

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22559

研究課題名（和文）未知の電子バイフリケーション反応の検証—新たな遺伝子資源の開拓—

研究課題名（英文）Verification of unknown electron bifurcation: Development of new gene resources

研究代表者

渡邊 友浩（Watanabe, Tomohiro）

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：80731968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヘテロジスルフィド還元酵素が触媒する電子分岐反応は、電子対の一方の電子を高エネルギー状態にする。これは、持続可能な社会の技術基盤として応用できる可能性が指摘されている。本研究では、硫黄酸化菌が合成する機能未知のヘテロジスルフィド還元酵素（sHdr）を研究した。遺伝子発現解析の結果、sHdrは硫黄化合物からのエネルギー合成に関与することが示唆された。sHdrを合成する硫黄酸化菌を大量培養することに成功した。細胞粗酵素液を各種クロマトグラフィーで分画した。紫外可視吸収スペクトル、SDS-PAGE、Native-PAGEによってsHdrの精製条件を検討し、得られた画分の質量分析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電子分岐反応は、物質生産プロセスの効率化などの技術基盤に応用することが期待されている。本研究では、電子分岐反応を触媒するヘテロジスルフィド還元酵素（Hdr）の多様性に着目した。硫黄酸化菌が合成するHdr（sHdr）は、独自の配列特徴を持っており、その機能が未知であった。本研究では、sHdrの機能解明に向けた技術基盤として硫黄酸化菌の大量培養、sHdrの分画、質量分析、酵素活性測定の一連の実験系を確立することに成功した。今後の研究の継続により、sHdrの機能を解明することで、電子分岐反応を応用する研究に新しい展開をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Heterodisulfide reductase catalyzes electron bifurcation, which makes a high-energy electron by splitting the energy of a pair of electrons. This reaction could be applied to an industrial basis and contribute to sustainable society. In this study, function-unknown heterodisulfide reductase from sulfur oxidizers (sHdr) was investigated. RNA sequencing of a sulfur oxidizer grown with dihydrogen or sulfur compounds suggested that sHdr involves in energy metabolism of sulfur compounds. Large-scale cultivation of a sulfur oxidizer producing sHdr was successfully achieved. Cell extract was anaerobically fractionated with chromatography techniques. Fractionation conditions of sHdr were examined with UV-visible spectra, SDS-PAGE and Native-PAGE. Mass spectrometry analysis of the obtained fractions is undergoing.

研究分野：生化学

キーワード：硫黄酸化菌 ヘテロジスルフィド還元酵素 電子分岐反応 リポ酸

1. 研究開始当初の背景

公共の塩基配列データベースは日々拡大を続けている。このような巨大な情報から有用な遺伝子資源を発掘することは、生命科学が持つ大きな可能性といえる。微生物が温和な条件で推進している化学反応の中には、持続可能な社会の技術基盤として有望なものがある。例えば、水素ガスの生産、窒素ガスの固定、二酸化炭素の固定が代表例として挙げられる。微生物は、これらの反応を高エネルギー電子を使っても推進することができ、高エネルギー電子は酵素が触媒する電子分岐反応によって生じることが知られている。この反応では、電子対のエネルギーが各電子に振り分けられて、一方の電子が高エネルギー状態になる。電子分岐反応は、物質生産プロセスの省エネルギー化などに応用できる可能性が指摘されており、本反応を触媒する酵素遺伝子は潜在的に有用な遺伝子資源である。

電子分岐反応を触媒する酵素の一種に、ヘテロジスルフィド還元酵素 (Hdr) がある。これまでに見つかった Hdr は3種類のタンパク質から構成されているのだが、ゲノム情報が充実したことで、Hdr には大きな多様性があることが分かった。例えば、Hdr の遺伝子はメタン、硫黄、金属、水素ガスや有機物をエネルギー代謝に利用する微生物のゲノムから見つかっており、そのアミノ酸配列からは独自の特徴が見出されている。また、Hdr 遺伝子の転写単位にはいくつかの別の遺伝子が含まれることが判明している。このことは、Hdr が含まれるさまざまな酵素複合体が存在することを示唆している。この様に、Hdr のアミノ酸配列と、Hdr 複合体のタンパク質構成には大きな多様性があるといえる。

