

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25810095

研究課題名(和文) ヒドロゲナーゼの改良を目指した分子進化工学的手法の開発

研究課題名(英文) Development of the directed evolution methods for the improvement of [NiFe]-hydrogenase

研究代表者

伊原 正喜 (IHARA, Masaki)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：50391868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主な成果は、[NiFe]-ヒドロゲナーゼの宿主ベクター系による発現系構築に成功した事である。[NiFe]-ヒドロゲナーゼは複雑な翻訳後修飾によって活性型と成熟するため、大腸菌などを宿主とした発現系による組換えヒドロゲナーゼ蛋白質の作製が困難であった。しかし、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ構造遺伝子をベクターに挿入し、翻訳後修飾関連遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、両者の発現量を調節することで、ヒドロゲナーゼを活性型として発現させる事が可能であることを実証できた。また、この発現系では、簡便にヒドロゲナーゼへの変異導入ができるため、蛋白質工学に欠かせない変異ライブラリーの作製を可能となった。

研究成果の概要(英文)：One of the results we achieved in this study is to establish the easy-to-use host-vector system for the production of the active [NiFe]-hydrogenase. So far, the production of the [NiFe]-hydrogenase mutants was time-consuming and labor-intensive work because the conventional host-vector systems are not available due to the complicated post-translation process for the maturation of the enzyme. We demonstrated for the first time that the balance of the expression level of the structural [NiFe]-hydrogenase genes and those responsible to post-translation process is critical for the completion of the post-translation process. We successfully established the novel host-vector system by regulating the those expression level and the [NiFe]-hydrogenase random library.

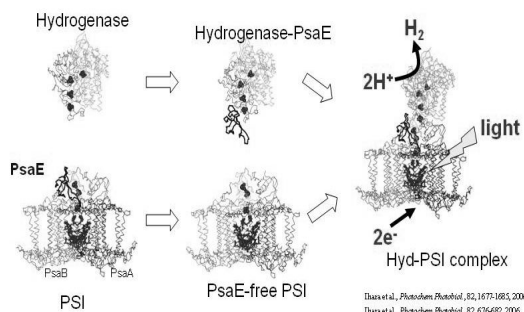
研究分野：蛋白質工学

キーワード：蛋白質工学 ヒドロゲナーゼ 水素 酸素耐性

### 1. 研究開始当初の背景

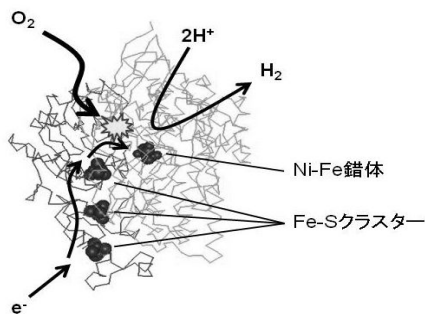
藻類の中には水素発生能を有する株が知られており、これらを野外の透明容器で培養することで、低コスト・低環境負荷の再生可能水素生産を実現させようとした研究が行われてきた。しかし、天然の藻類による水素生産は、「光-水素変換効率が低い」ことと、「酸素によって水素発生が停止する(酸素阻害)」という2つの問題により実用化に至っていない。

我々は、まず光変換効率問題に対して分子レベルの解決を目指し、これまでに、光合成反応中心である光化学系 I (PSI) に、水素生成酵素であるヒドロゲナーゼを組み合わせた人工的蛋白質複合体を考案し、PSI で吸収した太陽光エネルギーを直接水素エネルギーに変換することに世界で初めて成功している(図1、Ihara et al., 2006)。その後、我々のグループの他にアメリカやドイツの数グループが参入して研究が展開された結果、光量子収率はほぼ理論的限界にまで改善されるに至っている(Krassen et al., 2009, Lubnera et al., 2011)。



【図1、ヒドロゲナーゼ-PSI 複合体】

しかし、酸素阻害問題は未解決のままである。この問題は、ヒドロゲナーゼ活性の酸素感受性に起因している。ヒドロゲナーゼの触媒反応の場合は、蛋白質内部に存在するニッケル-鉄([NiFe])、もしくは鉄-鉄([FeFe])から成る二核錯体であるが、水素生成時、非常に高い還元状態となるために、酸化力の強い酸素分子と副反応を起こしてしまい、このことがヒドロゲナーゼの酸素感受性の要因と



