

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2013

課題番号：21248010

研究課題名(和文)絶対独立栄養性・好熱性水素細菌のゲノム情報を基盤とした生理生化学的研究

研究課題名(英文)Physiological and biochemical studies on an obligately autotrophic and thermophilic hydrogen oxidizing bacterium based on the genome information

研究代表者

石井 正治 (Ishii, Masaharu)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30193262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,800,000円、(間接経費) 11,040,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム情報を基盤としたTK-6株の進化系統的位置づけの明確化、絶対独立栄養性の分子基盤、高度好熱性の分子基盤、新規窒素代謝経路の分子基盤、呼吸代謝能多様性の分子基盤、新たな代謝系の探索とその分子基盤、に関して、当初の計画以上の結果を得た。具体的には、原著論文15件、学会発表27件、そして産業財産権の出願1件、という誇るべき成果を出せたものと自負している。

研究成果の概要(英文)：Clarification of the phylogenetic position of the strain TK-6 based on the genome information, clarification of the molecular basis of the obligate autotrophy of the strain, clarification of the thermophilic nature of the strain, clarification of the molecular basis of the newly discovered nitrogen compound metabolism of the strain, clarification of the molecular basis of the varieties of respiration metabolism of the strain, clarification of and search for the new metabolism; we did our best in terms of the above mentioned items. In fact, we published 15 original papers, made 27 presentations in Annual Meetings, and asked for 1 patent. We are very proud that we did much more than we promised.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：水素細菌 ヒドロゲナーゼ 活性酸素除去 硫黄代謝 アミノ酸代謝

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、2008年8月に絶対独立栄養性高度好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6株のゲノム情報を完全に明らかにすることに成功した。このことを受け、本研究では、TK-6株が示す進化的特異性、さらには絶対独立栄養性、高度好熱性、新規な窒素代謝経路、エネルギー代謝多様性などの生理生化学的特質を、ゲノム情報をもとに多面的に解析し明らかにすることを第一の目的とする。さらに、こうした基盤的知見を踏まえ、二酸化炭素からの *de novo* 物質生産、水素エネルギー利用等の応用的研究に足がかりを得ると共に、ゲノム情報を最大限活用した有用代謝機能探索研究や有用酵素探索研究を行うことを第二の目的とする。

TK-6株は、70に生育至適温度を有する絶対独立栄養性菌である。本菌は1980年代に単離されたが、絶対独立栄養性を示したため、有機化合物資化性などに頼っている従来の分類学的手法が適用できなかった。そのため、化学分類学的手法が試みられ、C18:0やC20:1が菌体脂肪酸の主成分となっていることや、メチオナキノンなる新規硫黄含有キノンが呼吸鎖キノン成分として存在していることなどが明らかにされてきた。こうした結果から、本菌は新属新種の *Hydrogenobacter thermophilus* として記載されている。TK-6株とその類縁菌はその後多く単離されてきており、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析結果から、進化系統的に非常に古い起源を有するバクテリアの一群であることが明らかとなってきた。なお、こうした一連の菌群は、現在では *Aquificales* 目として分類されている。

本菌は、物質代謝の面でも多くの新規性を有している。即ち、還元的 TCA サイクルを用いて二酸化炭素を固定している点、還元型フェレドキシンを電子供与体とした GS-GOGAT 経路を用いてアンモニア取り込みを行っている点、アンモニア態窒素だけでなく硝酸態窒素も取り込める点、硝酸態窒素の取り込み時にも還元型フェレドキシンを電子供与体として用いている点、水素ガスをエネルギー源とした時に酸素ガス、硝酸イオン、三価鉄イオンを最終電子受容体として生育できる点、酸素ガスを電子受容体とした時に水素ガスだけでなく硫黄化合物もエネルギー源として生育できる点、ゲノムにニトロゲナーゼ遺伝子が含まれている点、窒素代謝系の検討からグリオキシル酸が窒素代謝に関わっていると推測される点、葉酸様物質が培養液に著量検出されている点、などである。

