

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14691

研究課題名(和文)絶対嫌気性超好熱菌へのTCAサイクル酵素導入による物質生産能の強化

研究課題名(英文) Introduction of TCA cycle enzymes into anaerobic hyperthermophilic archaeon aiming at efficient production of useful compounds

研究代表者

福居 俊昭 (FUKUI, TOSHIAKI)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：80271542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：絶対嫌気性超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* はデンプンやピルビン酸の酸化分解と共役したプロトン還元により水素を発生させるが、これら基質はアセチル-CoAを経て最終的に酢酸として排出される。*T. kodakarensis* はC6カルボン酸を変換する酵素群を有しておらず、アセチル-CoAを代謝するTCAサイクルは機能していないと考えられているが、これら酵素群を有している超好熱菌も存在する。本研究では、*T. kodakarensis* に超好熱菌由来の耐熱性C6カルボン酸変換酵素群を導入し、TCAサイクルを駆動させることによる生育および物質生産能への影響を解析した。

研究成果の概要(英文)：Hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* evolves hydrogen on starch or pyruvate which is associated with oxidative degradation of the growth substrates to acetyl-CoA, and acetate was formed from acetyl-CoA as an end product. *T. kodakarensis* is thought to lack TCA cycle because genes for enzymes converting C6 carboxylic acids are missing in the genome, whereas some related hyperthermophilic archaea possess the enzymes although the function in carbon/energy metabolisms has been unclear.

In this study, the genes of the missing TCA cycle enzymes, derived from the related hyperthermophile, were introduced into *T. kodakarensis*, and investigated the effects of the TCA cycle enzymes on the growth of and metabolisms in *T. kodakarensis*.

研究分野：微生物工学

キーワード：超好熱性アーキア *Thermococcus* 代謝改変 水素

1. 研究開始当初の背景

90°C以上で生育可能な極限環境微生物である超好熱性アーキアは ADP 依存型キナーゼやタングステン含有酸化還元酵素などの特異な酵素群からなるユニークな代謝経路を多く有している。また超好熱菌が産生するタンパクは高い耐熱性を示すことから、有用熱安定酵素の遺伝子資源としても重要である。一方、好熱菌を用いた高温発酵では雑菌汚染がなく、またセルロースなどの非可食性バイオマス由来の繊維質は高温で酵素反応を受けやすくなることが知られている。高温の維持には発電所・工場などの廃熱を利用することでエネルギー効率の良いプロセスとすることが期待できる。

水素は次世代エネルギーとして期待されているが、現状では水素は主にナフサや天然ガスの水蒸気改質で生産されており、脱化石資源の根本的解決とはならない。そこで生物機能を利用したバイオ法による水素生産について検討されてきた。光合成生物による光と水からの水素生産は理想的であるが低い生産効率や受光に大面積が必要といった欠点がある。バイオマスを原料とする発酵水素生産は効率がよく、天候や季節に生産が左右されないことから、有力な方法である。

絶対嫌気性従属栄養超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は遺伝子操作系が開発されていることから有用な超好熱菌モデル生物である。本菌はデンプンやピルビン酸からアセチル-CoA を生成する酸化分解と共役したプロトン還元により水素を発生させるが、このアセチル-CoA は最終的に酢酸として排出される (Fig. 1)。これまで国内外の研究グループにおいて *Thermococcus* 属や近縁の *Pyrococcus* 属超好熱菌における水素発生代謝やヒドロゲナーゼに関する研究、ジャーファーメンター培養による水素生産が研究されている。我々は最近、本菌の水素生成と共役したピルビン酸/アミノ酸の同時酸化について解析を行い、その過程で、最終産物の1つである酢酸の生成を抑制し、アセチル-CoA をさらに酸化するための代謝改変を施すことで、有用物質生産により適した超好熱菌株を作製できるのではないかと着想した。

