

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成23年4月～平成28年3月

研究代表者: 跡見晴幸
(京都大学大学院工学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、まずアーキアにおけるバイオマス分解およびバイオエネルギー生産に関わる機能を理解し、それらの強化を進めた。さらに異種生物由来の機能も導入し、機能の融合を図ることにより非可食性バイオマスからの水素・メタン・スクワレン等バイオエネルギー生産能を示すアーキアの創製を目指して研究を実施した。

バイオマス分解については超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のキチン分解経路を中心に解析を進めた。未同定であった酵素(グルコサミンキナーゼ)を明らかにし、その後本経路の強化を目指した。キチンから中央糖代謝の中間体であるフルクトース 6-リン酸までの代謝経路の全酵素遺伝子の大量発現を進めることにより効率的なキチン分解菌の構築に成功した。さらに解糖系遺伝子の発現を抑制する転写制御因子の破壊およびキチンを炭素源とした集積培養を行うことにより、キチン分解能と水素生産能を融合することに成功しキチン依存的な水素生産を実現することができた。また異なる好熱性微生物よりキチン・キシラン分解活性を示す新型酵素も複数同定することができた(跡見・今中 G)。中でも、超好熱性アーキア *Thermococcus chitonophagus* からはキチン鎖の還元末端を認識する新型耐熱性キチナーゼを同定し、その生化学的特性を明らかにした(跡見 G)。また *T. kodakarensis* 由来キチナーゼの chitin binding domain の立体構造を解明した(三木 G)。

アーキアのペントース代謝にも着目し、ribokinase family に属する3種の機能未知タンパク質の解析を進めた。予想に反し、TK2285 が *myo*-inositol、TK1843 が cytidine、TK2029 が ribose 1-phosphate を基質とするリン酸化酵素であることが判明した。これらの生理的役割について検討したところ、TK2029 がいままで認識されていなかった nucleoside の分解経路に関与することがわかった。本経路は nucleoside の ribose 部位を ribose 1-phosphate→ribose 1,5-bisphosphate→ribulose 1,5-bisphosphate→2分子の 3-phosphoglycerate にまで変換し、中央代謝経路へと導く役割を果たす。新しい本経路を pentose bisphosphate pathway と命名した(跡見・今中 G)。また好塩菌において同経路の変形型のものも明らかにした(跡見 G)。さらに TK2285 が新型の *myo*-inositol kinase であったことからその立体構造・反応機構・基質認識機構を解明した(三木・跡見 G)。またメタン生成アーキアの1種である *Methanospirillum hungatei* において、Rubisco が関与する新しい炭酸固定経路 reductive hexulose phosphate pathway を発見した。本経路では二酸化炭素がホルムアルデヒドへと変換され、メタン生成経路に導入されると考えられる(蘆田 G)。

T. kodakarensis による水素生産については、水素発生型ヒドロゲナーゼ(Mbh)遺伝子群の大量発現を行うことにより Mbh のタンパク質量および水素生産速度がともに増加した。さらに水素消費型ヒドロゲナーゼ(Hyh)遺伝子の破壊を進めた結果、さらなる水素生産速度の上昇が観察された。これらの実験においては pyruvate およびデンプンを基質としていたが、上記の通り、キチン分解経路の強化を進めることにより、キチン依存的な水素生産が可能となった(跡見 G)。

アーキアによる炭化水素燃料合成を目指した研究においては、まず藻類のスクワレンシンターゼと相同性のある遺伝子を好熱菌由来ゲノム情報から検索した。数種の候補遺伝子のうち、好熱性アーキア由来のホモログを *T. kodakarensis* に導入した結果、炭化水素の生成が観察された。また炭化水素生産量の増加を目指して、前駆体である acetyl-CoA の合成・消費経路に着目した。具体的には(i) acetyl-CoA 消費経路の同定、および(ii) CoA 生合成制御機構の解明、などを進めた。(i)については、ゲノム上に存在する5種の acetyl-CoA synthetase ホモログの基質特異性を明らかにすることができた(跡見・今中 G)。(ii)については ketopantoate reductase (KPR) への CoA による feedback inhibition という真核生物やバクテリアのものとは異なる制御様式を同定することができた。また KPR および KPR-CoA 複合体の立体構造を解明することにより CoA による feedback inhibition の分子機構を解明することができた(三木・跡見 G)。

本研究を通じて新規活性を示す数多くの耐熱性酵素が同定されたが、それらを利用した *in vitro* 人工代謝経路の構築も進めた。いままでにグリセロールから乳酸へのワンポット変換、補酵素 NAD⁺のサルベージ系等が達成できている(本田 G)。

このように本研究を通じて、バイオマス分解やバイオエネルギー生産に関わるアーキアの特異

な酵素や代謝機構が数多く同定された。またこれらの機能の強化や他生物種由来機能との *in vivo*, *in vitro* 融合によりバイオマス分解に依存したバイオエネルギー生産も可能となった。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. アーキアにおいてヌクレオシドを代謝するペントースビスリン酸経路の発見

概要: アーキアの多くはペントースリン酸経路を持たずヌクレオシド代謝が不明であった。本課題では、超好熱性アーキアにおいてヌクレオシドのペントース部位を中央糖代謝産物に分解、もしくは核酸に変換するペントースビスリン酸経路を発見した。また本経路で機能するADP 依存的リボース 1 リン酸キナーゼを同定した。

本成果によりアーキアにおけるペントース代謝機構の理解がさらに深まり、効率の良いペントース(有機物)分解のデザインに寄与する知見を提供できた。ADP 依存的リボース 1 リン酸キナーゼやペントースビスリン酸経路発見を含む研究成果はトップクラスのジャーナルに掲載され(*Nature Chem. Biol.*, vol. 11, No. 5, pp. 355-360, 2015)、極めて先導的であると言える。

2. アーキアにおける CoA 生合成経路および制御機構の同定

概要: 超好熱性アーキアにおいて CoA の前駆体の1つであるβ-アラニンの生合成に関与する新規アスパラギン酸デカルボキシラーゼを同定した。また、CoA 生合成には多くのエネルギーを必要とすることからその制御が重要であるが、本研究課題ではアーキアおよび Type III pantothenate kinase を有するバクテリアにおける CoA 生合成のフィードバック制御機構も解明した。

CoA は本研究課題で合成に成功した炭化水素を含め様々な化合物の生合成に必要な因子である。本成果により、CoA 生合成機構(*J. Bacteriol.*, vol. 194, No. 19, pp. 5434-5443, 2012, *Extremophiles*, vol. 16, No. 6, pp. 819-828, 2012, *J. Bacteriol.* vol. 196, No. 6, pp. 1222-1230, 2014)とその制御(*Mol. Microbiol.*, vol. 90, No. 2, pp. 307-321, 2013)が明らかにできたことから、CoA 自体の大量生産やCoAを用いた化合物の生産に活かすことができると考えられる。すなわち、真核生物・細菌・アーキアの代謝経路を組み合わせることにより、フィードバック制御の標的酵素を回避できると考えられ、今後の代謝工学研究に波及効果があると考えられる。

3. ヒドロゲナーゼ成熟化因子の構造解析と作用機構の解明

概要: ヒドロゲナーゼは、次世代エネルギーとして期待されている水素を生成する酵素であるが、活性体としての発現が難しく、その理由の一つとして複雑な成熟化機構の存在が挙げられる。本研究課題では、ヒドロゲナーゼの成熟化に関わる 4 つの因子の立体構造を明らかにし、特にヒドロゲナーゼへのニッケルの挿入に関する作用機構を明らかにした。

本成果により、ヒドロゲナーゼ組換え型タンパク質の *in vitro* における成熟化や細胞内での成熟型ヒドロゲナーゼの活性発現に対する方向性が明確になった。研究成果はトップクラスのジャーナルに掲載され(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 112, No. 25, pp. 7701-7706, 2015)、極めて先導的であると言える。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. アーキアにおける炭化水素生産株の創製

概要: 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が持つイソプレノイド合成能と好熱菌由来酵素が持つプレニル二リン酸縮合能を融合することにより、スクワレン様炭化水素の合成に成功した。さらに、スクワレン様炭化水素の前駆体である acetyl-CoA を代謝する遺伝子の破

壊(遺伝子工学)および細胞固定化担体の添加(培養工学)により炭化水素の生産量を向上させた。

本成果により、量はまだそれほど多くないもののアーキアを宿主として炭化水素を合成できた。スクワレン様炭化水素はバイオ燃料や化粧品成分としての利用が期待できるため、さらなる生産量の向上を達成できれば、キチンなどの非可食性バイオマスからの高付加価値化合物の工業生産に繋がられる可能性がある。(下記2参照)

2. 非可食性バイオマスからの水素生産株の創製

概要: 超好熱性アーキア *T. kodakarensis* のキチン代謝経路を遺伝子工学的に増強し、さらに集積培養により強化することで、キチン分解能が飛躍的に増強された *T. kodakarensis* 株の単離に成功した。本菌において、野生株では確認できなかったキチン添加に伴う水素生産量の増加が確認された。コロイド状キチンからの水素生産量は同量のマルトデキストリンからの水素生産量に匹敵し、キチンの有効利用への道を開く可能性がある。

3. NAD⁺サルベージ合成のための *in vitro* 人工代謝経路の構築

概要: NAD⁺サルベージ合成のための *in vitro* 人工代謝経路を完成させ、NAD⁺の見かけの熱安定性を大幅に向上させることができた。これにより、好熱性酵素の産業利用に際して従前からの課題となっていたニコチンアミド補酵素の熱分解を抑える道筋が明らかとなった。耐熱性酵素の優れた安定性を十分に活用することが可能となり、酵素法による新たな有用物質生産プロセスの開発につながりうる成果である。

§3 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「京都大学・工学研究科(跡見)」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
跡見 晴幸	京都大学工学研究科	教授	H23.4～
金井 保	同上	講師	H23.4～
佐藤 喬章	同上	助教	H23.4～
SIMONS, Jan-Robert	同上	研究員	H25.4～
青野 陸	日本学術振興会	特別研究員	H23.4～
ASLAM, Mehwish	京都大学工学研究科	D2	H26.4～
蜂須賀 真一	同上	D1	H25.4～
金関 剛史	同上	M2	H26.4～
川村 弘樹	同上	M2	H26.4～
中田 菜月	同上	M2	H26.4～
吉井 祐太	同上	M2	H26.4～
下坂 天洋	同上	M1	H27.4～
濱北 宗太郎	同上	M1	H27.4～
福島 ひかる	同上	M1	H27.4～
藤澤 智子	同上	M1	H27.4～
片野 正展	同上	研究員	H23.12～H24.8
横大路 祐介	同上	研究員	H23.4～H26.9
JHA, Savyasachee	同上	M1	H26.1～
富田 宏矢	同上	D3	H23.4～H26.3
石橋 拓也	同上	M2	H23.4～H24.3
小谷 徹	同上	M2	H23.4～H24.3
坂井 祐樹	同上	M2	H23.4～H24.3
李 瑞賢	同上	M2	H23.4～H24.3
藤本 理夏子	同上	M2	H23.4～H25.3
法土 咲菜恵	同上	M2	H23.4～H25.3
牧野 勇樹	同上	M2	H23.4～H25.3
山本 康之	同上	M2	H23.4～H25.3
高田 大輔	同上	M2	H24.4～H26.3
竹野 領	同上	M2	H24.4～H26.3
福家 翼	同上	M2	H24.4～H26.3
堀内 あゆみ	同上	M2	H24.4～H26.3
岡田 安弘	同上	M2	H25.4～H27.3
肥山 貴圭	同上	M2	H25.4～H27.3
吉田 晃	同上	M2	H25.4～H27.3

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
- アーキアへのスクアレン合成能付与
- *Methanococcus* への糖質取り込み能 / *Thermococcus* へのメタン生成能の付与

- ・細胞増殖を伴わないバイオマス分解・バイオエネルギー生産
- ・糖中央代謝経路の理解と強化
- ・スクアレン前駆体合成増強のための細胞工学
- ・外来遺伝子発現に利用可能な有用プロモーター探索と開発

② 「京都大学・理学研究科(三木)」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
三木 邦夫	京都大学理学研究科	教授	H23.4～
竹田 一旗	同上	准教授	H23.4～
藤橋 雅宏	同上	助教	H23.4～
喜田 昭子	京都大学原子炉実験所	助教	H23.4～
平野 優	京都大学理学研究科	特定研究員	H24.4～H25.3
西谷 優一	同上	特定研究員	H24.4～
鈴木 里絵	同上	技術補佐員	H24.4～
佐々木 大輔	同上	D3	H23.4～H24.3
相川 佳紀	同上	教務補佐員	H27.4～
富永 大河	同上	D3	H23.4～H25.3
花園 祐矢	同上	日本学術振興会 特別研究員	H23.4～H27.3
桐山 智博	同上	M2	H23.4～H24.3
城塚 秀之	同上	M2	H23.4～H24.3
岸本 麻子	同上	D3	H23.4～
小杉 正幸	同上	M2	H23.4～H25.3
高場 圭章	同上	D2	H24.4～
永田 隆平	同上	D2	H24.4～
Kwon Sunghark	同上	D2	H26.4～
日比 真仁	同上	M2	H24.4～H26.3
井上 正大	同上	M2	H25.4～H27.3
河島 拓未	同上	M2	H25.4～H27.3
丹羽 智美	同上	D1	H25.4～
邨 洋	同上	D1	H25.10～
河辺 正貴	同上	M2	H26.4～
辻中 智考	同上	M1	H27.4～

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
- ・ アーキアへの squalene 合成能付与

③ 「立命館大学・生命科学部 (今中)」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
今中 忠行	立命館大学 総合科学技術研究機構	上席研究員	H23.4～
福田 青郎	立命館大学生命科学部	講師	H23.4～
吉川 祐子	立命館大学	客員教授	H23.4～

	総合科学技術研究機構		
千野 陽三	立命館大学 生命科学研究科	M3	H23.4～H24.3
田頭 健太	同上	D3	H23.4～H27.3
藤村 早野	同上	M2	H23.4～H24.3
和気 遊也	同上	M2	H23.4～H24.3
奥野 寛和	同上	M2	H23.4～H25.3
東海林 寿久	同上	M2	H23.4～H25.3
高井 知幸	同上	M2	H23.4～H25.3
林 千広	同上	M2	H23.4～H25.3
石井 尊	同上	M2	H24.4～H26.3
岩前 幸三	同上	M2	H24.4～H26.3
植木 郁成	同上	M2	H24.4～H26.3
木村 知見	同上	M2	H24.4～H26.3
酒井 啓	同上	M2	H24.4～H26.3
笥中 靖弘	同上	M2	H24.4～H26.3
原 悠大	同上	M2	H24.4～H26.3
内田 圭亮	同上	M2	H25.4～H27.3
福井 小百合	同上	M2	H25.4～H27.3
原田 美樹	同上	M2	H25.4～H27.3
JAZIRI Abdul Aziz	同上	M2	H25.10～H27.9

研究項目

- ・キチン・キシラン等バイオマス高分解能を示す候補微生物の分離
- ・バイオマス高分解性微生物のバイオマス分解に関わる酵素の同定
- ・キシラン分解能が強化された*T. kodakarensis*株の単離
- ・*T. kodakarensis*の水素発生強化株の単離と評価

④「大阪大学・工学研究科(本田)」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
本田 孝祐	大阪大学工学研究科	准教授	H26.4～
万袋木麻子	同上	技術補佐員	H26.4～H26.5
Malia Cheng	同上	博士研究員	H26.6～

研究項目

- ・キチン・キシランからのバイオエネルギー生産
- ・水素を還元力とした CO₂ 固定型バイオコモディティ生産

⑤「神戸大学大学院・人間発達環境学研究科(蘆田)」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
蘆田 弘樹	神戸大学大学院・人間発達環境学研究科	准教授	H26.4～
河野 卓成	同上	学術研究員	H27.4～

研究項目

- ・メタン産生に関わる新規炭素代謝回路の機能解析

§ 4 研究実施内容及び成果

4. 1. (京都大学 工学研究科(跡見)グループ)

4. 1. 1. *Thermococcus* のキチン分解経路の増強と分解速度の評価 (跡見 G)

<研究のねらい>

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は、そのゲノム上に新規なキチン分解・代謝系遺伝子をもつが、実際にはキチン依存的な生育は見られていない。そこでまず本菌のキチン分解・資化経路の全容を解明し、得られた情報を基にキチン代謝経路の遺伝学的強化を進める。また、高いキチン資化能力を有する微生物のキチン分解・代謝経路の同定を進め、それらの *T. kodakarensis* への導入を行う。

<研究実施内容及び成果>

[1] *T. kodakarensis* のキチン分解・資化経路の解明と機能強化

T. kodakarensis は特異なキチン代謝経路をもつが、まず分泌型キチナーゼ (ChiA) によってキチンは二糖であるキトビオース (GlcNAc)₂ にまで分解される。(GlcNAc)₂ は細胞内へと取り込まれた後、二種の酵素によって2分子のグルコサミン (GlcN) に変換される。その後 GlcN は未同定のキナーゼによりグルコサミン 6-リン酸 (GlcN6P) に変換され、さらに GlcN6P デアミナーゼによってフルクトース 6-リン酸へと変換され、解糖系に合流する。本菌のキチン分解能を高めるために、まずキチナーゼ高発現株の育種を試みた。続いて、本菌のキチン資化能の向上を目指し、キチン代謝経路上で未同定であった GlcN キナーゼを同定するとともにキチン分解経路下流の遺伝子の発現強化も試みた。その結果、キチン分解に依存した水素発生能を示す *T. kodakarensis* 株を取得することができた。

[2] *Thermococcus chitonophagus* 由来キチン分解関連酵素の解析と *T. kodakarensis* への導入

超好熱菌 *T. chitonophagus* はキチンを唯一の有機物源とする培地により単離され、キチナーゼを持つことが示唆されてはいるものの、その遺伝子の同定は行われていない。*T. chitonophagus* のキチン分解・資化に関与する遺伝子群の同定を目的として、次世代シーケンサー (イルミナ HiSeq 2000) を用いた本菌のゲノム解析を行った。本菌のゲノムデータ (総コンディグ数 20、総コンディグ塩基数 1,964,779 bp、予想 ORF 数 2,168) より、GH18 型のキチナーゼドメインが 3 つ発見された (*Tc-ChiA1* ~ *Tc-ChiA3*)。さらに N 末端領域に分泌シグナルと chitin-binding domain (ChBD) を 2 つもつ機能未知 ORF が発見された (*Tc-ChiD*)。

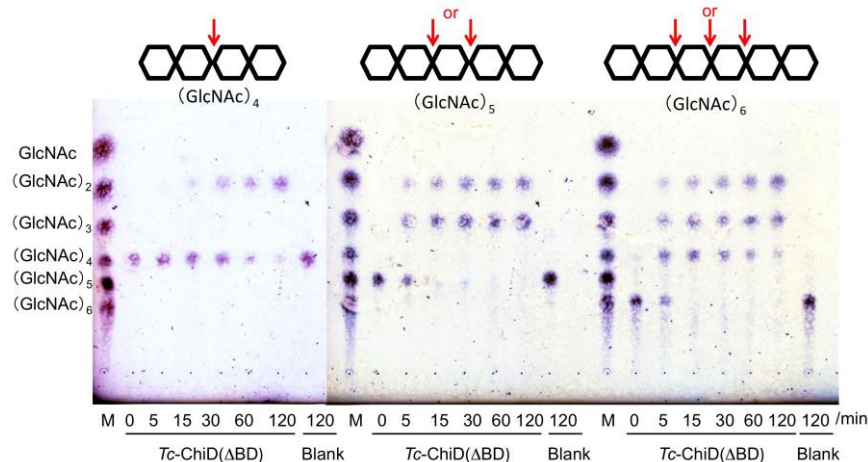


図 1. *Tc-ChiD* (Δ BD) によるキチンオリゴ糖の分解実験(TLC)

Tc-ChiD の C 末端領域は、既存のキチナーゼが属する糖質加水分解酵素ファミリー (GH18/GH19) との相同性は見られない。Tc-ChiD が新規なキチナーゼであると予想して、その C 末端ドメインを大腸菌内で調製し (Tc-ChiD (Δ BD))、様々な鎖長のキチンオリゴ糖の 85°C における加水分解活性を調べた。その結果、Tc-ChiD は (GlcNAc)₄ 以上の鎖長のキチンオリゴ糖に対する加水分解活性をもつことが判明した (図 1)。また本酵素が還元末端側の鎖を認識してキチン鎖を切断する新規 (耐熱性) キチナーゼであることが示された。またキチン結合ドメインが酵素の熱安定性の向上にも寄与することが判明した。

