

(様式第9号)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	森山 大輔
審査委員	主査 川向 誠 (印)
	副査 戒能 智宏 (印)
	副査 阿座上弘行 (印)
	副査 中川 強 (印)
	副査 児玉基一朗 (印)
題目	Bioproduction of coenzyme Q ₁₀ in fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> でのコエンザイムQ ₁₀ の生産)
<p style="text-align: center;">審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>コエンザイムQ (CoQ) はユビキノンとも称され、ミトコンドリアにおける好気性呼吸に関与する電子伝達系の構成成分であり、ATP依存型のエネルギー生産において重要な役割を果たしている。CoQはイソプレノイド側鎖とキノン環からなり、キノン (酸化型) とキノール (還元型) の変換を行うことで電子の受け渡しを行う。この酸化還元反応によりCoQは脂溶性抗酸化物質として働き、過酸化脂質の除去に寄与している。またCoQは、大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) において、タンパク質のジスルフィド結合の際の電子供与体としての役割を果たしたり、分裂酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) やその他の生物で広く硫化物の酸化に関与することが知られている。さらにCoQは、真核生物のUMP (uridine monophosphate) の<i>de novo</i>合成にも必要であることが知られている。しかしながら、ヒトのCoQ₁₀合成量は20歳をピークに減少することが知られており、外部からCoQ₁₀を補給することは重要であると考えられている。そのため、現在ではサプリメントでのCoQ₁₀の摂取が一般的となり、CoQ₁₀の需要は増加の一途をたどっている。</p> <p>CoQは生物種によってそのイソプレノイド側鎖の鎖長が異なり、<i>S. pombe</i>やヒトではCoQ₁₀、<i>E. coli</i>ではCoQ₈、出芽酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) ではCoQ₆を合成する。<i>S. pombe</i>は元々CoQ₁₀を生合成するため、CoQ₆やCoQ₈を生合成する他の一般的な微生物である<i>S. cerevisiae</i>や<i>E. coli</i>と比較して、遺伝子操作によるCoQ₁₀生産が容易である。そこで本論文で筆者は、元々CoQ₁₀を生産する<i>S. pombe</i>の遺伝子組換えによるCoQ₁₀生産性向上の検討と、異種の宿主でのCoQ₁₀生産に有用な新規なデカプレニルニリン酸合成酵素の探索を行っている。</p>	

第一に、*S. pombe*でCoQ生合成遺伝子群を発現させCoQ₁₀生産性の向上を試みた。*S. pombe*からCoQ生合成遺伝子 (*dps1-dlp1*, *ppt1*, *coq3-coq9*) をクローニングし、個々に高発現させたがCoQ生産性にほとんど変化は認められなかった。そこで、増強したCoQ生合成遺伝子とは異なる遺伝子が律速となっている可能性を考え、複数のCoQ生合成遺伝子の同時増強を試みた。しかしながら、10種のCoQ生合成遺伝子を同時増強したにもかかわらず、CoQ₁₀の生産性向上は認められなかった。次に、CoQ₁₀の前駆体であるPHB (*p*-hydroxybenzoate) 及び、DPP (decaprenyl diphosphate) の供給量を増やすことでCoQ₁₀の生産性が向上しないか検討を行った。シキミ酸経路やメバロン酸経路を調節していることが知られている遺伝子のうち、それらの制御を解除した遺伝子や、生合成経路をバイパスし効率的な代謝の流れを可能にする遺伝子の計9種についてクローニングを行い、各種遺伝子の単独増強株を取得してCoQ₁₀の生産性を評価した。その結果、*Eco_ubiC* (*E. coli*由来のchorismate lyase) 及び、*Sce_thmgr1* (*S. cerevisiae*由来の切断型HMG-CoA reductase 1) 遺伝子増強株で約30%、*Eco_aroF^{FBR}* (*E. coli*由来のフィードバック阻害耐性DAHP (3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate) synthase) 遺伝子増強株で約15%のCoQ₁₀の生産性向上効果が認められた。そこでさらに、これらの遺伝子の同時増強について検討を行った結果、*Sce_thmgr1*と*Eco_aroF^{FBR}*、*Sce_thmgr1*と*Eco_ubiC*の2遺伝子増強株、及び、*Sce_thmgr1*と*Eco_aroF^{FBR}*と*Eco_ubiC*の3遺伝子増強株で2倍のCoQ₁₀生産性向上効果が認められた。これらの結果より、*S. pombe*において、CoQ₁₀前駆体の供給量増加がCoQ₁₀の生産性向上に効果的であることが示唆された。

次に、CoQ₁₀を生合成する酵母*Bulleromyces albus*、*Saitoella complicata*、*Rhodotorula minuta*から3種のデカプレニルニリン酸合成酵素遺伝子をクローニングした。これらの酵素Dps1には長鎖trans-プレニルニリン酸合成酵素に典型的な7つの保存された領域(ドメインI-VII)が認められ、基質であるFPPとIPPの認識にかかわる共通配列“DDXXD”も認められた。また、*S. complicata*、*B. albus*、*R. minuta*のDps1は、それぞれ440、528、537アミノ酸をコードしており、CoQ₁₀を生合成する*S. pombe*のDps1と比較して、それぞれ51%、50%、46%の相同性があった。そこで著者らは、これらの酵母由来Dps1を*E. coli*及び*S. pombe*で発現させ、その性質を調べた。その結果、これらのDps1を発現させた*E. coli*ではもともとのCoQ₈に加えてCoQ₁₀を生合成することが確認でき、3種の酵母由来*dps1*遺伝子のうち2つ (*S. complicata*と*R. minuta*由来) について、*E. coli*の側鎖合成酵素遺伝子である*ispB*を相補可能であることが確認できた。また、*S. pombe*においても3種の酵母由来*dps1*遺伝子が*S. pombe*の側鎖合成酵素遺伝子*dps1*と*dlp1*を相補可能であることが確認できた。さらに、これらの3種類の*dps1*遺伝子を*S. pombe*で増強しCoQ₁₀の生産性向上が可能か検討したが、生産性の向上は認められず、外来のDps1が*S. pombe*のDps1又はDlp1と相互作用し悪影響を及ぼしているのかもしれない。これらの結果より、酵母由来の3種のDps1がデカプレニルニリン酸合成酵素活性を有し、ホモマーとして機能していることが確認できた。今回クローニングした酵母由来*dps1*遺伝子は*S. pombe*やその他の生物種でのCoQ₁₀の効率的生産に有用である。

このように著者による発見は *S. pombe* での CoQ₁₀ の生産性向上につながる新たな重要な知見を提供していることから、本論文は博士(農学)の学位論文に値すると認められる。