構成成分の新規性でも前述の通り、メチオナキノン、さらには新規アミノリン脂質の化学構造を明らかとしてきている。

さらに生理学的特質としては、TK-6株は絶対独立栄養性菌でありながら、約1時間という

世代時間を有している点や、絶対独立栄養性を有している点、70という高温に生育至適温度を有している点などが挙げられる。

## 2. 研究の目的

上述のように、我々はTK-6株のゲノム情報を完全に明らかにすることに成功した。そこで、本研究においては、これまで我々が明らかにしてきた、あるいはTK-6株の特性としては既に分かっていたものの適切な解析手段がなかったために研究そのものが着手されていなかった、TK-6株の生理生化学的特質を、ゲノム情報をもとに多面的に解析し明らかにすることを第一の目的とする。具体的には、以下の研究を推進する。

### (1) ゲノム情報を基盤としたTK-6株の進化系統的な位置づけの明確化

*Aquificales* 間、*Aquificales* -  
*-proteobacteria* 間の比較ゲノム解析

アノテーションされた個々の構造遺伝子による系統樹の統合的解析  
TK-6株の進化系統に関する統合的考察

### (2) 絶対独立栄養性の分子基盤

二酸化炭素ガスだけを炭素源とした条件における、炭素代謝系(還元的TCAサイクル並びに糖新生系)を中心としたマイクロアレイ解析とメタボローム解析

TK-6株が示す絶対独立栄養性の分子基盤の解明

### (3) 新規窒素代謝経路の分子基盤

窒素固定に関わる遺伝子の転写解析  
TK-6株の窒素代謝について、炭素代謝とも絡めた統合的な討論

### (4) 呼吸代謝多様性の分子基盤

水素あるいは硫黄化合物をエネルギー源とした場合の、エネルギー獲得系を中心としたマイクロアレイ解析  
水素濃度を变化させた時のヒドロゲナーゼの転写解析

TK-6株の呼吸代謝多様性についての分子基盤的討論

### (5) 新たな代謝系の探索とその分子基盤

この(1)から(5)までの実験並びに解析、討論によりTK-6株が示す進化的特異性や生理生化学的特質を、ゲノム情報をもとに多面的に明らかにする。本研究は、これまで申請者が物質レベルで明らかにしてきた独立栄養性細菌の代謝を、ゲノムベースの情報も含め統合的に理解しつつ、新たな学問領域にもメスを入れていこうという内容で、独創性は極めて高いものと自負している。

### (6) TK-6株の特質の応用的展開

TK-6株は二酸化炭素から全ての菌体炭素成分を生合成でき、かつ1時間足らずの極めて短い世代時間を有しているため、二酸化炭素からの *de novo* 物質生産を目指す際のモデル微生物となり得る。そこで、(1)から(5)で得ら

れた知見を、物質生産を目指すという観点から改めて見直し、二酸化炭素からの *de novo* 物質生産への生化学的な足がかりを得る。加えて、本菌は水素ガスをエネルギー源として用いるため、水素エネルギーの人為的利用という方面への生化学的応用も目指す。

さらに、遺伝子のアノテーションを進展させていくことで、本菌のゲノムからは、多くの有用遺伝子が掘り起こされてくるものと信じている。そこで、そのような遺伝子をできるだけ多く大腸菌などで発現させ、有用物質生産に活かしていく。なお、学術的に有用な酵素あるいはタンパク質については、発現に加え結晶構造解析まで進展させ、物質レベルでの進化系統を論じる素材などとして発展させていく。

二酸化炭素利用に対して独立栄養性細菌の代謝を最大限利用することは、大きな将来的展望を有しているものと自負している。その他、全ての面で最大限の研究展開を図っていく。

### 3. 研究の方法

各種生化学的手法を用いて、研究を進展させた。

### 4. 研究成果

#### (21年度)

(1) ゲノム情報を基盤とした TK-6 株の進化系統的な位置づけの明確化

・TK-6 株のゲノムを中心に Aquificales 間、さらに他の細菌菌株も含めた詳細なゲノム解析を行った。

・アノテーションされた遺伝子の内、炭素代謝や窒素代謝など中心的代謝に関わるものを選択し、他の細菌菌株も含め、個々に系統樹を作成した。さらに、作成した系統樹内の TK-6 株のトポロジーを統合的に解析し、各種のパターンに分類した。

