

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02871

研究課題名（和文）超好熱菌を用いたキチンからの高効率水素生産系の構築

研究課題名（英文）Production of a high-conversion hydrogen production system using hyperthermophiles

研究代表者

金井 保（Kanai, Tamotsu）

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：10346083

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：Thermococcus kodakarensis KC04 tM1株より作製した細胞質型ヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株では、H<sub>2</sub>生産量が親株よりも有意に増加し、さらには消費キチン量に対するH<sub>2</sub>生産量の割合も上昇したことから、水素をより高効率に生産可能な株を取得できた。Pyrococcus chitonophagusの遺伝子組換え系を構築して3種のキチナーゼ遺伝子破壊株の作製した結果、ChiAが本菌のキチン分解に最も重要であることが分かった。またP. chitonophagusにおいて、GlcNAcリン酸化酵素とGlcNAc-6リン酸脱アセチル化酵素からなる新規なキチン資化経路の存在を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超好熱菌Thermococcus kodakarensisを用いた水素生産システムにおいて水素変換効率を向上させた株を取得できたことは、化石燃料に依存しない新たな水素生産系の実用化に向けた大きな成果といえる。さらにはPyrococcus chitonophagusのキチン資化経路の解析により、新規な経路の存在が予想されたことから、広範囲な基質の利用が可能なシステムの構築に繋がることが予想される。

研究成果の概要（英文）：The cytosolic hydrogenase gene disruption strain prepared from the Thermococcus kodakarensis KC04 tM1 strain showed a significant increase in H<sub>2</sub> production as well as in the ratio of H<sub>2</sub> production to the amount of chitin consumed. On the other hand, construction of the genetic system in Pyrococcus chitonophagus enabled the author to obtain a gene-disrupted mutant that lacks each three chitinase gene. As a result, ChiA was identified to be the most important enzyme for chitinolysis. Moreover, a new chitinolytic pathway consisting of GlcNAc kinase and GlcNAc-6 phosphate deacetylase was identified in P. chitonophagus.

研究分野：生物学

キーワード：キチン アーキア 超好熱菌 水素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) キチンは、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を基本単位とするホモポリマーであり、地球上における年間生成量は  $10^{10}$ ~ $10^{11}$  トンと推定されているものの、バイオマスとしての有用性は十分には認知されていない。キチンは甲殻類の外骨格の主成分であることから、これらが多く生息する海底には強力なキチン分解システムがあることが予想される。

(2) 筆者らは、超好熱性アーキアである Thermococcales 目の 2 種 (*Thermococcus kodakarensis* と *Pyrococcus chitonophagus*) を対象とし、これまでに *T. kodakarensis* が高い発酵水素生産能力を有すること、*T. kodakarensis* へのキチン資化性の付与、キチン資化性である *P. chitonophagus* からの新規キチナーゼの同定などの研究を進めてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、莫大な生産量を誇るキチン系バイオマスを、海洋性超好熱菌がもつキチン分解・資化システムを利用して水素へと変換することを目的とした。より具体的には、海洋性超好熱性アーキア *T. kodakarensis* と *P. chitonophagus* が示す強力なキチン分解・資化システムの分子レベルでの理解を進めると共に、その知見に基づいてキチン資化能力の改良を行い、高いキチン依存的水素生産を示す株の育種を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) キチン資化速度および水素変換効率が向上した *T. kodakarensis* 株の育種

適応進化を経てキチン資化能が向上した *T. kodakarensis* KC04ΔtM1 株の全ゲノム解析を行い、変異部位の同定を進めた。また KC04ΔtM1 株を元株として、水素の再吸収に関わる細胞質型ヒドロゲナーゼ Hyh の遺伝子破壊株を作製し、そのキチン分解能や水素生産能を評価した。

### (2) *P. chitonophagus* における新規キチン分解機構の探索と評価

*P. chitonophagus* における遺伝子組換え系の構築のために、ピリミジン合成系酵素をコードする *pyrE* 破壊株を作製した。本株を元に、既存のキチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiC*, *chiD*) の破壊株を作製し、キチン分解能を評価した。また *P. chitonophagus* の新たなキチン分解資化系路の探索の一環として、GlcNAc 代謝系路に着目した。*T. kodakarensis* にはホモログがない GlcNAc kinase や GlcNAc-6-phosphate deacetylase とアノテーションされている遺伝子を大腸菌で発現させた組換え酵素を用いて、活性を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) キチン資化速度および水素変換効率が向上した *T. kodakarensis* 株の育種

