

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
[1年追加支援期間分]

研究期間 平成28年4月～平成29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

前年度までの研究を通じて、バイオマス分解・バイオエネルギー生産に関わるアーキアの代謝特性の解明・強化および融合を進めてきた。本年度は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* において強化したキチン分解能と機能融合により得られたファイトエン合成能に着目し、実用化に向けた各系の最適化、さらなる融合(キチンからファイトエンの合成)およびスケールアップを進め、物質生産系としての効率を向上させる。またアーキアの代謝特性を活かした *in vitro* 物質生産系を構築するとともに、それに求められる補酵素の供給・安定化・再生に関わる技術開発を進める。

T. kodakarensis のキチン分解能については、既に得られていた強化株 *T. kodakarensis* の KC04 Δ tM1 株に対して、pRPEx 型プラスミドを用いた遺伝子導入を可能とするため、まず arginine decarboxylase 遺伝子 (*pda*) を破壊した宿主細胞を作製した。得られた KC04 Δ tM2 株にキチン鎖の還元末端を認識・切断する *Thermococcus chitonophagus* 由来 chitinase (Tc-ChiD) を導入した結果、Tc-ChiD タンパク質の発現が認められた。詳細な評価を進めつつ、ファイトエン合成能強化のための遺伝子導入も試みた。遺伝子としては、(i) His-Saci_1734、(ii) His-Saci_1734E169Q、(iii) メバロン酸経路の遺伝子群 (acetyl-CoA から mevalonate までの経路および mevalonate から isopentenyl/dimethylallyl pyrophosphate までの経路を構成する 2 つの遺伝子群)、および (iv) 超好熱性バクテリア *Thermotoga maritima* 由来 ketol-acid reductoisomerase (KARI) 遺伝子である。これによりキチンからファイトエンの生産を実現するとともに、現状よりも高い効率で生産できると期待した。*In vitro* 物質生産系については *T. kodakarensis* 由来 maltodextrin phosphorylase (MalP) の加リン酸分解活性を利用した maltodextrin から *myo*-inositol を生産する系の最適化を進めた。酵素および NAD⁺ の量を検討し、スケールアップを図った。その結果、アミロースを原料として *myo*-inositol を収率 90% 以上、グラムスケールで生産することができた。さらにイモデンプン等の利用を視野に入れ、耐熱性の枝切り酵素 (α -1,6-グリコシド結合加水分解酵素) も調製し、反応系に添加した結果、ジャガイモデンプンから 50% 以上の収率 (w/w) で *myo*-inositol が生産できた。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 超好熱菌 *T. kodakarensis* における新規 ADP-dependent serine kinase を発見した。本酵素の発見により、serine から cysteine を合成する新しい代謝経路、および serine の新しい資化経路が明らかとなった (Nature Communications, vol 7, 13446, 2016)。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のキチン分解能・解糖系・水素生産系を強化・融合することにより未利用性バイオマスであるキチンからの水素生産系を構築した。(Appl. Environ. Microbiol. 誌の Spotlight Article に選定)

§ 2 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	H28.4～
金井 保	同上	講師	H28.4～
佐藤 喬章	同上	助教	H28.4～
SCOTT, Joseph Walker	同上	研究員	H28.6～
ASLAM, Mehwish	同上	D3	H28.4～
蜂須賀 真一	同上	D2	H28.4～
下坂 天洋	同上	M2	H28.4～
濱北 宗太郎	同上	M2	H28.4～
福島 ひかる	同上	M2	H28.4～
藤澤 智子	同上	M2	H28.4～
JHA, Savyasachee	同上	M2	H28.4～
井崎 力久	同上	M1	H28.4～
諏訪 貴士	同上	M1	H28.4～
谷本 充	同上	M1	H28.4～
萬代 由莉恵	同上	M1	H28.4～

研究項目

- ・ *Thermococcus kodakarensis* のキチン分解経路の解明と機能強化
- ・ アーキアへのスクアレン合成能付与
- ・ 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

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

糖質代謝についてはドイツ Duisburg-Essen 大学の Bettina Siebers 教授と、phytoene/squalene synthase についてはドイツ Greifswald 大学の Uwe Bornscheuer 教授と、coenzyme A 生合成やバイオインフォマティクス解析については米国 NIH の Eugene Koonin 博士と、それぞれ情報交換・研究交流を行っている。