4. 1. 2. *Thermococcus* のキシラン分解能の評価・増強およびペントース代謝機構の解明 (跡見 G) <研究のねらい>

Xylanase 相同遺伝子 (TK0892) や実際に xylose/xylulose に対してリン酸化活性を示すタンパク質 (TK2285) を有する *T. kodakarensis* のキシラン分解能の有無を調べ、分解能が確認された場合は機構を明らかにして強化する。また、効率的なペントース分解を目指すため *T. kodakarensis* におけるペントース代謝の全容を解明する。

<研究実施内容及び成果>

【1】*Thermococcus kodakarensis* 由来 TK0892 発現産物の xylanase 活性の判定

【2】*Thermococcus kodakarensis* のキシラン分解経路の解明

TK0892 の組換え型酵素を調製し、活性を測定した結果、xylanase 活性は示さないことが明らかとなった。また、増殖試験においてもキシラン添加による明確な細胞数の増加は観察されていないことから、本菌にはキシラン分解活性がない可能性が考えられた。

後述のように今中グループによりキシラン分解好熱菌 45-6 株が単離され、その xylanase 遺伝子配列と活性が確認されている (今中グループ 4. 3.参照)。現在菌体外で 45-6 株由来 xylanase を発現すべく、*T. kodakarensis* に導入を試みている。

【3】Xylulose/xylose リン酸化活性を示す TK2285 産物の機能解析

TK2285 タンパク質は xylose, xylulose, talose, lyxose など複数の単糖に対してリン酸化活性を示すことが分かっていたが、何れに対しても K_m 値が高いことが判明した。そこで本来 ribokinase family タンパク質が基質とはしない糖も含めて様々な糖に対し詳細に検討を進めた結果、TK2285 タンパク質はアーキアとしては初となる *myo*-inositol kinase であることが明らかとなった (原著論文 14)。また、TK2285 (*myo*-inositol kinase) の生理的役割の解明を目指して、反応産物であるリン酸化 inositol のどの位置のヒドロキシル基がリン酸化されているかを検討した。*myo*-Inositol の 6 つのヒドロキシル基の内一部が水素に置き換わっている誘導体に対する活性測定や、TK2285 反応産物の NMR 解析やキラルカラムを用いた LC-MS 解析を行い、反応産物が *myo*-inositol 3-phosphate (Ins3P) であることを明らかにした (原著論文 24)。また、後述の結晶構造解析からも反応産物が Ins3P であることが示された (三木グループ 4. 2.参照)。Ins3P は生体内において膜脂質や浸透圧調整物質の原料となることが分かっていることから、TK2285 は何らかの経路で産生する *myo*-inositol をサルベージしている可能性が考えられた。

【4】*Thermococcus kodakarensis* の pentose 代謝経路の解明

T. kodakarensis におけるペントース代謝の全容解明を目指して、ribokinase family ホモログおよび AMP のリボース部位を中央代謝へと導く AMP 代謝経路の各酵素の機能解析を進めた。AMP 代謝経路については、本経路が AMP だけではなく CMP や UMP も分解できること、本経路を構成する酵素の 1 つである ribose-1,5-bisphosphate isomerase が AMP によって活性化されることを明らかにした (原著論文 8)。

次に【3】の TK2285 とは別の、機能不明 ribokinase ホモログ TK1843 および TK2029 の機能解析も行った。これらの組換え型タンパク質を調製し、様々な糖に対して活性を測定したところ、TK1843 は cytidine kinase、TK2029 は今まで知られていなかった反応を触媒する

ADP-dependent ribose-1-phosphate kinase をコードすることが明らかとなった (図 5)。TK1843 により cytidine から産生すると考えられる CMP は上記の通り AMP 代謝経路の基質となる。また、TK2029 により ribose 1-phosphate (R1P) から産生する ribose 1,5-bisphosphate (R15P) は AMP 代謝経路の代謝中間体である。よって、これら 2 つの酵素は AMP 代謝経路とリンクしている可能性が考えられた。TK2029 遺伝子破壊株由来の無細胞抽出液中の活性を検討した結果、TK2029 は確かにヌクレオシドから AMP 代謝経路の産物である 3-phosphoglycerate を生成する経路で機能し得ることが明らかとなった。さらに TK2029 の基質である R1P を供給する可能性のある nucleoside phosphorylase 候補遺伝子 3 種 (TK1479, TK1482 および TK1895) の遺伝学的解析を進めた結果、TK1895 はアデノシン、TK1482 はグアノシン、TK1479 はウリジンを中心に基質として R1P を産生していることが示唆された。

つまりこれらの phosphorylase と TK2029 によりアデノシン・グアノシン・ウリジンから R15P が合成され、AMP 代謝

経路により 3-phosphoglycerate へと分解される、もしくは核酸であるヌクレオシドモノリン酸に変換されることが示唆された (図 2)。アーキアにはペントースリン酸経路がないことから、ヌクレオシドの代謝については不明であったが、本研究課題により、アーキア特異的なヌクレオシド代謝に寄与するペントース代謝経路を解明できた。真核生物やバクテリアにおいてはヌクレオシドのペントース部位を中央糖代謝に導く経路はペントースに 1 つリン酸がついた化合物を中間体とするペントースリン酸経路である。一方、今回明らかにした代謝経路はペントースを 2 つリン酸がついた状態で代謝していくことから、ペントースビスリン酸経路と名付けた (原著論文 23)。

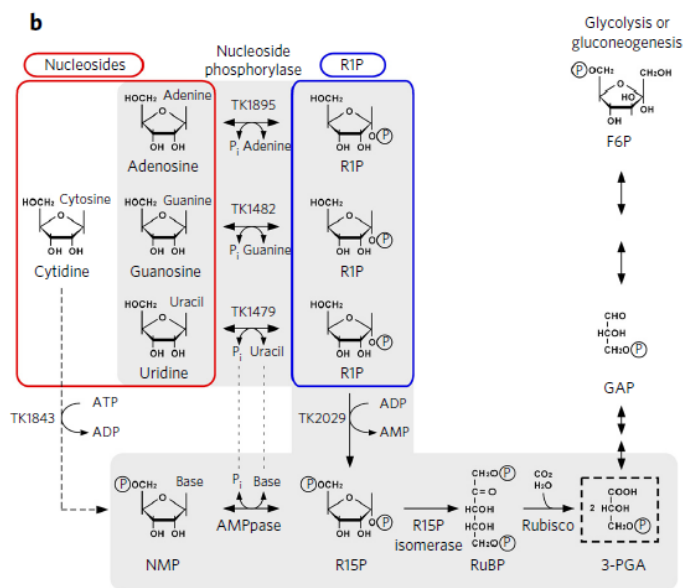


図 2. *T. kodakarensis* における核酸・ヌクレオシドのペントース部位代謝経路 (ペントースビスリン酸経路)

4. 1. 3. *Thermococcus* の水素生産機構の解明と増強 (跡見 G)

<研究のねらい>

Thermococcus 属やその近縁のアーキアは、培地中に硫黄が存在しない生育条件において水素(H₂)を生成する。[NiFe] ヒドロゲナーゼが担うこの反応はプロトンポンプ機能と連動し、細胞内での ATP 生産とリンクしている。これまでの研究により *T. kodakarensis* やその類縁菌が他の微生物と比較して非常に高い水素生産速度 (菌体あたり) を示すことが判明している。そこで *T. kodakarensis* を用いて水素発生に関わる代謝経路を解明し、得られた情報を基に水素発生経路の遺伝学的強化を進める。

<研究実施内容及び成果>

【1】*T. kodakarensis* のヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊・プロモーター強化による育種株の単離:

T. kodakarensis ゲノム上に存在する 3 種の [NiFe] ヒドロゲナーゼ様 operon (*hyh*, *mbh*, *mbx*) に関する遺伝学的解析を行った結果、細胞質型 [NiFe] ヒドロゲナーゼに対応する *hyh* operon は水素の吸収に、膜型 [NiFe] ヒドロゲナーゼに対応する *mbh* operon は水素発生に関与する

ことが判明した。これらの知見に基づいて細胞質型[NiFe] ヒドロゲナーゼ Hyh を遺伝子破壊し、*csg* プロモーター (P_{csg}) を利用した膜型[NiFe] ヒドロゲナーゼ Mbh の発現増強を進めることにより、水素生産速度が 28% 上昇した育種株 (MAH1 株) を構築できた (連続培養、 $D=0.27-0.30 \text{ h}^{-1}$) (図 3)。さらに MAH1 株培養時の希釈率を上昇させると、 $D=0.83-1.07 \text{ h}^{-1}$ において、単位菌体あたりの水素発生速度が $120 \text{ mmol g-dcw}^{-1} \text{ h}^{-1}$ に達した。この水素発生速度は、連続培養系における過去最高値である (原著論文 26)。

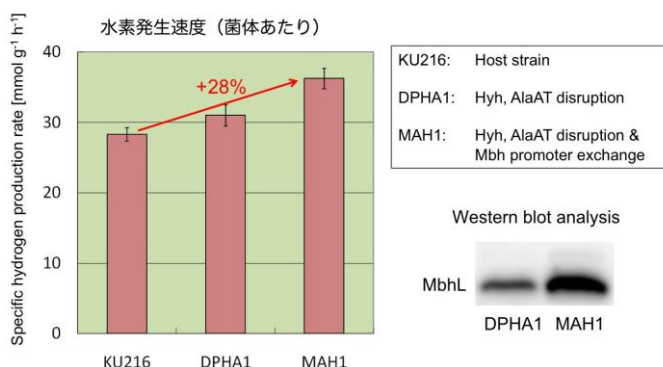


図 3. *T. kodakarensis* の水素生産機能の増強

【2】*T. kodakarensis* の成熟化因子の大量発現 (跡見 G・三木 G) :

[NiFe] ヒドロゲナーゼの活性発現には、複数の補助タンパク質が関与する成熟化機構を経る必要がある。*T. kodakarensis* の水素発生を担う Mbh の成熟化において、Ni の挿入に関わる HypB と最終段階での large subunit の切断を担う HycI protease が未同定であった。HypB タンパク質の探索を進めた結果、既存の HypB とは相同性を示さない TK2007 タンパク質が HypB の機能である [NiFe] ヒドロゲナーゼへの Ni 挿入に必須であることがわかった (原著論文 25)。一方で、HycI protease の 2 種類のホモログ (TK2004, TK2066) について、それらが Mbh および Hyh それぞれの large subunit (MbhL, HyhL) の切断に与える影響を検討し、それぞれの役割を明らかにした。これらの成果により、Mbh の機能発現に必要な全成熟化因子が明らかとなり、Mbh 機能発現強化に向けた基盤的知見が得られた。

【3】水素発生能力を有する他の微生物からの機能導入:

Glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) から 3-phosphoglycerate までの代謝において、GAP:ferredoxin oxidoreductase (GAPOR) が還元型 ferredoxin を、non-phosphorylating GAP dehydrogenase が NADPH をそれぞれ供給していることを明らかにした (原著論文 1)。水素発生には還元型 ferredoxin が電子供与体となるので GAPOR もしくは同じく還元型 ferredoxin を供給する pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (POR) の発現強化が有効である可能性が考えられる。

4. 1. 4. アーキアへのスクワレン様炭化水素合成能付与 (跡見 G)

<研究のねらい>

膜脂質の疎水性部位は真核生物やバクテリアでは脂肪酸から構成されているが、アーキアではイソプレノイドが骨格となっている。そこでアーキアのイソプレノイド合成能を利用して燃料や化粧品成分としての利用が期待できるスクワレン様炭化水素を合成することを目的とした。具体的には、プレニルニリン酸を縮合する能力を *T. kodakarensis* に導入し、炭化水素生産株の創成を試みた。

<研究実施内容及び成果>

【1】好熱菌由来スクワレンシンターゼホモログの活性の判定

超好熱性アーキアや好熱性細菌のゲノム上からスクワレンシンターゼホモログを探索し、候補遺伝子を大腸菌内で発現した。好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 由来のホモログはスクワレンシンターゼ活性を示した。他の候補遺伝子については *T.*

kodakarensis での発現を試みた。

【2】 *T. kodakarensis* へのスクワレンシンターゼホモログの導入と炭化水素合成能の検討

超好熱性アーキアや好熱性細菌由来スクワレンシンターゼホモログを His-Tag を付加した形で *T. kodakarensis* 内で発現させた。His タグ抗体を用いた Western blot 解析により何れも可溶性タンパク質として発現していることを確認できた。

【3】 炭化水素合成能の検討

多糖のマルトデキストリンを添加した培地において 60℃で培養した遺伝子挿入株から有機溶媒により炭化水素を抽出し、TLC 解析を行った。その結果、超好熱性アーキア由来スクワレンシンターゼホモログ挿入株において、1 mM メバロン酸添加時にスクワレン様炭化水素の合成が確認された。炭化水素の合成が確認できたため、合成量向上を目指した培養条件の検討を行った。その結果、遺伝子挿入株を 60℃で培養した際に最も合成量が多かった。また、炭素源について検討を行った結果、ピルビン酸添加培地で合成量が最も多かった。

4. 1. 5. スクワレン様炭化水素前駆体合成増強のための細胞工学（跡見 G）

<研究のねらい>

上記 4. 1. 4. において *T. kodakarensis* のプレニルニリン酸合成能とスクワレンシンターゼホモログの縮合能を融合することによりスクワレン様炭化水素の合成が達成できたので、ここではその生産性向上に向けた代謝工学を進めた。プレニルニリン酸の前駆体は acetyl-CoA であることから合成収率・合成速度の両面から acetyl-CoA の潤沢な供給が重要と考えられた。真核生物や細菌においては acetyl-CoA は TCA 回路、Glu/Asp 合成、脂肪酸合成に利用されるが、*T. kodakarensis* は TCA 回路を持たず、また脂肪酸合成系も存在しないため、比較的少ない遺伝子改変で acetyl-CoA をプレニルニリン酸合成へと導くことができると考えた。本中研究課題では *T. kodakarensis* における細胞内 acetyl-CoA 濃度が上昇した育種株の構築を目的とした。

<研究実施内容及び成果>

【1】 *T. kodakarensis* の CoA 合成経路の理解と強化

・ *T. kodakarensis* における CoA 生合成制御機構の解析

我々は本研究が開始する以前に *T. kodakarensis* を含む大半のアーキアが細菌や真核生物とは異なる経路で CoA を合成することを明らかにした。Pantoate から 4'-phosphopantothenate までの変換を担う酵素は、細菌や真核生物では pantothenate synthetase および pantothenate kinase (PS/PanK) であるのに対し、アーキアでは2種の新規酵素 pantoate kinase および phosphopantothenate synthetase (PoK/PPS) が用いられる(図4)。細菌や真核生物では CoA による PanK を標的としたフィードバック阻害により CoA の合成量が厳密に制御されているが、アーキアは PanK を利用しないため、制御機構が不明であった。

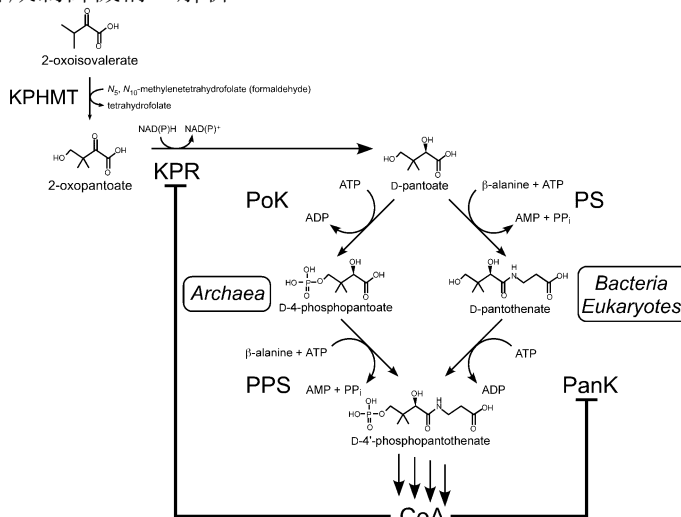


図 4. アーキア・細菌・真核生物における CoA 生合成制御機構

PoK あるいは PPS が CoA によるフィードバック阻害を受けるかどうかを明らかにするために両酵素の詳細な生化学的解析および構造解析を進めた。その結果、両酵素ともに CoA によるフィードバック阻害を受けないことが分かった (原著論文 5, 6)。そこで合成経路中の他の酵素がフィードバック阻害の標的となっている可能性を検討するため、初発段階を触媒する ketopantoate hydroxymethyltransferase (KPHMT) および 2 つ目の反応を触媒する ketopantoate reductase (KPR) の解析を進めた。結果的に KPR に対する CoA のフィードバック阻害が細胞内 CoA 合成量を制御していることが強く示唆された (原著論文 15)。そこで、超好熱性バクテリアの *Thermotoga maritima* 由来 KPR の探索を進め、KPR 活性を示すタンパク質をコードする遺伝子 (TM0550) を同定した。組換え型タンパク質を調製・精製し、生化学的解析を進めた結果、本タンパク質 (TmKPR) は CoA により阻害されないことが明らかとなった。また *T. maritima* の無細胞抽出液内の KPR 活性の大半が TmKPR に由来することもわかった。一方で、*T. maritima* の PS (TM1077)、PanK (TM0883) 遺伝子も発現し、組換え型タンパク質 (TmPS、TmPanK) を調製・精製した。TmPanK の一次構造は一般に CoA によるフィードバック阻害を受けないとされる Type III 型の PanK と相同性を示した。TmPS、TmPanK の生化学的解析を進めた結果、TmPS の活性は CoA による影響を受けなかったが、TmPanK は顕著な活性阻害を示した (図 5)。したがって、*T. maritima* は Type III 型の PanK を利用するにもかかわらず、PanK を標的としたフィードバック阻害により CoA の生合成を制御していることが明らかとなった。また *T. maritima* 由来 KPR を *T. kodakarensis* に導入することにより、*T. kodakarensis* の細胞内 acetyl-CoA の濃度を増加させる可能性が示唆された。

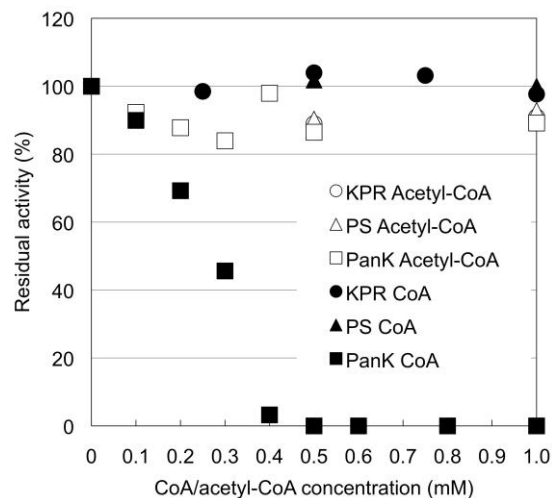


図 5. *T. maritima* 由来 KPR, PS, PanK の CoA による活性阻害

一方で、CoA の合成には 2-oxoisovalerate、cysteine、 β -alanine が必要である。 β -alanine の合成酵素として新規 aspartate decarboxylase を同定できた (原著論文 18)。

【2】*T. kodakarensis* の acetyl-CoA 消費経路の抑制 (跡見 G)

上記の通り、*T. kodakarensis* においては糖分解により得られる acetyl-CoA は主に ADP-forming acetyl-CoA synthetase (ACS) の作用により、酢酸と CoA へと加水分解される。ACS α -subunit ホモログは *T. kodakarensis* ゲノム上に 5 種存在し、既に 3 種については基質特異性が明らかとなっており、acetyl-CoA に対して活性を示す ACS I、ACS II、succinyl-CoA 特異的な succinyl-CoA synthetase (SCS) が同定されている。残る 2 種について検討した結果、一方は acetyl-CoA を含む多様な acyl-CoA に対して活性を示し (ACS III と命名)、もう一方は 2-(imidazol-4-yl) acetyl-CoA に特異的であることが判明した (2-(imidazol-4-yl) acetyl-CoA synthetase, ICS と命名) (図 6) (原著論文 17)。

