

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07717

研究課題名（和文）ギ酸デヒドロゲナーゼを用いた新規人工炭酸固定系

研究課題名（英文）Synthetic carbon dioxide fixation system using formate dehydrogenase

研究代表者

伊原 正喜（Ihara, Masaki）

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：50391868

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：二酸化炭素と水素の反応により生成するギ酸は、持続可能社会において、石油に代わる物質生産のハブ物質と考えられる。ギ酸から有用な物質を合成する方法として、ギ酸資化菌を利用した発酵工学が有望であるが、現在知られているギ酸資化菌のギ酸取り込み速度は1リットルあたり1日数ミリグラムとかなり遅い。そこで、それらの既存のギ酸資化菌酵素を用いる限り、大幅な改善は期待できない。本研究では、ギ酸資化関連酵素の改良および探索を目指した。ギ酸資化にはギ酸からの還元力供給が律速となっているため、ギ酸デヒドロゲナーゼの改良を行い、安定化に成功した。また、自然界から、これまでで最もギ酸資化能の高い新規ギ酸資化菌を単離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水素は、昨今の再生可能エネルギー発電の低価格化によって、安く大量に低環境負荷にて生産されるようになった。この水素を使えば、二酸化炭素を固定化（還元）して、石油代替品を生産することができ、そのような社会がいよいよ実現しようとしている。水素と二酸化炭素の反応による最初の生成物は、ギ酸である。このギ酸をさらに複雑で有用な物質に変換する際にも、環境負荷の低い方法が重要であり、ギ酸を資化し、様々な物質に変換するバクテリアの重要性は高い。我々の成果は、ギ酸を資化するバクテリアの改良に必要な酵素のレパートリーを高めたことに意義がある。

研究成果の概要（英文）：Formate is expected as a hub compound for the material industry in a next sustainable society. The bioprocess using formate-utilizing bacteria is desirable to convert formate into value-added compounds. However, the uptake rates of the bacteria are slow (several micro grams per day per little), which makes impossible to use them industrially. We tried to improve the enzymes associated with formate assimilation or to screen new formate-utilizing bacteria. We successfully established the expression system for formate dehydrogenase, a key enzyme in energy supply in formate assimilation, and improved the stability and activity. We also found two new formate-utilizing bacteria with 5~10 fold higher formate uptake abilities.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：ギ酸デヒドロゲナーゼ 二酸化炭素固定 微生物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2015年COP21にて「パリ協定」が締結され、低炭素社会実現に向けた技術開発の機運が高まっていた。当時、太陽電池や風力発電による再生可能発電コストが昨今のような価格破壊が起こっていなかった。著者は、“再生可能エネルギーの6次産業化”を提案し、発電を利用した“二酸化炭素の資源化”(1次産業)によって、生分解プラスチックなどの化成品を生産し(2次産業)、さらに3Dプリンター技術等による製品化と販売(3次産業)までを一貫して行うモデルを考えた。我々は、水の電気分解によって生産した水素ガスを利用した二酸化炭素固定化が現実的であると考え、固定化した二酸化炭素を小規模施設で一気にプラスチック素材などに高分子化するには、バクテリアの利用が最も合理的であると考えた。

同様の考えは昨年 Nocera らによって報告されている(Nocera et al., *PNAS*, 2015, 112, 2337)。彼らは、水素発生型光触媒と水素細菌 *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*) を一つの反応槽に入れ、二酸化炭素を吹き込みながら光照射することで、二酸化炭素の資源化に成功している。*R. eutropha* は、水素ガス、酸素ガス、二酸化炭素の混合気体雰囲気下で、エネルギーを獲得し、カルビン回路で二酸化炭素を固定化する化学独立栄養生物であり、且つ生分解性プラスチック合成菌として知られている。よって、二酸化炭素からプラスチック生産が可能となる。しかし、カルビン回路は、速度および効率に課題があり、需要に答えるためには改善が求められる。

