

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	超好熱アーキアThermococcus kodakarensisにおける水素発生代謝の解析と改変
Title(English)	
著者(和文)	野原健太
Author(English)	Kenta Nohara
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10175号, 授与年月日:2016年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:福居 俊昭,中村 聡,丹治 保典,和地 正明,平沢 敬
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10175号, Conferred date:2016/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis* における 水素発生代謝の解析と改変

福居研究室 野原 健太

【緒言】

次世代クリーンエネルギーとして期待される水素は、現在主に石油や天然ガスを原料として生産されており、化石燃料に依存しない生産法の確立が望まれている。*Thermococcus kodakarensis* は 80℃以上の高温環境で生育可能な絶対嫌気性超好熱アーキアである。本菌は硫黄非存在下においてピルビン酸やデンプンなどの有機基質に依存した生育を行い、プロトンを経済電子受容体として水素を発生する。その際の菌体あたり水素発生能が高いことから、本菌はバイオマスを原料とする発酵水素生産の候補株として有望であるが、本菌における水素発生代謝の詳細については未だに不明な点が多い。本研究では、*T. kodakarensis* の水素発生に関わるピルビン酸/アミノ酸酸化代謝の解析を行うとともに、代謝改変による水素発生能の強化を目指した。

【結果と考察】

(1) *T. kodakarensis* の水素発生に関与するピルビン酸/アミノ酸酸化代謝の解析

T. kodakarensis はピルビン酸とアミノ酸を同時に酸化することでエネルギーを獲得するとされており、その過程で生じた還元型フェレドキシン (Fd_{red}) を電子供与体とするプロトン還元により水素を発生する。しかし、ピルビン酸酸化およびアミノ酸酸化の水素発生への寄与の程度については不明であった。そこで、水素発生条件下におけるピルビン酸/アミノ酸酸化関連代謝物のマスバランス解析を行ったところ、本菌における水素と二酸化炭素の発生はピルビン酸酸化に加えてアミノ酸酸化を介しても確かに行われており、アミノ酸酸化が全体の約 1/3 を占めると見積もられた。また、菌体自ら発生した水素が細胞質ヒドロゲナーゼによって再酸化され、この際に生じた還元力が 2-オキソグルタル酸の還元的アミノ化およびギ酸生成に利用されていることを示した。マスバランス解析において、栄養豊富培地では酢酸が過剰に生成された一方で、この過剰の酢酸生成はアミノ酸を主体とする完全合成培地では見られなかった。そのため、栄養豊富培地に含まれる何らかの成分に由来する未知の酢酸生成経路の存在が示唆された。

(2) *T. kodakarensis* における 2-オキソ酸 : Fd 酸化還元酵素 (KOR) パラログの機能解析

T. kodakarensis のピルビン酸/アミノ酸酸化において、ピルビン酸を含む 2-オキソ酸のアシル-CoA への酸化的脱炭酸反応は 2-オキソ酸 : フェレドキシン酸化還元酵素 (KOR) ホモログによって触媒される。本菌は多数の KOR ホモログ群 (Por, Vor, Ior1, Ior2, Ogor, Xor) を有しており、これらの基質特異性が一部オーバーラップしていたことから、菌体内での各酵素の寄与や分担については明らかではなかった。そこで、KOR ホモログ遺伝子破壊株を作製し、その水素発生代謝のマスバランスを測定することで、これらの機能を解析した。その結果、各 KOR ホモログのピルビン酸/アミノ酸酸化における役割を明らかにした。

(3) *T. kodakarensis* への TCA サイクル関連酵素遺伝子の導入

T. kodakarensis はクエン酸シンターゼ・アコニターゼ・イソクエン酸デヒドロゲナーゼの TCA サイクル中の C₆ 有機酸代謝に関連する酵素遺伝子を有しておらず、完全な TCA サイクルが機能していないと考えられる。一方、超好熱アーキアの中にはこれら 3 酵素の遺伝子をクラスターとして有するものが見出されている。この外来遺伝子クラスターを *T. kodakarensis* に導入し、その生育や水素発生におよぼす影響を検討した。その結果、TCA サイクル関連代謝のフラックスが強化されている可能性を示唆する結果が得られた。

【発表論文】

Nohara K, Orita I, Nakamura S, Imanaka T, Fukui T (2014)

Genetic examination and mass balance analysis of pyruvate/amino acids oxidation pathways in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. J Bacteriol 196:3831-s