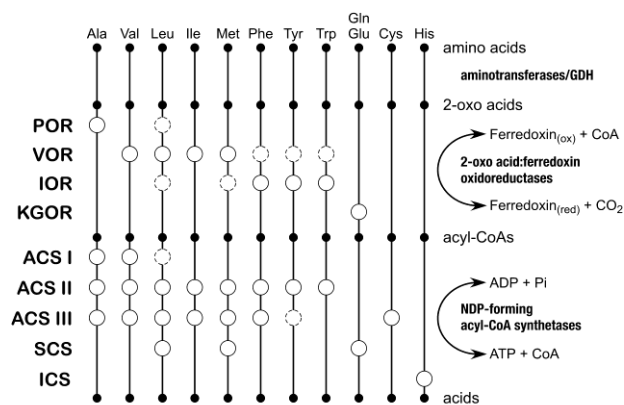


図 6. *T. kodakarensis* におけるアミノ酸異化代謝

4. 1. 6. *Methanococcus* への糖質取り込み能の付与/*Thermococcus* へのメタン生成能の付与 (跡見 G)

<研究のねらい>

メタン生成菌はその名の通り次世代エネルギーとしての利用が期待されているメタンを生成し、アーキアにのみその存在が知られている。しかし、一般に化学独立栄養生物であることから有機物は資化できない。そこで、有機物を資化できる超好熱性アーキア *T. kodakarensis* にメタン生合成遺伝子を導入して非可食性の余剰バイオマスなどの有機物からのメタン生成を目標とした。しかしメタン生合成経路を丸ごと導入するには 100-200 種の遺伝子導入の必要があるため、大規模に外来遺伝子を導入する技術の開発を行った。

<研究実施内容及び成果>

ゲノム規模の遺伝子断片を導入できる組換え系構築を目指して 3 つの戦略を試した。A. 非相同的組換えによる他生物由来ゲノム全体の組み込み、B. あらかじめ他生物由来ゲノムの断片を 1 つ導入しておき、その部位でのシングルクロスオーバーによる他生物由来ゲノム全体の組み込み、C. あらかじめ他生物由来ゲノムの断片を 2 つ導入しておき、その部位でのダブルクロスオーバーによる他生物由来ゲノムの導入 (図 7)、の 3 つである。宿主には *T. kodakarensis* KU216 ($\Delta pyrF$) を用い、DNA 供与体としてはまず近縁種である *Pyrococcus furiosus* のゲノム DNA を抽出して用いた。

宿主の *pyrF* 欠損株はウラシル要求性を示すが *P. furiosus* 由来の *pyrF* 遺伝子がゲノムに挿入された場合、ウラシル要求性が相補される。よってウラシルを含まない選択培地で、目的の組換えが起こった株をスクリーニングできる。

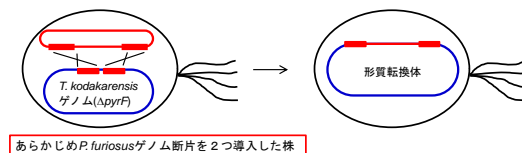


図 7. 大規模組換えの模式図

その結果、C の手法に関してのみ *P. furiosus* 由来の *pyrF* を含む 2.3 kbp の遺伝子断片が挿入され、ウラシル要求性が相補された株を得ることができた。

さらに、あらかじめ導入しておく相同領域の位置を移動させていくことによって挿入される遺伝子断片の長さを長くしていったところ、5.0 kbp の遺伝子断片はこの手法で導入できるものの、長さが 10 kbp になると導入できなくなることが分かった。メタン生合成経路全体などといった 200 kbp 超の遺伝子断片を導入する必要がある場合は、5 kbp の断片しか導入できない場合、50 回以上繰り返し形質転換を行う必要があり非現実的である。そこで一度に導入できる断片の長さをさらに伸ばすべく、新たな形質転換手法の開発を目指した。宿主と DNA 供与体細胞を共存させることにより生細胞間での DNA のやりとりや、菌同士の界面の死菌体から放出される DNA を宿主が受け取ることなどを期待した手法を考案した。このような操作を通じて 75 kbp 以上の長さのゲノム断片を導入することに成功した。

4. 1. 7. 細胞増殖を伴わないバイオマス分解・バイオエネルギー生産への挑戦 (跡見 G)

<研究のねらい>

本研究では水素発酵能力を示す超好熱性アーキア *T. kodakarensis* などを宿主とし、単独では ATP 加水分解活性を示す超好熱菌由来 ATP synthase の A_1V_1 domain を発現させることにより、細胞内 ATP の分解を促し、本菌のバイオマス分解能やバイオエネルギー生産能と細胞の増殖を切り離すことを目的とする。

<研究実施内容及び成果>

まず *T. kodakarensis* 自身の ATP synthase の A_1V_1 domain ($\alpha\beta\gamma$ subunit) 遺伝子 (TK1602-TK1604) を増幅・クローニングし、誘導型の *FBPald* プロモーターの下流に融合した。これらを *T. kodakarensis* ゲノム内に挿入した (KUA-PF 株)。KUA-PF 株の Western blot 解析を行ったところ、 α subunit の発現量が顕著に増加していることを確認できた。KUA-PF

株において、ピルビン酸やマルトデキストリンを主炭素源とした培地で水素生産能の評価を行った（バッチ培養）。その結果、ホスト株と比べて細胞収量あたりの水素生産量が向上していることが明らかとなった。このことから細胞増殖と水素生産の密接な関係性を部分的とはいえ切り離すことに成功し、細胞増殖を伴わない水素生成という研究コンセプトが有効であることが証明できた。

4. 1. 8. 糖中央代謝経路の理解と強化（跡見 G）

<研究のねらい>

本中研究課題では *T. kodakarensis* における糖代謝関連酵素遺伝子の遺伝学的解析をドイツ Duisburg-Essen 大学の Bettina Siebers 教授と共同で進め、本菌の糖中央代謝の理解および強化を目的とした。中研究課題（1）において *T. kodakarensis* のキチン分解経路の理解と強化を進めているが、本菌のキチンの分解速度と比較してその増殖速度が遅いことや chitobiose が多く蓄積していることを観察している。これは、フルクトース 6-リン酸以降の中央代謝では解糖能力が十分に機能していないことが原因の可能性も懸念された。そこで解糖系における主要酵素であるグルコキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼの遺伝学的解析を行った。また、我々や Siebers 教授のグループはこれまでに解糖系の酵素の幾つかはグルコース 1-リン酸によって活性化されることを明らかにしていることから、グルコース 1-リン酸を産生する経路で機能し得るマルトデキストリンホスホリラーゼおよびホスホグルコムターゼの遺伝学的解析も行った。ゲノム情報に基づくと、*T. kodakarensis* は細胞内に取り込んだマルトオリゴ糖を 2 種の代謝ルートで解糖系へ導くことができる。一方はオリゴ糖の加水分解およびグルコキナーゼ依存的なリン酸化でグルコース 6-リン酸を得る。もう一方はオリゴ糖の加リン酸分解およびリン酸転移反応でグルコース 1-リン酸を経由してグルコース 6-リン酸を得るルートである。遺伝子破壊により前者を遮断しても解糖条件で生育が損なわなければ、キチン分解強化株に対してさらにオリゴ糖の加水分解を担う遺伝子を破壊することを検討する。加水分解・リン酸化のルートを遮断することにより、少量のデンプン添加により加リン酸分解反応産物であるグルコース 1-リン酸が効率よく生成し、酵素レベルで中央代謝の機能が活性化され、キチン資化能の向上に結びつく可能性を考えた。

<研究実施内容及び成果>

Siebers 研究室では *T. kodakarensis* のグルコキナーゼ遺伝子破壊株が作製された。当研究室ではホスホフルクトキナーゼ、フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子の破壊株を単離した。各破壊株の解糖条件・糖新生条件における増殖特性を検討したところ、ホスホフルクトキナーゼ、フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子は解糖条件においては必要であることが判明した。一方で、グルコキナーゼ遺伝子破壊株は解糖条件でも生育できることが判明し、マルトオリゴ糖→グルコース→グルコース 6-リン酸の経路以外に、マルトデキストリンホスホリラーゼおよびホスホグルコムターゼが形成するマルトオリゴ糖→グルコース 1-リン酸→グルコース 6-リン酸の経路の寄与が示唆された。これはマルトデキストリンホスホリラーゼ遺伝子破壊株の増殖特性によっても裏付けされた。

4. 1. 9. 外来遺伝子発現に利用可能な有用プロモーター探索と開発（跡見 G）

<研究のねらい>

T. kodakarensis 細胞内で遺伝子発現を行う際に、目的産物を大量発現させるケースや、特定の培養条件でのみ発現をコントロールするケースなど、様々な状況が想定される。この様な多様な遺伝子発現に対する要求に柔軟に対応するため、多種類のタイプのプロモーターの存在が望まれる。本研究では強力な構成型プロモーターおよび制御が比較的容易な環境変化に応答する誘導型プロモーターを同定し、それらにおける基本転写因子・転写制御因子な

どの機能を理解することによりそれらの有用性を高める。

<研究実施内容及び成果>

T. kodakarensis KOD1 株 (野生株) を解糖・糖新生条件、様々な温度など、異なる条件で生育させた細胞より RNA を調製し、DNA microarray 解析や RNA sequencing により遺伝子の転写量を網羅的に比較した。その結果、*csg* 遺伝子 (TK0895)、*gdh* 遺伝子 (TK1431) に加え、*eflα* 遺伝子 (TK0308) などが構成的高発現遺伝子であることが判明し、これらのプロモーターが高発現型プロモーターとして利用可能であることが予想された。また α 多糖の有無により制御されるプロモーター候補として *FBPald* 遺伝子 (TK0989) を、トリプトファンの有無により制御されるプロモーター候補として、*trpC* 遺伝子 (TK0252) を、温度変化により制御される *pfid2* (TK1121) を、それぞれ選択した。*csg*、*gdh*、*eflα* プロモーターに関しては既に構成的高発現を必要とする場合、特に 4.1.1, 4.1.3, 4.1.4 で利用を開始しており、それらの機能評価を進めた。また α 多糖の有無に応答する *FBPald* プロモーターは 4.1.7 で使用を進めた。

また、*T. kodakarensis* ではゲノム上に 2 つ基本転写因子 TFB の機能的相関関係について、遺伝子破壊株を用いた解析により調べた。その結果、2 種類の TFB の機能はオーバーラップする部分もあるが、例えば TFB1 は鞭毛形成に関わる遺伝子の転写に重要であり、TFB2 はメバロン酸や脂質合成に関わる遺伝子の転写に重要であるなど、その支配下にある遺伝子の特異性の違いを明らかにした (原著論文 19)。

また本菌の Trp 生合成に関わる転写活性化因子として同定された転写制御因子の機能解析を行った結果、本タンパク質が Trp 生合成遺伝子群のプロモーターに結合する際の結合配列を同定し、さらには *in vitro* 転写系を用いて本タンパク質が転写活性化作用をもつことを示した。また *T. kodakarensis* には Trp 生合成遺伝子群内に存在する *trpB* 遺伝子 (*trpB1*) 以外に第2の *trpB* 遺伝子 (*trpB2*) が存在する。これらに関する生化学的・遺伝学的解析を進めた結果、両遺伝子とも Trp 生合成に寄与することがわかった (原著論文 21)。

4. 2. (京都大学 理学研究科(三木)グループ)

4. 2. 1. *Thermococcus kodakarensis* のキチン分解経路の解明と機能強化 (三木 G)

<研究実施内容及び成果>

・アーキア由来キチン分解関連酵素の構造解析

T. kodakarensis 由来キチナーゼについて、キチン結合に重要な残基を特定するため、本酵素の持つ三つのキチン結合ドメイン (ChBD-1、ChBD-2、ChBD-3) それぞれについて、構造解析を行った。二つのドメイン (ChBD-2、ChBD-3) のキチン非結合型について、それぞれ 1.3 Å と 2.1 Å 分解能で結晶構造を決定することができた。ChBD-2 と ChBD-3 の全体構造は、9本の β-strand から構成されており (図 8 左、中)、両者は非常によく一致していた。また、キチンとの結合に重要と思われる三つのトリプトファン残基が、疎水性残基であるにもかかわらず、タンパク質表面に等間隔で並んでいることも分かった。タンパク質全体が弧状の構造をとっており、これらのトリプトファン残基は、他のタンパク質表面のアミノ酸残基よりもより外側に位置していた。三つのトリプトファン残基と重なるよ

に、ChBD-2 構造にキチンの構造モデルをあてはめたところ、トリプトファン残基とキチンが有する環の位置がよく一致し、CH-π結合による相互作用の存在が示唆された (図 8 右)。また、アセチルグルコサミンが有するアミド基を安定化するように、グルタミン酸残基が配置されていた。全く

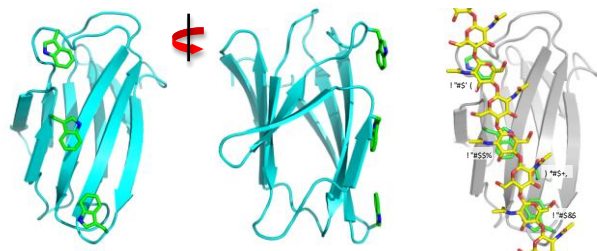


図 8. ChBD-2 の結晶構造。(左、中)全体構造、(右)キチンとの結合予想モデル

同様のことを ChBD-3 構造でも確認することができた (原著論文 27)。

4. 2. 2. *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 (三木 G) <研究実施内容及び成果>

・キシラン分解・ペントース代謝関連酵素の立体構造解明

機能解析の結果、*myo*-inositol kinase であることが分かった TK2285 タンパク質について、その反応機構を明らかにすることを目的に、構造解析を行った。アポ型、基質結合型、基質を反応させて作製した生成物結合型それぞれについて、1.8 Å、1.9 Å、2.1 Å 分解能で構造を決定した。TK2285 タンパク質の全体構造は、これまでに解析された ribokinase superfamily の酵素と類似していた (図 9 左)。生成物結合型構造では、ATP は ADP に、*myo*-inositol は *myo*-inositol 3-phosphate にそれぞれ変換されていた (図 9 右)。このことと、生成物の HPLC 分析および NMR

解析の結果から (跡見グループ 4.2. 参照)、本酵素は *myo*-inositol 3-kinase であると結論づけた。イノシトールの認識に関わる Asp12、Gln136、Arg140 をアラニンに置換する変異を導入し、活性への影響を調べたところ、いずれも *myo*-inositol に対する K_m 値が上昇もしくは結合力の大幅な低下により測定不能となり、これらの残基は *myo*-inositol の認識に重要な役割を果たしていることが分かった (原著論文 24)。

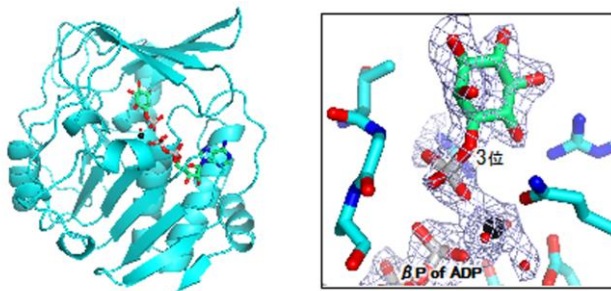


図 9. TK2285 タンパク質の結晶構造 (左) 全体構造、(右) 生成物結合部位

・ペントース代謝に関与する新規酵素の結晶構造解析

AMP 代謝経路に関連して、新規酵素である AMP phosphorylase (AMPpase) の結晶構造解析を行った。本酵素は細胞内において 40 量体を超える巨大複合体を形成しており、結晶化が困難であったが、N 末端や C 末端を切断することで会合状態が小さくなり、構造を決定することができた。AMPpase は三つのドメインから構成されている。二つの異なる二量体会合面を持ち、それらが交互に連なることで複雑な会合様式をとることが分かった (図 10)。また、本酵素特有の N 末ドメインは酵素活性に必須であり、多量体形成や基質結合に伴う Closed 構造の安定化に寄与していることが分かった。さらに、生化学的解析の結果、本酵素の多量体構造は熱安定性に関与しており、高温下で機能する本酵素にとって必要不可欠であることも分かった (原著論文 13)。

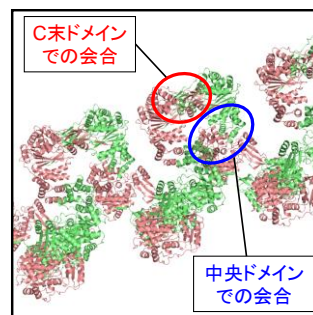


図 10. AMPpase 結晶構造

4. 2. 3. *Thermococcus kodakarensis* の水素生産機構の解明と機能強化 (三木 G)

<研究実施内容及び成果>

・[NiFe] ヒドロゲナーゼの成熟化補助タンパク質の構造解析

[NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化機構に関わる *T. kodakarensis* 由来 Hyp タンパクについて、ヒドロゲナーゼへの Ni 組込み機構を明らかにすることを目的に、*T. kodakarensis* 由来 HypB について構造解析を行い、2.1 Å 分解能で結晶構造を決定した。HypB は、非結晶学的な二回軸で関係づけられるホモ二量体構造を形成していた。また、本酵素はゲル濾過カラムの溶出位置から、溶液中でも二量体であることが分かっており、この二量体は生理条件下での Native な構造であると思われた。二量体会合面には大腸菌由来の ADP 分子が結合しており、ATP の加水分解に重要な役割を果たす Lys28 が ADP と相互作用していた。ADP との相互作用に関わる残基は、Mrp/MinD family に属する HypB 間でよく保存されていた。また、従来の G3E family に属する HypB は GTP を用い

て Ni 挿入を行うが、本酵素は ADP に対して強い親和性をもつことが示唆された。Mrp/MinD family に属する ATP 結合型 Soj との重ね合わせを行った結果、ATP の γ 位リン酸が HypB の Asp57、Pro135、Lys28 と接触することが分かり、HypB は ATP の結合に伴って構造変化が起こることが示唆された。

この結果を受けて、HypAB 複合体の構造解析に取り組んだ。ATP γ S を加えた条件下で、両者が複合体を形成することを見だし、1.7 Å 分解能で複合体構造を決定することができた。HypAB 複合体は、HypA 二分子 HypB 二分子のヘテロ四量体を形成していた(図 11 左)。また、HypB と複合体を形成することで、HypA は大きく構造変化しており、His98 が N 末端に接近していた。その結果、単独の HypA には存在しなかった Ni 結合部位が N 末端に形成されており、その部位には Ni が平面四配位で結合していることが分かった(図 11 右)。また、等温滴定型熱量測定を行ったところ、HypA の Ni に対する親和性は、複合体を形成することにより約 600 倍上昇することが明らかになった。これらの結果から、ヒドロゲナーゼへの Ni 組込み機構の詳細を初めて議論できた(原著論文 25)。

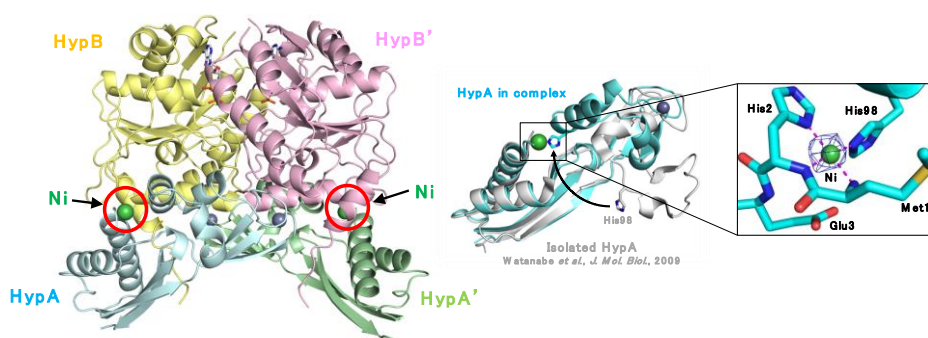


図 11. HypAB 複合体の結晶構造 (左)ヘテロ四量体構造、(右)HypA の構造変化

また、同じく成熟化機構に関わる HypE についても、反応中間状態であるカルバモイル化型またはシアノ化型 HypE の構造を、それぞれ 1.53 Å と 1.64 Å 分解能で決定することができた。その結果、カルバモイル化された C 末のシステイン残基は、二段階の脱プロトン化過程を経て脱水化されるという反応機構を初めて提唱することができた(原著論文 16)。

ヒドロゲナーゼの切断修飾を行う *T. kodakarensis* 由来 HybD (計画書に記載していた HycI より名称変更)について、本酵素の修飾機構を明らかにすることを目的に構造解析を行い、1.9 Å 分解能で結晶構造を決定できた。HybD は、七つの α -helix と五つの β -strand からなる α/β サンドウィッチ構造をしていた(図 12)。また、類似構造との比較から、ヒドロゲナーゼ大サブユニット(HyhL)との相互作用に重要な金属イオンの結合部位を予想した。