### 2. 研究の目的

本研究では、図1に示した新しい二酸化炭素固定系を、非光合成バクテリア内に構築する事を目的とした。大腸菌由来ギ酸デヒドロゲナーゼ(EcFDH-0)は、二酸化炭素を還元してギ酸を生成する酵素として知られていたが、我々のこれまでの研究によって、水素ガス分解能を併せ持つ事が明らかとなった。よって、EcFDH-0、及びC1代謝系を導入することで、水素ガス存在下で二酸化炭素をギ

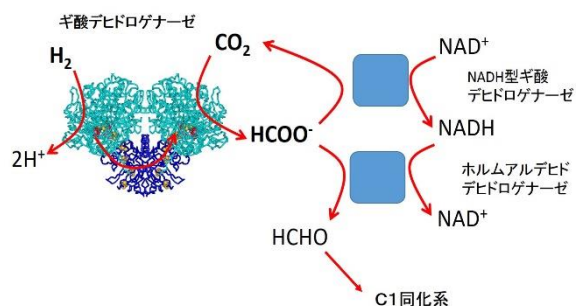


図1、ギ酸デヒドロゲナーゼと水素分子を用いた二酸化炭素固定系

酸、ホルムアルデヒドへと変換し、さらにバイオプラスチックなどに資源化するバクテリアを創出する事ができると考えた。本研究では、この新規二酸化炭素固定系の課題であるEcFDH-0の安定化と改良に取り組んだ。また、ギ酸などのC1化合物資化経路の改善を目指して、自然界からギ酸資化菌をスクリーニングし、安定性や活性の高い関連酵素の探索を行った。

### 3. 研究の方法

先行研究にて、EcFDH-0タンパク質の膜結合 $\gamma$ サブユニット全体と、鉄硫黄を有する $\beta$ サブユニットの膜結合ヘリックスを削除したEcFDHsolを作製していた(図2)。本研究では、EcFDHsolの安定化のために、多数のアミノ酸置換体を作製し、それぞれの安定性を評価した。アミノ酸置換箇所については、分子動力学シミュレーションやタンパク質構造解析ソフトによって、揺らぎ(RMSF)の大きな部位、種間でのアミノ酸保存度(The

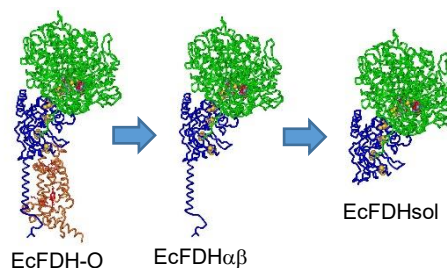


図2、可溶性ギ酸デヒドロゲナーゼ(EcFDHsol)作製スキーム

ConSurf Server)、タンパク質表面の疎水性度、分子内相互作用 (Arpeggio)、ループ構造のひずみ、タンパク質表面の塩橋、タンパク質内部の空洞を評価、可視化し、それらから不安定化に寄与していると考えられる部位のアミノ酸数個にいくつかの変異を導入した。得られた変異体について、ゲルろ過クロマトグラフィーや、活性測定、安定性 (失活速度) を評価した。

また、ギ酸資化菌の探索のため、メタノールを唯一の炭素源とした液体最小培地で、いくつかの海水サンプルを集積培養した後に、ギ酸を唯一の炭素源とした寒天培地に播種してクローニングした。それぞれの単離株について、ギ酸資化能を液体培養にて評価した。