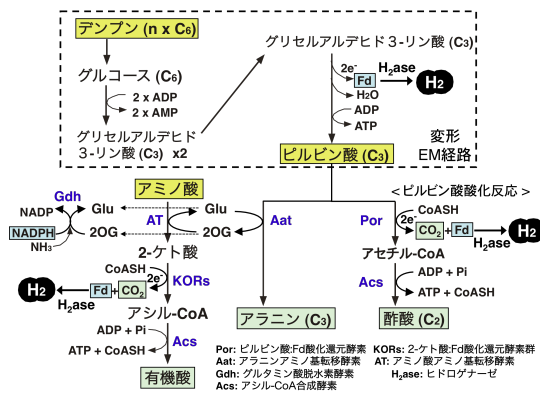


Fig. 1. *T. kodakarensis* における水素発生代謝

チル-CoA をさらに酸化するための代謝改変を施すことで、有用物質生産により適した超好熱菌株を作製できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究ではアセチル-CoA を酸化する TCA サイクル酵素群を *T. kodakarensis* で機能させることで、生育基質に由来するアセチル-CoA を酢酸として排出するのではなく、さらに酸化代謝で得たエネルギー・還元力を物質生産に利用できる代謝改変株の確立を目指した。

3. 研究の方法

T. kodakarensis ゲノム解析では TCA サイクル中の酵素の多数についてホモログが見出されず、特に C₆カルボン酸を変換するクエン酸シンターゼ (Cit)、アコニターゼ (Acn)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (Idh)、およびコハク酸デヒドロゲナーゼ (Sdh) をコードするホモログ遺伝子が存在しないことから、TCA サイクルは機能していないと考えられた。一方で、近縁の超好熱性アーキア超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* のゲノムには、代謝上の機能は不明ながらも Cit (PF0203)・Idh, (PF0202)・Acn (PF0201) の耐熱性酵素遺伝子の遺伝子クラスター (以下 *Pf-cia* と略) が存在する。本研究では各種 *T. kodakarensis* 株に *Pf-TCA* を導入した組換え株 (Fig. 2) をピルビン酸培地による水素発生条件で培養し、その際の培養上清におけるピルビン酸、アミノ酸、酢酸を含む各種有機酸、アンモニアの各濃度、および発生ガス中の水素・二酸化炭素の各濃度を測定するマスバランス解析を行った。

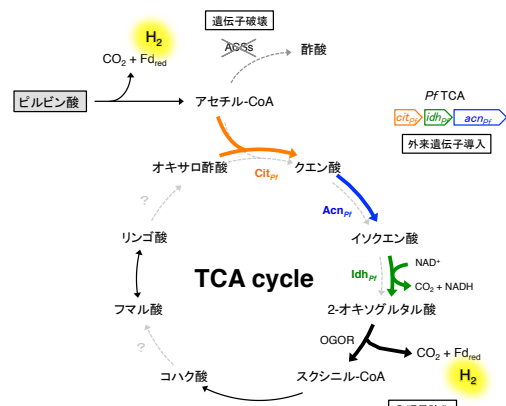


Fig. 2. *T. kodakarensis* への TCA サイクル酵素導入

4. 研究成果

強力かつ恒常的に機能するプロモーターである P_{CSG} 下流に *Pf-TCA* を連結したシャトルベクター (Fig. 3) を作製し、*T. kodakarensis* に導入した。宿主としては、水素発生を担う膜結合型ヒドロゲナーゼの発現が強化され、発生水素の再酸化を担う細胞質ヒドロゲナーゼ遺伝子を欠失させた株を用いた。水素発生培

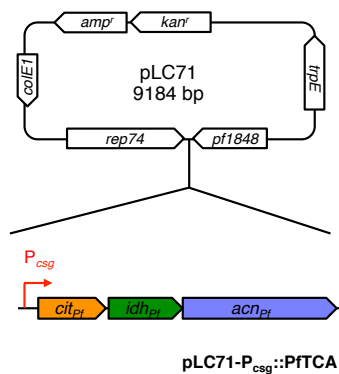


Fig. 3. *Pf*-TCA 導入用シャトルベクター

養におけるマスバランス解析を行ったところ、*Pf*-TCA 導入株では空ベクターを導入したコントロール株と比較して、培地中に排出されたコハク酸が 1.3 倍に増加した一方で、排出アンモニアが著しく減少し、グルタミン酸デヒドロゲナーゼによるアンモニア消費反応が亢進されている可能性が推測された。水素と二酸化炭素の派生量の比率は 1:1 と *Pf*-TCA 導入による変化はなかったが、基質消費量あたりの水素発生収率は 55% から 59% に増加した。