§ 3 研究実施内容及び成果

京都大学 工学研究科(跡見)グループ

昨年度までに、超好熱菌由来耐熱性 maltodextrin phosphorylase (MalP)、phosphoglucomutase (PGM)、*myo*-inositol-3-phosphate synthase (MIPS)、*myo*-inositol monophosphatase (IMPase) を利用してアミロースから高効率に *myo*-inositol を合成する *in vitro* 物質生産系を構築した(図1)。本年度はこの系の最適化とスケールアップを進めた。酵素としては MalP (TK1406) および PGM (TK1108) は *T. kodakarensis* 由来、MIPS (AF1794) は *Archaeoglobus fulgidus* 由来、IMPase は *Thermotoga maritima* 由来のもの (TM1415) を用いた。

本系の最適化を進めている過程で、酵素量によっては、*myo*-inositol の生産効率が著しく低下し、代わりに glucose が生成することが判明した。本系においては中間産物として glucose 1-phosphate (G1P) および glucose 6-phosphate (G6P) が生成することから、これらの熱分解が原因であると考え、それぞれの熱安定性を評価した。その結果、G6P の方が熱安定性が低く、G6P の蓄積を回避する必要があることがわかった。すなわち MIPS 反応が律速とならないよう、改めて酵素量の検討を進めた。アミロース 5 mM (グルコース 80 mM 換算)、2 mL の反応系において各酵素の添加量、アミロース、NAD⁺等の濃度、逐次添加等を検討した(結果の例:図2、図3)。

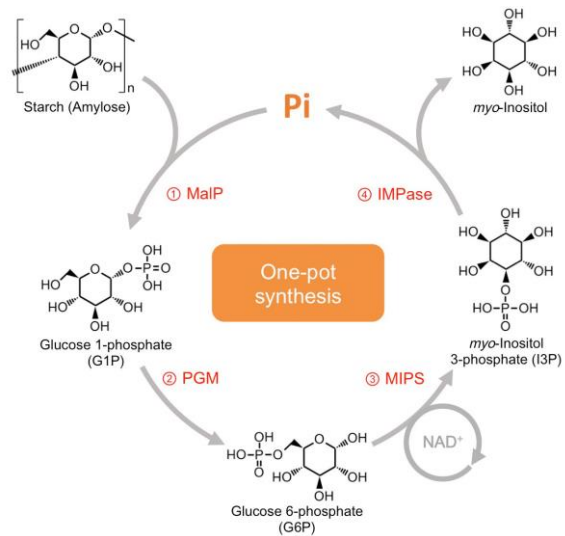


図1. 耐熱性酵素を利用した *myo*-inositol 生産系

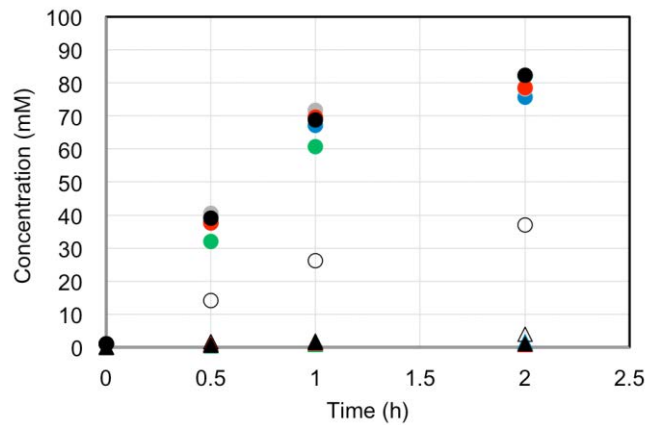


図2. *myo*-Inositol 合成系における NAD⁺濃度の検討。*myo*-Inositol は○、glucose は△。NAD⁺非添加 (white)、0.5 mM NAD⁺ (black)、1.0 mM NAD⁺ (red)、2.0 mM NAD⁺ (gray)、5.0 mM NAD⁺ (green)、10 mM NAD⁺ (blue)。

