

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 4 日現在

機関番号：12401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06085

研究課題名(和文)試験管内生合成系を利用した高活性型人工ヒドロゲナーゼの創出

研究課題名(英文)Creation of an artificial hydrogenase enzyme with high activity using in vitro metal cofactor biosynthesis

研究代表者

藤城 貴史 (FUJISHIRO, Takashi)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：20740450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：水素分子を環境低負荷なエネルギーキャリアとして利用可能とする酵素[FeFe]-ヒドロゲナーゼに注目し、その活性中心の生合成系を人工的な補因子に置き換える方法により、活性の向上を狙った。大腸菌内で、[FeFe]-ヒドロゲナーゼと、3種類の生合成酵素を同時に発現させた、活性型[FeFe]-ヒドロゲナーゼ生合成系を調整し、Feとは異なる異種金属を作用させた結果、活性の向上は見られず、生合成系の活性中心とは異なる別の金属コファクター、鉄硫黄クラスターの分解傾向が見られた。今後は、鉄硫黄クラスターの生合成系酵素も同時に発現させ、鉄硫黄クラスターの分解を抑えつつ、ヒドロゲナーゼ活性向上を狙う予定である。

研究成果の概要(英文)：[FeFe]-hydrogenase is an attractive metalloenzyme, because it can use molecular hydrogen, which is an eco-friendly energy carrier. To increase its activity, the metal cofactor as the active site was modified with artificial metal ions using apo-[FeFe]-hydrogenase and its three biosynthetic enzymes. As a result, the hydrogenases activity was not increased, whereas the other metal cofactor, iron-sulfur cluster might be decomposed. Therefore, for further study, iron-sulfur cluster biosynthetic proteins should be also mixed in the reaction mixture in order to avoid decomposition of the iron-sulfur cluster toward increasing the hydrogenase activity.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ヒドロゲナーゼ 鉄 コファクター 生合成 酵素

### 1. 研究開始当初の背景

[FeFe]-ヒドロゲナーゼは、活性中心である金属コファクター、H-クラスターにおいて、水素分子を活性化し、電子を抽出し、プロトンに開裂する(図1)。水素の環境低負荷型エネルギーキャリアとしての利用価値から、[FeFe]-ヒドロゲナーゼの触媒としての利用が注目されている。近年、H-クラスターは3種類の鉄硫黄クラスターを有する生合成酵素(HydE、HydF、HydG)によって生合成されることが明らかとなった(図2)。このことにより、本来[FeFe]-ヒドロゲナーゼと、そのH-クラスター生合成系を持たない異種生物でも[FeFe]-ヒドロゲナーゼを生産し、研究することが可能となってきており、[FeFe]-ヒドロゲナーゼの触媒としての利用のための、活性向上の手法の開発が望まれている。

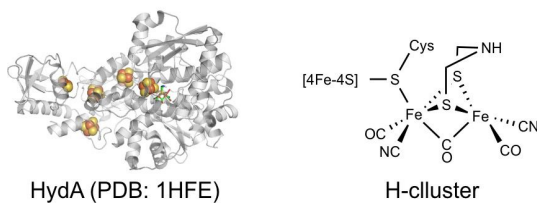
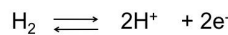


図1. [FeFe]-ヒドロゲナーゼによる水素活性化反応、[FeFe]-ヒドロゲナーゼタンパク質(HydA)の全体構造と、活性中心 H-クラスターの化学構造。

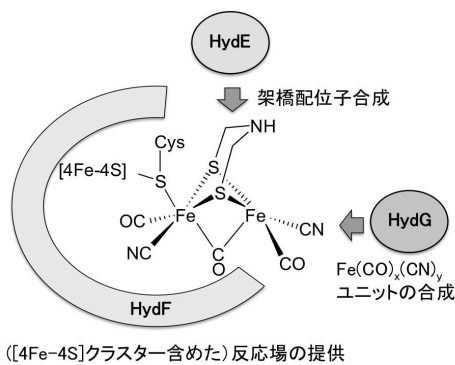


図2. [FeFe]-ヒドロゲナーゼの活性中心の生合成の模式図。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、[FeFe]-ヒドロゲナーゼの活性向上の方法の1つとして、H-クラスターの生合成系に注目し、その生合成系で利用される材料、特にH-クラスターの鉄イオンを天然にない異種金属に置き換えた人工ヒドロゲナーゼの合成について検討した。異種金属としては、これまでヒドロゲナーゼのモデル金属錯体で用いられたRuや水素利用型の分子触媒で用いられるPdなどを検討した。