T. kodakarensis において *Pf*-TCA にコードされる 3 酵素が機能した場合、アセチル-CoA とオキサロ酢酸からクエン酸を經由して 2-オキソグルタル酸が生成され、次いで 2-オキソグルタル酸:フェレドキシン酸化還元酵素 (Ogor) により還元型フェレドキシン生成を伴ってスクシニル-CoA へと変換される。*Pf*-TCA 導入時において Ogor の機能が重要になることを予測し、強力プロモーター P_{csg} を用いて Ogor 高発現株を構築し、*Pf*-TCA を導入した。作製した組換え株は生育能が大きく低下し、代謝バランスの乱れが考えられたが、Ogor 高発現により基質消費量あたりの水素発生収率は 61% に向上し、*Pf*-TCA の導入によってさらに 63% に増加した。

T. kodakarensis ではアセチル-CoA から酢酸を生成する AMP 依存型アセチル-CoA シンターゼとして ACSI, ACSII, ACSIII の 3 つのパラログが存在する。上記のヒドロゲナーゼ改変株について ACS パラログそれぞれの単独遺伝子欠失を行ったところ、ACSII 欠失株は取得できなかった。ACSI または ACSIII の欠失により生育能の低下、水素発生量・コハク酸生成量の顕著な減少が見られた。ACSI および ACSIII 欠失株に *Pf*-TCA を導入したところ、コハク酸生成量が大幅に増加し、ACS 非欠失株と比較しても約 1.7 倍に増加した。水素発生収率も *Pf*-TCA によって ACS 非破壊株と同程度にまで回復した。ACSIII 破壊株およびその *Pf*-TCA 導入株について菌体内代謝物を抽出してメタボローム解析を行ったところ、菌体内のクエン酸の増加、ホスホエノールピルビン酸の減少が観察された。

これらの結果から、*Pf*-TCA を導入した *T. kodakarensis* 株では TCA サイクルが機能し、炭素/エネルギー代謝に影響していることが強く示唆されたが、水素発生量の増加は見ら

れなかった。*Pf*-TCA の導入に用いたシャトルベクターの維持のため添加したロバスタチンはアセチル-CoA を前駆体とするメバロン酸経路を阻害することから、その添加はアセチル-CoA や酢酸の代謝に影響を与える懸念がある。そこで *Pf*-TCA を染色体に導入した組換え株を新たに作製した。今後、本株を用いた検討を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 4 件)

1) 野原健太、中村 聡、今中忠行、福居俊昭
「超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* のアミノ酸化代謝に關与する 2-ケト酸: フェレドキシン酸化還元酵素ホモログの機能解析」
日本 Archaea 研究会第 28 回講演会、平成 27 年 7 月 22~23 日、愛媛

2) K. Nohara, I. Orita, S. Nakamura, T. Imanaka, T. Fukui
“Gene Deletion and Mass Balance Analyses of H₂-evolving Metabolisms in Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*”
The 13th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering. 2015.11.16-20, Jeju Island, Korea.

3) 野原健太、中村 聡、今中忠行、福居俊昭
「超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis* における 2-オキソ酸: フェレドキシン酸化還元酵素パラログの機能解析」
第 10 回日本ゲノム微生物学会年会、平成 28 年 3 月 4 日~5 日、東京

4) T. Fukui, R. Futatsuishi, K. Adachi, A. Kaneko, I. Orita, S. Nakamura, T. Imanaka
“Development of Random Insertional Mutagenesis and Isolation of Temperature-sensitive Mutants of *Thermococcus kodakarensis*”
11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016), 2016.9.12, Kyoto.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福居 俊昭 (FUKUI TOSHIAKI)
東京工業大学・生命理工学院・教授
研究者番号：80271542

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

野原 健太 (NOHARA KENTA)