

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2008～2012
課題番号：20248023
研究課題名(和文) 深海熱水生態系に基づく脱石油型次世代エネルギーと新素材の生産に関する研究
研究課題名(英文) Study on next-generation technology for production of oil independent energy and new materials based on deep-sea hydrothermal environments.
研究代表者
左子 芳彦 (SAKO YOSHIHIKO)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：60153970

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：深海熱水環境、新エネルギー、水素、CO₂固定、好熱菌、ヒドロゲナーゼ、CO₂デヒドロゲナーゼ

1. 研究計画の概要

本研究目的は、海洋性(超)好熱菌由来の触媒機能を用いた石油資源に依存しない再生可能な水素エネルギーおよび石油代替素材の生産・開発である。次世代エネルギー及び新素材の生産開発において、申請者は太陽光に依存せず膨大なバイオマスを有する深海熱水生態系を支える好熱菌のエネルギー及び物質循環系に着目した。そして、次世代エネルギーとして注目される水素の生産触媒として(超)好熱菌のヒドロゲナーゼ(H₂ase)に着目し、光触媒を組み合わせて持続的水素生産系を構築する。また、新素材生産に関わる触媒として化学合成独立栄養微生物ならびに一酸化炭素デヒドロゲナーゼ(CODH)を用いて、CO₂からの有用新バイオポリマーの生産系を構築する。これらの触媒を、太陽光エネルギーと共役させ、脱石油型エネルギーおよび素材資源の生産プラットフォームを創成することが本研究の最終的な目標である。

2. 研究の進捗状況

(1) 超好熱菌 H₂ase の多様性解析

海洋性超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* を 90℃で培養し、菌体をフレンチプレスで破碎し、各種クロマトグラフィーを用いて3種類のサブユニットからなる分子量 168kDa の H₂ase を完全に精製した。本酵素の水素生産比活性は 0.97 μmol/H₂/min/mg (85℃, pH6.0)であり、4℃大気下での酸素耐性は708時間後も50%の活性を維持し、既報の酵素に比較して極めて酸素耐性が強かった。超好熱古細菌 *Aeropyrum camini* を好気条件下

85℃にて培養し精製した本酵素の水素生産比活性は 7.3 mmol H₂/min/mg (85℃, pH 6.0)で、4℃大気下で酸素耐性を調べた結果336時間後も50%の活性を維持し極めて強い酸素耐性を有していた。

深海熱水孔から分離された微好気性好熱水素細菌 *Hydrogenimonas thermophila* を水素：二酸化炭素：酸素(78:20:2)混合ガス中にて55℃で培養し、ビーズビーターで細胞を破碎し膜画分からH₂aseを可溶化し精製した。本酵素の水素生産比活性は 900 μmol/H₂/min/mg (80℃, pH6.0)と極めて高く、酸素暴露57時間後も50%の高活性を有した。精製酵素をエドマン分解法にて内部アミノ酸配列を決定した。本配列をもとに本酵素遺伝子(*h₂p*)群をPCR法にて調べた結果、H₂ase遺伝子は酸素耐性が強いε-proteobacteriaの[NiFe]-H₂aseと高い相同性を示し、オペロン構造を有していた。

(2) 耐熱・耐酸素性を有する固定化 H₂ase の電気化学的解析

3種で最大の耐酸素性を示した *Aeropyrum camini* の H₂ase を交互積層法(LBL法)並びにシリカゾルゲルマトリクス法(SG法)にてGlassy Carbon上に固定化し、アンペロメトリー試験を行った。LBL固定化法において168時間にわたって水素生産が観察され、SG法より高い活性と持続時間が得られた。