### 3. 研究の方法

[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子と H-クラス

ターの生合成遺伝子3種類を、本来[FeFe]-ヒドロゲナーゼを持たない大腸菌細胞内で同時に発現させ、カラムクロマトグラフィーによって活性型[FeFe]-ヒドロゲナーゼとその生合成酵素の混合液を調整した。そこに種々の異種金属を添加し、生合成反応を行った後、ヒドロゲナーゼ活性を測定した。

### 4. 研究成果

大腸菌で[FeFe]-ヒドロゲナーゼと H-クラスターの3種の生合成酵素を His-tag 融合タンパク質としてそれぞれ発現させ、Ni アフィニティーカラムで精製した。精製したサンプルを用いて SDS-PAGE を行った結果、[FeFe]-ヒドロゲナーゼと3種の生合成酵素は十分な量かつ高純度で精製されることが確認された。

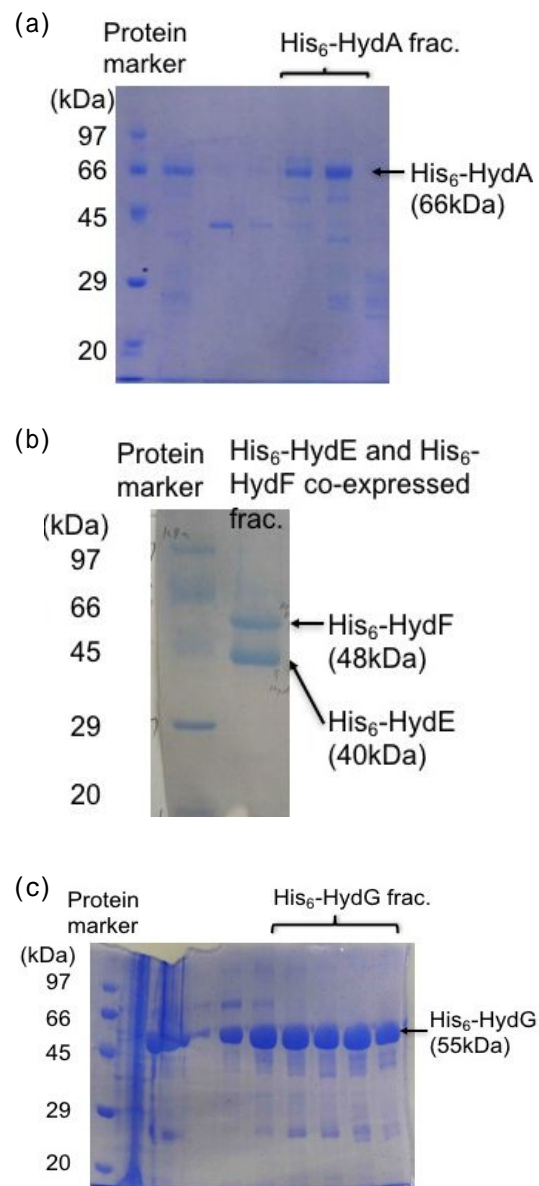


図3. 大腸菌発現系での(a)[FeFe]-ヒドロゲナーゼ(b)HydEとHydF,(c)HydGの発現と精製。

この精製標品に対し、嫌氣的雰囲気下で異種金属である Ru、Pt、Re の塩化物塩を種々の濃度で添加し作用させ、人工的な H-クラスターの生合成反応を行い、生合成反応系のヒドロゲナーゼ活性を評価した。しかしながら、活性の向上は見られなかった。そこで、4種の酵素を別々に精製し、異種金属添加の影響を調べた結果(図3)どの酵素の場合にも、鉄硫黄クラスターが部分的に分解している傾向が見られた。ヒドロゲナーゼ活性を司る活性中心金属コファクターの生合成に必要な3種の生合成酵素はどれも鉄硫黄クラスターを持っているため、この手法では活性向上は困難と考えられた。

そこで、より温和な条件と考えられる、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ生合成系を発現させた大腸菌細胞内 (*in vivo*) で、異種金属添加のヒドロゲナーゼ活性の影響を検討した。培地に異種金属を添加して、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ生合成系を発現させ、同様にヒドロゲナーゼを精製し活性測定した結果、活性の向上は見られなかった。原因は現在検討中であるが、おそらく異種金属イオンの大腸菌への取り込み効率が低いことが原因の1つと考えられる。