【図2、[NiFe]-ヒドロゲナーゼの構造と酸素失活】

なっている(図2)。

我々は、ヒドロゲナーゼの酸素耐性を改善するには、酸素分子の蛋白質内部への侵入もしくは接近を阻止することが必要であると考へ、4つの独自のストラテジー；

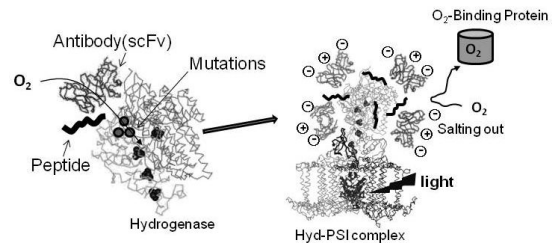
(1) 酸素分子の侵入経路付近にアミノ酸置換を導入することで経路を遮断する(図3左)

(2) 侵入経路入口をペプチドや抗体で封鎖する(図3左)

(3) 高度に帯電したペプチドをヒドロゲナーゼ表面に結合させることでカウンターイオンを引き寄せ、高塩濃度条件下で酸素分子の溶解度が低下する Salting out 効果を利用して周辺の酸素分子濃度を低下させる(図3右)

(4) 酸素分子結合能を持つシアノグロビンやレグヘモグロビンなどの蛋白質を共存させて、遊離の酸素分子濃度を低下させる(図3右)

を提案している。



【図3、ヒドロゲナーゼ酸素耐性化のためのストラテジー】

(左) 酸素分子侵入経路をアミノ酸変異によって遮断し、さらに入口を一本鎖抗体(scFv)やペプチドで封鎖する。(右) 多数の電荷を導入した抗体を結合させることで、イオンを引き寄せて酸素溶解度を低下させる。さらにシアノグロビンなどの酸素結合蛋白質を共存させて遊離酸素濃度を低下させる。

### 2. 研究の目的

研究開始当初の目的では、[NiFe]タイプと[FeFe]タイプの2種のヒドロゲナーゼのうち、より酸素耐性の高い[NiFe]-ヒドロゲナーゼについて、上記の(1) 酸素分子侵入経路の遮断を目指した。

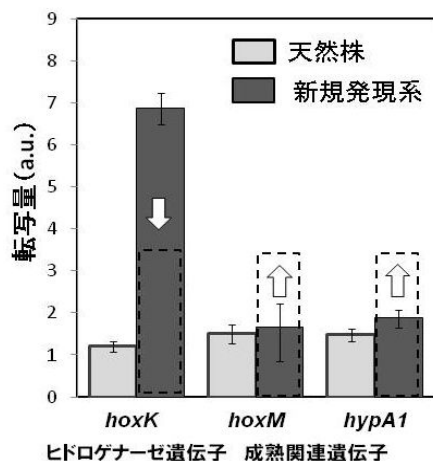
### 3. 研究の方法

ヒドロゲナーゼ酵素における酸素分子侵入経路の遮断には、蛋白質工学の知識や技術が必要となる。つまり、分子進化学的手法やコンピューターシミュレーションによる分子設計であるが、いずれにしても変異導入とスクリーニングを高速で繰り返すことが成功の鍵であり、変異体調製法とスクリーニング法の開発が必須である。しかし、[NiFe]-ヒドロゲナーゼは複雑な翻訳後修飾によって活性型と成熟するため、大腸菌を宿主とし

た発現系による変異体作製が困難であるという問題があった。そのため、[NiFe]-ヒドロゲナーゼの変異体作製は、相同組み換えによって宿主ゲノム上のヒドロゲナーゼ遺伝子を変異遺伝子と置換する方法などで行われていたが、調製に数ヶ月を要するだけでなく、数百～数千の変異体を同時に作製することができなかった。

そこで我々は、増殖速度が速く、高い[NiFe]-ヒドロゲナーゼ発現能を有する *R. eutropha* ヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を宿主とし、*R. eutropha* ヒドロゲナーゼ遺伝子を挿入した広宿主域ベクター-pBHR1を用いた新しい発現系を試みた。pBHR1は、5000bpと広宿主域ベクターとしては格段にサイズが小さいために、組換え操作が容易であり、エレクトロポレーションによる形質転換効率も高いという利点を有する。その結果、変異導入から活性評価までを二週間程度に短縮することに成功している。このことは、我々の開発した発現系が、現時点で唯一の簡便・迅速な[NiFe]-ヒドロゲナーゼ変異体調製系であることを意味している。