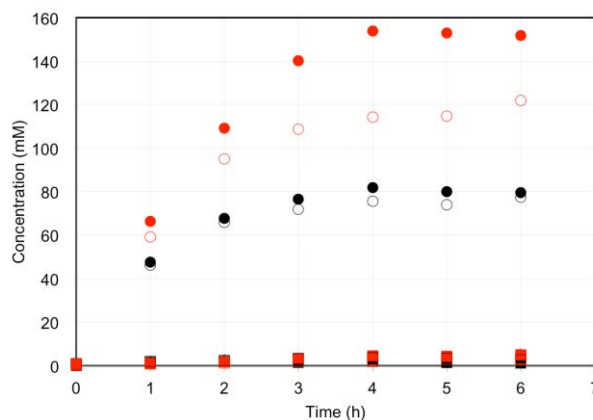


図3. *myo*-Inositol 合成系におけるアミロース濃度、NAD⁺添加の影響。*myo*-Inositol は○、glucose は△、maltose は□。アミロース初期濃度は 5 mM (black) と 10 mM (red)。1 時間毎に NAD⁺が添加されている系は closed symbols, 非添加の系は open symbols で示されている。

2 mL の系における最適化が進んだので、本系のスケールアップを試みた。200 mL の反応系で *myo*-inositol 生産を行ったところ、2.9 g のアミロースから 2.9 g の *myo*-inositol が得られ、グラムスケールの生産性を達成した(図4)。またこの際の変換効率は 96%と高いものであった。

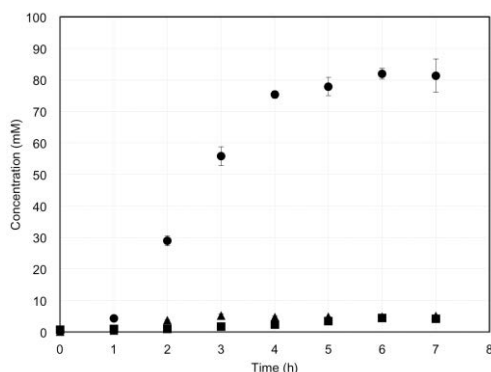


図4. 200 mL の系における *myo*-inositol の生産。 *myo*-Inositol は●、 glucose は▲、 maltose は■。アミロース初期濃度は 5 mM で 2 時間毎に NAD^+ (1 mM 相当) が添加されている。

さらに本系を利用してジャガイモデンプンから直接 *myo*-inositol が生産できるかを試みた。男爵 (D)、メイクイーン (M) の 2 種のジャガイモを利用して 6 h 反応させた結果、いずれにおいても *myo*-inositol の生産が認められた (図5)。また *T. maritima* 由来 pullulanase 遺伝子 (TM1845) を大腸菌内で発現させ、ジャガイモデンプンに含まれる α -1,6 グリコシド結合を加水分解する耐熱性酵素を調製した。この耐熱性の *T. maritima* 由来 pullulanase を反応系に加えたところ、*myo*-inositol の生産性がさらに向上した (図5)。ジャガイモデンプンの乾燥重量に対して 50%以上の変換効率 (w/w) が達成された。

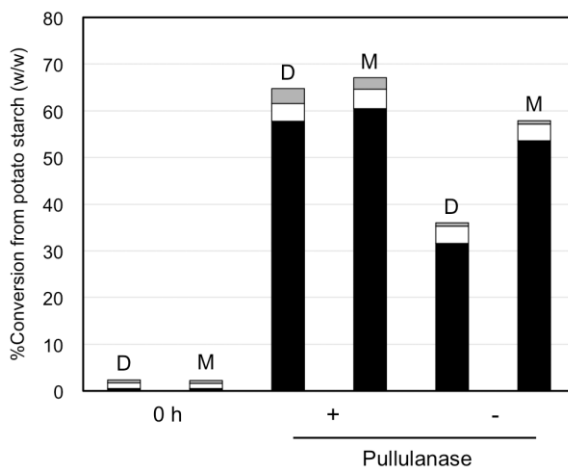


図5. 男爵イモ (D)、メイクイーンイモ (M) のジャガイモからの *myo*-inositol の生産。反応開始時と 6 h 反応後の *myo*-inositol (black)、glucose (white)、maltose (gray) が示されている。2 時間毎に NAD^+ (1 mM 相当) が添加されている。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際 (欧文) 誌 9 件)

