

「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による
バイオエネルギー創成のための基礎技術の創出」
平成22年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

跡見 晴幸

京都大学大学院工学研究科・教授

海洋性アーキアの代謝特性の強化と融合によるエネルギー生産

§1. 研究実施体制

(1)「京都大学・工学研究科(跡見)」グループ

① 研究代表者: 跡見 晴幸 (京都大学工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ *Thermococcus kodakarensis* のキチン分解経路の解明と機能強化
- ・ *Thermococcus* のキシラン分解能の評価・強化およびペントース代謝機構の解明
- ・ *Thermococcus kodakarensis* の水素生産機構の解明と機能強化
- ・ アーキア由来 squalene synthase 様タンパク質の機能解析

(2)「京都大学・理学研究科(三木)」グループ

① 主たる共同研究者: 三木 邦夫 (京都大学理学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ アーキア由来キチン分解関連酵素の構造解析
- ・ アーキア由来キシラン・ペントース代謝関連酵素の構造解析
- ・ 水素生産, スクアレン合成関連酵素の構造解析

(3)「立命館大学・生命科学部(今中)」グループ

① 主たる共同研究者: 今中 忠行 (立命館大学生命科学部、教授)

② 研究項目

- ・ 環境サンプルから新規キチン分解菌のスクリーニングと解析
- ・ 環境サンプルから新規キシラン分解菌のスクリーニング

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(1)「京都大学・工学研究科(跡見)」グループ

- *Thermococcus kodakarensis* のキチン分解経路の解明と機能強化: キチン分解経路の強化を目指して, chitinase 遺伝子の promoter を *csg* 遺伝子(TK0895)のものと置換し, chitinase 大量発現株(OE-chiA 株)を作製した。OE-chiA 株は野生株 KOD1 や宿主の KU216 と比べて高いキチン分解能を示し, 分解能の増加はコロイダルキチン・結晶性キチンのいずれに対しても観察された。培地中に chitinase 反応の生成物である chitobiose の蓄積も観察された。また, 高いキチン分解活性を示す超好熱菌のゲノム解析を進め, キチン分解に関与する遺伝子の探索を行った。さらに *csg* や *gdh* promoter に加えて実用的な promoter の探索・開発, 転写制御因子や基本転写に関わる可能性のある因子(TBP, TFB, histone⁵)の解析を進めている。
- *Thermococcus* のキシラン分解能の評価・強化およびペントース代謝機構の解明: ペントース代謝に関連する可能性のある3つの推定 ribokinase 遺伝子(TK1843, TK2029, TK2285)産物の活性をそれぞれ同定することができた。TK2285 は構造的に新規な *myo*-inositol kinase, TK1843 は cytidine kinase, TK2029 は新規酵素 ADP-dependent ribose-1-phosphate kinase をコードすることが判明した。また *T. kodakarensis* 内の AMP・ペントース分解経路の各酵素の特性を明らかにし, 本経路が CMP・UMP をも分解できることがわかった⁴。したがってTK1843・TK2029タンパク質の活性は本経路と関与することが示唆された。また xylanase 相同遺伝子(TK0892)の産物は esterase 活性を示すことがわかった。
- *Thermococcus kodakarensis* の水素生産機構の解明と機能強化: *T. kodakarensis* の水素発生を担う hydrogenase (Mbh)の機能発現(成熟化)に必要なタンパク質の機能解析を行った^{3,7,8}。特に, いままで未同定であった HypB タンパク質, HycI protease の探索を進めた。HypB に関しては遺伝学的解析により TK2007 タンパク質が HypB の機能である hydrogenase large subunit への Ni 挿入に必須であることがわかった⁸。HycI に関しては候補遺伝子の破壊とそれらが Mbh および水素吸収を担う hydrogenase Hyh それぞれの large subunit (MbhL, HyhL)のプロセッシングに与える影響を検討した。その結果 MbhL の切断にはTK2004のみが, HyhLの切断には主にTK2066が関与することがわかった。一方, *T. kodakarensis*におけるNiなどの2価カチオンの取り込みに関与するトランスポーターの同定を目指した遺伝学的解析を進めた。
- アーキア由来 squalene synthase 様タンパク質の機能解析: 超好熱性アーキア *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus acidocaldarius* および好熱性藍藻 *Thermosynechococcus elongatus* 由来 squalene/phytoene synthase 様遺伝子を *T. kodakarensis* に導入した株をそれぞれ作製した。これらのうち, *S. acidocaldarius* 由来遺伝子を導入した株で phytoene と考えられる炭化水素の蓄積が認められた。また phytoene の原料となる acetyl-CoA の供給

を強化するため、acyl-CoA を分解する acyl-CoA synthetase 群⁹⁾および CoA 合成に関与する pantoate kinase, phosphopantothenate synthetase の諸特性を明らかにした^{1,2,6)}。

