

## ホスファターゼ導入による *Synechocystis* sp. PCC 6803 でのファルネソール合成

二宮 功伎 (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】

ファルネソール (FOH) は炭素数 15 のセスキテルペンアルコールで香水や医薬品として利用され、ディーゼル燃料としても期待されている。自然界からの抽出や化学合成で得られる FOH の量と純度は共に低く、高純度・大量生産には相当のコストがかかる (Wang et al. 2011)。FOH は動物や植物、原核生物の体内に普遍的に存在しているファルネシル 2 リン酸 (FPP) から合成される。そのため遺伝子改変技術によって大腸菌や酵母の FOH 生合成株が確立されている。しかし、独立栄養性生物を用いた FOH の恒常的生合成を目指した研究はいまだにない。そこで本研究は遺伝子導入などの操作が比較的簡単なシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に FPP の脱リン酸を触媒する酵素を異種発現することで FOH の合成株の確立を目指した。

FPP から FOH 生成を触媒する酵素はいくつか知られている。その中でも本実験では大腸菌の NudB, PgpB という 2 つのホスファターゼとイチョウの GbTPS1 というセスキテルペン合成酵素を異種発現させた形質転換株を作成した。GbTPS1 に関しては配列不特定の部分もあり、2 種類の GbTPS1 を含めた全部で 4 種類の形質転換株を作成し、各形質転換株の FOH 合成量を比較することでより高効率な FOH 生産株の作出を目指した。

### 【材料・方法】

#### ▶ プラスミドのコンストラクト

*Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換には neutral サイトの *shr2031* 遺伝子中に発現遺伝子を相同組み換えにより導入する pTCHT2031 ベクターを使用した。目的酵素をコードする遺伝子は In-Fusion 反応で pTCHT2031v に組み込み、大腸菌でのクローニング後、プラスミドの構造を DNA 塩基配列により確認した。イチョウの cDNA 配列は *Synechocystis* のコドン使用頻度に合わせて合成した。

各遺伝子を導入した形質転換株 *S. 6803::nudB*, *S. 6803::pgpB*, *S. 6803::GbTPS(L)*, *S. 6803::GbTPS(F)* を作成した。

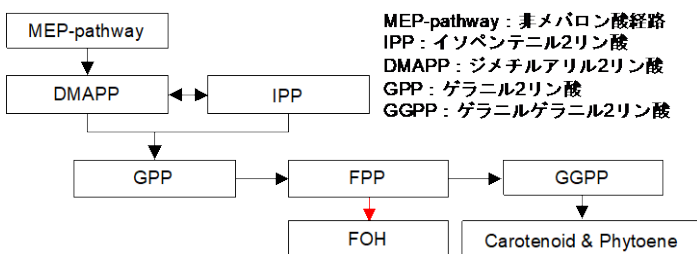


図 FOH 合成代謝経路

#### ▶ 形質転換株の培養と FOH の検出

FOH は揮発性物質である。さらに先行研究から大腸菌等において FOH などのセスキテルペンアルコールは基本的に細胞内に長時間保持されることなく細胞膜から体外へ放出されることが知られている (Vermaas et al. 2018)。そのため FOH の揮発防止と *in situ* 抽出のため培養液に有機溶媒のイソプロピルミ

スチン酸 (IM) もしくはデカンを重層した。3 日間の培養後有機層を回収し GC-FID を用いて化合物の検出を行なった。

### 【結果】

大腸菌由来の *nudB*, *pgpB*、イチョウの *GbTPS(L)*, *GbTPS(F)* 遺伝子を導入したプラスミドを作成した。これらのプラスミド DNA を *Synechocystis* の細胞に取り込ませ、相同組み換え株をいくつか得た。これらの細胞から DNA を抽出し、それらを鋳型に PCR を行なった。導入した遺伝子と野生型の染色体が完全に置き換わった株をそれぞれ 4, 5, 3, 2 株獲得した。

野生株と各形質転換株を start OD<sub>730</sub>=0.01 で培養したところ *S. 6803::TPS1(F)* の対数増殖期の比増殖速度 ( $d^{-1}$ ) が他の株よりも明らかに低かった (N=1)。さらに培養開始から 24 時間後にデカンを重層した系では全ての形質転換株の比増殖速度が増加し、逆に野生株の比増殖速度は減少した (N=1)。

FOH の標品を IM と混合し GC-FID で分離すると、ほぼ同じ保有時間にピークが検出されるため、FOH の検出は困難であった。一方、デカンと FOH のピークは分離できた。得られた株をそれぞれデカン重層した状態で培養し、デカン層を回収して GC で FOH の検出を試みたが、これまでのところ FOH の合成は確認できていない。

### 【考察・展望】

対数増殖期の比増殖速度の比較は再現性を担保するために反復実験を行うことを計画している。

私は、FOH 合成が確認できない 2 つの原因を考えている。まず 1 つは異種遺伝子が正常に発現していないか、もう 1 つは FOH の合成量が GC-FID の検出限界値以下であるかである。

本実験では構成的に強く発現するプロモーター (Ptrc) を異種発現に用いた。実際に転写産物量や発現タンパク質を確認する必要がある。

FPP は *Synechocystis* の細胞内でフィトエン、カロテノイド合成の前駆体として合成されている。フィトエンはクロロフィル a の合成において重要であり、カロテノイドは補助色素、強光からの防御機構の役割も果たしている。そのため細胞内で FOH 合成に用いることのできる FPP の蓄積量が十分ではないことが考えられる。

*Synechocystis* の FPP 蓄積量をさらに増やすためイソペンテニル 2 リン酸 (IPP) から FPP を合成する大腸菌の *ispA* 遺伝子、IPP からゲラニルゲラニル 2 リン酸まで合成する *Synechocystis* の CrtE の基質特異性を改変した酵素遺伝子を導入することで FOH 合成量の増加を試みたい。

### 【参考文献】

- [1]. Wang, C et al. (2011), *Biochem.* 46, 1221-1229
- [2]. Vermaas, J et al. (2018), *J. Phys. Chem. B*, 122, 10349-10361