1. 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, vol 72 Pt 5, pp. 369–375, 2016 (DOI: 10.1107/S2053230X16005033)
2. Ayumi Horiuchi, Aslam Mehwish, Tamotsu Kanai, and Haruyuki Atomi “A Structurally Novel Chitinase from the Chitin-Degrading Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus chitonophagus*”, Appl Environ Microbiol, vol 82 No. 12, pp. 3554–3562, 2016 (DOI: 10.1128/AEM.00319-16)
3. Takahiro Shimosaka, Hiroya Tomita, and Haruyuki Atomi “Regulation of Coenzyme A Biosynthesis in the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*”, J Bacteriol, vol 198 No. 14, pp. 1993–2000, 2016 (DOI: 10.1128/AEM.00319-16)
4. Sunghark Kwon, Yuichi Nishitani, Satoshi Watanabe, Yoshinori Hirao, Tadayuki Imanaka, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, and Kunio Miki “Crystal structure of a [NiFe] hydrogenase maturation protease HybD from *Thermococcus kodakarensis* KOD1”, Proteins, vol 84 No. 9, pp. 1321–1327, 2016 (DOI: 10.1002/prot.25070)
5. Yuichi Nishitani, Jan-Robert Simons, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, and Kunio Miki “Crystal structure of the TK2203 protein from *Thermococcus kodakarensis*, a putative extradiol dioxygenase”, Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications, vol 72 Pt 6, pp. 427–433, 2016 (DOI: 10.1107/S2053230X16006920)
6. Yuki Makino, Takaaki Sato, Hiroki Kawamura, Shin-ichi Hachisuka, Ryo Takeno, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi “An archaeal ADP-dependent serine kinase involved in cysteine biosynthesis and serine metabolism”, Nature Communications, vol 7, 13446, 2016 (DOI: 10.1038/ncomms13446)
7. Ayako Yoshida, Takeo Tomita, Haruyuki Atomi, Tomohisa Kuzuyama, and Makoto Nishiyama “Lysine biosynthesis of *Thermococcus kodakarensis* with the capacity to function as an ornithine biosynthetic system”, J Biol Chem. vol 291 No. 41, pp. 21630–21643, 2017 (doi: 10.1074/jbc.M116.743021)
8. Tamotsu Kanai, Ayako Yasukochi, Jan-Robert Simons, Joseph Walker Scott, Wakao Fukuda, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi “Genetic analyses of the functions of [NiFe]-hydrogenase maturation endopeptidases in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*”, Extremophiles, vol 21 No. 1, pp. 27–39, 2017 (DOI: 10.1007/s00792-016-0875-1)
9. Ryuhei Nagata, Masahiro Fujihashi, Hiroki Kawamura, Takaaki Sato, Takayuki Fujita, Haruyuki Atomi and Kunio Miki “Structural study on the reaction mechanism of a free serine kinase involved in cysteine biosynthesis” ACS Chemical Biology, published online (DOI: 10.1021/acscchembio.7b00064)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 跡見晴幸、アーキア由来 Rubisco の特異な代謝機能、バイオサイエンスとインダストリー、74巻、4号、303–307、2016
2. 跡見晴幸、インターフェイスから探る代謝機構のルーツを探る、生物工学会誌 Vol.94, No. 11, 693–695, 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 3 件、国際会議 3 件)

1. Haruyuki Atomi, Riku Aono, Sanae Hodo, Yuta Yoshii, and Takaaki Sato, Novel Pathways Involved in Pentose Metabolism in Archaea, KMB2016, Daejeon, 2016年6月23日
2. 跡見晴幸、第三の生物アーキアの特異な代謝様式、日本進化学会第18回大会、東京工業大学大岡山キャンパス、東京、2016年8月28日
3. Haruyuki Atomi, Tomoko Fujisawa, Takuya Shiraishi and Takaaki Sato, The unique metabolism of Archaea and its potential as a platform for metabolic engineering, The KSBB fall meeting 2016, Gwangju, Korea, 2016年10月13日
4. Haruyuki Atomi, Yuki Makino, Hiroki Kawamura, Shin-ichi Hachisuka, Ryo Takeno and Takaaki Sato, Novel enzyme discovery through examination of archaeal metabolism, The 14th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Nanning, China, 2016年11月17日
5. 跡見晴幸、牧野勇樹、川村弘樹、蜂須賀真一、竹野領、佐藤喬章、超好熱性アーキアにおける特異な代謝機構、第39回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、横浜、2016年12月1日
6. 跡見晴幸、佐藤喬章、青野陸、富田宏矢、牧野勇樹、超好熱性アーキアの特異な代謝戦略、第1回 Biothermology Workshop、岡崎コンファレンスセンター、岡崎、2016年12月11日