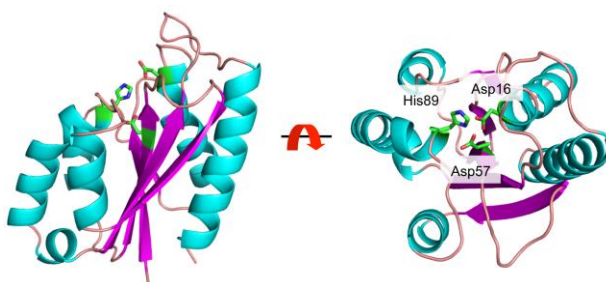


図 12. HybD の結晶構造 残基は金属結合部位

4. 2. 4. スクワレン前駆体合成増強のための細胞工学 (三木 G)

<研究実施内容及び成果>

・CoA 生合成経路関連酵素の立体構造解明

CoA 生合成経路に関連する酵素のうち、アーキアに特有の *T. kodakarensis* 由来 phosphopantothenate synthetase (PPS) について、反応機構を明らかにすることを目的に、構造解析に取り組んだ。アポ型構造を 2.0 Å 分解能で、基質である ATP/Mg および ATP/Mg/ホスホパントイ

ン酸 (PPo) との複合型構造を 2.4 Å と 2.3 Å 分解能で、それぞれ決定することができた。PPS は α/β 構造をとっており、アポ型構造では非結晶学的な二回対称軸で関係づけられる位置から約 10° ずれた、非対称な二量体を形成していた (図 13 左)。また、二つの基質結合型構造においても、やはり非対称な二量体を形成していることが分かった (図 13 中、右)。この非対称性のために、PPS 二量体中に二ヶ所存在する活性部位は非等価であり、一方は広く (w-site) もう一方は狭く (n-site) なっていた。PPS と ATP/Mg との複合型構造では、n-site ではペアとなる単量体由来の Arg17 と Tyr45 が ATP のリン酸部位と結合していたが、w-site ではこれらの残基は ATP との結合に関与していなかった。この構造を基に作製した R17A および Y45A 変異体では、酵素活性が著しく低下することも確認された。また、対称な二回軸で関係づけられる仮想二量体モデルでは、両残基と活性部位は弱い相互作用しかできない位置関係になった。これらの結果から、Arg17 と Tyr45 は酵素反応に必須であり、また PPS の非対称性は酵素反応にとって重要であることが結論づけられた。また、n-site のみで Mg イオンが確認されたことから、PPS の反応はまず n-site で起こることが考えられた。一方、ATP/Mg/PPo との複合型構造では、n-site、w-site の両方において、反応中間体であるホスホパントイルアデニレート (PPA) が結合している様子が確認できた (原著論文 20)。

これらの結果より、PPS の反応機構には二量体の非対称性が必要であること、また二つの活性部位のうち、最初に n-site で反応中間体が生成され、続いて PPS 二量体分子の構造変化が起こって n-site と w-site が入れ替わり、新たに形成された n-site で反応中間体の形成が起こるといふ反応機構を初めて提唱できた。

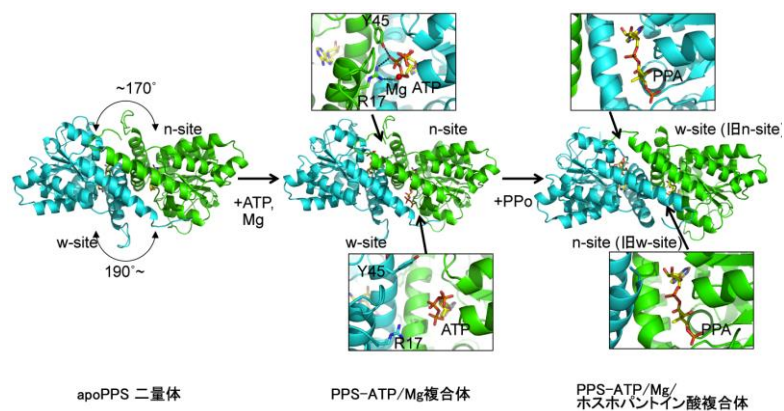


図 13. PPS 二量体の予想される反応機構

同じく CoA 生合成経路に関連する *T. kodakarensis* 由来 ketopantoate reductase (KPR) については、機能解析の結果 CoA によるフィードバック阻害を受けることが分かった。そこで、CoA による KPR の阻害機構を明らかにすることを目的に、CoA 非結合型および CoA/基質 2-oxopantoate との三者複合型それぞれについて構造解析を行い、2.3 Å と 1.65 Å 分解能で結晶構造を決定した。

KPR は二量体構造をしており、CoA は一方の単量体の NADH 結合部位にのみ結合し、Cys84 とジスルフィド結合を形成していた (図 14)。この Cys84 をアラニンへと置換した変異体を作成し、野生型と C84A 変異体の活性測定を行ったところ、野生型では CoA による時間依存的な阻害が見られたのに対し、C84A 変異体ではそのような阻害は見られないことが分かった。このことは、CoA の結合は不可逆的であることを示唆しており、Cys84 とのジスルフィド結合が KPR の活性阻害に重要な役割を果たしていることが分かった。また、2-oxopantoate も同じ分子に結合しており、活性部位は閉じた構造をしていた。もう一方の単量体には発現宿主として用いた大腸菌由来と思われる NADP⁺のみが結合し、活性部位は開いていた。以上の結果から、CoA は 2-oxopantoate と協同的に結合することで、KPR を閉じた構造へと変化させ、厳密な活性阻害を引き起こすことが分かった (原著論文 27, 31)。

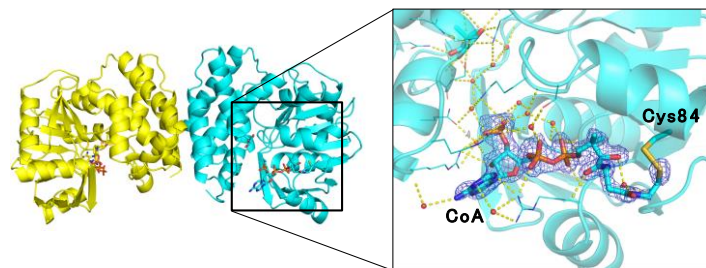


図 14. KPR の結晶構造 (左)ホモ二量体構造、(右)CoA 結合部位

4. 3. (立命館大学 生命科学部 (今中) グループ)

<研究のねらい>

日本各地より採集した環境サンプル中からキチン・キシランなどの非食性バイオマス分解能を示す微生物を濃縮・分離する。分離された微生物のうち、特に高い分解能あるいは有用な分解特性を示すものに対しては、生化学的手法やゲノム解析を通じて関与する遺伝子を同定する。また機能強化・機能融合された微生物の活性を培養工学的手法により最適化し、分解・生産収率を求め、評価する。

4. 3. 1. キチン・キシラン等バイオマス高分解能を示す候補微生物の分離 (今中 G)

<研究実施内容及び成果>

大分県の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、立命館大学周辺の田んぼ中の土壌サンプルよりキチン分解菌 (1-1 株) の単離に成功した。本菌の 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、本菌は *Lysinibacillus* 属細菌と予想された。また同様に家庭用コンポストのサンプルよりキチン分解菌 (64-4 株) の単離に成功した。本菌の 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、本菌は *Bacillus* 属細菌と予想された。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 (図 15)。本菌は 70°C で生育可能な好熱菌であり、その 16S rRNA 遺伝子配列の解析結果より、*Caldicellulosiruptor* 属細菌と予想された。上述の多糖分解菌に加え、一連の微生物探索の過程において、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。



図 15. (左) 白池地獄、(中) 培養 3 日目 45-6 株、(右) 顕微鏡観察の様子

4. 3. 2. バイオマス高分解性微生物のバイオマス分解に関わる酵素の同定 (今中 G)

<研究実施内容及び成果>

前述の得られた微生物のうち *T. kodakarensis* への遺伝子導入を視野に入れ、キシラン分解能をもつ好熱性の *Caldicellulosiruptor* 属細菌 45-6 株について特に注目した。この 45-6 株について次世代シーケンサーを用いて全ゲノム DNA のドラフト解析を行った。その結果ゲノム上に xylanase 遺伝子ホモログをはじめとして β -xylosidase などキシラン分解関連の酵素が多数見出された (表 1)。これらのうち特に β -1,4-xylanase をコードすると予想されている遺伝子は 3 種類存在した。

表 1. 45-6 株が持つ様々なキシラン分解関連酵素

酵素名	ホモログの数
β -xylanase	7
(特に β -1,4-xylanase)	(3)
β -xylosidase	4
α -glucuronidase	1
α -L-arabinofuranosidase	2

これら酵素群の性質を明らかにすべく、まずはこの 3 種類の β -1,4-xylanase ホモログのうちのひとつの遺伝子 (*xylI*) について、大腸菌で異種発現を試みた。結果として SDS-PAGE により、目的の大きさのタンパク質が発現していることを確認した。得られた粗酵素につ

いてジニトロサリチル酸法を用いて 60°Cから 100°Cの範囲内で酵素が生産する還元糖の定量を行ったところ、超好熱菌 *T. kodakarensis* の至適生育温度である 85°Cにおいても 2 時間以上の間 50%以上の酵素活性を維持しており、高い耐熱性を有することも分かった。今回特に *T. kodakarensis* の至適生育温度でも活性を有していたことは、*T. kodakarensis* が本酵素を利用する際に非常に有効であると考えられた。また一方で残りの二つ (*xyl2*、*xyl3*) について大腸菌内で異種発現を試みた。その結果 *xyl2* に関しては推定分子質量 (約 76kDa) よりも小さな状態で発現し、得られたタンパク質からは xylanase 活性も確認されなかった。*xyl3* についても活性な xylanase は確認されなかった。

T. kodakarensis は水素生産能をもつが、キシラン分解能をもたない。そこでキシラン分解酵素を導入することで、*T. kodakarensis* によるキシランからの水素生産が期待できる。ここで前述のように *Xyl1* は *T. kodakarensis* の生育温度でも十分な活性を示す事が分かっている。そこで *xyl1* について分泌タンパク質として発現するように *T. kodakarensis* ゲノムへの組み込みを試みた。その結果 *xyl1* 導入株の取得に成功した。野生株及び *xyl1* 導入株をキシラン含有固体培地上で生育させたところ、*xyl1* 導入株コロニー周辺で、野生株コロニーでは見られなかったキシランの分解帯が観察された。このように *T. kodakarensis* にキシラン分解能を付与することに成功した。

4. 4. (大阪大学 工学研究科(本田)グループ)

4. 4. 1. キチン・キシランからのバイオエネルギー生産 (本田 G)

<研究のねらい>

先行研究により開発された耐熱性酵素による *in vitro* 人工代謝経路構築技術を用い、様々なバイオマス由来物質から、各種の有用化学品を高収率に生産する。これまでの研究でグルコースを原料に乳酸、リンゴ酸、*n*-ブタノールを選択的に作り分けることに成功しているが、本課題では、出発物質側のレパートリーを拡張することを主眼に研究を進める。具体的には、跡見 G により全容が解明された *T. kodakarensis* 由来キチン分解酵素群を用い、キチンを出発物質とした *n*-ブタノール生産のための人工代謝経路を構築すること、ならびに *in vitro* で構築した人工経路を *T. kodakarensis* 等の (超) 好熱性微生物内に導入することを視野に入れ、一連の酵素遺伝子群をアッセンブルした人工オペロンを構築することを目指す。

<研究実施内容及び成果>

出発物質レパートリーの拡張を目指すにあたり、キチンに先立って、グリセロールを原料とした人工代謝経路構築に取り組んだ。*T. kodakarensis* 由来 glycerol kinase、*Thermus thermophilus* 由来 glycerol-3-phosphate (G3P) dehydrogenase によりグリセロールを G3P にまで変換し、これを先行研究で構築済みの ATP 非生産性キメラ型解糖経路に接続することで、グリセロールから乳酸へのワンポット変換反応を行った。また本システムは、100 mM 程度までのメタノールを含む反応液中でも動作可能であり、バイオディーゼル生産の副産物である粗グリセロールからの物質生産への適用可能性も示された。

一方、キチンを出発物質とした人工代謝経路の構築に向けて、一連の酵素群の速度論的解析を実施した。また好熱性細菌 *Thermus thermophilus* 由来 glucokinase が、ATP 依存的にグルコサミンのリン酸化を触媒可能であることを見出した。*T. kodakarensis* のキチン分解酵素群のひとつである ADP-依存型 glucosamine (GlcN) kinase (TK1110)をこれと置換することによって、キチン分解経路を上述のキメラ型解糖経路へ接続した際の ATP/ADP バランスを合致させることが可能であることを示した。さらに、キメラ型解糖経路酵素群をコードする一連の遺伝子を人工オペロンとして集積し、大腸菌内で共発現させた。本共発現株の粗酵素液を熱処理に供したものを触媒とし、fructose-6-phosphate から pyruvate への変換が可能であることを示した。一連の酵素を組み合わせ、*n*-ブタノールを含む種々の有用代謝物の合成前駆体である pyruvate を、キチンから収率約 50%で生産させることに成功した。

4. 4. 2. 水素を還元力とした CO₂ 固定型バイオコモディティ生産 (本田 G)

<研究のねらい>

跡見 G により機能解明が進められている *T. kodakarensis* 由来水素吸収型ヒドロゲナーゼ (Hyh) をはじめとする耐熱性ヒドロゲナーゼを利用し、水素を還元力とした CO₂ 固定型人工代謝経路を構築する。

<研究実施内容及び成果>

利用可能な耐熱性ヒドロゲナーゼとして米・ジョージア大・M. Adams らのグループにより、同酵素の成熟化タンパク質を含む一連の酵素遺伝子を共発現させた組換え大腸菌株を譲り受けた。また、CO₂ 固定の初発反応となりえる formate dehydrogenase (FDH) について、複数の (超) 好熱菌に由来する当該酵素遺伝子のクローニングと大腸菌内での異種発現を試みた。このうち *Pyrococcus furiosus* 由来 FDH 発現株を用いた場合に、水素雰囲気下で炭酸 (重炭酸イオンとして添加) からのギ酸生産が確認されが、その活性は高温で容易に失われるものであった。すなわち、*P. furiosus* 由来 FDH は大腸菌内での活性発現にあたり、宿主由来の非耐熱性タンパク質と協調的に機能しているものと考えられた。以上より、FDH を初発反応とした CO₂ 固定型物質生産システムの構築には見直しが必要と考えられ、今後は、バイオマス由来物質を出発物質としたバイオコモディティー生産と余剰還元力を利用した水素生産といった異なる方向性を模索する必要もあると考えられる。

一方、先行研究も含めた一連の研究において、高温領域における NAD(H)、NADP(H) の熱分解が耐熱性酵素を用いた有用物質生産システムの課題として顕在化しつつあった。これらの補酵素はヒドロゲナーゼ反応と物質生産反応を介する電子メディエーターとしても必要となるものであることから、NAD(H)、NADP(H) の安定化に関する研究を並行して実施した。一連のニコチンアミド補酵素群のうち、特に NAD⁺ に注目し、その熱分解産物を同定するとともに、それらから NAD⁺ を再合成するための耐熱性サルベージ酵素群を探索した。得られた酵素群を *in vitro* 代謝経路構築技術のスキームに則り組み合わせることで、NAD⁺ の人工サルベージ合成経路を完成させた (図 16)。これを用いて NAD⁺ の安定化が可能であることを示すとともに、成果をもとに特許出願を行った。

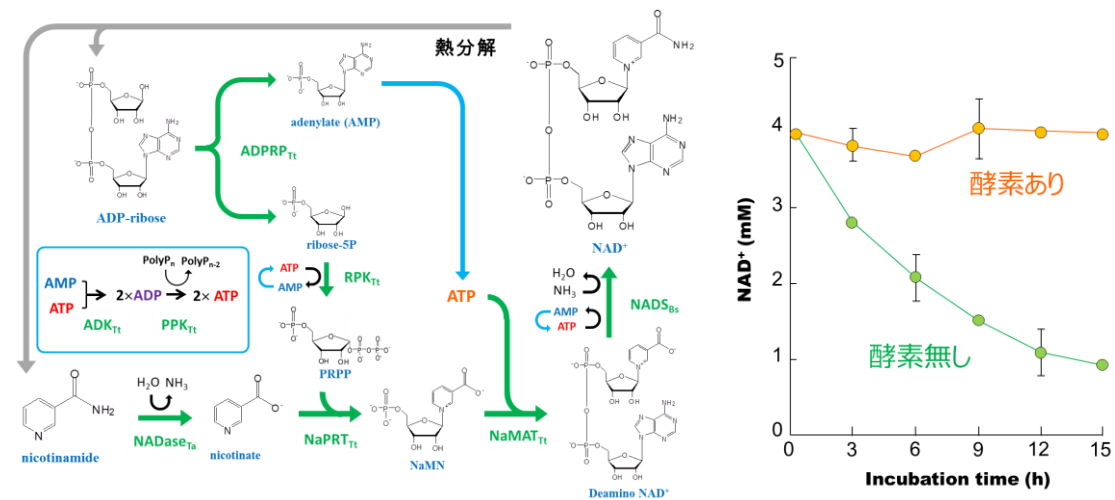


図 16. NAD⁺サルベージ合成のための *in vitro* 人工代謝経路の概略図 (左) と同経路を用いた NAD⁺ の安定化効果 (pH8.0、60°C)

4. 5. (神戸大学大学院 人間発達環境学研究所(蘆田)グループ)

4. 5. 1. メタン産生に関わる新規炭素代謝回路の機能解析 (蘆田 G)

<研究のねらい>

メタン菌ゲノム情報の解析等から、RuBisCO と phosphoribulokinase (PRK) が機能する新規の炭

素代謝回路が予想され、またこの新規回路がメタン産生代謝へ還元炭素を供給していることが予想された。将来的なアーキアにおけるメタン産生能強化を可能とするため、この新規炭素代謝回路の機能を詳細に解析することを目的に研究を進めた。

<研究実施内容及び成果>

メタン菌である *Methanospirillum hungatei* に注目し、RuBisCO と PRK ホモログの酵素学的解析を行った。*M. hungatei* の RuBisCO ホモログの大腸菌リコンビナントタンパク質を用いて活性測定を行った結果、カルボキシラーゼ活性を示し、このタンパク質が正真正銘の RuBisCO であることが明らかになった。また、同様に *M. hungatei* を含む 4 種のメタン菌の PRK ホモログの大腸菌リコンビナントタンパク質を用いて酵素学的解析を行った結果、全てのホモログで PRK 活性が検出された。このことからアーキア、特にメタン菌では、PRK により合成された ribulose biphosphate (RuBP) を基質に RuBisCO が CO₂ 固定反応を触媒していることが示唆された。しかしこれらアーキアはペントースリン酸経路を有していないため、PRK の基質である ribulose 5-phosphate (Ru5P) がどのように供給されているか明らかでなかった。Ru5P 供給経路としてアーキアや一部のバクテリアが利用する CO 固定経路である Ribulose monophosphate (RuMP) pathway が予想された。RuMP 経路酵素である 6-phospho-3-hexulo-isomerase と hexulose-6-phosphate synthase を *M. hungatei* ゲノム中の候補遺伝子の 大腸菌リコンビナントタンパク質の解析から同定した。これらの結果から、*M. hungatei* において、光合成カルビンサイクルの一部が RuMP 経路に置換された RuBP と PRK が機能する新規炭素代謝回路、reductive hexulose-phosphate (RHP) cycle の存在が示唆された。また、RHP cycle では、還元炭素を formaldehyde としてメタン菌特有のメタン産生経路、または還元的アセチル-CoA 経路へ供給していることが予想された。

RHP cycle の生体内における存在を検証するために、6-phospho-3-hexulo-isomerase、hexulose-6-phosphate synthase、PRK、RuBisCO のリコンビナントタンパク質を用いて試験管内で解析した結果、RuBisCO 反応生成物である 3-phosphoglycerate への変換が検出され、またこの変換は、RuBisCO の特異的阻害剤により完全に抑制されたことから、この回路を試験管内で再現することができた。さらに、*M. hungatei* の細胞抽出液を用いて、fructose 6-phosphate から 3-phosphoglycerate への変換を解析した結果、fructose 6-phosphate から 3-phosphoglycerate への変換が検出され、この変換は RuBisCO の特異的阻害剤により完全に抑制された。このことから、RuBisCO 依存的な RHP cycle が機能していることを明らかにした。