(2) 絶対独立栄養性の分子基盤

・マイクロアレイシステムを立ち上げた。  
・ミニジャーファーマンターを用い、二酸化炭素ガス濃度を種々変化させて TK-6 株を培養した。経時的にサンプルを調製し、マイクロアレイ解析を行った。

(3) 新規窒素代謝経路の分子基盤

TK-6 株のゲノム中にはニトロゲナーゼ遺伝子群が検出されている。果たして、TK-6 株で窒素固定系が機能しているのか否かを知るために、転写解析実験を行った。

(4) 呼吸代謝能多様性の分子基盤

TK-6 株の培養には通常水素ガスをエネルギー源として用いている。また、TK-6 株のゲノム中にはヒドロゲナーゼ遺伝子が複数見出されている。そこで、本菌のヒドロゲナーゼについて、その発現性を詳細に知るために、水素ガス濃度を変化させて培養を行い、かつ経時的にサンプルを調製した。得られたサンプルに対し、ヒドロゲナーゼの転写解析を行い、時期特異的に発現している分子種あるいは

水素ガス濃度依存的に発現している分子種を特定しつつある。

#### (22年度)

(1) ゲノム情報を基盤とした TK-6 株の進化系統的な位置づけの明確化

・TK-6 株の進化系統に関して統合的考察を行った。

(2) 絶対独立栄養性の分子基盤

・何故 TK-6 株が絶対独立栄養性を示すのかをこれまでの解析をもとに検討を加えた。一番大きな理由としては、解糖系の内 2 箇所の酵素が存在せず、糖新生の方向にのみ機能していることと考えられた。

(3) 新規窒素代謝経路の分子基盤

・窒素代謝と炭素代謝の代謝的関連性を明らかにする過程で、糖新生ならびにアミノ酸生合成に着目した。糖新生経路においては、Fructose-1,6-bisphosphatase に着目した。本菌の無細胞抽出液を各種カラムクロマトグラフィーに供することにより、Fructose-1,6-bisphosphatase を精製し、その性状を明らかにした。また、アミノ酸生合成においては、セリン生合成に着目した。本菌の無細胞抽出液を各種カラムクロマトグラフィーに供することにより、ホスホセリンホスファターゼを精製し、その性状を明らかにした。

(4) 呼吸代謝能多様性の分子基盤

・本菌は好気性菌であるにもかかわらず、還元的 TCA サイクルにより炭酸固定を行うことができる。そのため、強い酸化防御システムを有していることが予想される。実際、FNR (Ferredoxin:NADP oxidoreductase) が反応に関与しルブレリスリンが還元され、還元型ルブレリスリンがペルオキシダーゼを有することで酸化防御システムとして機能している、ということが示された。なお、この推論はルブレリスリン変異株を用いた実験により、実証されている。

#### (23年度)

(1) 絶対独立栄養性の分子基盤

・何故 TK-6 株が絶対独立栄養性を示すのかをこれまでの解析をもとに説明した。

(2) 新規窒素代謝経路の分子基盤

・窒素代謝と炭素代謝の代謝的関連性を明らかにし、どのような制御系が機能しているのかも含めて統合的な議論を行った。

(3) 呼吸代謝能多様性の分子基盤

・TK-6 株の呼吸代謝能多様性について分子基盤の解析をもとに知見を得た。

(4) TK-6 株代謝の応用的展開

・TK-6 株を、二酸化炭素からの *de novo* 物質生産を目指す際のモデル微生物と捉え、これまでに得られた知見を、物質生産の観点から捉え直した。

#### (24年度)

(5) 新たな代謝系の探索とその分子基盤

・本菌のセリン生合成系について、missing link となっていた部分をタンパク質化学的に明らかにし、さらに結晶構造解析的手法に

より詳細な解析を加えた。チオ硫酸酸化系について研究を進めたところ、新規なタンパク質が硫黄代謝に関わっていることが遺伝子破壊実験などから明らかになった。また、フェリパーオキシシンと命名された新規タンパク質が活性酸素除去システムで中心的に機能していることが、遺伝子破壊実験などにより明らかとなった。

