

シアノバクテリアの光呼吸経路の改変によるグリコール酸の合成に関する研究

小林 孝太郎 (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・目的

近年、微細藻類や微生物を用いて燃料や医薬品などに利用できる有用物質を生産する試みが広く知られるようになった。シアノバクテリアは、酸素発生型光合成をおこなう細菌である。また内部構造や光合成に関わるタンパク質は、高等植物の葉緑体のそれと共通点が多く、葉緑体の起源であると考えられている。更にシアノバクテリアは、遺伝子組換えによる形質転換も遙かに簡便で増殖も速い。なかでも *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、グルコースを用いた光従属栄養的にも生育可能である事から光合成研究のモデル微生物として広く利用されてきた。

シアノバクテリアや葉緑体のカルビン・ベンソン回路で、CO₂固定を触媒するリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RubisCO) はカルボキシラーゼ反応によって基質であるリブローズ 1,5-ビスリン酸 (RuBP) に CO₂ を固定する一方で、オキシゲナーゼ反応により RuBP に O₂ を固定して 2-ホスホグリコール酸を生じる反応も起こす。通常この反応によって生じた 2-ホスホグリコール酸は、いわゆる光呼吸により 3-ホスホグリセリン酸へと変換され、カルビン・ベンソン回路内へと戻される。これまで、RubisCO の CO₂ 固定反応による物質生産系は複数検討されているが、オキシゲナーゼ反応により物質生産を試みられたことはない。光呼吸経路の中間体のグリコール酸からの物質生産系の構築に向け、グリコール酸デヒドロゲナーゼ (GlcD) をコードしている 2つの遺伝子 *glcD1*, *glcD2* の二重変異体を作製し、その性質、グリコール酸の蓄積について検討した。

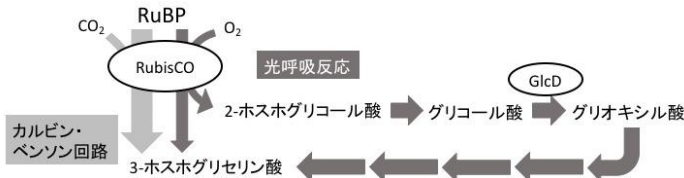


図1. 光呼吸経路の概略

材料・方法

シアノバクテリアは既に全ゲノムが解読されており、モデル生物として広く使われている *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を使用した。*glcD1* および *glcD2* の組換えはまずゲノム PCR により増幅した両遺伝子を含んだ領域をそれぞれ組込んだ pMD19 プラスミドベクターを作製し、それぞれカナマイシン耐性遺伝子またはスペクチノマイシン耐性遺伝子カセットを、制限酵素処理によって ORF 中に挿入し機能を欠失させた。これらのプラスミドを相同組換えによりシアノバクテリアの野生株の染色体上に挿入し、一重変異株 $\Delta glcD1$ および $\Delta glcD2$ を得た。形質転換体の選抜には抗生物質であるカナマイシンまたはスペクチノマイシンを 5 μ g/mL 含んだ BG-11 寒天培地を使用し、コロニー選抜後は抗生物質濃度を 25 μ g/mL に高めた BG-11 プレートを使用して培養を行った。PCR によって組換えを確認した。さらに *glcD1* 株を用いた相同組換えによって、二重変異体である $\Delta glcD1/2$ を得た。先行研究において二重変異体は空気中の CO₂ 濃度 (0.03%) では生育

できないことが指摘されているため、1%CO₂ を通気しながら培養した。

野生株および形質転換によって得られた変異株について、あらかじめ 5%CO₂ を通気して培養した細胞を、細胞濁度 0.3 の濃度で新たな培地に植菌しさらに一晩培養した。その後遠心(2800rpm, 10 min)により細胞を回収し、50 mL HEPES-NaOH (pH 7.5) に細胞濁度が 0.3 になるよう懸濁し、5% CO₂ 通気下と 0.03% CO₂ 通気下に移して培養した。培養開始から 0 時間、1.5 時間、3 時間の培地を回収し、Calkins 法により培地中へのグリコール酸の放出量を調べた。

結果・考察

野生株および変異体の *glcD* 遺伝子のゲノムを抽出し、*glcD* 遺伝子領域の PCR を行った結果、図 1 に示すようにいずれの変異体においても意図した薬剤耐性遺伝子の導入が確認できた。野生型の遺伝子は完全に変異型に置き換えられており、高 CO₂ 条件下では *glcD* 遺伝子は必須ではないことが示された。現在、CO₂ 条件を変化させた条件での培養特性について検討中である。

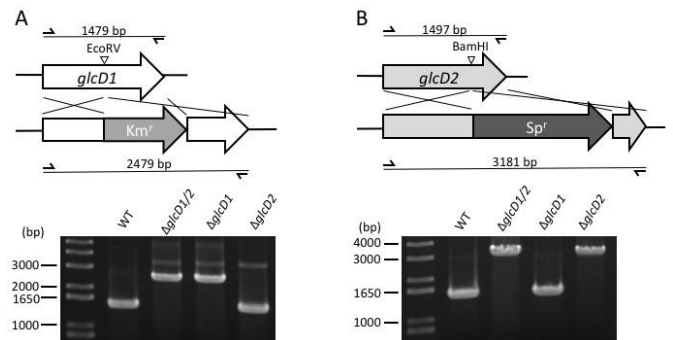


図2. *glcD1* (A)および *glcD2* (B)遺伝子の組換えの概要と PCR 結果

一方で培地中へのグリコール酸の放出は確認できなかった。原因としては培地中の細胞数が少ないか、シアノバクテリアの細胞外へのグリコール酸放出が他の藻類と比較して少ないためと考えられる。

今後の展望

シアノバクテリア野生株および *glcD* 変異体におけるグリコール酸量をより詳しく調べるために、有機溶媒による抽出や他の分析方法についても試してみたい。

グリコール酸は光呼吸経路ではグリオキシル酸へと酸化されカルビン・ベンソン回路へと戻されるが、 $\Delta glcD1/2$ 株への外来遺伝子導入によってグリコール酸のエチレングリコールやビタミン B₆ といった有用物質への転換、または別の代謝経路へのバイパスができないか検討中である。また、シアノバクテリアのもつ炭酸固定機構に関与する遺伝子の操作によって RubisCO のカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ活性の割合を変更しグリコール酸の生成量を増やすことができないかについても検討している。