② 口頭発表 (国内会議6件、国際会議1件)

1. 下坂 天洋、富田 宏矢、跡見 晴幸、超好熱菌における coenzyme A 生合成制御機構の解明、日本 Archaea 研究会第29回講演会、東洋大学白山キャンパス、東京、2016年7月7-8日
2. 堀内 あゆみ、Mehwish Aslam、金井 保、跡見 晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus chitonophagus* 由来新規キチナーゼの同定、日本 Archaea 研究会第29回講演会、東洋大学白山キャンパス、東京、2016年7月7-8日
3. Haruyuki Atomi, Unique metabolism in Archaea and its engineering, 11th International Marine Biotechnology Conference (IMBC 2016), Hyatt Regency Inner Harbor, Baltimore, USA, 2016年8月29日-9月2日
4. 堀内 あゆみ、Mehwish Aslam、金井 保、跡見 晴幸、超好熱菌由来新規キチナーゼの同定と生化学的解析、第10回バイオ関連化学シンポジウム、石川県立音楽堂、金沢、2016年9月7-9日
5. 藤澤智子、跡見晴幸、好熱菌由来の酵素を利用した *in vitro* における *myo*-inositol 合成系の開発、第17回極限環境生物学会年会、東京工業大学すずかけ台キャンパス、2016年11月25-26日
6. 堀内 あゆみ、Mehwish Aslam、金井 保、跡見 晴幸、新規な一次構造をもつキチナーゼの同定、日本農芸化学会2017年度大会、京都女子大学、京都2017年3月17-20日
7. 佐藤 喬章、福家 翼、Savyasachee Jha、Myra Tansengco、跡見 晴幸、アーキアのイソプレノイド合成能を利用した炭化水素生産、日本農芸化学会2017年度大会、京都女子大学、京都2017年3月17-20日

③ ポスター発表 (国内会議9件、国際会議10件)

1. Takahiro Shimosaka, Hiroya Tomita, and Haruyuki Atomi, Regulation of coenzyme A biosynthesis in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, ICC05-AEM2016, 宇奈月国際会館セレネ、黒部、2016年9月4-8日
2. Hiroya Tomita, Yuusuke Yokooji, Takuya Ishibashi, Takahiro Shimosaka, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Functional characterization of enzymes involved in coenzyme A biosynthesis in archaea, ICC05-AEM2016, 宇奈月国際会館セレネ、黒部、2016年9月4-8日

