratuitously” functional CBB cycle in *R. eutropha* under aerobic heterotrophic conditions participated in reutilization of CO₂ emitted during sugar degradation.

Moreover, this study clarified the novel sugar degradation pathway depending on CBB cycle under aerobic heterotrophic condition.

In conclusion, this study provided several new knowledge for P(3HB) biosynthesis by *R. eutropha* on sugars, as well as a new insight of the role of CBB cycle functioning in reutilization of CO₂ emitted through sugar degradation.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).