RHP cycle に特徴的な酵素遺伝子をアーキアのゲノムデータベースから検索した結果、*M. hungatei* と同じメタン菌の多く、また超好熱菌の一部が RHP cycle を利用していることが明らかになった。これら超好熱菌由来の酵素は *T. kodakarensis* で機能させることが可能と予想されるため、*T. kodakarensis* へのメタン産生能付与が成功した後の RHP cycle 導入による更なる生量強化が期待できる。

§ 6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 31件)

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*, vol.78, No.11, pp.3806-3815, 2012 (DOI: 10.1128/AEM.07996-11.)
5. Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “Biochemical Characterization of Pantoate Kinase, a Novel Enzyme Necessary for Coenzyme A Biosynthesis in the *Archaea*”, *Journal of Bacteriology*, vol. 194, No. 19, pp. 5434-5443, 2012 (DOI: 10.1128/JB.06624-11)
6. Takuya Ishibashi, Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Tatsuya Morikita, Bunta Watanabe, Jun Hiratake, Asako Kishimoto, Akiko Kita, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “A Detailed Biochemical Characterization of Phosphopantothenate Synthetase, a Novel Enzyme Involved in Coenzyme A Biosynthesis in the *Archaea*” *Extremophiles*, vol. 16, No. 6, pp. 819-828, 2012 (DOI: 10.1007/s00792-012-0477-5)
7. Taiga Tominaga, Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka and Kunio Miki, “Structure of the [NiFe]-hydrogenase Maturation Protein HypF from *Thermococcus kodakarensis* KOD1”, *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, vol. 68, No. 10, pp. 1153–1157, 2012 (DOI: 10.1107/S1744309112036421)
8. Riku Aono, Takaaki Sato, Ayumu Yano, Shosuke Yoshida, Yuichi Nishitani, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “Enzymatic Characterization of AMP Phosphorylase and Ribose-1,5-bisphosphate Isomerase Functioning in an Archaeal AMP Metabolic Pathway.” *Journal of Bacteriology*, vol. 194, No. 24, pp. 6847-6855, 2012 (DOI: 10.1128/JB.01335-12)
9. Lubomira Cubonová, Masahiro Katano, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, John N. Reeve, and Thomas J. Santangelo “An Archaeal Histone is Required for Transformation of *Thermococcus kodakarensis*” *Journal of Bacteriology*, vol. 194, No. 24, pp. 6864-6874, 2012 (DOI: 10.1128/JB.01523-12)
10. Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, “Crystal Structures of the HypCD Complex and the HypCDE Ternary Complex: Transient Intermediate Complexes during [NiFe] Hydrogenase Maturation”, *Structure*, vol. 20, No. 12, pp. 2124–2137, 2012 (DOI:

- 10.1016/j.str.2012.09.018)
11. Daisuke Sasaki, Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Toshihisa Shoji, Ayako Yasukochi, Kenta Tagashira, Wakao Fukuda, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, “Identification and Structure of a Novel Archaeal HypB for [NiFe] Hydrogenase Maturation.” *Journal of Molecular Biology*, vol. 425, No. 10, pp. 1627-1640, 2013 (DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.004)
 12. Yuusuke Yokooji, Takaaki Sato, Shinsuke Fujiwara, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “A Genetic Examination of Initial Amino Acid Oxidation and Glutamate Catabolism in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*” *Journal of Bacteriology*, vol. 195, No. 9, pp. 1940-1948, 2013 (DOI: 10.1128/JB.01979-12)
 13. Yuichi Nishitani, Riku Aono, Akira Nakamura, Takaaki Sato, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, “Structure Analysis of Archaeal AMP Phosphorylase Reveals Two Unique Modes of Dimerization.” *Journal of Molecular Biology*, vol. 425, No. 15, pp. 2709-2721, 2013 (DOI: 10.1016/j.jmb.2013.04.026)
 14. Takaaki Sato, Masahiro Fujihashi, Yukika Miyamoto, Keiko Kuwata, Eriko Kusaka, Haruo Fujita, Kunio Miki, and Haruyuki Atomi, “An Uncharacterized Member of the Ribokinase Family in *Thermococcus kodakarensis* Exhibits *myo*-Inositol Kinase Activity.” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, No. 29, pp. 20856-20867, 2013 (DOI: 10.1074/jbc.M113.457259).
 15. Hiroya Tomita, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, “Identification and Characterization of an Archaeal Ketopantoate Reductase and its Involvement in Regulation of Coenzyme A Biosynthesis.” *Molecular Microbiology*, vol. 90, No. 2, pp. 307-321, 2013 (DOI: 10.1111/mmi.12363)
 16. Taiga Tominaga, Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka and Kunio Miki, “Crystal structures of the carbamoylated and cyanated forms of HypE for [NiFe] hydrogenase maturation”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, No. 51, pp. 20485-20490, 2013. (DOI: 10.1073/pnas.1313620110)
 17. Tomotsugu Awano, Anja Wilming, Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Toshiaki Fukui, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, “Characterization of Two Members among the Five ADP-forming Acyl Coenzyme A (Acyl-CoA) Synthetases Reveals the Presence of a 2-(Imidazol-4-yl)acetyl-CoA Synthetase in *Thermococcus kodakarensis*.” *Journal of Bacteriology*, vol. 196, No. 1, pp. 140-147, 2014 (DOI: 10.1128/JB.00877-13.)
 18. Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, “An archaeal glutamate decarboxylase homolog functions as an aspartate decarboxylase and is involved in β -alanine and coenzyme A biosynthesis”, *J. Bacteriol.* vol. 196, No. 6, pp.1222-1230, 2014 (DOI: doi: 10.1128/JB.01327-13)
 19. Ryota Hidese, Ryo Nishikawa, Le Gao, Masahiro Katano, Tomohiro Imai, Satoru Kato, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka and Shinsuke Fujiwara, “Different roles of two transcription factor B proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*”, *Extremophiles* vol. 18, No. 3, pp.573-588, 2014 (DOI: 10.1007/s00792-014-0638-9)
 20. Asako Kishimoto, Akiko Kita, Takuya Ishibashi, Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi and Kunio Miki, “Crystal structure of phosphopantothenate synthetase from *Thermococcus kodakarensis*”, *Proteins* vol. 82, No. 9, pp.1924-1936, 2014 (DOI: 10.1002/prot.24546)
 21. Takayoshi Hiyama, Takaaki Sato, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, “The tryptophan synthase β -subunit paralogs TrpB1 and TrpB2 in *Thermococcus kodakarensis* are both involved in tryptophan biosynthesis and indole salvage.” *FEBS J.* vol. 281, No. 14, pp.3113-3125, 2014 (DOI: 10.1111/febs.12845b)
 22. Chalisa Jaturapaktrara, Suchada Chanprateep Napathorn, Maria Cheng, Okano

- Kenji, Hisao Ohtake, and Kohsuke Honda, “*In vitro* conversion of glycerol to lactate with thermophilic enzymes”, *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 1, No. 18, 2014 (DOI: 10.1186/s40643-014-0018-4)
23. Riku Aono, Takaaki Sato, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, “A pentose bisphosphate pathway for nucleoside degradation in Archaea”, *Nature Chem. Biol.*, vol. 11, No. 5, pp. 355-360, 2015 (DOI:10.1038/nchembio.1786).
 24. Ryuhei Nagata, Masahiro Fujihashi, Takaaki Sato, Haruyuki Atomi and Kunio Miki. “Crystal structure and product analysis of an archaeal *myo*-inositol kinase reveal substrate recognition mode and 3-OH phosphorylation” *Biochemistry*. vol 54, No. 22, pp. 3494-3503, 2015 (DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00296).
 25. Satoshi Watanabe, Takumi Kawashima, Yuichi Nishitani, Tamotsu Kanai, Takehiko Wada, Kenji Inaba, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka and Kunio Miki. “Structural basis of a Ni acquisition cycle for [NiFe] hydrogenase by Ni-metallochaperone HypA and its enhancer” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol. 112, No. 25, pp. 7701-7706, 2015 (DOI: 10.1073/pnas.1503102112).
 26. Tamotsu Kanai, Jan-Robert Simons, Ryohei Tsukamoto, Akihito Nakajima, Yoshiyuki Omori, Ryoji Matsuoka, Haruki Beppu, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi. “Overproduction of the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase in *Thermococcus kodakarensis* and its effect on hydrogen production”, *Front Microbiol.* vol. 26, No. 6, pp. 847, 2015 (DOI: 10.3389/fmicb.2015.00847).
 27. Yuya Hanazono, Kazuki Takeda, Satomi Niwa, Masahito Hibi, Naoya Takahashi, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Kunio Miki. “Crystal structures of chitin binding domains of chitinase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1”, *FEBS Lett.* vol. 590, No. 2, pp. 298-304, 2016 (DOI: 10.1002/1873-3468.12055.)
 28. Yoshiki Aikawa, Yuichi Nishitani, Hiroya Tomita, Haruyuki Atomi, Kunio Miki. “Crystal structure of archaeal ketopantoate reductase complexed with coenzyme a and 2-oxopantoate provides structural insights into feedback regulation”, *Proteins*. vol. 84, No. 3, pp. 374-382, 2016. (DOI: 10.1002/prot.24984)
 29. Maria Cheng, Hayato Yoshiyasu, Kenji Okano, Hisao Ohtake, Kohsuke Honda “Redirection of the reaction specificity of a thermophilic acetolactate synthase toward acetaldehyde formation”, *PloS One*, vol 11, No. 1: e0146146, 2016 (DOI: 10.1371/journal.pone.0146146)
 30. Kohsuke Honda, Naoya Hara, Maria Cheng, Anna Nakamura, Komako Mandai, Kenji Okano, Hisao Ohtake “*In vitro* metabolic engineering for the salvage synthesis of NAD⁺”, *Metab. Eng.*, vol 35: 114-120, 2016 (DOI: 10.1016/j.ymben.2016.02.005)
 31. Yoshiki Aikawa, Yuichi Nishitani, Hiroya Tomita, Haruyuki Atomi and Kunio Miki. “Crystal structure of ketopantoate reductase from *Thermococcus kodakarensis* complexed with NADP⁺”, *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, in press.

【査読審査の入る proceedings 等】

1. Haruyuki Atomi, Hiroya Tomita, Takuya Ishibashi, Yuusuke Yokooji, and Tadayuki Imanaka, “CoA Biosynthesis in *Archaea*”, *Biochemical Society Transactions*, vol. 41, No. 1, pp. 427-431, 2013 (DOI: 10.1042/BST20120311)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Takaaki Sato and Haruyuki Atomi, “Novel Metabolic Pathways in *Archaea*”, *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, No. 3, pp. 307–314, 2011 (DOI:

- 10.1016/j.mib.2011.04.014)
2. Haruyuki Atomi, Takaaki Sato and Tamotsu Kanai, “Application of Hyperthermophiles and their Enzymes”, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, No. 5, pp. 618-626, 2011 (DOI: 10.1016/j.copbio.2011.06.010)
 3. Tadayuki Imanaka, “Molecular Bases of Thermophily in Hyperthermophiles”, *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. vol. 87, No. 9, 587-602, 2011 (DOI:10.2183/pjab.87.587)
 4. 今中忠行(監修), “酵素の開発と応用技術”, シーエムシー出版, 2011
 5. Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Toshiaki Fukui “Overview of the Genetic Tools in the Archaea” *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, 337, 2012 (DOI: 10.3389/fmicb.2012.00337)
 6. Haruyuki Atomi “Nothing to Waste” *Nature Chemical Biology*, vol. 8, No. 11, pp. 877-878, 2012 (DOI: 10.1038/nchembio.1089)
 7. 今中忠行(監修・著), “極限環境生物の産業展開”, シーエムシー出版 (ISBN: 978-4-7813-0624-7), 2012.
 8. 金井保, 「超好熱菌による水素生産」, pp. 184-189, “極限環境生物の産業展開”, シーエムシー出版 (ISBN: 978-4-7813-0624-7), 2012.
 9. Tamotsu Kanai and Haruyuki Atomi, “Enzymes from Thermophilic Organisms” pp. 145-162, *in Protein Engineering Handbook volume 3*, Eds: Stefan Lutz and Uwe Bornscheuer (ISBN: 978-3-527-33123-9) Wiley-VCH, 2013
 10. Takaaki Sato and Haruyuki Atomi, “Genomics of Thermophilic Bacteria and Archaea”, pp. 307-330, *in Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, Second Edition*, Eds: Tulasi Satyanarayana, Jennifer Littlechild, and Yutaka Kawarabayasi (ISBN:978-94-007-5898-8) Springer, 2013.
 11. Tamotsu Kanai, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, “Hydrogen Production by the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*”, *Journal of the Japan Petroleum Institute*, vol. 56, No. 5, pp. 267-279, 2013.
 12. 福田 青郎, 今中忠行, “温泉に住む微生物・好熱菌”, 生物工学よもやま話—実験の基礎原理から応用まで— (生物工学会編), pp. 158-163, 2013
 13. 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, “超好熱菌を用いた水素連続生産系の構築”, 酵素工学会誌, 71号, pp. 18-24, 2014
 14. 今中忠行, “極限環境の生体分子、その歴史と将来展望”, 極限環境の生体分子 (日本化学会編), 化学同人, pp. 30-38, 2014
 15. 佐藤喬章, 跡見晴幸, “超好熱菌のゲノム情報とポストゲノム研究の展開”, 極限環境の生体分子 (日本化学会編), 化学同人, pp. 40-49, 2014
 16. 西谷優一, 三木邦夫, “好熱菌タンパク質の構造と機能改良”, 極限環境の生体分子: 過酷な環境下での機能を科学する (日本化学会編), 化学同人, pp. 50-54, 2014
 17. 本田孝祐, “耐熱性酵素を用いた *in vitro* バイオリファインリーへの挑戦” 環境バイオテクノロジー学会誌, 14号1巻, pp.31-36, 2014
 18. 金井保, “好熱菌による発酵水素生産”, バイオ水素とキャリア開発の最前線, シーエムシー出版, pp. 50-56, 2015
 19. 青野陸, 佐藤喬章, 跡見晴幸, “アーキアにおいてヌクレオシドの分解を担うペントースピスリン酸経路の発見”, ライフサイエンス新着論文レビュー, (DOI: 10.7875/first.author.2015.050)
 20. Elizaveta Bonch-Osmolovskaya, Haruyuki Atomi. “Editorial overview: Extremophiles: From extreme environments to highly stable biocatalysts” *Curr. Opin. Microbiol.* Epub 2015 Jun 23. (DOI: 10.1016/j.mib.2015.06.005).
 21. 佐藤喬章, 跡見晴幸, “超好熱菌の高温適応戦略”, 生物工学会誌, 93号8巻, pp. 468-472, 2015
 22. 青野陸, 佐藤喬章, 跡見晴幸, “アーキアで見つかった新しい核酸分解経路—光合成反

- 応の起源と進化に迫る発見”、化学、化学同人、70号9巻、pp. 12-16、2015
23. Wakao Fukuda and Tadayuki Imanaka. “Thermophilic Viruses and Their Association with Thermophiles”, pp. 235-247, in “Thermophilic Microorganisms”, Eds. Fu-Li Li (ISBN: 978-1-910190-13-5), Caister Academic Press, 2015.
 24. 岡野憲司、本田孝祐、“*In vitro* 代謝工学による1-ブタノール生産”、バイオサイエンスとインダストリー、73巻6号、pp. 481-482、2015
 25. 富田宏矢、横大路裕介、跡見晴幸、“アーキアにおける補酵素A (coenzyme A)の生合成機構”、化学と生物、54号2巻、pp. 85-93、2016

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 23件、国際会議 31件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

〈国際〉

1. Takaaki Sato, Unique metabolism involving archaeal Rubiscos, Wageningen University and Research Centre/Kyoto University Joint Workshop, Kyoto, April 26, 2011.
2. Tadayuki Imanaka, Hydrogen Production by the Hyperthermophile, *Thermococcus kodakaraensis*, BIT'S 1st Annual World Congress of Bioenergy, Dalian, China, April 27, 2011.
3. Tadayuki Imanaka, Molecular basis of thermophily in hyperthermophile, Workshop of Archaea Research Association, Jeju, Korea, May 9, 2011.
4. Haruyuki Atomi, Identification and characterization of novel enzymes from *Thermococcus kodakarensis*, Workshop of Archaea Research Association, Jeju, Korea, May 10, 2011.
5. Haruyuki Atomi and Tadayuki Imanaka, The unique metabolic pathways of hyperthermophilic archaea, International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, Sapporo, September 7, 2011.
6. Tadayuki Imanaka, Molecular basis of thermophily in hyperthermophile, International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, Sapporo, September 7, 2011.
7. Takaaki Sato, Riku Aono, Akira Nakamura, Yuichi Nishitani, Masahiro Fujihashi, Ayumu Yano, Shosuke Yoshida, Tadayuki Imanaka, Kunio Miki, and Haruyuki Atomi, Novel enzymes involved in pentose metabolism in the Archaea, Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, Toyama, September 14, 2011.
8. Haruyuki Atomi, Hiroya Tomita, Takuya Ishibashi, Yuusuke Yokooji, Tadayuki Imanaka, Biosynthesis and Regulation of Coenzyme A in the Archaea, Molecular Biology of Archaea III, Marburg, Germany, July 4, 2012
9. Tadayuki Imanaka, Hydrogen Production by the Hyperthermophile, *Thermococcus kodakaraensis*, Symposium on Industrial Bioprocess Optimization and Control, Shanghai, August 14, 2012
10. Haruyuki Atomi, Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi, Tadayuki Imanaka, Coenzyme A Biosynthesis in the Archaea, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Daegu, Korea, September 19, 2012
11. Haruyuki Atomi, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, Understanding and Altering the Unique Metabolism of Hyperthermophilic Archaea, International Symposium on Biotechnology for Green Growth, Kobe, October 26, 2012
12. Takaaki Sato, Riku Aono, Masahiro Fujihashi, Yukika Miyamoto, Keiko Kuwata, Eriko Kusaka, Haruo Fujita, Kunio Miki and Haruyuki Atomi, Functional Characterization of Three Ribokinase Homologs on the Genome of the

- Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*, Biotechnology and Chemistry for GREEN GROWTH, Osaka, Japan, March 11, 2013
13. Tamotsu Kanai, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, Biohydrogen Production using a Hyperthermophile, 245th ACS National Meeting, New Orleans, LA, USA, April 9, 2013.
 14. Haruyuki Atomi, Riku Aono, Tadayuki Imanaka, and Takaaki Sato, Archaeal Genes with the Same Names but Different Functions, The Last Frontier of Life: Extremophiles, Jeju, Korea, May 22, 2013.
 15. Tadayuki Imanaka, Genetic studies on the virus-like regions in the genome of hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, The Last Frontier of Life: Extremophiles, Jeju, Korea, May 22, 2013.
 16. Tadayuki Imanaka, Hydrogen Production by the Hyperthermophile, *Thermococcus kodakarensis*, GIM 2013, Cancun, Mexico, June 25, 2013.
 17. Haruyuki Atomi, Riku Aono, Masahiro Fujihashi, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, Takaaki Sato, Studies on Three Archaeal Members of the Ribokinase Family, 17th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology, Hamburg, Germany, July 27, 2013.
 18. Haruyuki Atomi, Yuusuke Yokooji, Tomotsugu Awano, Anja Wilming, Hiroya Tomita, Yuki Makino, Takaaki Sato, and Tadayuki Imanaka, Recent Progress in our Understanding of Nucleotide and Amino Acid Metabolism in *Thermococcus kodakarensis*, Thermophiles 2013, Regensburg, Germany, September 10, 2013.
 19. Haruyuki Atomi, Riku Aono, Masahiro Fujihashi, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, Takaaki Sato, Novel Enzyme Discovery in the Archaea, Enzyme Engineering XXII, Toyama, Japan, September 26, 2013.
 20. Tadayuki Imanaka, Evolution of PCR Enzymes, International Symposium on Biocatalysis and Biosynthetic Engineering 2013, Shanghai, China, November 12, 2013.
 21. Haruyuki Atomi, Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi and Tadayuki Imanaka, Novel enzymes and pathways in the Archaea, The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Taipei, Taiwan, May 7, 2014.
 22. Takaaki Sato, Riku Aono, Sanae Hodo, Yuta Yoshii, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Novel metabolic pathways in Archaea, 2014 Korean Society for Microbiology and Biotechnology International Symposium & Annual Meeting, Busan, Korea, June 26, 2014.
 23. Haruyuki Atomi, Novel enzymes and pathways in the Archaea, 248th ACS National Meeting, San Francisco, USA, August 13, 2014.
 24. *Haruyuki Atomi, Riku Aono, Sanae Hodo, Yuta Yoshii, Tadayuki Imanaka and Takaaki Sato Novel metabolic networks in Archaea, Closing Lecture, Extremophiles 2014, St. Petersburg, Russia, September 11, 2014.
 25. Haruyuki Atomi, Riku Aono, Sanae Hodo, Yuta Yoshii, Tadayuki Imanaka and Takaaki Sato, Nucleoside Degradation Systems in Archaea, Gordon Research Conference 2015, Sunday River, Maine, July, 29, 2015.
 26. Kohsuke Honda "In vitro salvage synthesis of nicotinamide cofactor by thermophilic enzymes." Enzyme Engineering XXIII. St. Petersburg, USA, September 8, 2015.
 27. Haruyuki Atomi, Ko Yoshida, Takuya Shiraishi, Kohei Matsubara, Bettina Siebers, Nuno Borges, Helena Santos, Takaaki Sato, Tamotsu Kanai, Sugar metabolism and its regulation in *Thermococcus kodakarensis*, Thermophiles 2015, Santiago, Chile, August 31, 2015.
 28. Haruyuki Atomi, Ayumi Horiuchi, Savyasachee Jha, Mehwish Aslam, Jan-Robert Simons, Tadayuki Imanaka, Tamotsu Kanai, Engineering the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* to generate hydrogen, The 18th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, Kyoto, September 14, 2015.