#### 4. 研究成果

EcFDHsol の  $\beta$  サブユニットの C 末端近傍、かつ鉄硫黄クラスター周辺の 6 個のアミノ酸が、 $\gamma$  サブユニット削除に伴ってタンパク質表面に露出していたため、種々の親水性アミノ酸で置換した変異体群を作製・評価した。この結果から、活性が向上した変異体を 4 種得ることができ、最も活性の高かった変異体 EcFDHFeS\_6 と呼ぶことにした。高活性変異体は、共通して I134E、Y138S、A141S の 3 つのアミノ酸置換を持っていたため、これら 3 つのアミノ酸置換のみを導入した変異体 EcFDHFeS\_3 を作製した。EcFDHFeS\_3 の発現量は、EcFDHsol と比較して低下していたが (図 3)、非活性では 1.8 倍であった (図 4)。しかし、細胞破碎 48 時間後の残存活性は、逆に EcFDHsol の方が高く、安定性の回復という目的は達成できなかった。

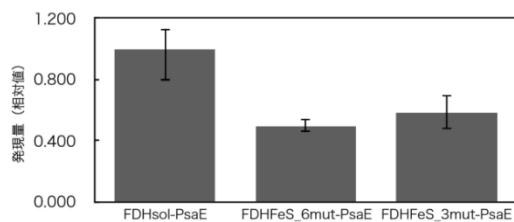


図 3、EcFDHsol および EcFDHFeS\_6、EcFDHFeS\_3 の発現量比較

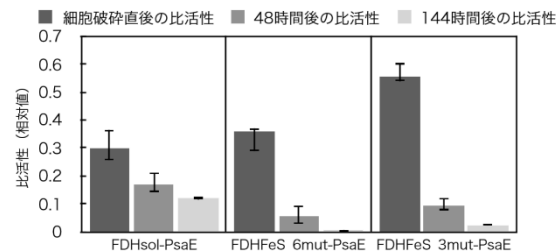


図 4、EcFDHsol および EcFDHFeS\_6、EcFDHFeS\_3 の失活速度比較

EcFDHsol と EcFDHFeS\_6 に関して、 $\beta$  サブユニットのみを用いた分子動力学シミュレーションを実施し、それぞれの 500 ナノ秒間の平均水和自由エネルギー差を計算した。その結果、EcFDHFeS\_6 の水和エネルギーは、EcFDHsol より約 300 kJ/mol 低いことが示唆され、水中での安定性が高いことが推測された。次に、 $\beta$  サブユニット内の鉄硫黄クラスターの 500 ナノ秒間における平均距離を算出した。EcFDHsol では約 14.5 Å、EcFDHFeS\_6 で約 13.5 Å であった。 $\beta$  サブユニットのみを用いた分子動力学シミュレーションの結果であるため、実際にこれほどの差が出ているかは分からないが、EcFDHFeS\_6 は、EcFDHsol と比較して構造維持力が強いことを示唆している。シミュレーション実験では、EcFDHFeS\_6 の安定性向上が示唆されたが、実際の失活

速度は高く、両者の結果は矛盾している。この原因については不明であるが、プロテアーゼ抵抗性が違っている可能性が考えられる。

新たなアミノ酸置換導入部位として、強い分子内相互作用および種間で高度に保存されている残基を排除した。次に、分子動力学シミュレーションの結果から、構造のゆらぎや

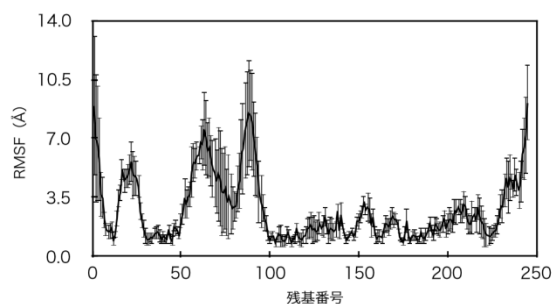


図 5、分子動力学シミュレーションによる EcFDHsol  $\beta$  サブユニットの RMSF

つことが予想された。これらの領域は、ループ構造をとっており、残基番号 60-70 のループ構造

(Loop60-70) 内には塩橋ペア、残基番号 15-25 のループ構造 (Loop15-25) については、ループ構造の短絡化を試みた。他にも、最も大きな分子内空洞内に塩橋ペアを設計し、タンパク質のパッキング性改善を目指した。さらに、溶媒に露出している疎水性残基や、反発していると考えられる表面の荷電性アミノ酸ペアを塩橋形成ペアへと改変するアミノ酸変異を設計した。上記 16 箇所のアミノ酸変異を一部もしくはすべて有している変異体、EcFDHsol\_4、EcFDHsol\_10、EcFDHsol\_1c を作製し、大腸菌内で発現させた。