3. Takahiro Shimosaka, Hiroya Tomita, and Haruyuki Atomi, Regulation of Coenzyme A Biosynthesis in the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*, 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016)、京都大学百周年記念館、2016年9月12-16日
4. Shin-ichi Hachisuka, Takaaki Sato, and Haruyuki Atomi, Metabolism Dealing with Thermal Degradation of NAD⁺ in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*, 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016)、京都大学百周年記念館、2016年9月12-16日
5. Mehwish Aslam, Ayumi Horiuchi, Naoya Takahashi, Jan R. Simons, Savyasachee Jha, Tadayuki Imanaka, Tamotsu Kanai, and Haruyuki Atomi, Engineering of a Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, that can Grow on Chitin, 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016)、京都大学百周年記念館、2016年9月12-16日
6. Savyasachee Jha, Takaaki Sato, Tsubasa Fuke, Uwe Bornscheuer, and Haruyuki Atomi, Production of Phytoene in *Thermococcus kodakarensis* through Genetic and Protein Engineering, 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016)、京都大学百周年記念館、2016年9月12-16日
7. Tamotsu Kanai, Ayako Yasukochi, Jan-Robert Simons, Joseph W. Scott, Wakao Fukuda, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, Genetic Analyses of the Functions of [NiFe]-hydrogenase Maturation Endopeptidases in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*, 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016)、京都大学百周年記念館、2016年9月12-16日
8. Takaaki Sato, Yuki Makino, Hiroki Kawamura, Shin-ichi Hachisuka, Ryo Takeno, Tadayuki Imanaka, and Haruyuki Atomi, An Archaeal ADP-dependent Kinase that Phosphorylates Free Serine, 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016)、京都大学百周年記念館、2016年9月12-16日
9. Ayumi Horiuchi, Mehwish Aslam, Tamotsu Kanai, and Haruyuki Atomi, A Structurally Novel Chitinase from the Chitin-degrading Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus chitonophagus*, 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016)、京都大学百周年記念館、2016年9月12-16日
10. 蜂須賀 真一, 佐藤 喬章, 跡見 晴幸, 超好熱性アーキアにおける NAD⁺熱分解産物の代謝機構、日本生物工学会、富山国際会議場-ANA クラウンプラザホテル富山、富山、2016年9月28-30日
11. 佐藤 喬章, 福家 翼, Jha Savyasachee, Tansengco Myra, 跡見 晴幸, アーキアを利用した炭化水素生産、日本生物工学会、富山国際会議場-ANA クラウンプラザホテル富山、富山、2016年9月28-30日
12. Tamotsu Kanai, Ayumi Horiuchi, Mehwish Aslam, and Haruyuki Atomi, A structurally novel chitinase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus chitonophagus*, 日本生物工学会、富山国際会議場-ANA クラウンプラザホテル富山、富山、2016年9月28-30日
13. 佐藤 喬章, 牧野 勇樹, 川村 弘樹, 蜂須賀 真一, 竹野 領, 跡見 晴幸, 超好熱性アーキアにおける新規 serine kinase の同定、酵素工学会第76回講演会、東京大学山上会館、東京、2016年10月7日
14. 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*, The 14th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Guangxi Wharton International Hotel, Nanning, China, 2016年11月16日-20日

15. 佐藤 喬章、藤橋 雅宏、永田 隆平、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、超好熱性アーキアにおける *myo*-inositol kinase の同定と解析、第 17 回極限環境生物学会年会、東京工業大学すずかけ台キャンパス、2016 年 11 月 25-26 日
16. 堀内あゆみ、Mehwish Aslam、金井 保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus chitonophagus* がもつ構造的に新規なキチナーゼ、第 17 回極限環境生物学会年会、東京工業大学すずかけ台キャンパス、2016 年 11 月 25-26 日
17. 蜂須賀 真一、佐藤 喬章、跡見 晴幸、超好熱性アーキアにおける NAD⁺熱分解産物の代謝機構の解明、第 17 回極限環境生物学会年会、東京工業大学すずかけ台キャンパス、2016 年 11 月 25-26 日
18. 下坂天洋、富田宏矢、跡見晴幸、超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* における新規 CoA 生合成制御機構、第 17 回極限環境生物学会年会、東京工業大学すずかけ台キャンパス、2016 年 11 月 25-26 日
19. Mehwish Aslam, Ayumi Horiuchi, Naoya Takahashi, Jan-Robert Simons, Savyasachee Jha, Tadayuki Imanaka, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Engineering of a hyperthermophile that can grow on chitin、第 17 回極限環境生物学会年会、東京工業大学すずかけ台キャンパス、2016 年 11 月 25-26 日

(5)受賞

①受賞

日本農芸化学会 2017 年度大会 トピックス賞

堀内 あゆみ、Mehwish Aslam、金井 保、跡見 晴幸、新規な一次構造をもつキチナーゼの同定

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

T. kodakarensis の水素発生を触媒する hydrogenase の新たな利用について、NEDO の「エネルギー・環境新技術先導プログラム」事業に採択され、現在実施中。課題名「生物・有機合成ハイブリッド微生物による 100%グリーンジェット燃料生産技術の開発」(H27~28)

②社会還元的な展開活動

本研究成果をインターネット (URL: <http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/atomi-lab/en/>) で公開し、一般に情報提供している。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2016 年 9 月 12-16 日	The 11th International Congress on Extremophiles (Extremophiles2016)	京都大学百周年記念館	約 380 名 (うち海外から 190 名)	極限環境微生物に関する国際会議。当該分野における世界的なリーダーが出席。バイオエネルギー関連のセッションも開催し、Janet Westpheling, Sung Gyun Kang, Robert Kelly, Michael Adams, Garo Antranikian,

			Marco Moracci, Roderick Mackey, Isaac Cann, Bettina Siebersらが参加した。
--	--	--	--