29. Haruyuki Atomi, Novel metabolic networks in Archaea, The 30th Anniversary Meeting of KSBB, October 12, Songdo, Korea.
30. Haruyuki Atomi, Regulation of sugar metabolism in Archaea, The International Symposium on Microbial Response, Adaptation and Evolution in the Environment, Tokyo, October 21, 2015.
31. Kohsuke Honda “Construction of in vitro metabolic pathways using thermophilic enzymes.” The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Bangkok, Thailand, November 18, 2015

〈国内〉

32. 跡見晴幸, 第 3 の生物アーキアの特徴的代謝経路, 京都大学微生物科学寄附研究部門主催シンポジウム, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール, 2011 年 6 月 23 日
33. 今中忠行, 超好熱菌の解剖と利用, 生化学若い研究者の会, 第 51 回生命科学, 夏の学校, 筑波大学, 2011 年 9 月 3 日
34. 跡見晴幸, 佐藤喬章, 青野陸, 藤橋雅宏, 中村顕, 西谷優一, 三木邦夫, 今中忠行, 超好熱性アーキアにおけるペントース代謝関連酵素の構造機能解析, 第 84 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 2011 年 9 月 23 日
35. 今中忠行, 新規炭酸固定系酵素群の構造機能解析, 日本生物工学会大会ワークショップ, 東京農工大学, 2011 年 9 月 27 日.
36. 跡見晴幸, 横大路裕介, 富田宏矢, 石橋拓也, 今中忠行, アーキアの補酵素 A 生合成経路とそれから見えてくる代謝進化, 日本農芸化学会 2012 大会, 京都女子大学, 2012 年 3 月 25 日
37. 跡見晴幸, ゲノム情報を基盤とした 微生物代謝・制御機構の解明, 有機合成化学研究所平成 24 年度第 1 回産学共同学習セミナー、京都大学、2012 年 7 月 24 日
38. 跡見晴幸、超好熱菌の解剖, 生命科学の新展開シンポジウム、立命館大学、2012 年 10 月 27 日
39. 金井保、武富尚吾、小谷徹、釜下知之、中之庄正弘、今中忠行、跡見晴幸, 超好熱性アーキアの環境適応に関わる転写調節因子の解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学、2013 年 3 月 27 日
40. 跡見晴幸、栗野知嗣、Anja Wilming、横大路裕介、青野陸、佐藤喬章、金井保、今中忠行, アーキアゲノム上に存在する重複遺伝子の機能解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学、2013 年 3 月 27 日
41. 今中忠行、超好熱菌の耐熱性の秘密、酵素補酵素研究会、立命館大学びわこくさつキャンパス、2013 年 6 月 21 日
42. 跡見晴幸、佐藤喬章、今中忠行、金井保、超好熱菌を対象とした代謝工学、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 30 日
43. 跡見晴幸、アーキアの特異な代謝とその改変、近畿化学協会バイオ部会例会、京都、2014 年 7 月 16 日
44. 今中忠行、微生物研究の基礎科学と産業応用、(公)新化学技術推進協会ライフサイエンス技術部会、東京、2014 年 8 月 29 日
45. 三木邦夫、タンパク質結晶学における量子ビームの連携利用と量子構造生物学、平成 26 年度第 1 回生物構造学研究会、東京都・エッサム神田ホール、2014 年 10 月 3 日
46. 跡見晴幸、山本康之、吉田晃、金関剛史、今中忠行、金井保、超好熱性アーキアにおける新規転写制御因子の同定、第 37 回分子生物学会、横浜、2014 年 11 月 26 日
47. 今中忠行、超好熱菌による廃棄バイオマスからの連続水素生産、平成 26 年度次世代エネルギー研究会第 3 回微細藻類部会、山口県産業技術センター (山口)、2015 年 1 月 21 日
48. 跡見晴幸、青野陸、法土咲菜恵、吉井祐太、今中忠行、佐藤喬章、アーキアにおける核酸分解機構の解明、農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年 3 月 29 日

49. 跡見晴幸、アーキアにおける新規代謝経路の同定、有機合成化学研究所第 30 回講演会、京都、2015 年 11 月 24 日
50. 本田孝祐、耐熱性酵素を用いた *in vitro* 人工代謝経路の構築と有用代謝産物生産への挑戦、日本応用細胞生物学会第 13 回シンポジウム、京都市国際交流会館（京都）、2015 年 12 月 5 日
51. 跡見晴幸、青野陸、法土咲菜恵、吉井祐太、今中忠行、佐藤喬章、アーキアにおける特異なペントース代謝機構、第 10 回ゲノム微生物学会年会シンポジウム、東京、2016 年 3 月 5 日
52. 跡見晴幸、ゲノム情報を基盤とした新規代謝経路の同定、極限環境微生物ゲノム機能開発学最終報告会、福岡、2016 年 3 月 8 日
53. 河野卓成、蘆田弘樹、光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究からの CO₂ 資源化への展開、日本化学会第 96 回春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2015 年 3 月 24 日
54. 跡見晴幸、金関剛史、山本康之、今中忠行、金井保、アーキアにおけるアミノ酸生合成関連遺伝子の発現制御機構、日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌コンベンションセンター、2016 年 3 月 29 日

② 口頭発表 (国内会議 64 件、国際会議 16 件)

〈国際〉

1. Satoshi Watanabe, Takayuki Arai, Rie Matsumi, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka and Kunio Miki, Crystal structures of Hyp protein complexes for [NiFe] hydrogenase maturation, 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, the University of British Columbia, Vancouver, August 7-12, 2011.
2. Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka and Kunio Miki, Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturase complexes, XXII Congress of the International Union of Crystallography, Municipal Conference Centre, Madrid, August 22-30, 2011.
3. Tamotsu Kanai, Ryoji Matsuoka, Haruki Beppu, Akihito Nakajima, Yoshihiro Okada, Haruyuki Atomi and Tadayuki Imanaka, Distinct physiological roles of the three [NiFe]-hydrogenase orthologs in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, Thermophiles2011, Big Sky, Montana, September 11-16, 2011.
4. Haruyuki Atomi, Toru Odani, Tomoyuki Kamashita, Shogo Takedomi, Tadayuki Imanaka and Tamotsu Kanai, Archaeal Transcription Regulators: DNA-binding Proteins with Built-in Sensors, The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kanazawa, May 29, 2012.
5. Haruyuki Atomi, Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi, Tadayuki Imanaka, Biosynthesis and Regulation of Coenzyme A in the Archaea, Biocat2012, Technical University of Hamburg-Harburg, Germany, September 4, 2012.
6. Tamotsu Kanai, Yuki Sakai, Daijiro Ikegami, Takashi Endoh, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi, Methods to Improve Productivity and Applicability of an *in vitro* Translation System using the Lysate of *Thermococcus kodakarensis*, Extremophiles2012, Seville, Spain, September 13, 2012.
7. Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi, Enzymes and Regulation Involved in Archaeal Coenzyme A Biosynthesis, Extremophiles2012, Seville, Spain, September 13, 2012
8. Riku Aono, Takaaki Sato, Ayumu Yano, Shosuke Yoshida, Yuichi Nishitani, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi, Studies on

- Nucleoside/Pentose Metabolism in Archaea, Biotechnology and Chemistry for GREEN GROWTH, Osaka, Japan, March 11, 2013.
9. Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, Studies on the Mechanisms of Coenzyme A Biosynthesis in Archaea, Biotechnology and Chemistry for GREEN GROWTH, Osaka, Japan, March 11, 2013.
 10. Riku Aono, Takaaki Sato, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Novel Kinases Reveal an Atypical Metabolic Network between Nucleosides and the Archaeal AMP Metabolic Pathway, Thermophiles2013, Regensburg, Germany, September 10, 2013.
 11. Takaaki Sato, Masahiro Fujihashi, Yukika Miyamoto, Keiko Kuwata, Eriko Kusaka, Haruo Fujita, Kunio Miki and Haruyuki Atomi, Functional Characterization of Ribokinase Family Proteins in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*, Thermophiles2013, Regensburg, Germany, September 10, 2013.
 12. Tamotsu Kanai, Yasuyuki Yamamoto, Tsuyoshi Kanaseki, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi, Genome-wide screening to identify novel transcriptional regulators from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, Extremophiles2014, Saint Petersburg, Russia, September 8, 2014.
 13. Kohsuke Honda, Construction of in vitro artificial metabolic pathway with thermophilic enzymes, The 13th China Japan Korea Enzyme Engineering Conference, Jeju, Korea, November 17, 2014.
 14. Haruyuki Atomi, Ayumi Horiuchi, Naoya Takahashi, Mehwish Aslam, Savyasachee Jha, Natsuki Nakada, Tamotsu Kanai and Tadayuki Imanaka, The 13th China Japan Korea Enzyme Engineering Conference, Jeju, Korea, November 17, 2014.
 15. Haruyuki Atomi, Riku Aono, Sanae Hodo, Yuta Yoshii, Tadayuki Imanaka and Takaaki Sato, Active Enzyme Molecule 2014, Toyama, Japan, December 19, 2014.
 16. Jan-Robert Simons, Tamotsu Kanai and Haruyuki Atomi, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem), Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2015.

〈国内〉

17. 石橋拓也, 富田宏矢, 横大路裕介, 森北達弥, 渡辺文太, 平竹潤, 今中忠行, 跡見晴幸, Archaea の補酵素 A 生合成に関わる新規酵素 phosphopantothenate synthetase の酵素学的解析, 日本アーキア研究会第24回講演会, 慶應義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス, 2011年9月3日
18. 青野陸, 中村頭, 佐藤喬章, 藤橋雅宏, 矢野歩, 吉田昭介, 今中忠行, 三木邦夫, 跡見晴幸, アーキア特異的な AMP 代謝経路を構成する新規酵素の解析, 日本アーキア研究会第24回講演会, 慶應義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス, 2011年9月3日
19. Seohyun Lee, Tamotsu Kanai, and Haruyuki Atomi, Elucidation of the functions of the ArsR transcription regulators in *Thermococcus kodakarensis*, Extremophiles (極限環境生物学会), Nagasaki, November 28, 2011.
20. 松原正晃, 福田青郎, 石井浩子, 松宮芳樹, 跡見晴幸, 今中忠行, 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるペントース代謝経路の改変, 日本アーキア研究会第24回講演会, 慶應義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス, 2011年9月3日
21. 東海林寿久, 藤村早野, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の有する転写制御因子の網羅的解析, 日本アーキア研究会第24回講演会, 慶應義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス, 2011年9月3日

22. 田頭健太, 松原正晃, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の有するウイルス様領域に関する研究, 日本アーキア研究会第24回講演会, 慶應義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス, 2011年9月3日
23. 櫛田卓志, 倉内康行, 鳴海一成, 藤原伸介, 今中忠行, 東端啓貴, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の DNA polymerase B は細胞の生育に必須ではない, 日本農芸化学会 2012 大会, 京都女子大学, 2012年3月23日
24. 野原健太, 折田和泉, 中村聡, 今中忠行, 福居俊昭, 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* での水素発生に関与するピルビン酸酸化経路の解析, 日本農芸化学会 2012 大会, 京都女子大学, 2012年3月24日
25. 長岡英里子, 島田陽子, 福田青郎, 今中 忠行, 藤原 伸介, 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼの系統学的及び遺伝学的解析, 日本農芸化学会 2012 大会, 京都女子大学, 2012年3月24日
26. 山下敬太, 秀瀬涼太, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介, 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の水素・硫化水素発生を調節する転写因子の機能解析, 日本農芸化学会 2012 大会, 京都女子大学, 2012年3月24日
27. 秀瀬涼太, 牛村友一, 高楽, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介, 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の二つの転写開始因子 TK1280 と TK2287 の生理機能解析, 日本農芸化学会 2012 大会, 京都女子大学, 2012年3月24日
28. 青木俊, 大西優介, 秀瀬涼太, 細川桂一, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介, 超好熱始原菌のリボソーム画分に存在する高温依存的なタンパク質の解析, 日本農芸化学会 2012 大会, 京都女子大学, 2012年3月24日
29. 足立恭子, 折田和泉, 中村聡, 今中忠行, 福居俊昭, 相同性組換えによる超好熱始原菌ランダム変異法の確立, 日本農芸化学会 2012 大会, 京都女子大学, 2012年3月25日
30. 青野陸, 佐藤喬章, 矢野歩, 吉田昭介, 西谷優一, 三木邦夫, 今中忠行, 跡見晴幸, アーキア特異的 AMP 代謝経路を構成する新規酵素の *in vitro* 解析, 環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会, 京都大学, 2012年6月26日
31. 片野正展, 清中茂樹, 跡見晴幸, 森泰生, 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の Zn^{2+} 及び Co^{2+} 輸送に関わるトランスポーターの生理的意義の解明, アーキア研究会、関西学院大学, 2012年7月21日
32. 石井 尊, 福田 青郎, 藤村 早野, 東海林 寿久, 金井 保, 跡見 晴幸, 今中 忠行, 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるストレス応答に関与する転写制御因子の解析, アーキア研究会、関西学院大学, 2012年7月21日
33. 岩前 幸三, 福田 青郎, 藤村 早野, 東海林 寿久, 金井 保, 跡見 晴幸, 今中 忠行, 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の有するキチン代謝関連転写調節因子の解析, 日本アーキア研究会、関西学院大学, 2012年7月21日
34. 金井保, 小谷徹, 釜下知之, 今中忠行, 跡見晴幸, 超好熱性アーキアにおける熱ショック応答転写制御因子の機能解析, 第 64 回日本生物工学会大会, 神戸国際会議場, 2012年10月24日
35. 山本康之, 金井保, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* ゲノムからの新規転写制御因子 の同定, 第 64 回日本生物工学会大会, 神戸国際会議場, 2012年10月24日
36. 牧野勇樹, 佐藤喬章, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における Ser/Cys/Met 生合成経路の解明, 第13回極限環境生物学会、日本大学文理学部, 2012年12月2日
37. 佐藤 喬章, 藤橋 雅宏, 宮本 幸花, 三木 邦夫, 跡見 晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来リボキナーゼファミリータンパク質 TK2285 の機能解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学, 2013年3月25日
38. 間宮 淳子, 折田 和泉, 中村 聡, 今中 忠行, 福居 俊昭, 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* におけるキチン資化能の強化およびその水素生産への応

- 用, 日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学、2013 年 3 月 25 日
39. 井上 貴央、青木 俊、秀瀬 涼太、細川 桂一、跡見 晴幸、今中 忠行、藤原 伸介、超好熱性アーキアのリボソーム画分に存在する熱ショックタンパク質の機能解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学、2013 年 3 月 25 日
 40. 川妻 孝平、秀瀬 涼太、今中 忠行、藤原 伸介、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の水素・硫化水素発生に関わる転写因子 Tk-SurR の転写制御機構, 日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学、2013 年 3 月 25 日
 41. 佐藤 喬章、青野 陸、藤橋 雅宏、宮本 幸花、桑田 啓子、日下 絵里子、藤田 春雄、三木 邦夫、今中 忠行、跡見 晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における 3 つの ribokinase family タンパク質の機能解析, 日本 Archaea 研究会第 26 回講演会、東京工業大学、2013 年 7 月 20 日
 42. 西川 諒、秀瀬涼太、今井友裕、片野正展、加藤知、金井保、跡見晴幸、今中忠行、藤原伸介、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の二つの Transcription factor B の役割, 日本 Archaea 研究会第 26 回講演会、東京工業大学、2013 年 7 月 20 日
 43. 秀瀬涼太、川妻孝平、今中忠行、藤原伸介、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の水素・硫化水素発生に関わる転写因子 Tk-SurR の転写調節機構, 日本 Archaea 研究会第 26 回講演会、東京工業大学、2013 年 7 月 20 日
 44. 内田圭亮、福田青郎、藤村早野、東海林寿久、金井保、跡見晴幸、今中忠行、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* における鉄代謝関連転写制御因子群の解析, 日本 Archaea 研究会第 26 回講演会、東京工業大学蔵前会館 ロイヤルブルーホール、2013 年 7 月 20 日
 45. 秋山貴志、姫野敦士、遠藤毅、廣崎賢、根岸留美、折田和泉、林宣宏、中村聡、今中忠行、福居俊昭、*Thermococcus kodakarensis* におけるプロテオームおよびタンパク質リン酸化ネットワークの解析, 日本 Archaea 研究会第 26 回講演会、東京工業大学、2013 年 7 月 20 日
 46. 田頭健太、福田青郎、金井保、跡見晴幸、今中忠行、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* のウイルス様領域とトリプトファン生合成の関係, 日本 Archaea 研究会第 26 回講演会、東京工業大学、2013 年 7 月 20 日
 47. 東端啓貴、櫛田卓志、鳴海一成、藤原伸介、今中忠行、*Thermococcus kodakarensis* $\Delta polB$ 株の DNA 損傷ストレス感受性と相補実験, 日本 Archaea 研究会第 26 回講演会、東京工業大学、2013 年 7 月 20 日
 48. 福家翼、Tansengco MYRA、佐藤喬章、跡見晴幸、アーキアのイソプレノイド合成能を利用したバイオ燃料の合成、日本化学会 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学 東山キャンパス、2013 年 9 月 27-29 日
 49. 山本康之、金井保、跡見晴幸、超好熱菌ゲノムからの新規転写制御因子の同定法, 日本化学会第 7 回バイオ関連化学シンポジウム 名古屋大学 東山キャンパス、2013 年 9 月 27-29 日
 50. 堀内あゆみ、高橋直哉、金井保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における chitin 高分解・高資化性株の分子育種、第 14 回極限環境生物学会、明治大学生田キャンパス、2013 年 10 月 26-27 日
 51. 竹野領、佐藤喬章、牧野勇樹、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が有する 3-phosphoglycerate dehydrogenase homolog の解析、日本農芸化学会関西支部会 第 483 回講演会、京都大学楽友会館、2014 年 2 月 1 日
 52. 高田大輔、佐藤喬章、伊藤隆、大熊盛也、跡見晴幸、アーキアにおける大規模 DNA 組換え系の構築、第 8 回 日本ゲノム微生物学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2014 年 3 月 7-9 日
 53. 野村宜成、坂本香織、秋山貴志、折田和泉、中村聡、今中忠行、福居俊昭、超好熱菌 chitin 代謝遺伝子群の発現調節に関与する機能未知タンパク質の解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 28 日

