

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： 生物プロセス 専攻
Department of
学生氏名： 野原 健太
Student's Name

申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員 (主)： 福居 俊昭
Academic Advisor(main)
指導教員 (副)：
Academic Advisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

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。

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なに行われており、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。

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 パラログ群 (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 パラ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、Por がピルビン酸酸化、Vor が分岐鎖アミノ酸酸化、Ior1 が芳香族アミノ酸酸化、Ogor が Glu/Gln・Ser 酸化をそれぞれ特異的に担っていることを明らかにした。Ior2, Xor はピルビン酸/アミノ酸酸化に関与していないと考えられた。また、アンモニアに着目した物質収支の再検討により、栄養豊富培地中の含アミド化合物が *T. kodakarensis* の菌体活性により加水分解されてアンモニアが生成されること、および一連の Hyh 欠失株がアンモニアを消費していることを見出した。

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遺伝子を有しておらず、TCA サイクルは機能していないとされている。一方で近縁の超好熱アーキア *Pyrococcus furiosus* は実際に活性を示すこれらの耐熱性酵素をコードする 3 遺伝子クラスター (以下、Pf-TCA と略する) を有する。そこで、*T. kodakarensis* に Pf-TCA を導入することで TCA サイクルを機能させ、 Fd_{red} 供給強化による水素発生効率の向上を試みた。*T. kodakarensis* への Pf-TCA 導入によりコハク酸生成量の増加が観察された。また、酢酸排出抑制のためにアセチル-CoA シンターゼ ACSI または ACSIII を欠失させたところ、Pf-TCA の導入によるコハク酸生成量の増加率が大幅に向上し、Pf-TCA にコードされる酵素による代謝フラックスが ACSI および ACSIII の欠失により強化されたと推測された。Pf-TCA 導入株は親株と比較して菌体あたり水素発生効率が高い傾向が見られ、特に ACSI 欠失株と ACSIII 欠失株でその増加率が高かったことから、コハク酸生成の増加との相関が強く示唆された。Pf-TCA の導入による代謝への影響を明らかにするためにメタボローム解析を行ったところ、意外なことに Pf-TCA 非導入の親株においてもクエン酸が検出された。Pf-TCA 導入時にはこのクエン酸の細胞内濃度が増加しており、TCA サイクルのフラックスが強化されていることが示唆された。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： 生物プロセス 専攻
Department of
学生氏名： 野原 健太
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)： 福居 俊昭
Academic Advisor(main)
指導教員(副)：
Academic Advisor(sub)

要旨(英文 300 語程度)
Thesis Summary (approx.300 English Words)

Thermococcus kodakarensis is a hyperthermophilic archaeon capable of growing anaerobically over 80°C. In the absence of elemental sulfur, this archaeon produces H₂, which is attracting interest as a new clean energy source, with high efficiency. However, details of the H₂-evolving metabolisms have been not thoroughly understood.

Mass balance analysis of *T. kodakarensis* under H₂-evolving condition demonstrated that the cells utilized pyruvate oxidation and amino acids oxidation simultaneously for H₂ production. The comparison of mass balance between a cytosolic hydrogenase (Hyh)-deficient strain and the parent strain indicated that NADPH generated via H₂ uptake by Hyh was consumed by reductive amination of 2-oxoglutarate and formate production. Excess acetate formation was observed in rich media but not in synthetic media, suggesting the presence of an unknown metabolisms producing acetate from some compounds in rich media.

Mass balance analysis using gene deletion strains was done to elucidate the function of various KOR paralogs (Por, Vor, Ior1, Ior2, Ogor, Xor), which is potentially involved in pyruvate/amino acids oxidation in *T. kodakarensis*. The results suggested that Por, Vor, Ior1, and Ogor are specifically involved in oxidation of pyruvate, branched-chain amino acids, aromatic amino acids, and Glu/Gln and Ser, respectively. No contribution of Ior2 and Xor in pyruvate/amino acids oxidation was observed.

A gene cluster encoding citrate synthase, aconitase, and isocitrate dehydrogenase in TCA cycle from the related hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* (*Pf*-TCA) was introduced in *T. kodakarensis* aiming to enhance formation of reduced ferredoxin for H₂ evolution. Introduction of *Pf*-TCA resulted in increase of succinate production and cellular H₂ yield. The succinate production and H₂ yield with *Pf*-TCA was further increased when acetyl-CoA synthetase ACSI or ACSIII-deletion strain was used as a host strain. Metabolome analysis interestingly detected the presence of a few TCA cycle intermediates including citrate and isocitrate in *T. kodakarensis* despite the lack of TCA cycle enzymes, as well as reinforcement of the cycle by introduction of *Pf*-TCA.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).