

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：42686

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658097

研究課題名(和文)光エネルギーを用いたニトロゲナーゼによる水素ガス生産

研究課題名(英文)Hydrogen production using nitrogenase driven by light energy

研究代表者

志澤 泰彦(Shizawa, Yasuhiko)

日本大学短期大学部・生物資源学科・講師

研究者番号：30413131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素を唯一の炭素源として生育し、かつ空気中の窒素を還元することによって窒素源を得ている微生物(放線菌)の酵素系を用いて、光エネルギーによる水の水素への変換システムを構築することを最終目的として研究を行った。この酵素系は窒素還元活性とともに反応副産物として水素を発生するニトロゲナーゼと呼ばれる酵素を含む。これらを遺伝子工学的に大量に合成するためその構造遺伝子を人工合成し、発現ベクターに組み込み、大腸菌に合成させることに成功した。発現させたリコンビナントタンパク質の活性発現に今後の研究の余地を残したが、光エネルギーによる水素産生活性の発現のための基礎を構築することに近づいたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Our research goal is the construction of hydrogen evolution system which is able to work by solar energy. We selected a bacterium whose name is *Streptomyces thermoautotrophicus* as an ideal candidate for this aim because of the features of its nitrogen reduction system. This bacterium normally grows with carbon monoxide as a sole carbon source at relatively high temperature, and also has a rather unique nitrogenase than generally known one. Since this nitrogenase functions in the severe environment; at a relatively high temperature and under oxygen, it will be available for bioreactor. We decided to utilize this nitrogenase system as a recombinant protein synthesized in *E.coli*. The corresponding genes were chemically synthesized and cloned into the expression vector. This approach may allow us to build a foundation for the construction of solar energy dependent hydrogen evolution apparatus using this nitrogenase system.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：ニトロゲナーゼ 水素ガス 光エネルギー

1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素を酸化しそのエネルギーを用いて生育する化学無機栄養生物 Carboxydrotroph に関する研究は、主にドイツ・バイロイト大学の O.Meyer らのグループによって精力的に進められてきた。彼らは Otto Warburg の定説「CO は、酸素呼吸代謝生物にとって毒物である」を覆すべく、研究に取り組んでいた。この一連の微生物探索の中で、本研究の主材料となる放線菌の一種である *Streptomyces thermoautotrophicus* が単離された。この微生物は燃える木炭堆積物 (burning charcoal pile) の中に見出された。(M.Ribbe et al. J.Biol.Chem. vol.272 pp.26627-26633 (1997))

以下に本微生物の特徴を記載した。

- (1) 至適成育温度は 65 の絶対好気性窒素固定高温菌である。
- (2) CO を唯一の炭素源として生育する。ただし、二酸化炭素/水素を炭素源・エネルギー源としても生育することが可能である。
- (3) 本微生物のニトロゲナーゼは、Str1 と Str2 とよばれる 2 つの酵素複合体からなる。
- (4) この微生物のニトロゲナーゼは、多くの点で従来研究されてきたいわゆる conventional nitrogenase とは異なり、非常にユニークである。一例を挙げれば、アセチレン還元活性を示さない。
- (5) Str2 は電子を Str1 に伝達する活性をもち、活性中心として Mo をもつ Str1 によって MgATP 存在下において、窒素を還元しアンモニウムイオンを生じさせる。その際に、副産物として水素ガスの産生が見られる。ただし、conventional nitrogenase に比較して ATP の消費量は約 25% である。

以上のような特徴を備えたニトロゲナーゼは、水素ガス産生のためのバイオリクターの反応の中心分子とするには格好の材料であると判断して、今回の研究に取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、ニトロゲナーゼの水素産生触媒機能を光エネルギーと連動させることによって、最もクリーンなエネルギーである水素ガスを生産させるデバイスの構築に向けた基礎的条件を検討・検証することにある。

本研究に用いた放線菌 (*Streptomyces thermoautotrophicus*) は、好気性の化学無機栄養菌であり、なおかつ窒素固定能を有する点で非常にユニークである。従来知られている *Azotobacter vinelandii* 由来のニトロゲナーゼは、酵素として酸素に対して極めて脆弱であるため、菌体内には酸素防御タンパク質を合成し酸素防御機構が構築されて、厳密な生物学的コントロール化でのみ酵素機能

を発揮する。しかし、本研究に用いた *Streptomyces thermoautotrophicus* は、上に述べたようにその生育に酸素を要求する微生物であり、その上、培養気相の窒素分子を還元してアンモニアを合成し栄養源としている。さらに、この微生物は 40 以下では増殖せず、65 という極めて高い温度帯の至適生育温度をもつ。これらを総合的に判断すると、この微生物由来のニトロゲナーゼ系は、従来のものと異なり、酸素と熱に対して極めて安定的な性質を有していると考えられた。

さらに、窒素還元に必要な電子は、superoxide ion を酸化する酵素である SOD 様の Str2 とよばれるタンパク質からこのニトロゲナーゼに伝達されることが示されている。(Michael T. Madigan et al. Brock 微生物学 (2003) p.644)

