

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)	要約
Type(English)	Outline

論文の要約

THESIS OUTLINE

東京工業大学大学院生命理工学研究科
生物プロセス専攻

氏名 清水 理恵

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 *cbbLSs* 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、[1-¹³C₁]-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 [1-¹³C₁]-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。さらに、*R. eutropha* の代謝経路改変株を用いて、CBB サイクルに依存した従属栄養生育について検討した。

以上のように、本論文ではバイオポリエステル生産菌である *R. eutropha* の遺伝子発現と代謝について新たな知見を得たことに加え、炭酸固定経路である CBB サイクルが代謝過程の脱炭酸で生成した CO₂を固定して再利用する機能を有することを明らかにした。