

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		メタン菌の代謝改変とメタン生成阻害剤を利用した CO <sub>2</sub> -メタノール変換触媒の開発			
研究テーマ (欧文) AZ		Development of a biocatalytic system for conversion of CO <sub>2</sub> -methanol using an engineered methanogenesis with an inhibitor suppressing its methane formation			
研究氏 代表 者	カタカナ CC	姓)フジシロ	名)タカシ	研究期間 B	2016 ~ 2018 年
	漢字 CB	藤城	貴史	報告年度 YR	2018 年
	ローマ字 CZ	Fujishiro	Takashi	研究機関名	埼玉大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		埼玉大学大学院理工学研究科生命科学部門分子生物学領域・助教			
<p>概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)</p> <p>地球温暖化をもたらす温室効果ガスのうち、二酸化炭素とメタンは、地球圏の炭素循環の主構成要素である。そこで、本研究では、地球圏の炭素循環に深く関わるメタン菌の代謝反応に注目し、そのメタン発生を抑えつつ、二酸化炭素から有用な炭素化合物であるメタノールを生産する生体触媒の開発を目指した。具体的には、メタン菌のうち、炭素源として CO<sub>2</sub> とメタノールのどちらもメタン生産に利用可能な <i>Methanosarcina barkeri</i> の代謝系酵素の解析と、それら酵素が関与する代謝経路の改変に向けたベクターの構築を試みた。</p> <p>(1)メタノール代謝の鍵酵素 MtaABC をコードする <i>mtaABC</i> 遺伝子のクローニングと、大腸菌-メタン菌シャトルベクターへのサブクローニング、及び、形質転換を試みた。<i>mtaA</i>、<i>mtaB</i>、<i>mtaC</i> 遺伝子をそれぞれ <i>M. barkeri</i> のゲノム (RIKEN JCM より提供) より KOD Plus Neo を用いた PCR により増幅し、pET21a、pRSFDuet、pACYCDuet ベクターにクローニングした。それらの大腸菌での発現検討を行った結果、MtaABC は MtaA:MtaB:MtaC=1:1 の複合体として共精製することを確認した。この結果と、MtaBC=1:1 複合体の結晶構造(Hagemeyer, C, <i>et al.</i>, <i>Proc. Natl. Acad. Sci USA</i>, 2006)を参考に、<i>mtaABC</i> が co-transcription されるように大腸菌-メタン菌シャトルベクターへ組み込んだ。またプロモーターは <i>M. barkeri</i> の近縁種である <i>Methanosarcina acetivorans</i> の強力な構成的プロモーター <i>P<sub>mcrB</sub></i> を <i>mtaABC</i> 遺伝子上流へ導入した。現在、メタン菌の形質転換方法として、既報の liposome-mediated 法 (Metcalf, WW, <i>et al.</i>, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>, 1997)と、エレクトロポレーション法を検討中である。</p> <p>(2) MtaABC のうち、MtaC はコバラミンを補因子として利用する。コバラミンの細胞内生産量は比較的強く抑えられており、コバラミン生合成遺伝子も <i>mtaABC</i> 遺伝子と同時に <i>M. barkeri</i> へ導入する必要があると考えられる。そこで、コバルトイオンをテトラピロール環へ挿入する鍵反応を触媒する金属キレターゼをスクリーニングし、SirB 酵素を単離、精製、また構造解析によるキャラクタリゼーションを行った(T. Fujishiro, <i>et al.</i>, <i>Dalton Trans.</i> in press)。SirB はコバルトイオンを活性部位に保持可能であり、テトラピロール環へのドッキングシミュレーションから、その反応機構を明らかとした。現在、大腸菌-メタン菌シャトルベクターへ、<i>mtaABC</i> の <i>P<sub>mcrB</sub></i> とは異なる誘導性プロモーター (スクリーニング中) の下流に <i>sirB</i> 遺伝子を構築中である。</p> <p>(3) <i>M. barkeri</i> によるメタノール代謝系以外に、CO<sub>2</sub> 代謝系も強化する必要があるが、CO<sub>2</sub> 代謝系は少なくとも 6 種の酵素が関与する複雑な系であり、酵素そのものの改変は難しい。そこで、これら酵素のほとんどが利用する補因子、鉄硫黄クラスターの生合成系の強化による CO<sub>2</sub> 代謝系全体の強化を行うこととした。通常、<i>M. barkeri</i> は、通常、鉄硫黄クラスター生合成に S<sup>2-</sup>のみを硫黄源として利用するが、他の微生物、例えば枯草菌は L-システインを硫黄源として利用する。そこで、メタン菌が S<sup>2-</sup>とL-システインの両方を硫黄源として鉄硫黄クラスター生合成をできる系の構築に向けて、枯草菌の鉄硫黄クラスター生合成遺伝子 <i>suf</i>-like オペロンの硫黄利用系 SufSU の解析を行った。SufSU の構造解析、機能解析により、SufS:SufU=1:1 で、Zn を介した複合体を形成し、L-システインから硫黄を供給することが明らかとなった(T. Fujishiro, <i>et al.</i>, <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 2017)。よって、現在 <i>sufSU</i> が co-transcription されるように、<i>P<sub>mcrB</sub></i> とは異なる誘導性プロモーター (スクリーニング中) の下流に <i>sufSU</i> をシャトルベクターへ構築中である。</p>					
キーワード FA					