このような性質をもったニトロゲナーゼをバイオリクター酵素として活用するための基礎を構築することを目指した。そのためには、その窒素還元ではなく、光エネルギーを用いて水素産生活性を優先的に引き出すことの可能な系を構築することが求められ、まさにそのことが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

(1) 微生物の大量培養

水素ガス産生用の酵素をすべて、本微生物を大量に培養することによって調製するべく、本微生物の大量培養法を模索した。ドイツのグループは、13% 一酸化炭素、9% 二酸化炭素および 78% 空気の体積割合で送気する系で大量 (70L) に培養する方式を採用していた。しかし、通常の実験室においては、一酸化炭素の取り扱いなど、安全面等において問題があるため、本研究においては、水素、二酸化炭素、空気の混合気相を用いて大量培養系を構築することを試みた。水素と二酸化炭素が、本微生物による代謝が行われることはすでに単離したグループから報告されている。安全に継続的に水素ガスを供給するために、本研究基金にて購入したガスクロマトグラフィー用の水素ガス発生装置によって水を電気分解して得られる水素ガスを用いた。10L のファーメンターに毎分、水素 150mL、二酸化炭素 100mL および空気を 300mL 送気することによって大量に培養する方法を検討した。

(2) ニトロゲナーゼ系遺伝子の人工合成

ドイツ・バイロイト大学の Dr.Hoffman 氏の博士学位論文(2000)によると、Str1 は、ヘテロ三量体からなるタンパク質であり、その構造遺伝子は、ゲノム上にタンデムに並んで存在することが示されている。その遺伝子配列は sdnM-sdnS-sdnL の順である。一部 ORF がオーバーラップしている部分もある。

われわれは、これらのそれぞれのサブユ

ニットの遺伝子を別々に人工合成した。その際、塩基配列は、オリジナルなものを用いずに、その後の大腸菌内での発現効率を考慮して、大腸菌に良く用いられるコドンを選択して codon optimization を実施し、完全化学合成したものを、それぞれ発現ベクターである pET11a (Novagen[®]) または pColdI (Clonetech[®]) 等に導入した。

(3) リコンビナント Str1 の発現

str1 遺伝子 (sdnM, sdnS, sdnL) を発現ベクターに挿入したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) に導入した。形質転換した菌を一晚 LB 培地で培養した菌を新しい LB 培地に植菌して、培養液の OD_{600nm} が約 0.4 ~ 0.5 になるまで培養した。その後は、pET11a ベクターを用いた場合には、IPTG を最終濃度 0.1mM になるように添加して、さらに 4 時間程度培養した。pColdI を用いた場合には、対数増殖期にある培養菌をすぐに 15 °C の恒温槽に移し 30 分間培養を継続したのち、0.1mM IPTG 条件下でさらに 24 時間の培養を継続した。

培養の終了した菌体を、50mM KH₂PO₄-NaOH buffer pH7.5 でリンスしたのち、超音波処理により菌体を破壊し粗細胞抽出液とした。これを 12.5 % T SDS-PAGE により、予想される分子量にリコンビナント SdnM, SdnS および SdnL が発現しているかを確認した。

(4) リコンビナント Str1 の精製

(3) によって発現が確認されたリコンビナントタンパク質の簡易精製法について検討した。以前の研究結果から Str2 については、大腸菌菌体内に発現させた後、超音波破碎によって得られた粗細胞抽出液を 65 °C で熱処理することによって、その上清に未変性の状態で活性をもった Str2 がほぼ純粋な状態で精製することが可能であることが過去の研究において明らかとなっていたため、この方法を Str1 にも適用し簡易精製の可否について検討した。

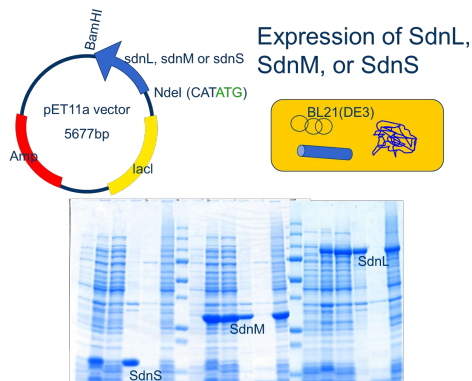
4. 研究成果

(1) 培養系について

ニトロゲナーゼを大量に精製することを目的として、*Streptomyces thermoautotrophicus* の大量培養系の条件を検討した。一酸化炭素によらない、水素を電子供給体とする系について検討した。一酸化炭素を用いた系では、窒素源を加えない条件での培養が可能であったが、水素/二酸化炭素系においては、窒素源の飢餓状態では、本菌の生育は著しく減衰することが明らかとなった。固形培地を用いた系の場合には、窒素源の有無における菌の生育の違いは確認されなかった。液体培養系での窒素源飢餓状態での大量培養は今後の検討が必要となることが明らかとなった。

