

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780070

研究課題名（和文）遺伝子工学技術を駆使した高度水素生産に有用な遺伝子の網羅的探索および機能向上化

研究課題名（英文）An Exhaustive Screening and Functional Enhancement of a Useful Genes Related to Hydrogen Production by Using a Genetic Engineering Approach.

研究代表者

前田 憲成（MAEDA TOSHINARI）

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：00470592

研究成果の概要（和文）：本研究は、次世代エネルギーとして期待されている水素ガスの高度生産化を最終目的としている。本研究期間中では、大腸菌の水素生成機構を完全に理解するために、大腸菌の変異株ライブラリーを用いた網羅的探索を行った。その結果、機能が明らかにされていない遺伝子などが水素生成に関与していることなどを突き止めた。さらに、大腸菌におけるグリセロールからの水素発酵におけるヒドロゲナーゼの機能についても追究した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to enhance bacterial hydrogen production. During this research activity, an exhaustive screening using an *Escherichia coli* mutant library was performed to find a useful gene related to hydrogen production, which could be helpful to fully understand biohydrogen production in *E. coli*; as a result, there are several uncharacterized genes, which have been never reported that they are related to hydrogen production. In addition, the function of *E. coli* hydrogenases in hydrogen fermentation from glycerol was studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：環境バイオテクノロジー

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：水素ガス、バイオテクノロジー、遺伝子工学、生体機能利用、代謝工学

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

原油枯渇問題が深刻な問題となりつつある現代において、石油に代わる新しいエネルギーの創成技術の研究開発は急務である。世界のエネルギーは、現在の化石燃料などへの依存から水素ガスとメタンガスへと将来的に移り変わると言われており、水素ガスの需要（自動車燃料や燃料電池など）は、益々増

加することが予想されている。水素ガスは燃焼しても無毒な水を生成するのみであるため、クリーンエネルギーとしての利用価値が高く、水素ガスの高度生産化に関する研究は今後の重要課題の一つといえる。

(2) 水素生産方法と研究材料の選定

従来の水素生産方法は、石油類を原材料として水蒸気改質法や熱化学分解などの化学

の方法や水の電気分解法などがあるが、これらの方法は「脱石油」を達成できていない点や高コスト化などの問題点がある。一方、生物学的な水素ガスの生産は低コスト化が期待できると共に、生ごみ、廃木材や米などの再生可能資源からの水素生産化にも有益である。現在、生物学的な水素生産に関して、主に光合成細菌と発酵細菌に関する研究が報告されているが、発酵細菌からの水素生産量は光合成細菌よりも多いと言われており、発酵細菌を用いた水素生産に関する研究は重要な取組みと考えられる。申請者は、発酵性細菌の中でも大腸菌に着目した。その理由として、①大腸菌は水素ガスを生産できること（大腸菌のFHL (Formate Hydrogen Lyase) 複合体がギ酸を触媒する反応過程で、水素ガスが生成される(参考文献4))、②大腸菌は変異株ライブラリーが充実しており、P1 トランスダクションとの組み合わせによって多重変異株を導入することが容易であること、③DNA マイクロアレイ技術が発達していることや④DNA 組換えなどの遺伝子工学技術が進展していることなどが挙げられる。したがって、大腸菌で発達している遺伝子工学技術を駆使して、水素ガスを高度生産化するようにデザインできると考えた。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究成果

研究代表者は、大腸菌 KEIO 変異株ライブラリー、選択マーカー欠失システム (KEIO ライブラリーのカナマイシン耐性遺伝子を除去することができる)、および P1 トランスダクションの3つの技術を組み合わせて、多重変異株を作製して、水素ガスを高度生産できるように大腸菌をデザインしてきた。すなわち、大腸菌が持つ水素を消費する機構の破壊、水素生成経路の活性化 (水素生成経路以外の基質を利用する経路を破壊)、水素生成に関わる遺伝子群の活性化など、大腸菌に5つの細工を実施して、水素ガスの生産能力が向上した大腸菌株の作製に成功した。この菌株は、ギ酸を基質とした場合、親株よりも最大で141倍の水素生成率を示した。また、本菌株はギ酸1モルから水素1モルを生産するという、理論値通りの水素生成能を持っていることもわかった。次に、グルコースからの水素生成能の向上化を狙い、さらに3つの細工を大腸菌に加えた。グルコースはピルビン酸に変換された後に、ギ酸と酢酸に変換される。そこで、グルコースからギ酸が多く生産されるように、グルコースからコハク酸の生合成に関与する FrdC タンパク質、ピルビン酸から乳酸の生合成に関わった LdhA タンパク質およびピルビン酸を二酸化炭素へと変換する AceE タンパク質をコードする遺伝子を不活性化した。その結果、親株よりも5倍の水

