

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年 3月 21日現在

時空間的探索による一酸化炭素資化菌の包括的研究とその応用基盤の構築
Comprehensive, Spatiotemporal Study and Applied
Research of Carboxydrotrophs

課題番号：16H06381

左子 芳彦 (SAKO, Yoshihiko)

京都大学・大学院農学研究科・教授



研究の概要（4行以内）

一酸化炭素資化菌は、環境中の一酸化炭素（CO）をCOデヒドロゲナーゼ（CODH）により除去し水素を生成することから環境の代謝活性を促進する‘潤滑油’として機能すると考えられる。そこで本菌の特性を分子生物学的手法により総合的に理解し、C1化学への展開に向けた持続的低炭素社会の基盤を構築することを目的とした。

研究分野：海洋微生物学

キーワード：一酸化炭素（CO）資化菌、CO代謝、ゲノム解析、海洋コア

1. 研究開始当初の背景

水素（H₂）生成型一酸化炭素（CO）資化菌は、有毒ガスであるCOを次世代エネルギーであるH₂に変換する。そのため、H₂生成型CO資化菌は合成ガス中のCOを利用して高効率にH₂を生成する微生物触媒への応用が期待されている。さらに、CO₂ ⇌ COの可逆反応を触媒するCOデヒドロゲナーゼ（CODH）は、CO₂から有用C1化合物であるCOを生成する新規持続的触媒として注目されている。より高効率な生物触媒ならびに触媒資源の開発に向けて、CO資化菌の資源化が望まれている。

2. 研究の目的

我々は、海洋・陸性熱水環境より多様なH₂生成型CO資化菌を分離してきた。特に海底カルデラコアから分離した新属種の細菌は、既報の生物で最多の6つのCODHを有する。本菌は、孢子として堆積コア内で休眠中の古代型CO資化菌と予測され、代謝過程にCOを共役させ、直接電子を取り込む強力なCO利用能を有している。本研究では、強力なCO利用能を有する古代型を中心に、CO資化菌を総合的に理解し、CO₂削減と次世代炭素循環の創生を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 古い年代の堆積コアを中心に海洋・陸性熱水環境から新規CO資化菌の分離とその環境の微生物叢を解明する。
- (2) 分離株の全ゲノム解析を行い、トラン

スクリプトーム解析による分子生理学的研究を進め未知CO代謝を解明する。

- (3) リスト化された高性能CODHを導入した組換え微生物の性状解析と本酵素大量発現系を構築する。

4. これまでの成果

(1) 新規CO資化菌の分離と微生物叢解析

海底堆積コア及び陸上熱水環境・カルデラ湖堆積物よりH₂生成型CO資化菌の分離を行った。その結果、新たに新種を含むバチルス綱細菌2株・クロストリジウム綱細菌9株の分離に成功した(図1)。中でもバチルス綱細菌2株は通性嫌気性であり、酸素存在下での好気呼吸による従属栄養増殖能に加え、嫌気CO雰囲気下では高いCO消費活性とH₂生成能を有することが明らかとなった。本分離株は、極めて新規な高性能組換え微生物の作出に応用可能であると示唆された。

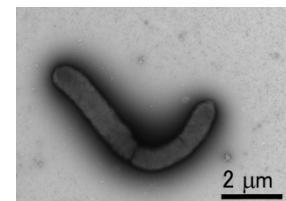


図1. バチルス綱細菌TG4株の電子顕微鏡写真

さらに、複数の火山性熱水環境・海底堆積コアから得られた100を超える環境試料について微生物叢解析を行った。H₂生成型CO資化菌が増殖に不適な環境においても、低密度ではあるが広く分布していたことから、H₂生成型CO資化菌は孢子として拡散し、環境変化にตอบสนองして発芽することで、微生物生態

学的ニッチを獲得する可能性を見出した。

(2) オミックス解析に基づく CO 代謝の解明
上記分離株を含む多様な H₂生成型 CO 資化菌 11 株についてゲノム配列を決定した。本性状菌には CODH/ヒドロゲナーゼ (ECH) 遺伝子クラスターが保存されていた。しかし、*Carboxydothemus pertinax* は本遺伝子クラスター上の CODH を欠失させており、H₂生成を伴う CO 代謝の多様性が示された。本菌のオミックス解析によって、CO の高い還元力を用いた H₂生成を伴うエネルギー保存に加えて、その還元力の一部をチオ硫酸還元と共役させる熱力学的に有利な CO 代謝経路の存在を発見した。さらに、既知 CO 感知転写因子は、ECH の転写のみを制御し、CODH を含むその他の遺伝子群は CO 酸化による二次的な転写調節を受けることを示した。