Hdr の機能はメタンを生産するアーキアにおいてしか知られていない。その電子分岐反応には、メタン生産アーキアに独自の補酵素が基質として使われる。このため、その他のさまざまな微生物のゲノムに存在する Hdr は、未知の基質を使って電子分岐反応を推進すると考えられるが、その実体は未解明である。Hdr 複合体が進化の過程で機能的に多様化したことは間違いのない。その未知機能を解明することで、電子分岐反応の応用可能性は新しい展開をみせると考えられる。

2. 研究の目的

硫黄化合物からエネルギーを合成する微生物(以下、硫黄酸化菌)のゲノムから見つかった、機能未知の Hdr (sHdr) を研究する。本研究では3つの達成目標「硫黄酸化菌の大量培養、硫黄酸化菌の細胞からの sHdr 複合体の精製、sHdr の反応基質の探索」を掲げる。

3. 研究の方法

硫黄酸化菌における sHdr 遺伝子の発現解析

sHdr 遺伝子を保有する硫黄酸化菌を、水素ガス酸化条件、チオ硫酸酸化条件、テトラチオン酸化条件で培養した。対数増殖中期と後期の細胞を回収し、総 RNA を抽出した。総 RNA から rRNA を除去したのに対してシーケンス解析を実施した。得られたリード数情報を正規化し、培養条件ごとの sHdr 遺伝子発現量を比較した。

硫黄酸化菌の大量培養

sHdr を合成する硫黄酸化菌を大量に培養するための培養条件を最適化した(詳細は結果に記述)。前培養として、対象の硫黄酸化菌を 10 ml の合成培地で一晚培養し、得られた 10 mL の培養液を 90 mL の合成培地に接種して約 1 日培養した。得られた約 100 ml の前培養液を 1000 mL の合成培地に接種し、ジャーファーマンターで培養した。合成培地にはエネルギー源としてチオ硫酸あるいはテトラチオン酸を加えた。

硫黄酸化菌の細胞からの sHdr 複合体の精製

sHdr は酸素感受性の酵素複合体である可能性が高いため、分画実験は全て嫌気条件で実施した。約 6 グラムの細胞をフレンチプレスで破碎して可溶性の細胞粗酵素液を調整した。これを陰イオン交換クロマトグラフィーで分画した。主要なタンパク質画分を硫酸アンモニウム沈殿、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーでさらに分画した。得られた画分は SDS-PAGE と分光光度計で分析した。SDS-PAGE の主要なタンパク質バンドを切り出し、ゲル内消化処理を行った試料を質量分析計で分析した。細胞粗酵素といくつかのクロマトグラフィー画分に対しては Native-PAGE を行った。推定分子量が 400,000 以上のバンドを切り出し、ゲル内消化処理の後に質量分析を行った。

sHdr の反応基質の探索

本研究では、機能未知の sHdr の反応基質が、リポ酸結合タンパク質に結合したりポ酸と硫黄リ

レータンパク質に結合したチオール基であることを提案している。これらは電子供与体に相当すると考えられる。この可能性を検証するために、2種類のリポ酸結合タンパク質、リポ酸結合タンパク質にリポ酸を結合する反応を触媒するタンパク質、そして2種類の硫黄リレータンパク質の合計5種類のタンパク質を大腸菌を使って合成した。合成したタンパク質はアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。sHdrの酵素活性を測定するために、人工電子伝達体やジスルフィド結合を含むいくつかの化合物を用いて活性測定実験を行った。

4. 研究成果

sHdr 遺伝子群の発現量は、チオ硫酸またはテトラチオン酸で培養した際に、水素ガスで培養した時よりも有意に増加した。対数増殖中期と後期の間には sHdr 遺伝子群の発現量に有意な変化は認められなかった。以上の結果より、sHdr は硫黄化合物からエネルギーを合成する過程で機能すると考えられる。

