

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06521

研究課題名（和文）グループ [NiFe]ヒドロゲナーゼの水素合成-プロトンポンピング共役機構の解明

研究課題名（英文）Hydrogen-evolving and proton-pumping mechanisms of the group IV [NiFe]-hydrogenase

研究代表者

庄村 康人（Shomura, Yasuhito）

茨城大学・理工学研究科（工学野）・准教授

研究者番号：50423900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：水素の合成と分解を可逆的に触媒する唯一の酵素と知られるヒドロゲナーゼは、燃料電池の電極触媒や人工光合成における水素合成触媒としての応用が期待されている。本研究では、Ni-Feクラスターを活性部位にもつヒドロゲナーゼのうち水素合成とプロトン輸送に特化した酵素を研究対象とした。酸素に弱い膜内在性のタンパク質であるため、最初は解析に十分な量と質の試料を調製することができなかったが、精製を効率よく行うための遺伝子組換え体を作製することによって、この問題克服することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回研究対象とした水素合成酵素は酸素に弱い膜タンパク質複合体であり、かつ複雑な金属クラスターをもつため大腸菌などの大量発現系によって調製することができない。本研究では、このような高難度タンパク質の解析を可能にするための技術開発を行うことに成功したが、この技術は燃料電池の電極触媒や人工光合成における水素合成触媒作製への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Hydrogenases are enzymes that catalyze a reversible hydrogen-evolving reaction, and their enzymatic properties might be applied to the electrode catalyst of the fuel cell and the catalyst for hydrogen synthesis in the artificial photosynthesis system. In this project, we have succeeded in the construction of a genetic modified bacterium that allows us to purify the target protein in a high yield and purity. With using the purified protein, the electron microscopic images have been obtained.

研究分野：構造生物学

キーワード：水素合成酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒドロゲナーゼは水素の分解と合成を触媒する金属タンパク質で、バクテリアとごく一部の光合成生物の細胞内小器官で生育に必要なエネルギーを水素から獲得したり、逆に余剰な還元当量を水素として放出する役割を担う。本研究で対象とする[NiFe]ヒドロゲナーゼは Ni-Fe クラスタを活性部位にもち、多くの場合、他の酵素と複合体を形成して生体内で機能し、その構造や機能の特長から5つのグループに分類されていた(現在では4つのグループに分類)。これらのうちグループ IV 以外は酸素抵抗性(O_2 -resistance)をもつ(酸素存在下でも不可逆的に失活しない)という共通した特徴を有し、さらにグループ I 膜結合型と呼ばれる酸素分圧 0.2 bar でも水素分解活性を示すような、著しく高い酸素耐性(O_2 -tolerance)をもつ(酸素存在下でも機能する)ヒドロゲナーゼも知られるようになっていた。このように研究開始当初は酸素耐性が高いヒドロゲナーゼに注目が集まっていた一方で、酸素抵抗性すらないグループ IV については立体構造もわかっておらず、不明な点が多かった。グループ IV は酸素雰囲気下で不安定なだけでなく、水素合成と共役したプロトンポンピング機能を有する膜タンパク質であるという特徴があるため、試料調製の難易度は極めて高い。さらに、複雑な活性部位形成のためのアクセサリタンパク質を多数必要とすることから大量発現系の構築が困難である点も重要な課題であった。

2. 研究の目的

本研究は、[NiFe]ヒドロゲナーゼの中でも特に構造や機能の理解が進んでいないグループ IV [NiFe]ヒドロゲナーゼに着目し、X線結晶構造解析によって本酵素の作動原理ならびに酸素抵抗性および水素分解・合成バイアス決定要因を原子レベルで理解すること、進化的に類縁するエネルギー代謝複合体とのメカニズムや構造における共通点と相違点を明らかにすることを最終目的とする。これまでに X線結晶構造が報告されている[NiFe]ヒドロゲナーゼは全て酸素抵抗性が高いものであるため、この物性の構造的な要因を明らかにするためには、酸素抵抗性が無い[NiFe]ヒドロゲナーゼを標的とした本研究による成果が不可欠である。

