

分岐鎖飽和脂肪酸を生産するラン藻の創出

曾根 薫 (筑波大学 生物学類)

指導教員：鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

光合成生物を利用した有用炭化水素の生産が注目を集めている。特に微細藻類は、高等植物に比べて生育が速く、限られた培養面積で多くのバイオマスが得られることから、バイオ燃料の生産への応用が強く期待されている[1]。しかしながら、藻類が生産する炭化水素の多くは、炭素骨格中に二重結合をもつ多価不飽和脂肪酸に由来しており、二重結合部分が容易に酸化を受ける性質を持つため、長期の保存に向かないという欠点がある[2]。また二重結合をもたない飽和脂肪酸に由来する炭素数 18 以上の炭化水素は融点が高く、常温で固体となってしまう、液体燃料として用いることができない。

本研究は、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の代謝系を改変し、分岐鎖飽和脂肪酸を合成させ、長期間保存可能で、かつ常温で液体となるような炭化水素の生産系の構築を目指すものである。分岐鎖飽和脂肪酸を合成する生物として、枯草菌 *Bacillus subtilis* が知られており、その分岐鎖脂肪酸合成経路は既に同定されている。bkd オペロンにコードされている 7 つの酵素は、ロイシン、イソロイシンなどの分岐鎖アミノ酸から分岐鎖アシル CoA を合成する (図 1) [3]。その分岐鎖アシル CoA を基質にして、fabHA と fabF にコードされている酵素が脂肪酸合成を行う (図 2) [4]。これらの分岐鎖脂肪酸合成に関わる遺伝子を *Synechocystis* に発現させることを試みた。

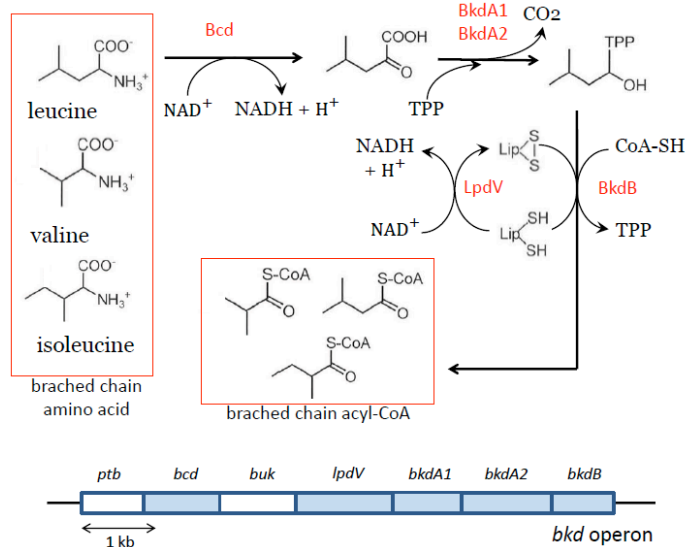


図1. 分岐鎖飽和脂肪酸合成経路①(分岐鎖アミノ酸から分岐鎖アシルCoAまで)

方法・結果

B. subtilis 由来の分岐鎖飽和脂肪酸の合成遺伝子を、相同組換えにより *Synechocystis* に導入する。まず、*B. subtilis* のゲノムから DNA を鋳型として、fabHA-fabF 領域を PCR で増幅し、ラン藻用発現ベクター (Trc プロモーター、クロラムフェニコール耐性) に In-fusion 法により導入した。同様に、bkd オペロンに含まれる 7 つの遺伝子のうちの 1 つである bcd と、連続する 4 つの遺伝子 lpdV-bkdA1-bkdA2-bkdB を PCR により増幅し、2

つのフラグメントを得た (図 1)。これらを In-fusion 法により、別のラン藻用発現ベクター (Trc プロモーター、カナマイシン耐性) に導入した。2 つのベクターは *Synechocystis* ゲノム上の異なる部位に相同組換えにより遺伝子を挿入するよう設計されている。ベクターの複製には大腸菌 *Escherichia coli* HST16CR 株を用いた。

fabHA-fabF を有するベクターを、*Synechocystis* の培養液に加えて相同組換えにより形質転換を行い、クロラムフェニコールあるいはカナマイシンを含むプレート培地に塗布した。

今後の実験

現在、形質転換体のスクリーニングを行なっている。それぞれの形質転換体が得られたら、もう一方の遺伝子群をそれぞれに導入し、二重遺伝子導入株を作製する。全ての遺伝子をもつラン藻が得られた後に、分岐鎖脂肪酸が合成されているかどうかを、ガスクロマトグラフィーにより検出したい。

また *Synechocystis* を形質転換している間、大腸菌を用いた発現チェックを行いたい。用いた Trc プロモーターは大腸菌内でも常時発現していると考えられるため、ベクターを保持している大腸菌から全タンパク質を抽出し、目的タンパク質の有無を SDS-PAGE により確認する。大腸菌でも 7 つの遺伝子を全て発現することができれば、*Synechocystis* 形質転換体と同様に分岐鎖脂肪酸を合成できると考えられるため、同じく大腸菌の形質転換体でもガスクロマトグラフィー解析を行いたい。

bkd オペロンを導入することで、分岐鎖アミノ酸の含量が低下してしまわないかを確認するため、遊離アミノ酸の定量も行う予定である。

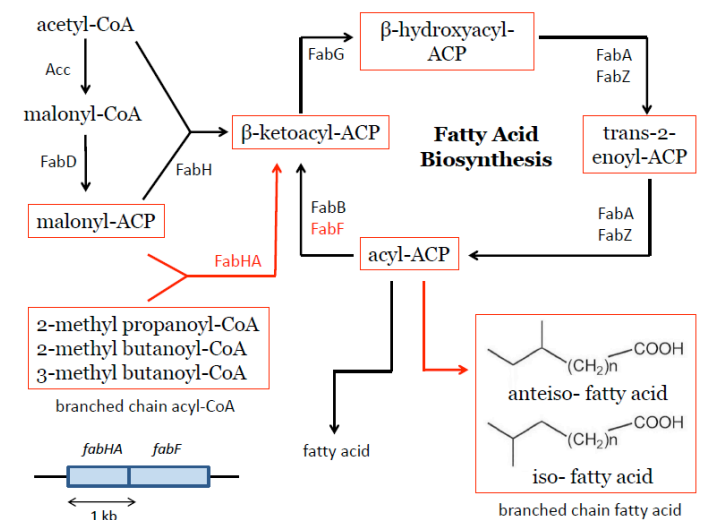


図2. 分岐鎖飽和脂肪酸合成経路②(分岐鎖アシルCoAから分岐鎖飽和脂肪酸まで)

参考文献

1. Yanqun *et al.* (2008), *Biotechnol. Prog.*, 24: 815-820
2. Frankel. (1980), *Prog. Lipid Res.*, 19: 1-22
3. Debarbouille *et al.* (1999) *J. Bacteriol.*, 181: 2059-2066
4. Choi *et al.* (2000) *J. Bacteriol.*, 182: 365-370