今後は鉄硫黄クラスターへの異種金属の影響を抑えつつ、生合成系を *in vitro* で構築する系や、鉄硫黄クラスター生合成酵素の *in vivo* 共発現系を検討する必要があると考えられる。

実際に、大腸菌では鉄硫黄クラスター生合成系は ISC マシナリーと SUF マシナリーの2種類があり、現在、鉄硫黄タンパク質の1つフェレドキシンをモデルとした相互作用解析により、タンパク質間相互作用が2種の生合成系でそれぞれ異なることが示唆されている(図4、図5)。

従って、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ生合成系においても、鉄硫黄クラスターの分解を抑えるために、これら ISC マシナリーと SUF マシナリーの使い分けを検討する必要があると考えられる。現在は、ISC マシナリーを導入した大腸菌株を構築中である、タンパク質発現の確認を行っている。

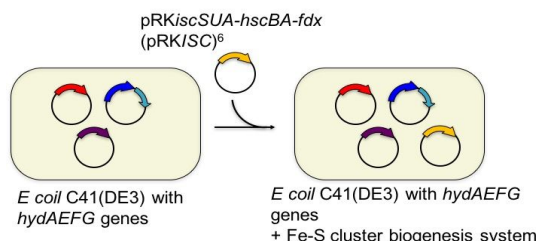


図4. 大腸菌発現系での[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子 (*hydA*) と、*hydE*、*hydF*、*hydG*、*isc* 遺伝子群の発現系の構築の模式図。isc 遺伝子群は鉄硫黄クラスター生合成系マシナリーをコードしており、プラスミドとしてその遺伝子を大腸菌に導入することで、細胞内鉄

硫黄クラスター濃度を向上させ、より活性体である [FeFe]-ヒドロゲナーゼの割合を増加させることが可能と期待される。

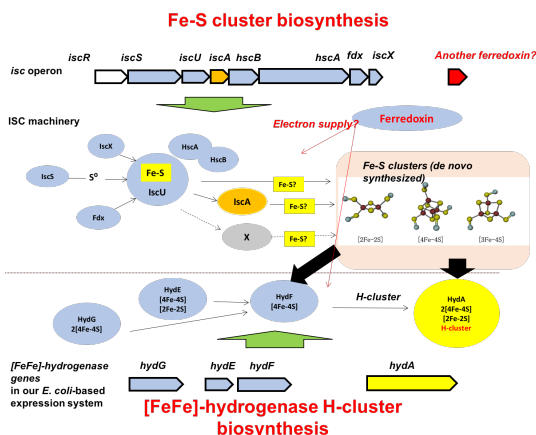


図5. 大腸菌発現系での[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子 (*hydA*) と、その活性中心 H-cluster 生合成遺伝子 *hydE*、*hydF*、*hydG*、および、鉄硫黄クラスター生合成遺伝子オペロン *isc* の、予想される大腸菌細胞内ネットワーク。鉄硫黄クラスターは、HydA、HydE、HydF、HydG 全てに用いられており、大腸菌内の鉄硫黄クラスター濃度を上昇させることで、より高いヒドロゲナーゼ活性を持つ細胞、あるいは、100%活性型の酵素を得ることが可能と考えられる。また、isc オペロン以外に大腸菌ゲノムに幾つかの電子伝達タンパク質であるフェレドキシンが見つかり、それらの1つが鉄硫黄クラスター生合成系オペロンや *hydA*、*hydE*、*hydF*、*hydG* などと関連し、細胞内の還元度、電子供給をコントロールしている可能性も、現在、検討中である。

## 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)

1. Liping Bai, Takashi Fujishiro, Gangfeng Huang, Jürgen Koch, Atsushi Takabayashi, Makio Yokono, Ayumi Tanaka, Tao Xu, Xile Hu, Ulrich Ermler, Seigo Shima, “Towards artificial methanogenesis: biosynthesis of the [Fe]-hydrogenase cofactor and characterization of the semisynthetic hydrogenase”, *Faraday Discuss.* accepted.

2. Takashi Fujishiro, Liping Bai, Tao Xu, Xiulan Xie, Michael Schick, Jörg Kahnt, Michael Rother, Xile Hu, Ulrich Ermler, Seigo Shima, “Identification of HcgC as SAM-dependent pyridinol methyltransferase in [Fe]-hydrogenase cofactor biosynthesis” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, vol.55, pp.9648–9651.