3. 研究の方法

本研究は偏性嫌気性高度好熱菌 *Caldanaerobacter subterraneus* 由来のグループ IV [NiFe]ヒドロゲナーゼを研究対象とし、従来どおり Native タンパク質を調製するアプローチと合わせて、精製効率と純度の向上および機能解析のための変異体作製を目的とする高度好熱菌の遺伝子組換え体の作製も試みた。

(1) Native タンパク質の調製

C. subterraneus を嫌気培養し、遠心分離による菌体回収・細胞破碎・タンパク質精製の一連の工程を嫌気グローブボックス内で行った。まず、菌体および標的タンパク質の収量を増やすための培養条件の最適化を行った。また、標的タンパク質の可溶化条件および精製条件の検討も進めた。精製試料の品質管理は SDS-PAGE、水素分解活性測定、およびクライオ電子顕微鏡によって行った。

(2) 遺伝子組換え体の作製

Native タンパク質の調製は精製工程が多く収率も低いままで改善が困難であったため、相同組換えを利用したアフィニティタグの導入を行った。Suicide ベクターに人工遺伝子合成で得られた kanamycin 耐性マーカー遺伝子とヒスチジンタグ配列を含む相同領域を挿入し、*C. subterraneus* を形質転換した。得られたコロニーに対してコロニー-PCR を行い、組換えの有無を判別した。

4. 研究成果

(1) 本菌体は糖をエネルギー源として、含硫黄化合物を最終電子受容体として生育することが知られており、標的タンパク質であるグループ IV [NiFe]ヒドロゲナーゼは細胞内の余剰な還元当量を消失しながらプロトン濃度勾配の形成に寄与すると考えられている。そこで、菌体および標的タンパク質の収量増加を目的とした培地中の糖や硫黄化合物の種類や濃度の検討を行った。糖としてはグルコース、スクロース、およびデンプンを、硫黄化合物としてはチオ硫酸ナトリウム、システイン、および亜硫酸ナトリウムを含む培地について収率を比較したところ、デンプンおよびチオ硫酸ナトリウムの組み合わせが最も高く、さらにそれぞれについて最適な濃度を決定した。また、培養時間と温度についても検討を行い、培地容量あたりの水素分解活性を判断基準とし、最も効率の良い条件を求めた。さらに、培地の pH および緩衝液成分についても最適化を試みたが、特に有意な差は見られなかった。

細胞を破碎後の膜画分からの膜タンパク質の抽出には界面活性剤による可溶化が一般的であるが、可溶化に適した界面活性剤の種類および濃度ならびに温度および時間はタンパク質によって大きく異なるため、その検討を行った。界面活性剤の種類としてはコストの面も考慮すると DDM が最適で、温度・時間は 4、12-16 時間(オーバーナイト)が最も効率良かった。

可溶化したタンパク質について陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびゲルろ過クロマトグラフィーによる精製条件の検討を試みたが、結晶化に十分な純度と収量を確保することは困難であると判断し、Native タンパク質の調製は途中で断念した。

(2) Native タンパク質の精製の際には工程を重ねるごとにタンパク質の失活や複合体解離の問題が顕著であったため、アフィニティータグの導入を試みた。*C. subterraneus* で安定に保持できるプラスミドはこれまでに知られていないため、ゲノム上の遺伝子に対して相同組換えでヒスチジンタグを挿入する方法を適用した。そのためにまず、寒天培地での培養方法を確立し、さらに組換え体選別のため様々な抗生物質を検討した結果、カナマイシンが有効であることが分かった。また、ヒスチジンタグを挿入するサブユニットとしてはオペロン上で構造遺伝子の最下流に位置する EchF が最適と考えて、耐熱性カナマイシン耐性遺伝子を含む組換え用の DNA 配列を設計し、pUC57-mini プラスミドに挿入した。このプラスミドを用いて *C. subterraneus* の形質転換を行った結果、約 2 週間でコロニーが得られ、ゲノム DNA のシーケンシングによって狙い通りの組換えが起こっていることを確認した。

