

2023 年度カーボンニュートラル研究助成制度実施報告書

カーボンニュートラル推進特設部会 御中

以下のとおり研究実施報告書を提出します。

基 本 情 報	研究課題名：メタン生成アーキアによる大気中 CO ₂ のメタン変換システムの開発ーバイオメタネーション技術への挑戦ー
	研究代表者 氏名： 吉村美歩
	【在籍者】 研究科・専攻・学年（学生証番号）： 【修了者等】 所属・職種： 生命科学部・教務助手
	指導教員（所属・職・氏名）： （※在籍者のみ記入）
	共同研究者（所属・職・氏名）：生命科学部・教授・山本兼由 （※指導教員と同人の場合は記入不要）
	その他 研究分担者：
	研究期間： 2023 年度

※研究計画の進捗状況を中心に今年度の研究実施状況を記載してください。

本研究では、水素と CO₂ によりメタンを生成するメタン生成アーキアの増殖メカニズムを分子レベルで理解し、安定的な培養システムを確立することによって、大気中の CO₂ をメタンに変換するバイオメタネーション技術の開発を目指した。これを達成するため、3 つの課題を設定した。

(課題 1)メタン生成アーキアの細胞維持から増殖への遷移で生じる細胞内分子プロファイル変化

(課題 2)メタン生成アーキアの増殖における CO₂ の定量化とメタン生成ポテンシャルの評価

(課題 3)メタン生成アーキアの増殖速度の向上と培養技術の確立

申請者らは、単細胞生物では細胞維持から増殖へ移行する際、プロテアソーム様タンパク質分解酵素がゲノム機能を制御することを大腸菌の解析より見出した。今年度はこの予察的研究成果から課題 1 について特に重点的に研究を進めた。大腸菌におけるプロテアソーム様タンパク質分解酵素の関与の詳細についてさらに進めるために、プロテアソーム様タンパク質分解酵素欠失株を用いて増殖開始前の誘導期における細胞内全タンパク質の変移を解析した。この結果、プロテアソーム様タンパク質分解酵素は想定通り定常期を支える誘導期特異的に減少するタンパク質の分解に寄与しており、驚いたことにさらに多くの誘導期特異的に増加するタンパク質の分解による発現調節になっていることがわかった。このことから、大腸菌においてプロテアソーム様タンパク質分解酵素はその増殖開始における増殖安定化因子の一つであると結論づけた。

メタン生成アーキアについて、課題 1 から課題 3 に繋がるような因子を見出すことを視野に入れて解析を進めた。環境中における増殖を伴わない細胞維持の状態から細胞増殖へ切り替わる時のプロテアソームの関わりに着目した。メタン生成アーキアは大腸菌と比べ短時間培養や遺伝子改変系に乏しいため、まずは大腸菌を用いてメタン生成アーキア *Methanothermobacter thermautotrophicus* deltaH のプロテアソームタンパク質を発現、大腸菌細胞内でサブユニット構造を再構成させ、精製することを試みた。メタン生成アーキアのプロテアソームの本体である 20S プロテアソームは α と β の二種類のサブユニットで構成され、 α と β の各 7 分子がリング状になり $\alpha \beta \beta \alpha$ の順にシリンダー状に積み重なった構造をとる巨大分子である。しかしながら、その活性様式および機能についてはほとんど不明である。20S プロテアソーム α 、 β を大腸菌細胞内で同時に安定的に等分子数を発現させる系を確立した。 α 、 β の両サブユニットを共発現する大腸菌の大量培養液から組換え 20S プロテアソームを精製した。さらにこの組換え 20S プロテアソームの分解活性を調べるため、分解により生じた α アミノ酸をフルオレスカミンとの蛍光生成反応にて評価した。その結果、組換え 20S プロテアソームが β カゼインをを分解し、その至適活性温度が生育温度と重複する 65°C–75°C であることが示されたことから *M. thermautotrophicus* deltaH 特有の性質を有することが示唆された。さらに組換え 20S プロテアソームは *M. thermautotrophicus* deltaH の細胞内タンパク質に対してもその分解活性が顕著に示した。今後さらに詳細な解析を行なうことによりその生化学的性質の解明や分解ターゲットの推定が可能になると考えている。

課題 2 および課題 3 について培養的側面より取り組んだ。メタン生成アーキアの増殖開始に最適な H₂、CO₂ 供給量および最も高い増殖条件を明らかにするため、*M. thermautotrophicus* deltaH について、まずは水素供給量のみをコントロールできる培養系の確立を目指した。方法として iron corrosion-assisted H₂-supplying system (iCH system, Kato et al., 2020) を採用した。具体的には培養バイアルと鉄粉末が入った培地ベースのバイアルをステンレス管によって繋ぎ、鉄粉末の腐食反応により自然発生する水素をステンレス管を通じて培養器に供給するシステムである。鉄粉末の量により水素発生量をコントロールできる。さまざまな検討の結果、濁度、ガスクロマトグラフィーによるメタン生成の確認および蛍光顕微鏡による補酵素 420 の蛍光検出から *M. thermautotrophicus* deltaH の生育を確認し、培養系を確立した。

今後 iCH system を用いて異なる水素供給量で培養下の比較プロテオーム等の解析を予定している。これらの知見をもとに、水素とCO₂を最適化した大量培養系の確立を目指す。

High H₂ Low H₂
3g iron powder 0.3g iron powder



iCH system

研 究 業 績	成果発表（学会・論文・研究会等）			
	学会・論文・研究会等の別		タイトル	発行または発表年月
	10 th Congress of European Microbiologists (FEMS2023)		Physiological Functional role of Clp protease for re-growth of <i>Escherichia coli</i>	2023 年 6 月 9 日
	微生物研究会		メタン生成アーキアの組換えプロテアソームの精製と生化学的性質の評価	2023 年 10 月 21 日
	日本分子生物学会		大腸菌 Clp プロテアーゼの再増殖における機能と細胞内動態変化	2023 年 12 月 7 日
研 究 業 績	その他（アピールすることがあればご記入ください。） メタネーション技術に直結する純粋培養系でのバイオリアクターの構想は研究開発が始まりつつある“これから”の研究分野である。所属研究室の研究対象である大腸菌の知見と技術を多く活用できドメインの異なる生物種の比較による重要な因子の発見は手法的にも画期的で、基礎研究分野においても貢献する研究となった。大腸菌との比較から反復培養の安定性に着目したのは独創的な試みであり、未だ競合がなく主導的な開発可能性を有する。			

支 出 報 告	費目	計画時金額	実績額	備考
	設備備品費	0	0	
	消耗品費	250,000	298,273	
	旅費	100,000	100,952	
	謝金等	50,000	0	
	その他	0	0	
	合計	400,000	399,225	