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA						
研究機関番号 AC					シート番号						

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Zinc-ligand swapping mediated complex formation and sulfur transfer between SufS and SufU for iron-sulfur cluster biogenesis in <i>Bacillus subtilis</i>							
	著者名 <sup>GA</sup>	T. Fujishiro, et al.	雑誌名 <sup>GC</sup>	<i>The Journal of the American Chemical Society</i>					
	ページ <sup>GF</sup>	18464~18467	発行年 <sup>GE</sup>	2	0	1	7	巻号 <sup>GD</sup>	139
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Structure of sirohydrochlorin ferrochelatase SirB: the last of the structures of the class II chelatase family							
	著者名 <sup>GA</sup>	T. Fujishiro, et al.	雑誌名 <sup>GC</sup>	<i>Dalton Transactions</i>					
	ページ <sup>GF</sup>	in press	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	~	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

#### 欧文概要<sup>EZ</sup>

Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and methane, which are known as green gases, are key carbon sources in the global carbon cycle. In this project, construction of a biocatalytic system converting CO<sub>2</sub> to methanol by utilizing engineered methanogenic archaea based on *Methanosarcina barkeri* with suppressed methane production has been focused on. Towards a construction such a biocatalytic system, three approaches have been attempted as follows:

(1) Genes encoding methanol-metabolizing enzyme MtaABC were cloned and expressed in *Escherichia coli* for investigation of protein-protein interaction. As a result, MtaA:MtaB:MtaC=1:1:1 ratio was found in complex formation. Based on this finding, *mtaABC* operon was inserted to a *E. coli*-methanogen shuttle vector at the upstream of the *P<sub>mcrB</sub>* promoter.

(2) MtaC utilizes cobalamin as a cofactor. Thus, an amount of cobalamin in the cells of methanogens such as *M. barkeri* is necessarily enhanced by introducing biosynthetic enzymes for cobalamin. SirB, which is one of the cobalamin biosynthetic enzymes, is a candidate for that purpose, because SirB catalyzes insertion of divalent metal to the metal-free cobalamin precursor. SirB crystal structure was unveiled for improving its activity toward engineering of SirB for use in production of cobalamin in the cells of methanogens for future works. (T. Fujishiro, *Dalton Trans.* in press.)

(3) CO<sub>2</sub> metabolism as well as methanol-metabolism should be also engineered. However, the CO<sub>2</sub> metabolic pathway in methanogens are composed of at least six enzymes utilizing iron-sulfur (Fe-S) clusters. Thus, enhancement of Fe-S cluster production is considered by using Fe-S cluster biosynthetic enzymes. SufS-SufU complex is one candidate for that purpose, and studied by X-ray crystallography. The unveiled SufS-SufU structure showed a proposed catalytic mechanism based on the Zn coordination structure, which is useful for re-engineering of it. (T. Fujishiro, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017.)