54. 二石涼平、足立恭子、野原健太、折田和泉、中村聡、今中忠行、福居俊昭、新規ランダム変異法による超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 温度感受性株の単離とその解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 28 日
55. 井上貴央、岡田和真、秀瀬涼太、今中忠行、藤原伸介、超好熱菌の長鎖・分岐型ポリアミンの翻訳促進効果、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 28 日
56. 岡田和真、秀瀬涼太、今中忠行、藤原伸介、超好熱菌の分岐鎖ポリアミン合成酵素の役割、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 29 日
57. 三浦歌織、藤原綾子、秀瀬涼太、今中忠行、藤原伸介、安定性の異なる *trpC* 遺伝子の置換が超好熱菌の生育に及ぼす影響、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 29 日
58. 青野陸、佐藤喬章、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるスクレオシド代謝の解明、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、2014 年 3 月 30 日
59. 福田青郎、内田圭亮、Abdul Aziz Jaziri、石井尊、岩前幸三、金井保、跡見晴幸、今中忠行、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子遺伝子の破壊日本 Archaea 研究会第 27 回講演会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2014 年 7 月 25 日
60. 内田圭亮、福田青郎、石井尊、宮崎恵里、三好史高、金井保、跡見晴幸 2、今中忠行超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* のストレス応答に関する転写制御因子の解析、日本 Archaea 研究会第 27 回講演会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2014 年 7 月 25 日
61. 肥山貴圭、佐藤喬章、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における tryptophan synthase β -paralog *trpB2* の機能解明、日本 Archaea 研究会第 27 回講演会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2014 年 7 月 25 日
62. 金井保、藤本理夏子、徳原将弘、布浦拓郎、橘高瑞奈、高木善弘、高見英人、高井研、跡見晴幸、未培養好熱性アーキア *Caldiarchoaeum subterraneum* がもつユビキチン様遺伝子の機能解析、日本 Archaea 研究会第 27 回講演会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2014 年 7 月 25 日
63. 吉田晃、山本康之、金井保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規糖代謝関連転写制御因子 TK1494 の機能解析、第 15 回極限環境生物学会、沖縄県今帰仁村コミュニティーセンター、2014 年 11 月 2 日
64. 蘆田弘樹、光合成炭素固定酵素の機能進化、環境変動の生態・生理学に関する研究会、神戸大学、2015 年 3 月 16 日
65. 原 直矢、中村安奈、万袋木麻子、本田孝祐、岡野憲司、大竹久夫、In vitro 代謝工学を用いた NAD⁺サルベージ経路の構築、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年 3 月 27 日
66. 堀内あゆみ、高橋直哉、Savyasachee Jha、金井 保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のキチン高分解・資化性株の創成、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年 3 月 27 日
67. 佐藤喬章、法土咲菜恵、吉井祐太、跡見晴幸、好塩性アーキアにおける新規糖代謝経路の解明、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学、2015 年 3 月 27 日
68. 白石拓也、松原光平、佐藤喬章、Bettina Siebers、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における多糖分解経路の解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学、2015 年 3 月 27 日
69. 福田青郎、内田圭亮、JAZIRI Abdul Aziz、市村瑞葉、何あゆみ、金井保、跡見晴

- 幸、今中忠行、“超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子”、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学、2015 年 3 月 28 日
70. 佐藤喬章、法土咲菜恵、吉井祐太、野口綾子、真鍋良幸、深瀬浩一、跡見晴幸、好塩性アーキアにおける新規糖代謝経路の同定、日本 Archaea 研究会、愛媛大学、2015 年 7 月 23 日
71. 福田 青郎、内田 圭亮、Abdul Aziz Jaziri、市村 瑞葉、何 あゆみ、金井 保、跡見晴幸、今中 忠行、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子の解析、日本 Archaea 研究会、愛媛大学、2015 年 7 月 23 日
72. 相川佳紀、西谷優一、富田宏矢、跡見晴幸、三木邦夫、超好熱性始原菌における補酵素 A 合成経路のフィードバック阻害機構、平成 26 年度日本生物高分子学会年会、香川大学幸町キャンパス、2015 年 9 月 19-20 日
73. 佐藤喬章、超好熱性アーキアにおける新規ペントース代謝経路の同定、第 16 回極限環境生物学会、東京海洋大学 品川キャンパス、2015 年 11 月 9 日
74. 吉井祐太、法土咲菜恵、佐藤喬章、野口綾子、真鍋良幸、深瀬浩一、跡見晴幸、好塩性アーキアにおける新規糖代謝経路の同定、第 16 回極限環境生物学会、東京海洋大学 品川キャンパス、2015 年 11 月 9 日
75. 金関剛史、山本康之、今中忠行、金井保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるヒスチジン生合成経路の転写調節機構の解明、第 16 回極限環境生物学会、東京海洋大学 品川キャンパス、2015 年 11 月 9 日
76. 福田青郎、内田圭亮、Abdul Aziz Jaziri、市村瑞葉、何あゆみ、金井保、跡見晴幸、今中忠行、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子の解析、第 16 回極限環境生物学会年、東京海洋大学・品川キャンパス、2015 年 11 月 9 日
77. 川村弘樹、牧野勇樹、佐藤喬章、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 serine kinase の機能解析、日本農芸化学会関西支部 第 493 回 講演会、京都大学楽友会館、2016 年 2 月 6 日
78. Mehwish Aslam, Ayumi Horiuchi, Naoya Takahashi, Jan-Robert Simons, Savyasachee Jha, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Development of a chitin-assimilating strain of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, 日本化学会 第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日
79. 金井保、Jan-Robert Simons、塚本遼平、中島昭人、大森良幸、松岡亮伺、別府春樹、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の水素高生産株の分子育種、日本化学会 第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日
80. Haruyuki Atomi, Yuuta Yoshii, Sanae Hodo, Ayako Noguchi, Yoshiyuki Manabe, Koichi Fukase, Takaaki Sato, A novel pathway involved in pentose metabolism in halophiles、日本化学会 第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日

③ポスター発表 (国内会議 83 件、国際会議 22 件)

〈国際〉

1. Hiroya Tomita, Takuya Ishibashi, Yuusuke Yokooji, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, Characterization of pantoate kinase, a novel enzyme necessary for CoA biosynthesis in the archaea, Thermophiles2011, Big Sky, Montana, September 11-16, 2011.
2. Wakao Fukuda, Masaaki Matsubara, Hiroko Ishii, Yoshiki Matsumiya, Haruyuki Atomi and Tadayuki Imanaka, Alteration of pentose metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, Thermophiles2011, Big Sky, Montana, September 11-16, 2011.
3. Haya Fujimura, Wakao Fukuda, Masaaki Matsubara, Tyuei Matsudo, Noriko Taki, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, Genetic Studies on transcriptional regulators from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus*

- kodakarensis*, Thermophiles2011, Big Sky, Montana, September 11-16, 2011.
4. Shinsuke Fujiwara, Takeaki Masuda, Nanako Morimoto, Nanami Najkajima, Wakao Fukuda, Tairo Oshima and Tadayuki Imanaka, Synthetic pathways of longer/branched chain polyamines in hyperthermophile. Thermophiles2011, Big Sky, Montana, September 11-16, 2011.
 5. Kenta Tagashira, Masaaki Matsubara, Wakao Fukuda, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi and Tadayuki Imanaka, Genetic studies on the virus-like regions in the genome of hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, Thermophiles2011, Big Sky, Montana, September 11-16, 2011.
 6. Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, Crystal Structures of the HypCD and HypCDE Transient Complexes for [NiFe] Hydrogenase Maturation, 2012 American Crystallographic Association Annual Meeting, Boston, The Westin Boston Waterfront Hotel, July 28-August 1, 2012
 7. Riku Aono, Takaaki Sato, Ayumu Yano, Shosuke Yoshida, Yuichi Nishitani, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Enzymatic Characterization of AMP phosphorylase and Ribose-1,5-bisphosphate Isomerase Functioning in an Archaeal AMP Metabolic Pathway, Extremophiles2012, Seville, Spain, September 10-13, 2012
 8. Takaaki Sato, Akira Nakamura, Riku Aono, Masahiro Fujihashi, Yosuke Nishiba, Shosuke Yoshida, Ayumu Yano, Tadayuki Imanaka, Kunio Miki and Haruyuki Atomi, Dynamic, ligand-dependent conformational change triggers the reaction of ribose-1,5-bisphosphate isomerase from *Thermococcus kodakarensis*, Extremophiles2012, Seville, Spain, September 10-13, 2012
 9. Yuichi Nishitani, Riku Aono, Akira Nakamura, Takaaki Sato, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, Structure analysis of archaeal AMP phosphorylase reveals a unique mode of multimerization, 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology, Nagoya, Japan, May 26-29, 2013
 10. Tamotsu Kanai, Naoya Takahashi, Ayumi Horiuchi, Haruyuki Atomi, Molecular breeding of the chitin-degradation pathway of a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, 10th Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium, Yonago, Japan, October 4-8, 2013
 11. Takaaki Sato, Riku Aono, Masahiro Fujihashi, Yukika Miyamoto, Keiko Kuwata, Eriko Kusaka, Haruo Fujita, Kunio Miki, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Functional characterization of three ribokinase family proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, American Society for Microbiology 114th General Meeting, Boston, USA, May 18, 2014.
 12. Tamotsu Kanai, Ayako Yasukochi, Daisuke Sasaki, Satoshi Watanabe, Rie Matsumi, Toshihisa Shoji, Kenta Tagashira, Wakao Fukuda, Tadayuki Imanaka, Kunio Miki and Haruyuki Atomi, Studies on the maturation process of [NiFe] hydrogenases in *Thermococcus kodakarensis*, Molecular Biology of Archaea 4, Paris, France, May 19, 2014.
 13. Ryuhei Nagata, Masahiro Fujihashi, Takaaki Sato, Haruyuki Atomi, Kunio Miki, Structural studies of *myo*-inositol kinase, The 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Montreal, Canada, August 5-12, 2014.
 14. Akiko Kita, Asako Kishimoto, Takuya Ishibashi, Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi, Kunio Miki, Crystal structure of archaeal phosphopantothenate synthetase, The 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Montreal, Canada, August 5-12, 2014.
 15. Riku Aono, Takaaki Sato, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, Studies on nucleoside/nucleotide metabolism in the hyperthermophilic archaeon

- Thermococcus kodakarensis*, Extremophiles 2014, St. Petersburg, Russia, September 8, 2014.
16. Jan-Robert Simons, Tamotsu Kanai and Haruyuki Atomi, Increasing H₂ production in *Thermococcus kodakarensis* via genetic engineering, Active Enzyme Molecule 2014, Toyama, Japan, December 17, 2014.
 17. Takaaki Sato, Yuki Makino, Hiroki Kawamura, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Identification of a novel cysteine biosynthetic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, American Society for Microbiology 115th General Meeting, New Orleans, USA, May 30-June 2, 2015.
 18. Yuichi Nishitani, Ayumi Horiuchi, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, and Kunio Miki, Structural studies of a novel type of chitinase from archaea, The 29th European Crystallographic Meeting, Rovinj, Croatia, August 23-28, 2015.
 19. Kenji Okano, Kohsuke Honda, and Hisao Ohtake, In vitro metabolic engineering employing thermophilic enzymes –a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway, 20th Young Asian Biochemical Engineers' Community Symposium (YABEC) 2014, Chaiyi, Taiwan, November 7, 2014.
 20. Riku Aono, Takaaki Sato, Tadayuki Imanaka and Haruyuki Atomi, Studies on nucleoside degradation in Archaea, 13th International meeting on Thermophiles, Santiago, Chile, September 1, 2015.
 21. Jan-Robert Simons, Tamotsu Kanai and Haruyuki Atomi, Overexpression of an A₁-ATPase in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* increases cell-specific H₂ production, The 18th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, Kyoto, Japan, September 14, 2015.
 22. Takaaki Sato, Yuki Makino, Hiroki Kawamura, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Identification of a novel cysteine biosynthetic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, The 18th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, Kyoto, Japan, September 14, 2015.

〈国内〉

23. 渡部聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 Hyp タンパク質の過渡的相互作用の構造基盤, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, ホテル阪急エキスポパーク, 2011 年 6 月 7-9 日
24. 金井保, 武富尚吾, 村上平, 中之庄正弘, 藤原伸介, 跡見晴幸, 今中忠行, 超好熱性アーキアのトランスクリプトーム解析, 京都大学微生物科学寄附研究部門 主催シンポジウム, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール, 2011 年 6 月 23 日
25. 横大路裕介, 富田宏矢, 跡見晴幸, 今中忠行, アーキアにおける新しい coenzyme A 生合成経路, 京都大学微生物科学寄附研究部門 主催シンポジウム, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール, 2011 年 6 月 23 日
26. 富田宏矢, 石橋拓也, 横大路裕介, 今中忠行, 跡見晴幸, アーキアにおける coenzyme A 生合成に関与する pantoate kinase の機能解析, 京都大学微生物科学寄附研究部門 主催シンポジウム, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール, 2011 年 6 月 23 日
27. 石橋拓也, 富田宏矢, 横大路裕介, 今中忠行, 跡見晴幸, アーキアにおける coenzyme A 生合成に関与する phosphopantothenate synthetase の機能解析, 京都大学微生物科学寄附研究部門 主催シンポジウム, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール, 2011 年 6 月 23 日
28. 青野陸, 佐藤喬章, 矢野歩, 吉田昭介, 中村頭, 三木邦夫, 今中忠行, 跡見晴幸, AMP 代謝に関わる新規酵素 ribose-1,5-bisphosphate isomerase の機能解析, 京都大学微生物科学寄附研究部門 主催シンポジウム, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール, 2011 年 6 月 23 日
29. 佐藤喬章, 青野陸, 今中忠行, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus*

- kodakarensis*におけるペントース代謝の解析, 京都大学微生物科学寄附研究部門 主催シンポジウム, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール, 2011年6月23日
30. 佐々木大輔, 渡部聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypB の結晶構造解析, 第28回 PF シンポジウム, つくば国際会議場, 2011年7月12-13日
 31. 佐々木大輔, 渡部聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypB の構造機能解析, 平成23年度日本結晶学会年会, 北海道大学, 2011年11月24-25日
 32. 富永大河, 渡部聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, ヒドロゲナーゼ成熟化に關与する HypF の結晶学的研究, 平成23年度日本結晶学会年会, 北海道大学, 2011年11月24-25日
 33. 石橋拓也, 富田宏矢, 横大路裕介, 森北達弥, 渡辺文太, 平竹潤, 今中忠行, 跡見晴幸, 補酵素 A 生合成に關与する Archaea 特有の新規酵素 phosphopantothenate synthetase の酵素学的特性の解明, 極限環境生物学会, 長崎大学 坂本キャンパス1良順会館, 2011年11月27日
 34. 小谷徹, 金井保, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における糖代謝關連転写制御因子 Tgr の機能解析, 極限環境生物学会, 長崎大学 坂本キャンパス1良順会館, 2011年11月27日
 35. 山本康之, 金井保, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のゲノム配列からの新規転写制御因子の同定, 極限環境生物学会, 長崎大学 坂本キャンパス1良順会館, 2011年11月27日
 36. 坂井祐樹, 金井保, 跡見晴幸, 高温で機能する *in vitro* 転写・翻訳反応系の構築, 極限環境生物学会, 長崎大学 坂本キャンパス1良順会館, 2011年11月28日
 37. 佐藤喬章, 青野陸, 中村頭, 西谷優一, 藤橋雅宏, 矢野歩, 吉田昭介, 今中忠行, 三木邦夫, 跡見晴幸, Archaea 特異的 AMP 代謝経路の生理的機能の解明, 極限環境生物学会, 長崎大学 坂本キャンパス1良順会館, 2011年11月28日
 38. 佐々木大輔, 渡部聡, 松見理恵, 東海林寿久, 安河内綾子, 田頭健太, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に關与する 新規 HypB の同定と構造解析, 第29回 PF シンポジウム, つくば国際会議場, 2012年3月15-16日
 39. 岸本麻子, 喜田昭子, 石橋拓也, 富田宏矢, 横大路裕介, 跡見晴幸, 三木邦夫, 超好熱性アーキアのホスホパントテン酸合成酵素の結晶構造, 第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 2012年6月20-22日
 40. 富永大河, 渡部聡, 松見理恵, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質 HypF の結晶構造, 第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 2012年6月20-22日
 41. 佐々木大輔, 渡部聡, 松見理恵, 東海林寿久, 安河内綾子, 田頭健太, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化を担う新規な HypB の同定と構造, 第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 2012年6月20-22日
 42. 安河内綾子, 金井保, 東海林寿久, 田頭健太, 福田青郎, 今中忠行, 跡見晴幸, 超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* における HypB ホモログの同定, 環境バイオテクノロジー学会 2012年度大会, 京都大学, 2012年6月26日
 43. 岸本麻子, 喜田昭子, 石橋拓也, 富田宏矢, 横大路裕介, 跡見晴幸, 三木邦夫, 超好熱性アーキア由来ホスホパントテン酸合成酵素の結晶構造解析, 平成24年度日本結晶学会年会, 東北大学片平キャンパス, 2012年10月25-26日
 44. 富田宏矢, 横大路裕介, 石橋拓也, 今中忠行, 跡見晴幸, アーキアの補酵素 A 生合成に關する酵素学的解析および制御機構の解明, 第13回極限環境生物学会, 日本大学文理学部, 2012年12月1-2日

45. 井上 貴央、青木 俊、秀瀬 涼太、細川 桂一、跡見 晴幸、今中 忠行、藤原 伸介、超好熱性アーキアのリボソーム画分に存在する熱ショックタンパク質の機能解析、第 85 回日本生化学会大会、マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 14-16 日
46. 金井保、塚本遼平、安河内綾子、今中忠行、跡見晴幸、超好熱菌の水素高生産株の分子育種、第7回ゲノム微生物学会大会、長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日
47. 跡見晴幸、富田宏矢、横大路裕介、石橋拓也、今中忠行、アーキアにおける補酵素 A の生合成とその制御、第7回ゲノム微生物学会大会、長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日
48. 佐藤喬章、藤橋雅宏、宮本幸花、桑田啓子、日下絵里子、藤田春雄、三木邦夫、跡見 晴幸、超好熱性アーキア由来 ribokinase family タンパク質の機能解析、第7回ゲノム微生物学会大会、長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日
49. 岸本麻子、喜田昭子、石橋拓也、富田宏矢、横大路裕介、跡見晴幸、三木邦夫、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来ホスホパントテン酸合成酵素の結晶構造、第 1 回物構研サイエンスフェスタ、つくば国際会議場、2013 年 3 月 14 - 15 日
50. 金井保、塚本遼平、安河内綾子、今中忠行、跡見晴幸、超好熱菌の水素高生産株の分子育種、日本化学会第 93 春季年会、立命館大学、2013 年 3 月 22-25 日
51. 跡見晴幸、富田宏矢、横大路裕介、石橋拓也、今中忠行、アーキアの補酵素 A 生合成機構、日本化学会第 93 春季年会、立命館大学、2013 年 3 月 22-25 日
52. 金井保、塚本遼平、安河内綾子、今中忠行、跡見晴幸、超好熱菌の水素高生産株の分子育種、環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会、北九州国際会議場、2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日
53. 富田宏矢、横大路裕介、石橋拓也、今中忠行、跡見晴幸、アーキアにおける補酵素 A 生合成の制御機構の解明とその利用、環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会、北九州国際会議場、2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日
54. 岸本麻子、喜田昭子、石橋拓也、富田宏矢、横大路裕介、跡見晴幸、三木邦夫、超好熱性アーキア由来ホスホパントテン酸合成酵素基質複合体の X 線結晶構造解析、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館、2013 年 6 月 12-14 日
55. 日比真仁、竹田一旗、高橋直哉、金井保、跡見晴幸、三木邦夫、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来キチン分解酵素が有するキチン結合ドメインの構造解析、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館、2013 年 6 月 12-14 日
56. 西谷優一、青野陸、佐藤喬章、跡見晴幸、今中忠行、三木邦夫、超好熱始原菌由来 AMP phosphorylase の基質認識、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館、2013 年 6 月 12-14 日
57. 岸本麻子、喜田昭子、石橋拓也、富田宏矢、横大路裕介、跡見晴幸、三木邦夫、*Thermococcus kodakarensis* 由来ホスホパントテン酸合成酵素の基質複合体の結晶構造解析、第 86 回日本生化学会大会、パンフィコ横浜、2013 年 9 月 11-13 日
58. 佐藤 喬章、牧野 勇樹、今中 忠行、跡見 晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 ADP-dependent Ser kinase の同定、第 65 回日本生物工学会、広島国際会議場、2013 年 9 月 18-20 日
59. 金井保、安河内綾子、東海林寿久、田頭健太、福田青郎、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子の遺伝学的解析、第 65 回日本生物工学会、広島国際会議場、2013 年 9 月 18-20 日
60. 吉田晃、金井保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるレポーター遺伝子を用いた転写活性測定系の構築、第 65 回日本生物工学会、広島国際会議場、2013 年 9 月 18-20 日
61. 井上貴央、秀瀬涼太、岡田和真、福田青郎、今中忠行、藤原伸介、長鎖・分岐型ポリアミン添加による高温下での無細胞翻訳系の高効率化、第 65 回日本生物工学会、広島国際会議場、2013 年 9 月 18-20 日
62. 肥山貴圭、佐藤喬章、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における *trpB2* の機能解明、第 65 回日本生物工学会、広島国際会議場、