硫黄酸化菌の大量培養

研究対象の硫黄酸化菌は、無機硫黄化合物を酸化してエネルギーを合成し、 O_2 を還元する。また、 CO_2 を固定する独立栄養性のバクテリアである。エネルギー源としてチオ硫酸ナトリウム塩あるいはテトラチオン酸カリウム塩を培地に加えた。硫黄化合物は酸化されて硫酸イオンになるため、増殖に伴い培地 pH の著しい低下と生育の阻害が認められた。前培養における最終細胞密度を高くするため、pH 7.0 の培地に 50 mM PIPES を加えて培養を実施した。また、前培養における気相の CO_2 濃度を検討した。気相に三種混合ガス $N_2:O_2:CO_2$ (60:20:20) を充填した場合、気相に大気を充填して培養した時と比べて、培養液の濁度が4倍以上高くなった(図1)。一方、培養後の培地 pH は 5.0 未満となった。この値は本菌の生育下限 pH を下回ることから、培地に加える緩衝剤をさらに検討した。50 mM PIPES を含む培地に、80 mM, 100 mM, 200 mM の MOPS を加えて培養を行った。この結果、50 mM PIPES と 80 mM 以上の MOPS の両方を含む培地において、培養後の培地 pH が 6.5 前後で保たれ、培養液の濁度が増加した。しかし、濁度の増加の再現性を確認することができなかった。また、80 mM 以上の MOPS を含む培地で継代すると、増殖が阻害された。これは、高濃度の緩衝剤によって培地のイオン強度が高くなったことに起因すると考えられる。以上の結果より、培地には 50 mM PIPES を加え、気相に三種混合ガスを充填して前培養を行うこととした。この条件において、23 時間以上培養した 10 ml 前培養液の最終 OD_{600} は 0.6 以上、培地 pH は 5.0 未満となった。これを継代して 23 時間以上培養した 100 ml 前培養液を大量培養に用いた。なお、前培養の過程で、14 時間経過時点で気相に三種混合ガスを充填した。

1.5 L のジャーファーマンターを用いて大量培養を行った。ファーマンターに pH 調整ユニットを接続したことから、培地には PIPES を加えなかった。培養条件を最適化した結果、最終的にチオ硫酸 (50 mM) あるいはテトラチオン酸 (79 mM) を電子供与体として含む培地 1.2 L において良好な増殖が得られた。テトラチオン酸で培養を開始する際、攪拌速度 500 rpm、三種混合ガス流量 0.5 L/min、温度 45 に設定し、消泡剤を 0.2 ml 加えた。この条件で 20 時間程度培養することで OD_{600} が ~2.3 に到達し、湿重量 ~2.5 グラムの細胞を回収した。チオ硫酸ナトリウムで培養を開始する際、攪拌速度 500 rpm、三種混合ガス流量 0.15 L/min、温度 45 に設定した。この条件で 15 時間培養した結果、 OD_{600} が ~1.1 となり、湿重量 ~1.4 グラムの細胞を回収できた。

硫黄酸化菌の細胞からの sHdr 複合体の精製

細胞粗酵素液を用いて sHdr の酵素活性を測定する条件を探索したが、いずれの条件においても酵素反応は認められなかった(詳細は次項参照)。このため、細胞粗酵素液を各種クロマトグラフィーで分画し、得られたタンパク質溶液の紫外可視吸収スペクトルを解析した。この結果、いくつかの画分の吸収極大波長が鉄硫黄クラスターのものと一致した。また、当初の計画に加えて、Native-PAGE による複合体解析を実施した。この結果、推定分子量が 400,000 を上回るタンパク質バンドが複数得られた(図2)。細胞粗酵素液由来のバンドと同じ移動度を示すバンドがクロマトグラフィー画分からも得られた(図2赤矢印)。その紫外可視吸収スペクトルからは対象のタンパク質に鉄硫黄クラスターが含まれることが示唆された。SDS-PAGE の結果も考慮した結果、赤矢印で示した画分は sHdr に相当する可能性が高いと考えている。現在、一連の実験で