素生成能を持った大腸菌株の作製にも成功した。また、水素生産に関わるタンパク質の触媒機能を高めるために、HycE と FhlA タンパク質の改変を行い、水素生産性が向上した変異体タンパク質の作製にも成功している。さらに、ランダム変異を導入して、いくつかの水素生産性が高まった変異株の取得にも成功した。

(2) 課題と研究目的

現在まで作製した菌株の水素生成能をもとに、これらの菌株が実用化に向けてどの程度有効であるかを次のように評価した。1キロワットの電力を発生させるのに、1時間あたり 23.9 モルの水素が必要とされている。2つの水素生成細菌株 (1モルのギ酸から理論値通りの1モルの水素を生産する菌株と、1モルのグルコースから1.3モルの水素を生産する菌株) を用いて、ギ酸とグルコースから水素ガスを作ることを想定する。ギ酸とグルコースの1キログラムあたりの価格を1,000円と仮定すると、1キロワットの電力を1年間にわたり発生させるのに、1年にそれぞれ763万円および2,900万円の費用がかかるということになる。

したがって、本研究では、遺伝子工学技術 (多重変異株作製技術、DNA マイクロアレイ技術、DNA シャッフリングなど) による高度水素生産化の取組みのために必要な、水素生成に関わる有用な遺伝子の探索および機能解明を行った。この取組みにより、将来的には、水素生産コストを低減化する取組みが可能となる。また、最終的に革新的な未来型エネルギー創成技術の確立にも貢献できるものと考えられる。

3. 研究の方法

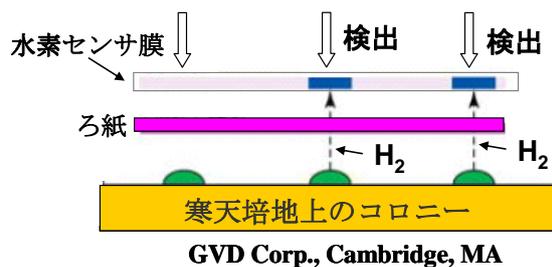


図1. 水素センサ膜と水素生成に関わる遺伝子変異株の探索イメージ図

本研究では、図1に示した水素センサ膜を用いて、使用した大腸菌変異株における水素生成の有無を確認した。使用した大腸菌変異株はKEIO変異株であり、3985変異株を対象に網羅的に実施した。また、確認した後は、さらに候補遺伝子変異株に対しては、水素発酵を行い、水素生成の定量的評価、また有機

酸分析などを行い、詳細な解析を行った。一方、大腸菌のヒドロゲナーゼ変異株を用いて、グリセロールからの水素発酵を行い、同様に解析等を行った。

4. 研究成果

(1) 全大腸菌変異株に対する網羅的スクリーニング

大腸菌 K E I O 変異株ライブラリー全種類 (3985 遺伝子) の網羅的スクリーニングを行い、グルコースからの水素生成の増減に関わる遺伝子を特定してきた。スクリーニングの完了まで、引き続き特定を進めているところであるが、表 1 に示した遺伝子変異が大腸菌の水素生成に関わっていることが明らかとなってきた。

表 1. 水素生成の増減に関与する遺伝子 (現在まで、明らかとなったもの)

水素生成が向上した遺伝子変異	水素生成が低減した遺伝子変異
<i>atpB, atpC, atpD, atpF, atpG, atpH, atpI, nrdE</i>	<i>holC, miaA, moaA, moaC, moeA, moeB, mog, nikB, mobA, mobB, modA, pncA, rpoN, selA, selB, selC, ydjA, yhjY, yehP, sufD, pgi, ydfW, phnN, yhfX, ypdJ, yieL, yqiG, yhbP</i>

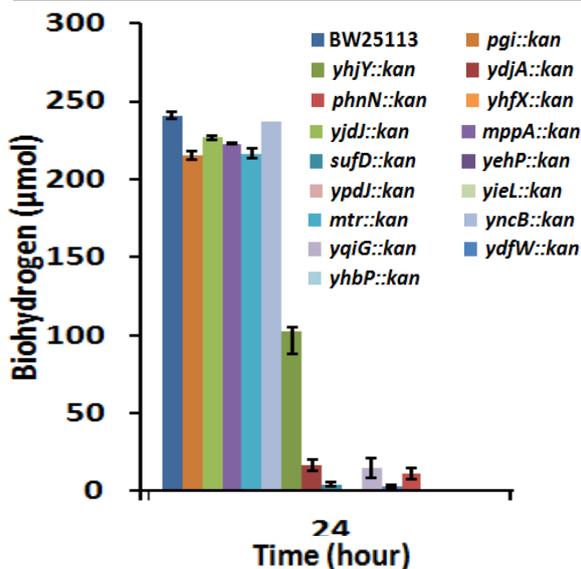


図 2. 水素生成に関わる遺伝子変異株

(2) YdjA や YhjY などの機能解析

表 1 の遺伝子の中でも特に現在機能が明らかにされていない変異株に着眼して、水素発酵を確認した。その結果、図 2 のように、水素生成が低下する変異株が多数見られた。特に、YdjA と YhjY に焦点を当て、その機能の追究を行ったところ、これらの遺伝子変異では、*fhIA*, *hypB*, *pflB* 遺伝子などの発現が抑制されていること、*ldhA* 遺伝子の発現が向上していることが分かった。加えて、*ydjA* 変異株においては、*fdhF* 遺伝子発現も抑制されていること、*hycA* の遺伝子発現が活性化していることも明らかとなった。