培養および標的タンパク質の可溶化は(1)に記載した方法で行い、精製の最初の工程には Ni アフィニティーカラムを用いた。この一回のカラム精製によって SDS-PAGE でほぼ目的タンパク質のみのバンドがクリアに得られるようになり、収率が 3 倍程度に向上した。しかしながら、標的タンパク質のサブユニットの分子量と合わないバンドも見られたため、膜内在性サブユニット以外の全てのバンドの N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ、4 つの全ての可溶性サブユニットが確認された他、LarC という機能の全く異なるタンパク質も同定された。LarC は Ni 結合タンパク質であることから、Ni アフィニティーカラムへの結合は避けられないが、陰イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーで除去できることが確認された。

ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて複合体構造を安定化する界面活性剤の検討を行った結果、DDM、UDM、および Cymal-6 を含む溶液の場合に単一かつ左右対称なピークが得られた。溶出画分を濃縮してクライオ電子顕微鏡を用いた観察を行ったところ、図 1 のような画像が得られたが、粒子の形が多岐にわたり粒子数が少ないことから 2D classification には至っていない。

ヒスチジンタグの導入により高純度の標的タンパク質複合体が精製できるようになったかには見えなかったが、鉄硫黄クラスターに由来するタンパク質溶液の色が薄く、クラスターが結合していない分子が多数存在している可能性が示唆された。実際に紫外可視吸収スペクトル測定からもこのことが確認されたため、AlphaFold2 を用いた構造予測により、ヒスチジンタグが鉄硫黄クラスター形成に干渉している可能性を検討した。その結果、ヒスチジンタグを導入した EchF サブユニットの C 末端は鉄硫黄クラスターを配位することが予想される領域と隣接していることが分かり、精製タンパク質の色が薄いのはこのためである可能性が高いと考えられる。EchF 以外では、EchB、EchC、EchD の C 末端がヒスチジンタグ導入サイトの候補であるため、このための DNA 配列を設再度設計して pUC57-mini プラスミドに挿入し、このプラスミドを用いて *C. subterraneus* の形質転換を行った結果、EchD へのタグ挿入を試みた形質転換体のみからコロニーが得られた。今後、この形質転換体について同様に培養を行い、標的タンパク質の単離・精製を試みて鉄硫黄クラスターの占有率を改善していきたい。

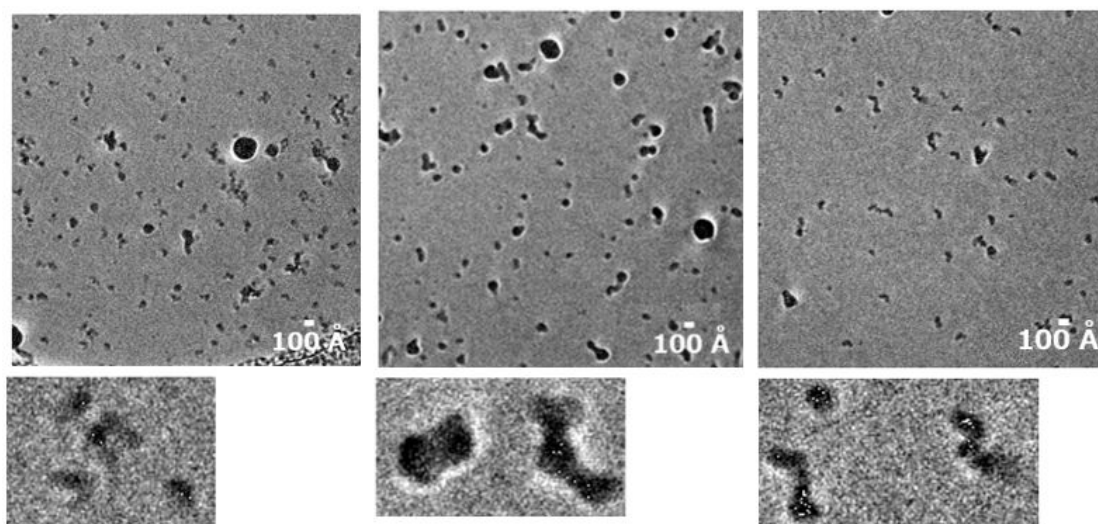


図 1. クライオ電子顕微鏡で撮影した画像 (92,000 倍、位相板あり)
左 : 0.05% DDM 中 : 0.05% Cymal-6_100 右 : 0.05% UDM_100

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------