発現量は、EcFDHsol が最も多く、次いで EcFDHsol\_4、EcFDHsol\_10 と EcFDHsol\_1c の順で低下することが明らかになった。細胞破碎直後の比活性については、EcFDHsol\_10 (EcFDHsol の 4.3 倍) が最も高く、次いで EcFDHsol\_4 (EcFDHsol の 2.7 倍)、EcFDHsol\_1c (EcFDHsol の 1.8 倍)、EcFDHsol の順となった (図 6)。EcFDHsol\_10 の細胞破碎後 48 時間後の残存活性は、EcFDHsol の約 4 倍であり、安定化に成功した (図 6)。

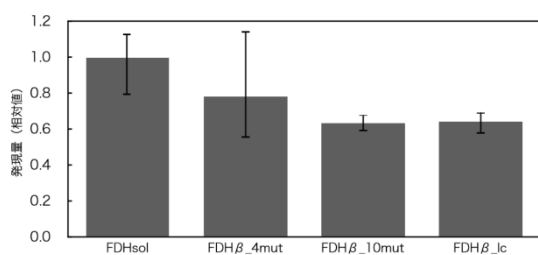


図 6、EcFDHsol および EcFDHsol\_4、EcFDHsol\_10、EcFDHsol\_1c の発現量比較

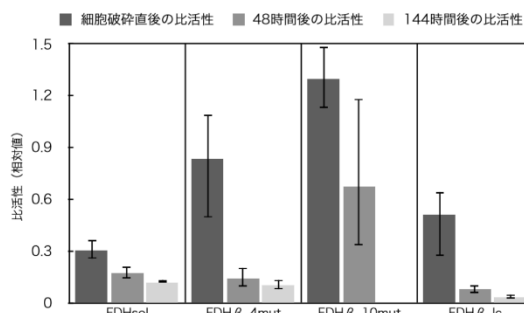


図 7、EcFDHsol および EcFDHsol\_4、EcFDHsol\_10、EcFDHsol\_1c の失活速度比較

C1 化合物代謝関連遺伝子の探索のため、ギ酸資化菌のスクリーニングを行った。ギ酸資化菌は、わずかに数株が単離されているのみであるが、今回新規ギ酸資化菌が 2 株単離でき、ギ酸添加最小培地において、最も研究されている *Methylobacterium extorquens* AM1 よりも増殖速度が 2~3 倍であった。また、二酸化炭素固定培養における課題が、水中の菌体へのガス (酸素や二酸化炭素) 供給のための激しい攪拌であることから、水面に浮遊するバイオフィームを形成し、気液界面に高い細胞密度を実現することで、ガスの取り込みを効率化している株を単離した。それぞれの株について、C1 代謝の宿主としての有用性や有用遺伝子のクローニングを行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Alice Uchida, Yukiko Higashi, Shota Yamamoto, Kazuhiro Shibata, Jun Nakanishi, Naoki Kanayama, Masaki Ihara	4. 巻 48
2. 論文標題 Production of extracellular polysaccharides and phycobiliproteins from Tolypothrix sp. PCC7601 using mechanical milking systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Algal Reaserch	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.algal.2020.101929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井麟太郎、水口真奈美、工藤哲也、伊原正喜
2. 発表標題 計算科学と分子進化工学を駆使したギ酸デヒドロゲナーゼの安定化
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東佑季子、金山直樹、山本翔太、中西淳、伊原正喜
2. 発表標題 FFF-MALSを用いた藻類多糖の構造解析
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----