(3) YhjY を用いた代謝工学的アプローチ

YhjY が水素生成に関わっていることが明らかになったため、この遺伝子機能を利用して、水素生成の向上化に取り組んだ。

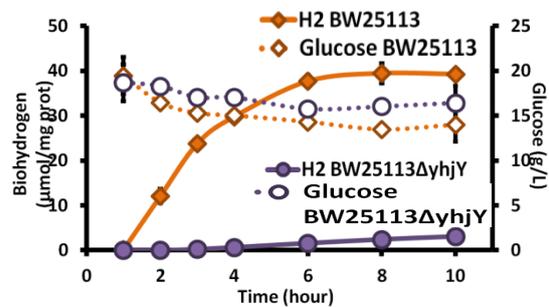


図 3. *yhjY* 遺伝子の水素生成における機能

yhjY 遺伝子変異株を用いて、水素生成とグルコース消費の関係を追究したところ、*yhjY* 変異株においては、グルコースが消費されおらず、YhjY はグルコース代謝の促進に寄与していることがわかった。また YhjY は相同性等の解析から膜タンパク質であるといわれているため、このタンパク質によりグルコースの取り込みが向上し、水素生成が促進したものと現在考えている。次にこの YhjY タンパク質を過剰発現させて水素生成を行ったところ、予想通り水素生成が促進した。また、これまで研究代表者が持っている高度水素生産菌株において YhjY を過剰発現させたところ、同様に水素生成が 2~3 倍程度向上し、新しい高度水素生産株の作製に成功している。加えて、大腸菌のグルコースからの水素生成量は、1 モルのグルコースから 2 モルの水素が理論的にできるといわれている。親株の大腸菌では、その値がグルコース 1 モルあたり 0.7 モルの水素生成であったが、この YhjY の過剰発現によりほぼ理論値通りの水素生成量となった。

(3) グリセロールからの水素発酵における大腸菌ヒドロゲナーゼの機能

大腸菌のグリセロールからの水素発酵は、これまで多くの謎を残してきた。特に、大腸菌のヒドロゲナーゼの機能はその代表である。通常グルコースを基質として用いた場合、ヒドロゲナーゼ1と2が水素消費活性、ヒドロゲナーゼ3が水素生成、ヒドロゲナーゼ4が機能なしといわれているが、グリセロールの場合は、ヒドロゲナーゼ1と2が水素生成、ヒドロゲナーゼ3と4が水素消費に関わっていると報告されている。本研究では、これらの謎の部分も詳細に解析するため、大腸菌ヒドロゲナーゼの変異株を用いて、グリセロールからの水素発酵を追究した。その結果、ヒドロゲナーゼ2と3の変異株では水素生成が見られなかった。しかし、詳細に解析したところ、ヒドロゲナーゼ2の変異株においてはグリセロールが消費されておらず、ヒドロゲナーゼ2の機能はグリセロールの代謝に寄与していることが明らかとなった。ヒドロゲナーゼ3も通常報告されている通り、水素生成に重要な役割を果たしていることがわかった。

(4) 偽遺伝子の水素生成への関わり

大腸菌は178個のシュードジーン(偽遺伝子)を持っていると考えられている。この偽遺伝子は遺伝子機能を持っていないと通常考えられている壊れた遺伝子である。研究代表者は上述の大腸菌変異株の網羅的スクリーニングを行った結果、3種類の偽遺伝子が水素生成に関わっている可能性を明らかにした。3つの偽遺伝子は *yqiG*、*ydfW*、*ypdJ* である。現在これらの偽遺伝子の機能解析を進めているが、*ydfW* に関してはDNAマイクロアレイを実施して、水素生成メカニズムの追究を行った。その結果、*ydfW* においては、Formate dehydrogenase-Nの遺伝子発現が活性化していることが分かった。一方で、Nitrate reductaseの遺伝子発現は抑制されており、窒素源の代謝機構の影響により、水素生成が低下したことが考えられた。現在、*YdfW* 自身の発現により機能が回復するかを確認しているところである。

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5件)