*T. kodakarensis* KU216 株より、分子育種と適応進化により、キチンからの水素生産が可能となった *T. kodakarensis* KC04ΔtM1 株について、全ゲノム解析を行った。適応進化前の株である KC04Δt 株についても同時にゲノム解析を行い、両者の比較を行った。その結果、既に同定済であった高発現のために導入した GDH プロモーター領域における変異部位以外にも、複数の変異部位が存在することが確認された。また KC04ΔtM1 株を元株として、水素の再吸収に関わる細胞質型ヒドロゲナーゼ (Hyh) 遺伝子を破壊した、KC04ΔtM3 株の作製を行った。この KC04ΔtM3 株を swollen chitin を含む ASW-VMT-SC 培地において 85 °C で培養を行い、KC04ΔtM1 株と同様のキチン資化能をもつことを確認した。キチン資化時における KC04ΔtM3 株の各代謝産物を定量するため、気相中の H<sub>2</sub> と CO<sub>2</sub> をガスクロマトグラフにより、培養液中の

アンモニアと酢酸を分光光度計を用いた酵素法により、さらには培養液中に残ったキチン分解産物である GlcNAc と(GlcNAc)<sub>2</sub> を HPLC により、それぞれ定量した。これらの定量結果から、KC04ΔtM3 株の H<sub>2</sub> 生産量は KC04ΔtM1 株と比べて有意に増加していること、さらには消費キチン量に対する H<sub>2</sub> 生産量の割合も有意に上昇していることが判明した。これらの結果から、水をさらに高効率で生産する株の取得に成功した。

## (2) *P. chitonophagus* における新規キチン分解機構の探索と評価

まずは 5-fluoroorotic acid に対する耐性を利用して *P. chitonophagus* 野生株より *pyrE* 変異株を単離した(CHU1 株)。続いて CHU1 株より制限修飾系遺伝子群の遺伝子破壊株(CRU1 株)を作製し、これをホスト株として、3 種のキチナーゼ(ChiA, ChiC, ChiD) 遺伝子破壊株の作製を進めた。その結果、各キチナーゼ遺伝子の破壊株が作製できた。このことは *P. chitonophagus* において実用的な遺伝子組換え系を構築することができたことを意味する。これらの各キチナーゼ遺伝子破壊株を用いて swollen chitin の分解試験を行った結果、ChiA 遺伝子破壊株において、ホスト株や他の遺伝子破壊株と比べて swollen chitin の分解が有意に低下した。以上のことから、本菌のキチン分解において ChiA が最も重要な役割を果たしていることが分かった。