2013年9月18-20日

63. 西谷優一、青野 陸、佐藤喬章、跡見晴幸、今中忠行、三木邦夫、超好熱始原菌由来 AMP phosphorylase の幅広い基質認識機構、平成 25 年度日本結晶学会年会、熊本大学黒髪南地区、2013 年 10 月 12-13 日
64. 永田隆平、藤橋雅宏、佐藤喬章、跡見晴幸、三木邦夫、myo-inositol kinase の基質認識機構、平成 25 年度日本結晶学会年会、熊本大学黒髪南地区、2013 年 10 月 12-13 日
65. 佐藤 喬章、牧野 勇樹、川村 弘樹、今中 忠行、跡見 晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 Cys 生合成経路の同定、第 14 回極限環境生物学会、明治大学生田キャンパス、2013 年 10 月 26-27 日
66. 金井保、安河内綾子、東海林寿久、田頭健太、福田青郎、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子の遺伝学的解析、第 14 回極限環境生物学会、明治大学生田キャンパス、2013 年 10 月 26-27 日
67. 肥山貴圭、佐藤喬章、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における *trpB2* の機能解明、京都大学微生物科学寄附研究部門主催 第二回シンポジウム「微生物科学研究の多様性と新展開」、京都大学 北部総合教育研究棟 益川ホール、2013 年 11 月 8 日
68. 吉田晃、金井保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるレポーター遺伝子を用いた転写活性測定系の構築、京都大学微生物科学寄附研究部門主催 第二回シンポジウム「微生物科学研究の多様性と新展開」、京都大学 北部総合教育研究棟 益川ホール、2013 年 11 月 8 日
69. 佐藤 喬章、牧野 勇樹、川村 弘樹、今中 忠行、跡見 晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 Cys 生合成経路の同定、第 8 回 日本ゲノム微生物学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2014 年 3 月 7-9 日
70. 永田隆平、藤橋雅宏、佐藤喬章、跡見晴幸、三木邦夫、イノシトールリン酸化酵素の構造学的研究、物構研サイエンスフェスタ 2013、つくば国際会議場、2014 年 3 月 18-19 日
71. 岡野憲司、朱倩沁、本田孝祐、大竹久夫、In vitro 代謝工学による非リン酸化型 Entner-Doudoroff 経路の構築および乳酸生産への応用、日本生物工学会第 66 回大会、札幌コンベンションセンター、2014 年 9 月 9 日
72. Xiaoyu Bei、Ninh Huynh Pham、本田孝祐、岡野憲司、大竹久夫、Multiple-gene-expression of thermophilic enzymes for one-step construction of in vitro metabolic pathway、日本生物工学会第 66 回大会、札幌コンベンションセンター、2014 年 9 月 9 日
73. 嶋田大起、橋本崇大、岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、In vitro 代謝工学によるコハク酸生産、日本生物工学会第 66 回大会、札幌コンベンションセンター、2014 年 9 月 9 日
74. 川村弘樹、牧野勇樹、佐藤喬章、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 serine kinase の機能解析、日本生物工学会、札幌、2014 年 9 月 9 日
75. 西川諒、籠谷さやか、Nobi Sahara Tatit、秀瀬涼太、今中忠行、藤原伸介、“超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導機構”、第 66 回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター（北海道）、2014 年 9 月 10 日
76. 三浦歌織、藤原綾子、秀瀬涼太、今中忠行、藤原伸介、“安定性の異なる *trpC* 遺伝子の置換が超好熱菌の生育に及ぼす影響”、第 66 回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター（北海道）、2014 年 9 月 10 日
77. 金関剛史、山本康之、今中忠行、金井保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における芳香族アミノ酸生合成経路の転写制御機構の解明、日本生物工学会、札幌、2014 年 9 月 10 日
78. 吉井祐太、法土咲菜恵、佐藤喬章、跡見晴幸、好塩性アーキアにおける新規糖代謝経路の同定、日本生物工学会、札幌、2014 年 9 月 10 日

79. 佐藤喬章, 青野陸, 藤橋雅宏, 宮本幸花, 桑田啓子, 日下絵里子, 藤田春雄, 三木邦夫, 今中忠行, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における ribokinase family タンパク質の機能解明、日本生物工学会、札幌、2014年9月10日
80. 高楽, 今中忠行, 藤原伸介, “超好熱菌の低温適応に必要な分子シャペロニンのアミノ酸置換”、第66回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター(北海道)、2014年9月11日
81. 井上貴央, 秀瀬涼太, 岡田和真, 福田青郎, 今中忠行, 藤原伸介, “長鎖・分岐型ポリアミン添加による高温下での無細胞翻訳系の高効率化”、第66回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター(北海道)、2014年9月11日
82. Takumi Kawashima, Satoshi Watanabe, Yuichi Nishitani, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, and Kunio Miki, Studies on intermediate HypAB complexes for Ni insertion during [NiFe] hydrogenase maturation, 第52回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター、2014年9月25-27日
83. 永田隆平, 藤橋雅宏, 佐藤喬章, 跡見晴幸, 三木邦夫, 立体構造に基づくイノシトールリン酸化酵素の基質認識機構と生成物の解明、第87回日本生化学会大会、京都国際会館、2014年10月15-18日
84. 相川佳紀, 西谷優一, 富田宏矢, 跡見晴幸, 三木邦夫, 始原菌由来 ketopantoate reductase の補酵素 A による負のフィードバック制御の構造基盤、第87回日本生化学会大会、京都国際会館、2014年10月15-18日
85. 河島拓未, 渡部 聡, 西谷優一, 金井 保, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関する HypAB 複合体の X 線結晶構造解析、平成26年度日本結晶学会年会、東京大学本郷キャンパス、2014年11月1-3日
86. 永田隆平, 藤橋雅宏, 佐藤喬章, 跡見晴幸, 三木邦夫, イノシトールリン酸化酵素の基質認識機構とその生成物についての構造学的研究、平成26年度日本結晶学会年会、東京大学本郷キャンパス、2014年11月1-3日
87. 相川佳紀, 西谷優一, 富田宏矢, 跡見晴幸, 三木邦夫, 始原菌由来 ketopantoate reductase の補酵素 A による負のフィードバック制御機構、平成26年度日本結晶学会年会、東京大学本郷キャンパス、2014年11月1-3日
88. 金井保, 山本康之, 金関剛史, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における芳香族アミノ酸合成経路の転写制御機構の解明、極限環境生物学会、今帰仁村, 沖縄、2014年11月2日
89. 川村弘樹, 牧野勇樹, 佐藤喬章, 今中忠行, 跡見晴幸, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 serine kinase の機能解析、極限環境生物学会、今帰仁村, 沖縄、2014年11月3日
90. 村松晃, 吉川祐子, 福田青郎, 藤原伸介, 梅澤直樹, 神戸俊夫, 今中忠行, 吉川研一, “超好熱菌由来の分岐型ポリアミンが引き起こすゲノム DNA の特異な高次構造変化”、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日
91. 河島拓未, 渡部 聡, 西谷優一, 金井 保, 和田健彦, 稲葉謙次, 跡見晴幸, 今中忠行, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼへ Ni を組み込む HypAB 複合体の結晶構造解析、第15回日本蛋白質科学会年会、あわぎんホール、2015年6月24-26日
92. 西谷優一, 堀内あゆみ, 金井 保, 跡見晴幸, 三木邦夫, アーキア由来新規キチナーゼの結晶構造解析、第15回日本蛋白質科学会年会、あわぎんホール、2015年6月24-26日
93. 権 成鶴, 西谷優一, 渡部 聡, 金井 保, 跡見晴幸, 三木邦夫, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関わるアーキア由来 HybD の X 線結晶構造解析、平成27年度日本結晶学会年会、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス、2015年10月17-18日
94. 西谷優一, 堀内あゆみ, 金井 保, 跡見晴幸, 三木邦夫, アーキア由来新規キチナーゼの構造学的研究、平成27年度日本結晶学会年会、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス、2015年10月17-18日

95. 佐藤喬章、白石拓也、松原光平、Siebers Bettina、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における多糖分解経路の遺伝学的解析、城山観光ホテル 鹿児島、2015年10月26-28日
96. 青野陸、佐藤喬章、今中忠行、跡見晴幸、ペントースビスリン酸経路:アーキアにおけるヌクレオシド分解機構、第16回極限環境生物学会、東京海洋大学 品川キャンパス、2015年11月8-9日
97. 権成鶴、西谷優一、渡部 聡、金井 保、跡見晴幸、三木邦夫、[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関わるアーキア由来 HybD の X 線結晶構造解析、2015年度量子ビームサイエンスフェスタ、つくば国際会議場、2016年3月15-16日
98. 西谷優一、堀内あゆみ、金井 保、跡見晴幸、三木邦夫、アーキア由来新規キチナーゼの結晶構造、2015年度量子ビームサイエンスフェスタ、つくば国際会議場、2016年3月15-16日
99. 佐藤喬章、牧野勇樹、川村弘樹、今中忠行、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における Cys 生合成経路の解明、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27-30日
100. 金井保、Jan-Robert Simons、別府春樹、今中忠行、跡見晴幸、*Thermococcus kodakarensis* での ATPase 高発現により水素生産の細胞増殖依存性は部分的に解除される、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27-30日
101. 蜂須賀真一、佐藤喬章、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における NAD⁺熱分解産物の代謝機構、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27-30日
102. 下坂天洋、跡見晴幸、超好熱性バクテリア *Thermotoga maritima* における Co-enzyme A 生合成制御機構の解明、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27-30日
103. 藤澤智子、跡見晴幸、酵素を利用した myo-inositol 合成法の開発、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27-30日
104. 福田青郎、内田圭亮、Abdul Aziz Jaziri、市村瑞葉、何あゆみ、金井保、跡見晴幸、今中忠行、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子の解析、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27-30日
105. 木村圭佑、岡野憲司、本田孝祐、耐熱性酵素を用いたキチンからの有用物質生産、日本農芸化学会 2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27-30日

(4)知財出願

①国内出願 (1件)

1. NAD⁺の製造方法及びNAD⁺製造用形質転換体セット、本田孝祐・跡見晴幸、国立研究開発法人科学技術振興機構、2015年2月24日、特願2015-33843

②海外出願 (1件)

1. 補酵素の製造方法及び補酵素製造用形質転換体セット、本田孝祐・跡見晴幸、国立研究開発法人科学技術振興機構、2016年2月19日、PCT/SP2016/054872

(5)受賞・報道等

①賞

1. 極限環境生物学会、優秀ポスター賞、石橋拓也、2011年11月27日
2. 極限環境生物学会、優秀ポスター賞、富田宏矢、2012年12月1-2日

3. Thermophiles 2013, Best Poster Prize、富田宏矢、2013年9月13日
4. 農芸化学技術賞、北林雅夫、小松原秀介、今中忠行、2014年3月27日
5. 20th Young Asian Biochemical Engineers' Community Symposium (YABEC) 2014, Best Poster Award、岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、2014年11月7日
6. 日本農芸化学会 農芸化学奨励賞、蘆田弘樹、2015年3月26日
7. 生物高分子学会 2015、優秀発表賞、相川佳紀、2015年9月20日
8. 酵素工学奨励賞、本田孝祐、2015年10月16日
9. 生物工学論文賞、森本有美、Ye Xiaoting、本田孝祐、岡野憲司、大竹久夫、2015年10月26日
10. 極限環境生物学会 優秀ポスター賞、青野陸、2015年11月8日
11. 極限環境生物学会 研究奨励賞、佐藤喬章、2015年11月9日

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

1. 日経産業新聞、「微生物の代謝に新経路」、2015年3月31日

アーキアの多くはペントースリン酸経路を持っていないことから、ヌクレオシドの代謝については不明であったが、ヌクレオシドのペントース部位を代謝するペントースビスリン酸経路を発見した。アーキアは真核生物の祖先とみる考え方もあり、また本経路には光合成の暗反応において炭酸固定を行う酵素、ルビスコが含まれる。よって発見した経路は光合成の原型である可能性も考えられる。

2. 日刊工業新聞、「京大、水素触媒の酵素たんぱく質がニッケルイオン獲得する際の立体構造を解明」、2015年6月10日

[NiFe] ヒドロゲナーゼの成熟化補助タンパク質の一つである HypAB 複合体について、構造・機能解析を行い、HypAB 複合体がヒドロゲナーゼの機能に必要な Ni イオンを正確に組み込む仕組みを明らかにした。この成果について、プレス発表を行った。

③その他

(6)成果展開事例

①社会還元的な展開活動

- ・高校生に対するアウトリーチ活動(大学における研究活動の紹介)を行う際に、本プロジェクトでの成果も紹介して研究分野の重要性や意義を説明し、基礎研究と産業利用との関係、研究に対する国のサポートなどにも言及した。
- ・研究の成果およびその背景について、日本化学会編集の総説集「CSJ カレントレビュー」の一冊「極限環境の生命科学」に、本プロジェクトの成果も織り込んで分担執筆を行っている。

§ 7 研究期間中の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011年4月11日	チーム内ミーティング (非公開)	京都大学 理学研究科	35人	本研究の全中研究課題に関して研究の進め方について討議した。
2011年8月19日	チーム内ミーティング (非公開)	京都大学 工学研究科	11人	本研究の中研究課題のうち、キチン・水素生産・ペントース代謝に関する研究の進め方について討議した。
2011年11月28日	チーム内ミーティング (非公開)	京都大学 理学研究科	13人	本研究の中研究課題のうち、キチン・水素生産・ペントース代謝に関する研究の進捗状況・研究の進め方について討議した。
2011年度	チーム内ミーティング (非公開)その他4度	京都大学	4-9人	個別中研究課題に関して進捗状況・進め方について討議した。
2012年7月22日	京都大学理学部, 最先端科学の体験型学習講座, ELCAS(先端科学の講演会)	京都大学大学院理学研究科	約150名	京都大学大学院理学研究科で行っている高校生を主な対象とした取り組みで、理数分野に関して卓越した才能のある生徒について、さらに意欲・能力を伸ばす体系的教育プログラムの開発および実施を行っている。この活動を通して、小中高等学校教員や保護者に理系職業や進路の魅力を伝えている。その一環である「先端科学の講演会」で講演し、本プロジェクトの成果も、先端科学における研究成果として紹介した。
2012年8月10日	京都大学, オープンキャンパス, 研究室訪問	京都大学大学院桂・吉田キャンパス	約30人	主に高校生を対象にバイオマス分解・水素生産に関する本研究の成果と今後の展望について紹介した。
2012年10月27日	生命科学の新展開	立命館大学 びわこくさつキャンパス	100人	生命科学に関するシンポジウム
2012年11月7日	チーム内ミーティング (非公開)	京都大学 理学研究科	13人	ヒドロゲナーゼ, ペントース代謝, キチナーゼに関する研究進捗報告のためのミーティング
2012年度	チーム内ミーティング (非公開)その他7度	京都大学 立命館大学	6-11人	個別中研究課題に関して進捗状況・進め方について討

				議した。
2013年8月6日	立命館大学 関西学院大学 研究交流会	関西学院大学神戸三田キャンパス	25人	生命科学に関する研究交流会
2013年8月8日	京都大学, オープンキャンパス, 研究室訪問	京都大学大学院桂・吉田キャンパス	約25人	主に高校生を対象にキチン分解・水素生産・機能の増強に関する本研究の成果と今後の展望について紹介した。
2013年8月9日	兵庫県立長田高等学校「人文・数理探究類型」総合学習プログラム「探究入門」	京都大学大学院理学研究科	約15名	兵庫県立長田高等学校で平成25年度に設置された「人文・数理探究類型」の総合学習プログラム「探究入門」の一部を担当し、大学での先端研究の一端を紹介した。その中で、本プロジェクトの成果も紹介した。
2013年8月7日	チーム内ミーティング(非公開)	京都大学理学研究科	12人	ヒドロゲナーゼ, ペントース代謝, キチナーゼ, CoAに関する研究進捗報告のためのミーティング
2013年度	チーム内ミーティング(非公開)その他3度	京都大学	4-7人	個別中研究課題に関して進捗状況・進め方について討議した。
2014年6月20日	チーム内ミーティング(非公開)	京都大学理学研究科	3人	ペントース代謝, キチン分解酵素, 水素生産関連酵素に関する研究進捗報告のためのミーティング
2014年7月8日	チーム内ミーティング(非公開)	京都大学理学研究科	3人	ペントース代謝, CoAに関する研究進捗報告のためのミーティング
2014年7月28日	兵庫県立長田高等学校「人文・数理探究類型」総合学習プログラム「探究入門」	京都大学大学院理学研究科	約15名	前年に行ったものと同様のプログラムを行い(2回目), 本プロジェクトの成果も紹介した。
2014年9月28日	京都大学アカデミックデー	京都大学百年時計台記念館	9人	当チームの研究内容の一部を一般市民に公開・解説した
2014年12月1日	チーム内ミーティング(非公開)	京都大学理学研究科	12人	ペントース代謝, CoA, 水素生産関連酵素に関する研究進捗報告のためのミーティング
2015年1月15日	チーム内ミーティング(非公開)	立命館大学BKCキャンパス	6人	ペントース代謝, 水素生産関連酵素に関する研究進捗報告のためのミーティング
2015年7月13日	ワークショップ「微生物研究のフロンティア開	京都大学桂キャンパス	13名	様々な微生物を研究している国内の一流研究者に講演

	拓」			をして頂いた。この中で、跡見と本田と蘆田が本プロジェクトの成果を紹介した。
2015年8月6日	平成27年度スーパーサイエンスハイスクール生徒研究発表会・研究者ミニライブ講演	インテックス大阪	約20名	文科省・JSTの主催で行われた題記イベントにおいて、SSH所属の高校生に対し、研究活動の具体例とその楽しさを伝えるための講演を行った。この中で本プロジェクトの成果も紹介した。
2015年8月6日	兵庫県立長田高等学校「人文・数理探究類型」総合学習プログラム「探究入門」	京都大学大学院理学研究科	約15名	前々年、前年に行ったものと同様のプログラムを行い(3回目)、本プロジェクトの成果も紹介した。
2015年9月11日	チーム内ミーティング(非公開)	京都大学桂キャンパス	3名	ペントース代謝、CoA生合成関連酵素に関する研究進捗報告のためのミーティング
2015年9月16日	国際共同研究チームミーティング	京都大学桂キャンパス	約30名	国際共同研究を行っているドイツのUwe Bornscheuer、Johannes Kabisch およびCREST岡田チームの岡田茂を招いて、炭化水素生産に関わる研究の進捗紹介および今後の研究方針について打ち合わせを行った。

§8 最後に

本研究では、アーキアにおけるバイオマス分解およびバイオエネルギー生産に関わる機能を理解し、それらの強化を目指した。また異種生物由来の機能も導入し、機能の融合を図ることにより非可食性バイオマスからの水素・メタン・スクワレン等バイオエネルギー生産能を示すアーキアの創製を目標とした。

機能の理解については、バイオマス分解およびバイオエネルギー生産に関わる多くの代謝経路について検討した。アーキアにおける CoA 生合成経路のほぼ全容を解明することができ、また CoA 生合成の制御機構も明らかにすることができた。またペントース代謝機構の解析ではヌクレオシドの新しい分解経路(pentose bisphosphate pathway)を同定することができた。さらにメタン生成菌においても新しい炭酸固定経路を発見することができた。その他、今まで知られていなかった基質特異性を示す acyl-CoA synthetase や新型の *myo*-inositol kinase 等、興味深い新規・新型酵素を多数同定することができた。これらの酵素の多くについては立体構造を明らかにし、基質認識機構や反応機構を明らかにすることもできた。本成果は微生物の代謝生理分野の発展に大きく貢献する意義深いものであると考えている。

機能の強化・融合については、アーキアのキチン分解経路および水素発生経路の強化を達成することができた。また解糖系を強制的に誘導することによりこれらの2つの機能を融合することもできた。さらにアーキアのイソプレノイド合成能と藻類のプレニル二リン酸縮合能とを融合することにより炭化水素燃料を産生できるアーキアの創出に成功した。一方好熱菌由来酵素を用いて、NAD⁺サルベージ合成のための *in vitro* 人工代謝経路を完成させ、NAD⁺の見かけの熱安定性を大幅に向上させることができた。機能強化・機能融合株について、菌体あたりのバイオマス分解能・バイオエネルギー生産能は比較的高いものが得られたが、用いた培養条件下では培地中の菌体密度が総じて低かったため、培地体積あたりの効率はまだ不十分であると言える。今後は菌体密度の上昇を目指したさらなる培養工学的研究が必要と考えている。

上記研究において、購入した物品は本研究の推進に効率よく利用された。またグループ間の情報交換、試料の提供は積極的に行われ、チーム間の連携は非常に優れていたと考えている。