

シアノバクテリアのグリコーゲン合成酵素の欠失が炭素代謝におよぼす影響

戸来 駿介 (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)

背景および目的

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は酸素発生源型光合成を行う原核生物であり、全ゲノム配列が解読されたモデル生物として代謝改変による研究が盛んに行われている。この生物は他の光合成生物と同様、カルビン・ベンソン回路により CO₂ を固定する。固定された炭素は通常グリコーゲンとして貯蔵され、呼吸基質として暗所での細胞の機能維持や保全に使用される。このシアノバクテリアを用いて、代謝改変により脂肪酸やエタノールなどの物質生産が試みられてきたが、固定した炭素が糖新生を経てグリコーゲンの合成に使用される為、ピルビン酸やアセチル CoA から合成される化合物の生産効率は高くなかった[2]。

本研究では、*Synechocystis* の糖新生からグリコーゲン合成に向かう経路に関連する 2 つの酵素遺伝子 (Fructose-1,6-ビスホスファターゼと ADP-glucose ピロホスホリラーゼ) をそれぞれ破壊することにより、固定した炭素を TCA サイクルの方向へ流すことを目指し、これらの変異が炭素代謝に及ぼす影響を調べることにした。

を行った。得られた変異株は、730 nm の濁度 (OD₇₃₀) を 0.05 に揃えた状態で、通常の無機培地 BG-11 で培養し、細胞の成長量とクロロフィル量は、それぞれ OD₇₃₀ と 90%メタノールで抽出した溶液の 665 nm の吸光度から測定した。

また測定 7 日後におけるグリコーゲン合成量の測定は、まずメタノール抽出残渣をグルコアミラーゼ処理し、グリコーゲンを Glucose へと分解した、生じ Glucose をヘキソキナーゼにより Glucose-6-リン酸へと変換し、NADP⁺存在下で Glucose-6-リン酸を Glucose-6-リン酸デヒドロゲナーゼによりグルコノラクトン-6-リン酸に変換する過程で、NADP⁺が NADPH と変換する速度を 340 nm の吸光度変化として測定した。

結果と考察

Fructose-1,6-ビスホスファターゼをコードする 2 つの遺伝子、また ADP-glucose ピロホスホリラーゼをコードする 1 つの遺伝子についてそれぞれ形質転換体を作成し、30°C の連続光下で 1 ヶ月間培養したが、この段階では野生型遺伝子を持つ染色体を完全には分離できていなかった。

ADP-glucose ピロホスホリラーゼの変異体について、BG-11 培地における成長量・クロロフィル量を測定したところ、変異株は野生株に比べ 1 日ほど長いラグタイムが存在したが、成長速度は野生株と大きな差は見られなかった。

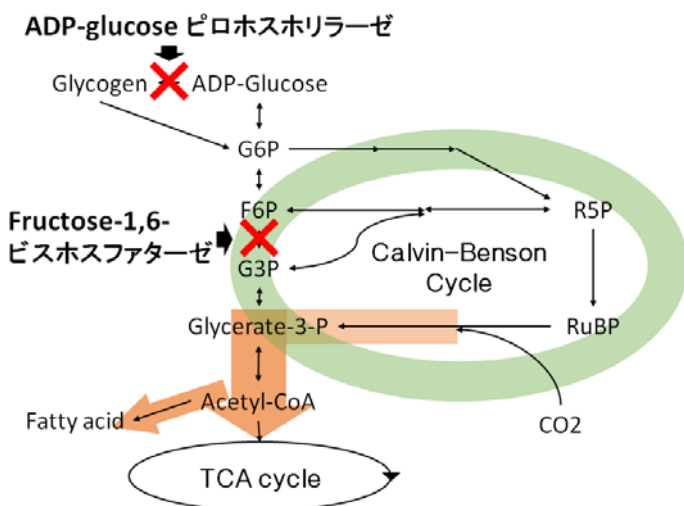
同じく ADP-glucose ピロホスホリラーゼの変異株について 7 日間培養した後のグリコーゲン合成量を測定したところ、野生株では 12.2 μg / μg Chl であったのに対し、変異株では 5.7 μg / μg Chl と約半分に減少していた。

今後の展望

今後は、Fructose-1,6-ビスホスファターゼ破壊変異体についても、成育およびグリコーゲン生産量を測定する予定である。Fructose-1,6-ビスホスファターゼについては、2 つの遺伝子があるため二重変異株の作成も行いたい。最終的に固定された炭素が TCA サイクル側に流れていることを確認するために、ピルビン酸・2オキシグルタル酸など代謝産物の測定を行いたい。これが確認出来た際に、目標となる有用物質を決定し、その生産のためのプラットフォーム細胞としての効果を評価したい。

参考文献

1. Gründel M *et al.* (2012), *Microbiol.* 158:3032-3043
2. Kudoh K *et al.* (2014), *J. Biosci Bioeng.* 118:20-28



材料と方法

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用い、欠損変異体の作成には二重相同組換を使用した。目的遺伝子上流と下流それぞれ 1 kb を PCR 法により増幅後、2 つの断片を PCR 法で結合した。この DNA 断片を TA クローニングによりベクターに組み込み、大腸菌へとトランスフォーメーションした。コロニーからプラスミドを回収し、塩基配列を 5 つのプライマーを用いて DNA シークエンシングにより確認した。最初の PCR で上流下流の断片の結合部位に BglII 制限酵素サイトを導入しており、そのサイトに薬剤耐性遺伝子をライゲーションにより挿入した。これらのプラスミドをシアノバクテリア細胞の形質転換に用いた。

シアノバクテリアの形質転換はそれぞれ挿入した薬剤耐性遺伝子に応じた薬剤を加えたプレートで培養することにより選別