この結果から、ニトロゲナーゼ (Str1) の取得については、Str2 の系で成功したリコンビナントタンパク質として人工合成する方向を検討することとした。

(2) リコンビナント Str1 の発現とニトロゲナーゼ活性について



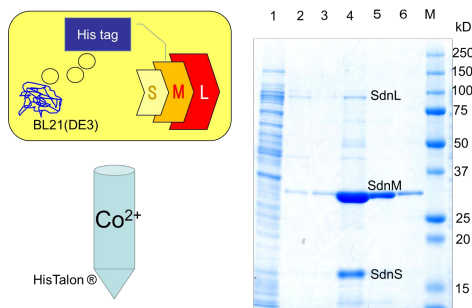
上図に示したとおり、Str1 のリコンビナントタンパク質はすべて、予想通りの分子量をもつタンパク質として大腸菌菌体内に発現させることが可能であった。しかしながら SdnS については、細胞粗抽出液に不溶であった。また、SdnM および SdnL については約 50% 程度の可溶性を示すことになった。さらに、得られた可溶性画分を 65 °C で加熱処理したのちに未変性状態の維持が可能であるかを調べた。以下の表にリコンビナントタンパク質の可溶性と熱に対する感受性試験の結果についてまとめた。総括すると、これら 3 つのサブユニットを *in vitro* 再構成することによるニトロゲナーゼ活性の発現の可能性は、否定される結果となった。

vector/ insert	After sonication	After heat treatment
pET11a/ St2	+++	+++
pET11a/ sdnS	-	ND
pET11a/ sdnM	+++	-
pET11a/ sdnL	++	-

以上の結果から、sdnM/S/L をそれぞれ独立に発現させて、再構成させることが実現できない状況となり、sdnM-sdnS-sdnL をゲノム上の配列に準じて、クローニングベクター pColdI に挿入し連続的に発現させることを試みた。pColdI は、低温ショック (15 °C) を与えてその温度で継続的に培養することで、変性傾向にあるタンパク質を効率よく未変性状態で発現させることが期待できる発現ベクターである。さらに、外来のタンパク質の N 末端部分に His-tag を導入する形の融合タンパク質として発現させることができる。すなわち、金属キレートカラムを用いて簡易精製することが可能

である。以上の結果を以下の図に示した。SDS-PAGE の lane4 に見られるように、三量体として発現した Str1 タンパク質を、 Co^{2+} のキレートカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製することが可能であった。

His - Tagged SdnL/M/S complex purification



さらに、このように精製したリコンビナント Str1 について、Str2 と共存させて dithionite を電子供与体 (還元剤) として Mg-ATP 存在下で、ニトロゲナーゼの活性をアンモニアおよび水素について測定を実施したが、この結果はネガティブであった。

(3) 今後の展開

水素産生のためのバイオリアクター酵素として、*Streptomyces thermoautotrophicus* 由来のニトロゲナーゼ系を利用することを想定して、遺伝子のクローニング、発現までを行った。これまでのところ、微生物から直接精製したこれらの酵素がもつ活性を、リコンビナント酵素にもたせることは実現していない。考えられる原因として、ニトロゲナーゼの活性にとって、補因子が重要であることから、大腸菌内で補因子の合成と挿入が行われていない可能性がある。しかしながら、ゲノム解析の結果から、大腸菌にも本ニトロゲナーゼに必須の MCD (molybdenum cytosine dinucleotide) の合成と挿入のための遺伝子の存在が明らかとなっている。これは、aldehyde oxidoreductase の *yagTSRQ* 遺伝子クラスター内の *YagQ* によって MCD が *YagR* に挿入されることが分かっている。(M.Nueman, FEBS vol.276 pp.2762-2774 (2009))

このタンパク質を大腸菌菌体内で発現させた状態で *sdnM/SL* を発現させて、MCD の挿入が見られるかの検討が必要である。また、ゲノムリコンビネーションによって、当該オペロン内に、本研究でクローニングしたニトロゲナーゼ構造遺伝子を挿入させるなど、補因子の合成・挿入系と連携させる等の遺伝子工学的手法を適用し、酵素活性を発現させるための基礎的研究が必要となった。

さらに、上記の研究の進展の影響を受けて、今回予定していた、酸化チタン等の光触媒活性をもつ無機化合物との連携による水素ガ

ス産生系の構築について、具体的な成果に至らなかった点については、順次研究の進展に応じて検討する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yasuhiko Shizawa Attempts for the construction of bioreactor of hydrogen gas production using recombinant proteins of nitrogenase components of *Streptomyces thermoautotrophicus*, 第 18 回 国際窒素固定会議、平成 25 年 10 月 15 日、フェニックス シーガイア リゾート 宮崎県宮崎市山崎町浜山

〔図書〕(計 1 件)

Yasuhiko Shizawa, Kazukiyo Onodera, Dilip Gadkari and Ortwin Meyer, NOVA science publishers, Advances in Medicine and Biology vol.62 "Constructions of a small bioreactor using nitrogenase of *Streptomyces thermoautotrophicus*", 2013, pp.123-136

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志澤 泰彦 (Shizawa, Yasuhiko)
日本大学短期大学部生物資源学科 講師
研究者番号：30413131