- ① V. Sanchez-Torres, M. Z. Mohd Yusoff, C. Nakano, T. Maeda, H. I. Ogawa, T. K. Wood, Influence of *Escherichia coli* hydrogenases on hydrogen fermentation from glycerol, International Journal of Hydrogen Energy, 査読有, Vol. 38, No. 10,

2013, pp. 3905-3912.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.031>

- ② M. Z. Mohd Yusoff, T. Maeda, V. Sanchez-Torres, H. I. Ogawa, Y. Shirai, T. K. Wood, Uncharacterized *Escherichia coli* proteins YdjA and YhjY are related to biohydrogen production, International Journal of Hydrogen Energy, 査読有, Vol. 37, No. 23, 2012, pp. 17778-17787. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.115>
- ③ S. N. Suhaimi, L.-Y. Phang, T. Maeda, S. Abd-Aziz, M. Wakisaka, Y. Shirai, M. A. Hassan, Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated *Escherichia coli* SS1, Brazilian Journal of Microbiology, 査読有, Vol. 43, No. 2, 2012, pp. 506-516. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000200011>.
- ④ T. Maeda, V. Sanchez-Torres, T. K. Wood, Hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* strains, Microbial Biotechnology, 査読有, 2012. Vol. 5, No. 2, pp. 214-225. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00282.x>
- ⑤ 前田憲成、有吉弘貴、高柳聖、尾川博昭、高度水素生産菌株を活用した迅速な安全性評価技術の開発、用水と廃水、査読有、53巻、2011、458-464

[学会発表] (計8件)

- ① N. H. Mohd Yasin, T. Maeda, M. Fukuzaki, T. Miyazaki, C. M. H. Che Maail, H. Ariffin, Biohydrogen production from sewage sludge and oil palm frond (OPF) juice by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain, 平成24年度日本水環境学会九州支部大会, 2013年2月16日, 北九州産業学術推進機構(北九州)
- ② M. Z. Mohd Yusoff, T. Maeda, Y. Hashiguchi, T. K. Wood, Y. Shirai, H. I. Ogawa, M. A. Hassan, Unrealized function of *Escherichia coli* genes: *sufD* and *yehP* in biohydrogen production, 創立90周年記念第64回日本生物工学会大会, 2012年10月25日, 神戸国際会議場(神戸)
- ③ 中野智恵理、前田憲成、尾川博昭、V. Sanchez-Torres、グリセロールからの水素発酵における大腸菌ヒドロゲナーゼの機能解析、第46回日本水環境学会年会、2012年3月14日、東洋大学(東京)
- ④ 福崎雅治、野中智徳、前田憲成、尾川博

昭、遺伝子工学的組換え微生物による下水余剰汚泥の可溶化成分からの水素発酵、第46回日本水環境学会年会、2012年3月14日、東洋大学（東京）

- ⑤ M. Z. Mohd Yusoff, T. Maeda, V. Sanchez-Torres, T. K. Wood, Y. Shirai, H. I. Ogawa, M. A. Hassan, Functional analysis of an important gene related to biohydrogen production in *Escherichia coli*, BioMicroWorld 2011, IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2011年9月14日, Malaga (Spain)
- ⑥ 有吉弘貴, 前田憲成, V. Sanchez-Torres, 尾川博昭、高度水素生産菌株を活用した簡易・迅速な毒性検出技術の開発、環境バイオテクノロジー学会 2011年度大会、2011年6月20日、東京大学（東京）
- ⑦ 前田憲成, 中野智恵理, V. Sanchez-Torres, M. Z. Mohd Yusoff, 尾川博昭、大腸菌ヒドロゲナーゼ変異株によるグリセロールからの水素発酵、環境バイオテクノロジー学会 2011年度大会、2011年6月20日、東京大学（東京）
- ⑧ T. Maeda, V. Sanchez-Torres, T. K. Wood, Exhaustive Screening of 3985 Isogenic *Escherichia coli* Mutants for Enhanced Bacterial Hydrogen Production, 2010 American Institute of Chemical Engineers (AIChE) Annual Meeting, 2010年11月10日, Salt Lake City (USA)

[図書] (計2件)

- ① 前田憲成, 中野光一, 尾川博昭、西日本新聞社、九工大世界トップ技術, 3, 2011年、110-122
- ② T. Maeda, H. I. Ogawa, Springer, Microbial Degradation of Xenobiotics, 2011, pp. 213-233

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：被験物のスクリーニング方法

発明者：前田憲成、尾川博昭

権利者：九州工業大学

種類：特許

番号：特願 2010-056824

出願年月日：22年3月13日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

①大学ホームページにおける研究代表者のデータベース

<https://research02.jimu.kyutech.ac.jp/h>

[tml/333_ja.html](#)

②研究室のホームページ

<http://www.life.kyutech.ac.jp/~toshi.maeda/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 憲成 (MAEDA TOSHINARI)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：00470592