次に *P. chitonophagus* の新規なキチン分解・資化系路の探索を目的として、本菌がもつ GlcNAc 代謝系路に着目した。*T. kodakarensis* においてもホモログ遺伝子が存在しない、GlcNAc リン酸化酵素とその生成物(GlcNAc-6 リン酸)の脱アセチル化酵素とアノテーションされた 2 つの遺伝子に注目した。大腸菌を用いてこれらの遺伝子を大量発現させた菌体より、酵素精製を進めた。得られた組換え酵素の活性測定を行った。その結果、アノテーション通りに ATP 依存的 GlcNAc リン酸化活性と GlcNAc-6 リン酸脱アセチル化活性をそれぞれ検出した。このことから、本菌の GlcNAc 代謝において、従来の経路の他に、これらの酵素が関与する新規な GlcNAc 代謝系路をもつことが強く示唆された。また GlcNAc kinase が、基質として *N*-アセチルムラミン酸(MurNAc)に対してもリン酸化活性をもつことも判明した。そこで本代謝経路がキチンだけでなくペプチドグリカンの資化にも関与すると予想し、MurNAc-6 リン酸から D-乳酸を脱離させる反応を触媒する酵素 MurNAc-6 リン酸 etherase の同定を進めた。大腸菌などで見つかっている本酵素のホモログ遺伝子は本菌のゲノム上に存在していない。そこでリン酸化糖を認識する SIS ドメインをもつ機能未知遺伝子に着目した。本タンパク質が MurNAc-6 リン酸脱乳酸化活性を示すかを検討するため、組換えタンパク質を調製し、これを GlcNAc/MurNAc kinase による MurNAc の反応産物に作用させたところ、GlcNAc-6 リン酸に相当するスポットが TLC 上で出現したことから、MurNAc-6 リン酸 etherase 活性をもつことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jan-Robert Simons, Haruki Beppu, Tadayuki Imanaka, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi	4. 巻 130
2. 論文標題 Effects of high-level expression of A 1-ATPase on H 2 production in Thermococcus kodakarensis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 149-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto Yasuyuki, Kanai Tamotsu, Kaneseiki Tsuyoshi, Atomi Haruyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 The TK0271 Protein Activates Transcription of Aromatic Amino Acid Biosynthesis Genes in the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus kodakarensis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01213-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01213-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Cann Isaac, Pereira Gabriel V., Abdel-Hamid Ahmed M., Kim Heejin, Wefers Daniel, Kayang Boniface B., Kanai Tamotsu, Sato Takaaki, Bernardi Rafael C., Atomi Haruyuki, Mackie Roderick I.	4. 巻 86
2. 論文標題 Thermophilic Degradation of Hemicellulose, a Critical Feedstock in the Production of Bioenergy and Other Value-Added Products	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02296-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.02296-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirata Akira, Suzuki Takeo, Nagano Tomoko, Fujii Daishiro, Okamoto Mizuki, Sora Manaka, Lowe Todd M., Kanai Tamotsu, Atomi Haruyuki, Suzuki Tsutomu, Hori Hiroyuki	4. 巻 201
2. 論文標題 Distinct Modified Nucleosides in tRNATrp from the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus kodakarensis and Requirement of tRNA m2G10/m22G10 Methyltransferase (Archaeal Trm11) for Survival at High Temperatures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00448-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00448-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 金井 保
2. 発表標題 超好熱菌を用いたキチンからの水素生産
3. 学会等名 日本生物工学会中部支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 侑、宮本 大暉、金井 保、跡見 晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキア <i>Pyrococcus chitonophagus</i> における新たなキチン資化経路の発見
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山 凌、谷本 充、Rengwei LIU、吉田 晃、山本 康之、金井 保、跡見 晴幸
2. 発表標題 Lrp/AsnC型転写制御因子TK2110によるアミノ酸異化代謝系制御機構の解明
3. 学会等名 バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金井 保、Mehwish Aslam、堀内 あゆみ、Jan-Robert Simons、Savyasachee Jha、今中 忠行、跡見 晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアの代謝改変によるキチン依存的な水素生産
3. 学会等名 第32回日本Archaea研究会講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamotsu Kanai、Mehwish Aslam、Ayumi Horiuchi、Jan-Robert Simons、Savyasachee Jha、Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Engineering of the hyperthermophilic archaeon <i>Thermococcus kodakarensis</i> for chitin-dependent hydrogen production
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamotsu Kanai、Masahiro Yamada、Natsuki Nakada、Daisuke Watanabe、Mehwish Aslam、Ayumi Horiuchi、Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Genetic characterization of multiple chitinases of the hyperthermophilic archaeon, <i>Pyrococcus chitonophagus</i>
3. 学会等名 International Congress on Thermophiles (Thermophiles2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 将大、中田 菜月、Mehwish Aslam、金井 保、跡見 晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキア <i>Pyrococcus chitonophagus</i> がもつキチナーゼの遺伝学的機能解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邉大輔、Mehwish Aslam、山田将大、金井保、跡見晴幸
2. 発表標題 <i>Pyrococcus chitonophagus</i> がもつ3種のキチナーゼの局在性解析
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Watanabe, H. Miyamoto, T. Kanai, H. Atomi
2. 発表標題 Identification of a potential second chitin assimilation pathway in the hyperthermophilic archaeon, Pyrococcus chitonophagus
3. 学会等名 13th International Congress on Extremophiles (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Watanabe, H. Miyamoto, T. Kanai, H. Atomi
2. 発表標題 A second chitin assimilation pathway proposed in the hyperthermophilic archaeon, Pyrococcus chitonophagus
3. 学会等名 Active Enzyme Molecule 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 植田充美、金井 保ほか(分担執筆)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 290
3. 書名 バイオエネルギー再燃	

1. 著者名 金井 保ほか(分担執筆) 日本応用細胞生物学会編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 太陽書房	5. 総ページ数 188
3. 書名 応用細胞資源利用学 第3巻(第4章 超好熱菌を用いたバイオマスからの水素生産)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------