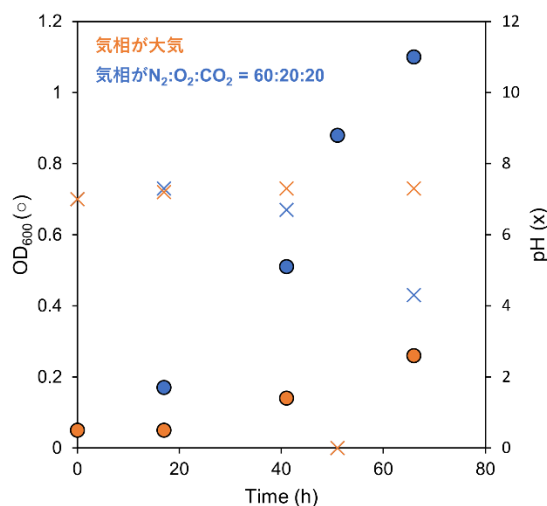


図1. 硫黄酸化菌の培養液 (100 ml) の OD_{600} と pH の推移。電子供与体はチオ硫酸、緩衝剤として 50 mM PIPES を加えた。気相を三種混

得られた画分あるいはタンパク質バンドの質量分析を進めている。

sHdr の反応基質の探索

2種類のリポ酸結合タンパク質、リポ酸結合タンパク質にリポ酸を結合する反応を触媒するタンパク質 (LplA) として硫黄リレータンパク質の1種の合計4種類のタンパク質を精製することに成功した。現在、LplA を用いてリポ酸をリポ酸結合タンパク質に結合するための反応条件を最適化している。リポ酸結合タンパク質にリポ酸が結合したホロ酵素を検出するために、尿素-PAGE および抗リポ酸抗体を使ったウエスタンブロッティング実験を行っている。

細胞粗酵素液を使って、ジスルフィド結合を含む化合物と人工色素を使った酵素活性測定実験を行った。複数の化合物の組み合わせで試験したが、いずれの条件においても酵素活性は認められなかった。

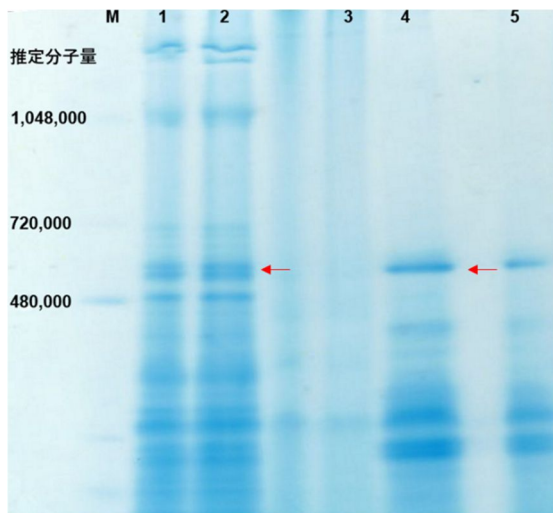


図2. Native-PAGE の結果。左のレーンが分子量マーカー (M)、1と2が細胞粗酵素液で、それ以降はクロマトグラフィーから得られた画分。赤矢印は、鉄硫黄クラスターを含有すると思われるタンパク質由来のバンド。

本研究では、ファーマンターを新たに導入することで、硫黄酸化菌を大量培養することに成功した。sHdr を合成する硫黄酸化菌の大量培養は報告されていないため、本研究で確立した培養手法は Hdr 研究における確かな前進である。Native-PAGE の結果からは推定分子量が400,000を上回るタンパク質バンドが想定以上に検出された。硫黄酸化菌において、このように巨大なタンパク質複合体が検出された前例は乏しい。今後の質量分析の結果から、予期せぬ酵素複合体の発見も期待される。

本計画の立案当時、当研究室では微生物のファーマンター培養、タンパク質の分画、酵素活性測定、質量分析を実行する環境の大半が整っていなかった。本プロジェクトによって、一連の実験を日常的に遂行することが可能になった。これは本研究の大きな成果のひとつである。本プロジェクト期間内に sHdr の反応基質を特定するには至らなかったが、最も重要な反応基質の候補であるリポ酸結合タンパク質を使った活性測定を行う準備が順調に進んでいる。さらに、質量分析の結果も近日中に得られる予定である。現在進行中のこれらの実験を完了することが重要である。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Tomohiro, Shima Seigo	4. 巻 50
2. 論文標題 MvhB-type polyferredoxin as an electron-transfer chain in putative redox-enzyme complexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 353 ~ 360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.200774	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------