#### (6) TK-6 株の特質の応用的展開

・本菌の水素酸化で主要な役割を担っているヒドロゲナーゼについて、どの遺伝子が重要な働きをしているのかを明らかにするために、個々のヒドロゲナーゼの破壊株を得、その生理生化学的性状解析を行った。また、本菌の代謝を電気化学的手法により制御できる可能性が示唆された。

(25年度)

#### (5) 新たな代謝系の探索とその分子基盤

・フェレドキシンの還元系に関しては、ヒドロゲナーゼ欠損変異株が単離できたことから、ヒドロゲナーゼ反応が直接的に関与するのではなく、膜を介したプロトン勾配を利用する系であることが絞り込まれてきている。電気化学的な培養としては、AQDSなるメディエーターを用いて、-0.6Vの電位を与えると、菌体に電子が流れ込んでいることなどが実験的に確認できたため、水素細菌に直接電気エネルギーを与えることが可能であることが示された。本菌の活性酸素除去システムについては、さらに精査を進め、BCPなるタンパク質も関与していることを示した。さらに、本菌の硫黄代謝系についても研究を進め、チオ硫酸の代謝にヘテロジスルフィドレダクターゼが関与していることが明らかとなり、本菌がテトラチオン酸を代謝できることと合わせ、本菌の硫黄代謝全体像を描けるようになった。ホスホセリンホスファターゼに関しては、細胞内にA-Aのホモ代マーとA-Bのヘテロダイマーが存在していることを明らかにし、さらにS-S結合が酵素の熱安定性に大きく貢献していることが明らかとなった。

・代謝フラックスの解析を行った。本菌におけるエネルギー代謝解明の一環として、水素ガスをエネルギー源、酸素ガスを電子受容体とした時のガス消費を経時的に測定し、酸素ガス濃度が上がると活性酸素を除去するような方向にエネルギー代謝が変化していることが判明した。

#### (6) TK-6 の特質の応用展開

・電気化学的培養と合わせ、乳酸生成性を検討した。

### 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](15件)

(1) (査読有) Chiba, Y., Horita, S., Ohtsuka, J., Arai, H., Nagata, K., Igarashi, Y., Tanokura, M., and Ishii, M.

(2013) Structural Units Important for Activity of a Novel-type Phosphoserine Phosphatase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 Revealed by Crystal Structure Analysis, *J Biol Chem* 288, pp. 11448-11458. (doi: 10.1074/jbc.M112.449561.)

(2) (査読有) Sato, Y., Kanbe, H., Miyano, H., Sambongi, Y., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2012) Transcriptome Analyses of Metabolic Enzymes in Thiosulfate- and Hydrogen-Grown *Hydrogenobacter thermophilus* Cells, *Biosci Biotech Bioch* 76, pp. 1677-1681. (<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120210>)

(3) (査読有) Sato, Y., Kameya, M., Fushinobu, S., Wakagi, T., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2012) A Novel Enzymatic System against Oxidative Stress in the Thermophilic Hydrogen-Oxidizing Bacterium *Hydrogenobacter thermophilus*, *Plos One* 7, e34825. (doi: 10.1371/journal.pone.0034825.)

(4) (査読有) Chiba, Y., Terada, T., Kameya, M., Shimizu, K., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2012) Mechanism for folate-independent aldolase reaction catalyzed by serine hydroxymethyltransferase, *Febs J* 279, pp. 504-514. (doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08443.x.)

(5) (査読有) Chiba, Y., Oshima, K., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2012) Discovery and Analysis of Cofactor-dependent Phosphoglycerate Mutase Homologs as Novel Phosphoserine Phosphatases in *Hydrogenobacter thermophilus*, *J Biol Chem* 287, pp. 11934-11941. (doi: 10.1074/jbc.M111.330621.)

(6) (査読有) Chiba, Y., Horita, S., Ohtsuka, J., Arai, H., Nagata, K., Igarashi, Y., Tanokura, M., and Ishii, M. (2012) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel type of phosphoserine phosphatase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *Acta Crystallogr F* 68, pp. 911-913. (doi: 10.1107/S1744309112025213.)

(7) (査読有) Oshima, K., Chiba, Y., Igarashi, Y., Arai, H., and Ishii, M. (2012) Phylogenetic Position of *Aquificales* Based on the Whole Genome Sequences of Six *Aquificales* Species, *Int J Evol Biol* 2012, Article ID 859264. (doi: 10.1155/2012/859264.)

