

「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盤技術の創出」
平成22年度採択研究代表者

H23 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 (京都大学大学院工学研究科, 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
- ・ アーキアを宿主としたバイオマス分解・バイオエネルギー生産の機能融合

(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 (京都大学大学院理学研究科, 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
- ・ 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
- ・ *T. kodakarensis* の育種・培養に関する基盤研究

§ 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: *T. kodakarensis* のキチン分解系の中で未同定であった glucosamine kinase の探索を進めた。ゲノム上の hexokinase 候補遺伝子の発現産物を解析した結果, TK1110 産物が glucosamine/*N*-acetylglucosamine kinase 活性を示すことが分かった。また本菌由来 chitinase が有する3種の chitin binding domain について, 構造解析を進めるためにそれぞれを発現し, 精製タンパク質を調製した。

・*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 遺伝子の発現産物を解析した結果, TK2285 産物が顕著な ribokinase 活性を有し, hexose/pentose に対して幅広い基質特異性を示すことがわかった。構造解析を進めるため, TK2285 精製タンパク質を大量調製した。また xylanase 相同遺伝子は大腸菌内で発現できず, *T. kodakarensis* 内で発現するための組換え株を構築した。

・*Thermococcus kodakarensis* の水素生産機構の解明と機能強化: *T. kodakarensis* は3種の hydrogenase 様 operon (*hyh*, *mbh*, *mbx*) をもつが, 我々は Hyh が水素吸収に, Mbh が水素発生に, Mbx が硫化水素生産に関与することを明らかにしてきた。これらの知見に基づいて Mbh 関連代謝の増強や Hyh 関連代謝の抑制を進めることにより, 水素生産速度が上昇した育種株を構築することができた。また hydrogenase の成熟化に必要な補助因子と hydrogenase 大サブユニットとの相互作用様式を検討するために, HypA, HypC タンパク質などを大量調製した²⁾。さらに解糖条件下で, Mbh 活性に必要な電子を供給する酵素は glyceraldehyde-3-phosphate (GAP):ferredoxin oxidoreductase であることを明らかにした。同じ GAP から 3-phosphoglycerate への変換を触媒し得る GAP dehydrogenase (GAPDH), non-phosphorylating GAPDH 経路はそれぞれ糖新生および細胞内 NADPH 生産に関与することも証明できた¹⁾。

・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* 由来 squalene synthase 様遺伝子が大腸菌内で発現困難であったため, *T. kodakarensis* 内で発現するための組換え株を構築した。また squalene 様炭化水素の原料である acetyl-CoA の供給を強化するため, acetyl-CoA を分解する acetyl-CoA synthetase および CoA 合成に関与する pantoate kinase, phosphopantothenate synthetase (PPS) の機能解析を進めた。PPS に関しては構造解明を目指して精製酵素を大量調製した。

・アーキアを宿主としたバイオマス分解・バイオエネルギー生産の機能融合: *T. kodakarensis* を宿主とした大規模 DNA 組換えに関して初期検討を行った。ウラシル要求性 ($\Delta pyrF$) を示す *T. kodakarensis* を宿主として *Pyrococcus furiosus* のゲノム断片を予め挿入し, *P. furiosus* から単離したゲノム DNA を用いて形質転換を試みた。ウラシル要求性の解除を指標に選択した結果, *P. furiosus* 由来 *pyrF* が *T. kodakarensis* ゲノム上に挿入された株が単離できた。

(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:キチン結合に重要な残基を特定するため、*T. kodakarensis* 由来 chitinase の持つ三つの chitin binding domain(ChBD-1, ChBD-2, ChBD-3)それぞれについて、結晶化条件の検討を行った。その際、キチンオリゴマー存在下および非存在下の両方の条件で行った。これまでに、二つのドメイン(ChBD-2, ChBD-3)のキチン非結合型結晶を得た。ChBD-3については、実験室系 X 線回折装置を用いて 2 Å 分解能のデータを収集し、空間群、格子定数などの結晶学的データを決定した。