しかし、新規発現系での[NiFe]-ヒドロゲナーゼ活性は、野生型と比較して約十分の一と低かった。定量PCR実験から、ベクター由来のヒドロゲナーゼ遺伝子が、宿主ゲノム由来の成熟関連遺伝子群に対して過剰に転写されていることが明らかになった(図4)。この結果から、[NiFe]-ヒドロゲナーゼの成熟が完全に進んでいないことが推測された。



【図4、新規発現系におけるヒドロゲナーゼ遺伝子(*hoxK*)と成熟関連遺伝子(*hoxM*, *hypA1*)の転写量比較】

そこで、本研究では、ベクター上の[NiFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子上流のプロモーターを弱め、ゲノム上の成熟関連遺伝子群のプロモーターを強めることで、両者の転写バランスの最適化を目指す。我々は、すでに *R. eutropha* で機能するプロモーター (SH プロモーター) に変異を導入して、様々な転写活性を持つプロモーターのライブラリーを独自に作製しており、これらを発現ベクター構築に利用する。また、ゲノム上の成熟関連遺

伝子群のプロモーターを強めるために、本来のプロモーターに加えて新たなプロモーターを挿入する。

さらに、作製した多数の[NiFe]-ヒドロゲナーゼ変異体を迅速に評価するスクリーニング系が必要である。スクリーニング系については、酸素分子の侵入速度を抑制できた変異体、もしくは酸素失活速度の低下した変異体を、多数の検体の中から簡便迅速に探索することを目指す。[NiFe]-ヒドロゲナーゼの酸素失活を直接的に追跡する方法としては、活性中心のNiイオンの電子スピン状態をEPR測定する方法が考えられるが、ハイスループット化に問題がある。そこで、ヒドロゲナーゼサンプル(細胞破砕液)を電子メディエーターであるPhenazine Methosulphate (PMS)、レドックスマーカーであるNitroblue Tetrazolium(NBT)とともに、酸素ガスを含まない水素ガス雰囲気下に置くことで、酸素分子によるヒドロゲナーゼ失活、水素分子によるヒドロゲナーゼ再活性化、活性化ヒドロゲナーゼによる水素分子の分解とPMSおよびNBTの還元が起こり、酸素失活速度に反比例したNBT還元が観測されると考えた。現在、水素ガス:酸素ガス:窒素ガス=10:1:89の混合気体を充填したプローブボックス内にプレートリーダーを設置し、酸素失活速度が異なるとされている *R. eutropha*[NiFe]-ヒドロゲナーゼと *Desulfovibrio vulgaris*[NiFe]-ヒドロゲナーゼによるNBT還元を観測することで、スクリーニング系の検証実験を行っており、今後最適化を行う予定である。

一方で、本来の目的である水素生成反応での酸素耐性を評価する系についても開発が望まれる。この場合は、酸素存在下で[NiFe]-ヒドロゲナーゼに電子(還元力)を供給し、水素発生活性を観察することになるが、電子供給源(還元剤など)と酸素分子が反応するために、酸素耐性を評価することが困難であった。そこで今回、[NiFe]-ヒドロゲナーゼを光触媒に固定化し、酸素ガスとアルゴンの混合ガスでバブリングすることで酸素濃度を一定に保った上で、光照射することを考案した。その結果、酸素分子によるヒドロゲナーゼ失活、不活性型ヒドロゲナーゼの再活性化、活性型ヒドロゲナーゼによる水素発生が競合的に起こると考えられ、水素発生速度から酸素失活速度を評価できると考えられる。水素分子の発生速度は水素検出素子(Seibert et al., 1998)の呈色反応によって、視覚的に判断する予定である。

#### 4. 研究成果

まず発現系構築のため、ベクターと宿主の改良を行った。発現系は、SHプロモーターと[NiFe]-ヒドロゲナーゼ構造遺伝子を有するベクターと、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ成熟関連遺伝子(ヒドロゲナーゼ構造遺伝子は欠失)を有する宿主の組み合わせで構築されているが、上記の通り、[NiFe]-ヒドロゲナー