3. Seigo Shima, Dafa Chen, Tao Xu, Matthew D. Wochnik, Takashi Fujishiro, Katherine M. Schultz, Jörg Kahnt, Kenichi Ataka, and Xile Hu, "Reconstitution of [Fe]-hydrogenase using model complexes" *Nat. Chem.*, **2015**, 7, 995–1002.

4. Takashi Fujishiro, Kenichi Ataka, Ulrich Ermler, and Seigo Shima, "Towards a functional identification of catalytically inactive [Fe]-hydrogenase paralogs" *FEBS J.*, **2015**, 282, 3412–3423.

5. Takashi Fujishiro, Jörg Kahnt, Ulrich Ermler, and Seigo Shima, "Protein-pyridinol thioester precursor for biosynthesis of the organometallic acyl-iron ligand in [Fe]-hydrogenase cofactor" *Nat. Commun.*, **2015**, 6, article number:6895.

6. 嶋盛吾, 藤城貴史「[Fe]-ヒドロゲナーゼの活性中心コファクターと立体構造解析に基づくその生合成酵素の同定」酵素工学ニュース(酵素工学研究会誌), 査読有, 2016年10月, 第76号, 25-29ページ.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 藤城貴史、大野知佳、上岡勇輝、高橋康弘「鉄硫黄クラスター生合成系タンパク質 IscA とフェレドキシン FdxN の相互作用の解析」日本化学会第 9 7 回春季年会、2017年3月16–19日、慶応大学日吉キャンパス、(神奈川県横浜市)。

2. 中村亮裕、藤城貴史、高橋康弘「鉄硫黄クラスター生合成系 NIF マシナリーのシステイン脱硫酵素 NifS の触媒メカニズムの解明」日本化学会第 9 7 回春季年会、2017年3月16–19日、慶応大学日吉キャンパス、(神奈川県横浜市)。

3. 藤城貴史、高橋康弘「鉄硫黄クラスターの生合成」東京大学物性研究所短期研究会 "新世代光源で切り拓く物質科学と生命科学の融合領域" 2017年3月7日、東京大学物性研究所、(千葉県柏市)。

4. 藤城貴史、中村亮裕、佐藤紗季子、高橋康弘「共結晶化によるリガンドスクリーニング法を用いた鉄硫黄クラスター生合成系 NIF マシナリーのシステイン脱硫酵素 NifS の構造-機能相関の解明」第 4 3 回生体分子討論会、平成 28 年 6 月 24 日–6 月 25 日、名古屋大学、野依記念学術交流館、(愛知県名古屋市)。

5. 藤城貴史、高橋康弘「異種生物由来の [FeFe]-ヒドロゲナーゼ関連遺伝子を導入した大腸菌水素生産系構築の試み」日本化学会第 9 6 回春季年会、2016年3月24–2

7 日、同志社大学京田辺キャンパス、(京都府京田辺市)。

6. 藤城貴史、KAHNT Jörg, XIE Xiulan, ERMLER Ulrich, 嶋盛吾「構造情報を利用した [Fe]-ヒドロゲナーゼのコファクター生合成に關与する Hcg 酵素の同定」, 第 3 8 回日本分子生物学会年会 / 第 8 8 回日本生化学会大会 合同大会, 平成 27 年 12 月 1 日–4 日, 神戸ポートアイランド, (兵庫県神戸市), 兵庫.

7. T. Fujishiro, J. Kahnt, X. Xie, U. Ermler, S. Shima, "Identification of Hcg enzymes in biosynthesis of [Fe]-hydrogenase cofactor", ICBIC17, 20-24 Jul. 2015, Beijing, China.

8. T. Fujishiro, J. Kahnt, X. Xie, U. Ermler, S. Shima, "Structure genomics-based functional identification of Hcg enzymes involved in the biosynthesis of the FeGP cofactor of [Fe]-hydrogenase" RIKEN Symposium series: "Metals in Biology" in Wako, 16-17 Jun. 2015, 理化学研究所 (埼玉県和光市)。

〔その他〕

ホームページ等  
埼玉大学研究者総覧  
<http://s-read.saitama-u.ac.jp/researchers/pages/researcher/aZwEQBIX?1491312390>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
藤城 貴史 (FUJISHIRO, Takashi)  
埼玉大学・  
理工学研究科生命科学部門  
分子生物学領域・助教  
研究者番号: 20740450