(3) 熱水環境から CODH 活性を有する菌の分離と性状解析及び本酵素発現系の確立

鹿児島県指宿市の鰻温泉から、気相100%CO₂、55℃の培養条件下で増殖可能な桿菌を分離した。本株の至適増殖温度は、62～64℃で鞭

毛を有し 16S rDNA 塩基配列の解析結果から *Carboxydothemus hydrogenoformans*, *C. siderophilus*, *C. ferrifeducens* と 95~96% の相同性を示した。本株は CO を消費して H₂ を生産し、対数増殖時に CODH 活性が認められたことから、*Carboxydothemus* 属の新種と考えられた。本株の CODH 遺伝子を PCR 法により解析した結果、ゲノム解析がなされた *C. hydrogenoformans* の CODH I~V に相同性を有する 5 つの CODH 遺伝子ホモログが見出され、各々異なるサブファミリーに属していた。次に、*C. hydrogenoformans*Z-2901 株由来 CODHII コード遺伝子 *cooSII* 全長を pET28-a ベクターに挿入し、大腸菌による発現系を確立した。組換え CODH は、CO 酸化活性ならびに CO₂還元活性を保持していた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。
(理由)超好熱菌からの H₂ase の精製と性状解析がなされ論文発表が完了しているが、酵素の効率的な固定化については問題点が残されている。CO 資化性菌の分離・性状解析と CODH 遺伝子の発現は予定通り進展しており現在論文投稿中である。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 昨年度までの研究により、深海熱水孔より分離した超好熱古細菌 *Aeropyrum camini* から水素を生産するヒドロゲナーゼ活性が検出され、精製してその耐熱性と耐酸素性を有する性状を明らかにした。今年度は、酵素の固定化や利用に向けて、ゲノム解析がなされより比活性が高い本酵素を生産する *A. pernix* の株を異なった熱水環境から分離して調べ、培養条件や生理学的条件を変化させて本酵素活性を測定して比較し、高い比活性を有する株を選択する。またこれらの株が生産するヒドロゲナーゼの遺伝子構造を比較解析して、耐熱性や比活性との関係を検討する計画である。

(2) *Aeropyrum* 属古細菌や好熱性水素細菌 *Hydrogenimonas thermophila* から精製されたヒドロゲナーゼを大量培養系を確立して本酵素を精製し、種々の方法を用いてより安定な酵素固定化を試みる計画である。本酵素の固定化法として交互積層法ならびにシリカゲルマトリクス法を中心に検討して光触媒等を用いた酵素固定化電極を作成し、電気化学アナライザーと生じた水素をガスクロマトグラフィーを用いて測定し水素生産試験を行う予定である。

(3) 昨年度までに鹿児島県指宿市の鰻温泉から、気相 100%CO₂、55℃の培養条件下で増殖可能な *Carboxydothemus* 属の新種を見出した。本属の CODHII に特異的な PCR プライマーを用いた生態学的調査において、本サン

pling地点には、本属種が全菌数に対して最大 10%も存在する可能性が示された。そこで、本環境を中心に CODH 活性を有する新規な菌の分離を引き続き試みる。分離法は、種々の高温環境から堆積物や熱水試料を採取し、CO を唯一の炭素源として増殖する菌を分離する。次に分離株の分類学的な性状を解析する。さらに、昨年度までに開発した大腸菌による CODH の大量発現系を用いて、分離株の CODH の生化学的性状解析を行う。特に得られた組換え酵素と既報の酵素において酸素耐性や耐熱性を比較し有用性の検討を行う。

5. 代表的な研究成果

(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 (Nishimura, H., Sato, N., Nomura, Y., Iwata, E. and Sako, Y. Purification and characterization of carbon monoxide dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *Fish. Sci.* 76. 999-1006. (2010) 査読有

② Nishimura, H., Kitano, Y., Inoue, T., Nomura, K. and Sako, Y. Purification and characterization of membrane associated hydrogenase from the deep-sea epsilon proteobacterium *Hydrogenimonas thermophila*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(8), 1624-1630 (2010) 査読有

③ Mochizuki, T., Yoshida, T., Tanaka, T., Forterre, P., Sako, Y. and Prangishvili, D. Diversity of viruses of the hyperthermophilic archaeal genus *Aeropyrum*, and isolation of the *Aeropyrum pernix* bacilliform virus 1, APBV1, the first representative of the family "*Clavaviridae*". *Virology* 402, 347-352 (2010) 査読有

④ Nishimura, H. and Sako, Y. Purification and characterization of the oxygen-thermostable hydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum camini*. *J. Biosci. Bioeng.* 108;299-303(2009) 査読有 他 2 件

[学会発表] (計 10 件)

① 大福高史・吉田天土・井上喬裕・米田恭子・西村宏・左子芳彦：「好熱性一酸化炭素資化性細菌 *Carboxydothemus* sp. Ugl 株における CODH 遺伝子の同定」平成 22 年度日本水産学会秋季大会 京都 2010 年 9 月 他 9 件

[図書] (計 2 件)

① 西村宏、左子芳彦：水素生産酵素 p. 897-901 (2010) 「酵素利用技術大系」株式会社エヌ・ティー・エス 東京 他 1 件