ゼ構造遺伝子発現量が、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ成熟関連遺伝子よりも数倍大きく、翻訳されたほとんどのヒドロゲナーゼペプチドが成熟する前に分解を受けていると予想された。そのため、プロモーターの発現活性を弱めたベクター（pBHR1~9）と、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ成熟関連遺伝子オペロンの上流にプロモーターを追加した宿主（HMU01~04株）を作製し、それぞれの組み合わせを検討した。その結果、pBHR1とHMU04株の組み合わせで、最も高い[NiFe]-ヒドロゲナーゼ活性が観測された。その活性は、野生型の半分程度であったが、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ進化工学の実施において十分であると判断した。

そこで、ベクター上の[NiFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子へのランダム変異導入を行い、ライブラリー（多様性約3000クローン）を作製した。それぞれのクローンは、96ウェルプレートで培養して、水素分解能を指標（水素存在下で、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ活性による、水素酸化とレドックスマーカーであるベンジルピオローゲン還元のカップリング反応に伴う600ナノメートルの吸光度上昇により判断）にスクリーニングした。本研究の目的では、酸素耐性を指標にすべきであるが、まだスクリーニング系が確立していないことや、[NiFe]-ヒドロゲナーゼの進化工学自体が大きなチャレンジであるために結果が得られやすい指標での変異体獲得を目指した。その結果、水素分解活性が有意に向上した変異体の取得に成功し、その成果をまとめて投稿した。しかし、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ蛋白質の精製方法について指摘を受け、再検討が必要となった。

指摘では、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ精製において、細胞破碎後、[NiFe]-ヒドロゲナーゼを安定に精製するために直ちに酸化させなければならないが、その方法に問題があり、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ活性を正確に見積もることが出来ていないというものであった。そこで、共同研究者であるドイツ・ベルリン工科大学レンツ教授の下で精製方法を習得し、その結果、[NiFe]-ヒドロゲナーゼ精製を成功させることができた。しかし、新たに精製し再評価したところ、意外にも、活性は野生型の十分の一以下であった。精製前の細胞抽出液中の総活性は、野生型と比較して有意に高いことから、以下のように考察できる。活性型の[NiFe]-ヒドロゲナーゼは、酸素存在下で酸化される事で、不可逆的に失活する事が知られているため、新しい精製方法では、酸化剤を用いることで、可逆的に再活性化可能な状態に変換して安定的に精製を進めることができる。しかし、変異体は、活性型として野生型と同等以上に発現したものの、酸化剤添加によっても不可逆に失活したため、活性が低くなったと考えられる。この仮説が正しければ、変異体のアミノ酸変異部位は、活性中心から遠く離れた、電子プール機能を

有する鉄硫黄クラスター近傍であることから、鉄硫黄クラスターが可逆的失活と不可逆的失活をコントロールしている可能性が浮上する。[NiFe]-ヒドロゲナーゼの失活仮定や、可逆的失活と不可逆的失活のコントロールは、ヒドロゲナーゼ研究において、最も重要な課題であるが、今回の変異体の更なる解析によって新たな知見が得られものと期待できる。

上の仮説を実証するために、失活状態や失活過程における[NiFe]-ヒドロゲナーゼ変異体の共鳴ラマン測定や赤外分光測定が必要である。[NiFe]-ヒドロゲナーゼの活性中心の鉄イオンにはC-OやC-Nイオンが配位しており、これらの振動数は、酸化還元状態に依存して鋭敏に変化するため、分光的手法を用いる事で、活性型、可逆的失活型と不可逆的失活型を区別でき、それぞれの経時変化を追跡することも可能である。そこで、信州大学工学部手嶋先生や、兵庫県立大学理学部小倉先生のご協力の下で、[NiFe]-ヒドロゲナーゼの分光測定を検討した。その結果、マイナス100以下において、サンプル損傷を最小限に抑えつつ、シャープなC-OやC-N由来バンドを観測することができ、酸化還元に伴うスペクトル変化から失活反応経路の推測が可能である事が明らかとなった。しかし、同時に、大量のサンプル（数十ミリグラム）が必要である事が明らかとなったため、大量培養系を立ち上げた。

今後は、[NiFe]-ヒドロゲナーゼの大量調製とともに、酸素耐性を指標にしたスクリーニング系の構築を目指す。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kai Kudoh, Shingo Hotta, Midori Sekine, Arisu Uchida, Genma Kubota, Rintaro Fujii, Yusuke Kawano, and Masaki Ihara (Overexpression of endogenous 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 accelerates protein aggregation) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, Vol.123, pp590-596. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.01.001 (査読有)