(3) CODH リスト化と組換え微生物の作出

10 万を超える微生物ゲノムから約 2 千個の CODH を幅広い生物群に見出し、その構造的特徴と関連遺伝子群の網羅的な分類を行った (図 2)。CODH の活性に重要なアミノ酸残基の多様性を明らかにし、新規な金属配位モチーフを持つ CODH を見出した。また既知の H₂生成や CO₂固定に加え、その構造的な特徴に応じて同一遺伝子領域にコードされるタンパク質と共役する多数の機能未知 CODH を見出した。

これらの CODH の機能解明と高性能微生物触媒の作出に向け、(1) で分離したバチルス綱 H₂生成型 CO 資化菌の遺伝子組換えプラスミドの構築に成功した。

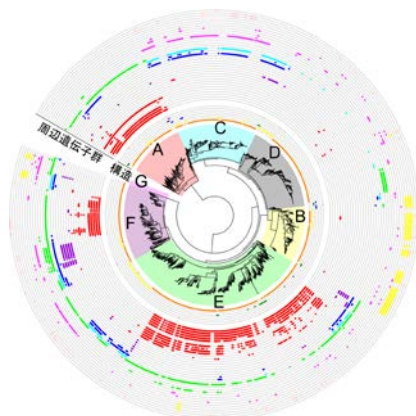


図 2. 大規模ゲノムデータ解析による CODH の系統樹とその分類

5. 今後の計画

(1) 海底コアサンプルから CO 資化菌集積培養系を得ており、さらなる新規 CO 資化菌の分離を進める。(2) 新たに分離したバチルス綱 H₂生成型 CO 資化菌に予想される、好気呼吸から嫌気 CO 資化といった全く新規な CO 応答機構をオミックス解析により解明する。(3) 本菌において CODH を大量発現させ

た次世代組換え微生物の作出を行い、合成ガスから高純度の H₂を高効率に生成すると同時に、機能未知 CODH の性状解析を行い CO 資化菌の包括的な理解を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
左子芳彦: 平成 30 年度日本水産学会 日本水産学会賞

Fukuyama, Y., Omae, K., Yoshida, T., Sako, Y.: Transcriptome analysis of a thermophilic and hydrogenogenic carboxydrotroph *Carboxydothemus pertinax*. *Extremophiles*, in press (2019)

Inoue, M., Tanimura, A., Ogami, Y., Hino, T., Okunishi, S., Maeda, H., Yoshida, T., Sako, Y.: Draft genome sequence of *Parageobacillus thermoglucosidasius* strain TG4, a hydrogenogenic carboxydrotrophic bacterium isolated from a marine sediment. *Microbiol. Resour. Announc.*, 8, e01666-18 (2019)

Inoue, M., Nakamoto, I., Omae, K., Oguro, T., Ogata, H., Yoshida, T., Sako, Y.: Structural and phylogenetic diversity of anaerobic carbon-monoxide dehydrogenases. *Front. Microbiol.*, 9, 3353 (2019)

Fukuyama, Y., Omae, K., Yoneda, Y., Yoshida, T., Sako, Y.: Insight into energy conservation via alternative carbon monoxide metabolism in *Carboxydothemus pertinax* revealed by comparative genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84, e00458-18 (2018)

Omae, K., Yoneda, Y., Fukuyama, Y., Yoshida, T., Sako, Y.: Genomic analysis of *Calderihabitans maritimus* KKC1, a thermophilic hydrogenogenic carboxydrotrophic bacterium isolated from marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 15, e00832-17 (2017)

Fukuyama, Y., Oguro, T., Omae, K., Yoneda, Y., Yoshida, T., Sako, Y.: Draft genome sequences of two hydrogenogenic carboxydrotrophic bacteria, *Carboxydocella* sp. strains JDF658 and ULO1, isolated from two distinct volcanic fronts in Japan. *Genome announcements* 5, e00242-17 (2017)

Fukuyama, Y., Omae, K., Yoneda, Y., Yoshida, T., Sako, Y.: Draft genome sequences of *Carboxydothemus pertinax* and *C. islandicus*, hydrogenogenic carboxydrotrophic bacteria. *Genome announcements* 5, e01648-16 (2017)

7. ホームページ等

<http://www.microbiology.marine.kais.kyoto-u.ac.jp>