- (8) (査読有) Sato, Y., Kameya, M., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2011) Detecting weak protein-protein interactions by modified far-western blotting, *J Biosci Bioeng* 112, pp. 304-307.(doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.05.011.)
- (9) (査読有) Yamamoto, M., Ikeda, T., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2010) Carboxylation reaction catalyzed by 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductases from *Hydrogenobacter thermophilus*, *Extremophiles* 14, pp. 79-85.(doi: 10.1007/s00792-009-0289-4.)
- (10) (査読有) Sano, R., Kameya, M., Wakai, S., Arai, H., Igarashi, Y., Ishii, M., and Sambongi, Y. (2010) Thiosulfate Oxidation by a Thermo-Neutrophilic Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*, *Biosci Biotech Bioch* 74, pp. 892-894.(http://dx.doi.org/10.1271/bb.90948)
- (11) (査読有) Kameya, M., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2010) Purification of three aminotransferases from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6-novel types of alanine or glycine aminotransferase, *Febs J* 277, pp. 1876-1885.(doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07604.x.)
- (12) (査読有) Ikeda, T., Yamamoto, M., Arai, H., Ohmori, D., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2010) Enzymatic and electron paramagnetic resonance studies of anabolic pyruvate synthesis by pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus*, *Febs J* 277, pp. 501-510.(doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07506.x.)
- (13) (査読有) Arai, H., Kanbe, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2010) Complete Genome Sequence of the Thermophilic, Obligately Chemolithoautotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *J Bacteriol* 192, pp. 2651-2652.(doi: 10.1128/JB.00158-10.)
- (14) (査読有) Yoshida, N., Ohmura, N., Matsumoto, N., Sasaki, K., Saiki, H., Arai, H., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2010) Dissimilatory Fe (III) reduction by cytochrome c-552 in a thermophilic, obligately chemolithoautotrophic bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *J Jpn Soc Extr* 9, pp. 61-66.( http://dx.doi.org/10.3118/jjse.9.61)
- (15) (査読有) Ikeda, T., Nakamura, M., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2009) Ferredoxin-NADP(+) reductase from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *Fems Microbiol Lett* 297, pp. 124-130.(doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01667.x.)
- [学会発表](計 27 件)  
 主要なものを以下に示す。全て日本農芸化学会大会で発表した。
- (1) 2010/03/29 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株の酸素耐性について、佐藤 由也、神邊 悠奈、亀谷 将史、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫
- (2) 2011/03/26 *Hydrogenobacter thermophilus* の phosphoserine phosphatase の精製と性状解析、千葉 洋子、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫
- (3) 2012/03/23 新規 phosphoserine phosphatase の性状解析と生物内分布、千葉 洋子、堀田 彰一朗、大塚 淳、新井 博之、永田 宏次、石井 正治、田之倉 優、五十嵐 泰夫
- (4) 2013/03/26 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の持つ Heterodisulfide reductase の機能に関する研究、石崎 優、佐藤 由也、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫
- (5) 2014/03/30 電子の流れを基に、微生物代謝を紐解く、石井 正治、佐藤 由也
- [図書](計 0 件)
- [産業財産権]  
 出願状況(計 1 件)
- 名称: 微生物の遺伝子発現制御方法  
 発明者: 平野伸一、松本伯夫  
 権利者: 電力中央研究所  
 種類: 特許  
 番号: 特許 2014-04082  
 出願年月日: 2014 年 3 月 3 日  
 国内外の別: 国内
- 取得状況(計 0 件)
- 名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 正治 (MASAHARU Ishii)  
東京大学、大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：30193262

(2) 研究分担者

新井 博之 (HIROYUKI Arai)  
東京大学、大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：70291052

(3) 研究分担者 (平成 25 年度)

松本伯夫 (NORIO Matsumoto)  
電力中央研究所、環境科学研究所・上席研究員  
研究者番号：40371512

(3) 研究分担者 (平成 25 年度)

平野伸一 (SHIN-ICHI Hirano)  
電力中央研究所、環境科学研究所・主任研究員  
研究者番号：20392748