・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: Ribokinase 活性を示す TK2285 タンパク質について結晶化条件を検索し、これまでに、沈殿剤として、ポリエチレングリコールとイソプロパノールを含む条件、2-メチル-2,4-ペンタンジオールと塩を含む条件、ポリエチレングリコールと塩を含む条件で結晶を得た。このうち、ポリエチレングリコールと塩を含む沈殿剤から得た結晶については、シンクロトン放射光施設を用いた X 線回折実験によって 1.62 Å 分解能のデータを収集し、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、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、結晶化条件の検討を行った。これまでに、ポリエチレングリコールを含む沈殿剤を用いて結晶を得た。さらに結晶化条件を最適化し、X 線回折実験を行うことが可能な結晶が恒常的に得られるようになった。シンクロトン放射光施設を用いて 2.1 Å 分解能のデータを収集し、重原子同形置換法によって位相を決定した。溶媒領域平滑化による位相改良、分解能の拡張を行うことで、 α/β 構造をとる PPS ホモ二量体の初期モデルを決定することができた。構造精密化が進行中で、並行して基質分子との複合体の結晶化条件の検索も進めた。

(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:別府温泉サンプルや、家庭用コンポスト、立命館大学周辺の土壌を分離源として、難分解性多糖であるキチンまたはキシランの分解菌のスクリーニングを行った。その結果、立命館大学の周辺土壌より *Lysinibacillus* 属細菌と予想されるキチン分解菌(1-1株)の単離に成功した。また同様に家庭用コンポストより *Bacillus* 属細菌と予想されるキチン分解菌(64-4株)の単離に成功した。一方で別府温泉白池地獄の温泉サンプルより、キシラン分解菌(45-6株)の単離に成功した。本菌は 70°C で生育可能な好熱菌であり、*Caldicellulosiruptor* 属細菌と予想された。上述の多糖分解菌に加え、難分解性多糖であるセルロースの分解菌や、難分解性タンパク質であるケラチンの分解菌も得られた。

・*T. kodakarensis* の育種・培養に関する基盤研究: *T. kodakarensis* のバイオマス分解・バイオエネルギー生産に関わる機能強化株の培養特性評価を行う予定であるが、一方で本菌の温度・酸素耐性を強化することも望まれている。そこで本菌の酸素耐性と低温耐性に関わるタンパク質の特性解析とそれらの利用について検討した^{3, 4)}。また様々な外来遺伝子を挿入する遺伝子座としてプロウィルス領域を考えているが、菌体の増殖に対するその破壊の影響を検討した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Kohei Matsubara, Yuusuke Yokooji, Haruyuki Atomi, and Tadayuki Imanaka, “Biochemical and Genetic Characterization of the Three Metabolic Routes in *Thermococcus kodakarensis* Linking Glyceraldehyde 3-phosphate and 3-Phosphoglycerate”, *Molecular Microbiology*, vol. 81, No. 5, pp. 1300–1312, 2011 (DOI:10.1111/j.1365-2958.2011.07762.x)
2. Daisuke Sasaki, Satoshi Watanabe, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, “Characterization and in vitro Interaction Study of a [NiFe] Hydrogenase Large Subunit from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 417, No. 1, pp. 192–196, 2012 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.083)
3. Xi Wu, Hiroki Kobori, Izumi Orita, Chong Zhang, Tadayuki Imanaka, Xin-Hui Xing, and Toshiaki Fukui, “Application of a Novel Thermostable NAD(P)H Oxidase from Hyperthermophilic Archaeon for the Regeneration of both NAD⁺ and NADP⁺”, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 109, No. 1, pp. 53-62, 2012 (DOI: 10.1002/bit.23294)
4. Le Gao, Atsushi Danno, Sayaka Fujii, Wakao Fukuda, Tadayuki Imanaka, and Shinsuke Fujiwara, “Indole-3-glycerol-phosphate Synthase is Recognized by a Cold-inducible Group II Chaperonin in *Thermococcus kodakarensis*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 2012 (In press)