Kudoh Kai, Kubota Genma, Fujii Rintaro, Kawano Yusuke, Ihara Masaki (Exploration of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases suitable for the

creation of a robust isoprenoid biosynthesis system) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, Vol.123, pp300-307.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.10.005 (査読有)

伊原正喜 (生物触媒を利用した半人工光合成) *化学と工業*, 2016年11月号, Vol.69, pp963-965. (査読有)

Masaki Ihara\*, Yusuke Kawano, Yusuke Fujiwara, Tetsuya Kodo, Manami Mizuguchi, Yusuke Mochizuki, Kai Kodoh, Ayako Okabe, Izumi Matsuno (Expression Systems for Soluble Metal-Dependent Formate Dehydrogenase) *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 2015, Vol.313, pp154-162. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2015.06.028 (査読有)

Kai Kudoh, Yusuke Kawano, Shingo Hotta, Midori Sekine, and Masaki Ihara (Prerequisite for highly efficient isoprenoid production by cyanobacteria discovered through the over-expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and carbon allocation analysis) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, Vol.118, pp20-28. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.018 (査読有)

Masaki Ihara, Yusuke Kawano, Miho Urano, and Ayako Okabe (Light Driven CO<sub>2</sub> Fixation by Using Cyanobacterial Photosystem I and NADPH-dependent Formate Dehydrogenase) *PLOS ONE*, 2013, Vol.8, e71581. DOI: 10.1371/journal.pone.0071581 (査読有)

〔学会発表〕(計 5件)

伊原正喜、工藤哲弥、水口真奈美、望月佑亮、藤井麟太郎、藤原祐輔、岡部あや子、松野泉 (可溶性ギ酸デヒドロゲナーゼの創出と光ギ酸への応用) 第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7-9日、福岡国際会議場(福岡市)

伊原正喜 (光合成と酸化還元酵素の新たな組み合わせによる光駆動物質生産系の設計) 第13回分子科学研究所 CIMoS セミナー、2016

年3月28日、分子科学研究所(岡崎市)

伊原正喜 (シアノバクテリア光化学系Iとギ酸脱水素酵素を用いた光駆動型CO<sub>2</sub>固定反応) 第96回日本化学春季年会特別企画“CO<sub>2</sub>資源化” 2016年3月24日、同志社大学(京田辺市)

伊原正喜 (ヒドロゲナーゼの応用とその課題) 平成27年度日本化学会東海支部東海コンファレンス、2015年10月8日、信州大学工学部(長野市)

望月佑亮、佐藤彩香、岡部あや子、伊原正喜 (ヒドロゲナーゼ酸素失活過程の分光学的評価方法の確立) 第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24-26日、あわぎんホール(徳島市)

〔図書〕(計 3件)

伊原正喜他 31名、化学同人、光合成のエネルギー変換と物質変換、2015年、pp241-247、ISBN 978-4-7598-1720-1

伊原正喜他 32名、化学同人、次世代のバイオ水素エネルギー開発、2014年、pp86-91、ISBN 978-4-7598-1375-3

伊原正喜他 37名、情報機構、人工光合成実用化に向けた最新技術、2014年、pp270-275、ISBN 978-4-86502-006-9

〔産業財産権〕

出願状況(計 3件)

名称: 可溶性ギ酸デヒドロゲナーゼの発現システム

発明者: 伊原正喜, 河野祐介  
権利者: 国立大学法人信州大学  
種類: 特許

番号: 特願 2014-248927  
出願年月日: 平成26年12月9日  
国内外の別: 国内

名称: 可溶性ギ酸デヒドロゲナーゼの発現システム

発明者: 伊原正喜, 河野祐介  
権利者: 国立大学法人信州大学  
種類: 特許

番号: 特願 2013-255225  
出願年月日: 平成25年12月10日  
国内外の別: 国内

名称: 「NiFe」-ヒドロゲナーゼの発現系  
発明者: 伊原正喜, 河野祐介  
権利者: 国立大学法人信州大学  
種類: 特許

番号: 特願 2013-249437  
出願年月日: 平成25年12月2日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊原 正喜 (IHARA, Masaki)  
信州大学学術研究院農学系・助教  
研究者番号: 50391868