(2)「京都大学・理学研究科(三木)」グループ

- ・アーキア由来キチン分解関連酵素の構造解析: *T. kodakarensis* 由来 chitinase の持つ三つの chitin binding domain (ChBD-1, ChBD-2, ChBD-3) について、結晶を得ることに成功した。ChBD-2 と ChBD-3 については、それぞれ 1.5 Å と 2.1 Å 分解能で結晶構造を決定し、キチンとの結合に重要な残基を特定することができた。ChBD-1 についても、厚さ 10 μm 以下の平板状結晶が得られており、現在、結晶化条件の最適化を進めている。
- ・アーキア由来キシラン・ペントース代謝関連酵素の構造解析: 機能解析の結果 myo-inositol kinase であることが分かった TK2285 タンパク質について、1.8 Å 分解能で結晶構造を決定した。全体構造は、これまでに解析された ribokinase superfamily の酵素と類似しており、このことから myo-inositol と ATP の結合部位を特定した。また、ATP 結合部位のループ構造は非対称単位中に含まれる二分子で異なっており、この領域は基質結合に伴って構造変化すると予想された。
- ・スクアレン合成関連酵素の構造解析: CoA 合成経路に関連して、*T. kodakarensis* 由来 PPS について、2.0 Å 分解能で結晶構造を決定した。PPS ホモ二量体の分子中心には、大腸菌由来と考えられるアデノシンが結合しており、このことから活性部位を特定した。また、基質である ATP, ホスホパントイン酸との複合体の結晶化条件を検索し、結晶を得ることに成功した。この結晶について X 線回折実験を行い、空間群・格子定数などの結晶学的データを決定した。
- ・水素生産関連酵素の構造解析: 14 種のサブユニットから構成される *T. kodakarensis* 由来 [NiFe] 型 hydrogenase (Mbh) について、野生型 *T. kodakarensis* からの単離・精製を試みた。陰イオン交換カラムとゲル濾過カラムを用いて精製を行い、ゲル濾過カラムの溶出位置から、最終精製サンプルの分子量を見積もることができた。また、ウエスタンブロッティングにより、活性中心となる MbhL サブユニットが含まれることも確認した。

(3)「立命館大学・生命科学部(今中)」グループ

・環境サンプルから新規キチン・キシラン分解菌のスクリーニング

いままでに得られた、難分解性多糖であるキチンまたはキシランの分解菌について、それらの分解能の解析を進めた。キチン分解菌として得られた *Lysinibacillus* 属細菌 1-1 株, *Pseudomonas* 属細菌 64-1 株, *Bacillus* 属細菌 64-4 株は、結晶性の低いコロイダルキチンだけでなく粉末キチンをも分解することができた。一方、キシラン分解能を有する好熱菌 *Caldicellulosiruptor* 属細菌 45-6 株や N1 株については、定常初期の培養上清中にキシラナーゼ活性が検出された。また N1 株培養上清に関してはさらにセルラーゼ活性(カルボキシメチルセルロース分解活性)も検出された。これらのうちキシラナーゼ活性が高かった 45-6 株について、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム DNA のドラフト解析を行い、複数のキシラナー

ゼ遺伝子ホモログを見出した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “Biochemical Characterization of Pantoate Kinase, a Novel Enzyme Necessary for Coenzyme A Biosynthesis in the *Archaea*”, *Journal of Bacteriology*, vol. 194, No. 19, pp. 5434-5443, 2012 (DOI: 10.1128/JB.06624-11)
2. Takuya Ishibashi, Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Tatsuya Morikita, Bunta Watanabe, Jun Hiratake, Asako Kishimoto, Akiko Kita, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “A Detailed Biochemical Characterization of Phosphopantothenate Synthetase, a Novel Enzyme Involved in Coenzyme A Biosynthesis in the Archaea” *Extremophiles*, vol. 16, No. 6, pp. 819-828, 2012 (DOI: 10.1007/s00792-012-0477-5)
3. Taiga Tominaga, Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka and Kunio Miki, “Structure of the [NiFe]-hydrogenase Maturation Protein HypF from *Thermococcus kodakarensis* KOD1”, *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, vol. 68, No. 10, pp. 1153–1157, 2012 (DOI: 10.1107/S1744309112036421)
4. Riku Aono, Takaaki Sato, Ayumu Yano, Shosuke Yoshida, Yuichi Nishitani, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “Enzymatic Characterization of AMP Phosphorylase and Ribose-1,5-bisphosphate Isomerase Functioning in an Archaeal AMP Metabolic Pathway.” *Journal of Bacteriology*, vol. 194, No. 24, pp. 6847-6855, 2012 (DOI: 10.1128/JB.01335-12)
5. Lubomira Cubonová, Masahiro Katano, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, John N. Reeve, and Thomas J. Santangelo “An Archaeal Histone is Required for Transformation of *Thermococcus kodakarensis*” *Journal of Bacteriology*, vol. 194, No. 24, pp. 6864-6874, 2012 (DOI: 10.1128/JB.01523-12)
6. Haruyuki Atomi, Hiroya Tomita, Takuya Ishibashi, Yuusuke Yokooji, and Tadayuki Imanaka, “CoA Biosynthesis in *Archaea*”, *Biochemical Society Transactions*, vol. 41, No. 1, pp. 427-431, 2013 (DOI: 10.1042/BST20120311)
7. Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, “Crystal Structures of the HypCD Complex and the HypCDE Ternary

Complex: Transient Intermediate Complexes during [NiFe] Hydrogenase Maturation”, *Structure*, vol. 20, No. 12, pp. 2124–2137, 2012 (DOI: 10.1016/j.str.2012.09.018)

8. Daisuke Sasaki, Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Toshihisa Shoji, Ayako Yasukochi, Kenta Tagashira, Wakao Fukuda, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, “Identification and Structure of a Novel Archaeal HypB for [NiFe] Hydrogenase Maturation.” *Journal of Molecular Biology*, in press 2013 (DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.004)
9. Yuusuke Yokooji, Takaaki Sato, Shinsuke Fujiwara, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “A Genetic Examination of Initial Amino Acid Oxidation and Glutamate Catabolism in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*” *Journal of Bacteriology*, in press, 2013 (DOI: 10.1128/JB.01979-12)