

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450125

研究課題名(和文)酸素耐性ヒドロゲナーゼの結晶構造に基づく変異導入実験に向けた最適発現系の構築

研究課題名(英文)Functional expression of an oxygen-tolerant hydrogenase toward mutagenic experiment according to information of the X-ray crystal structure

研究代表者

西原 宏史(NISHIHARA, Hirofumi)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：10260465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：耐熱性と酸素耐性に優れる *Hydrogenovibrio marinus* 由来膜結合型ヒドロゲナーゼの R. eutropha における機能的発現が成された。精製を容易にするために小サブユニットのシグナルペプチドを除去して、可溶性酵素として発現させることも試みたが、高い耐熱性をもつ立体構造を形成するには膜への局在化が必要であることが示唆された。膜酵素として発現を行った実験ではオリジナル酵素と同等の耐熱性と酸素耐性が確認されたため、変異酵素の作製による構造と機能の研究やヒドロゲナーゼの改良に活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Heterologous expression of the oxygen-tolerant, highly thermostable membrane-bound hydrogenase from *Hydrogenovibrio marinus* was performed in *Ralstonia eutropha*. Expression of the enzyme as a soluble enzyme was also investigated by deletion of the small subunit signal peptide, which is necessary for membrane transduction. However, the result suggested that the process of membrane translocation is necessary for producing a proper conformation possessing high thermal stability. The recombinant enzyme expressed as membrane enzyme exhibited oxygen-tolerance and high thermal stability equivalent to those of the original enzyme. Therefore, the expression system is useful for introducing designed mutations to the *H. marinus* hydrogenase to study relationship between its unusual properties and structure.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ヒドロゲナーゼ 水素酸化細菌 水素 燃料電池触媒 蛋白質発現

1. 研究開始当初の背景

(1) 好気性水素酸化細菌 *Hydrogenovibrio marinus* 由来の酸素耐性・耐熱性ヒドロゲナーゼ

ヒドロゲナーゼは水素の酸化と発生を触媒する酵素で、水素燃料電池用触媒や水素生産への利用が期待されるが、酸素による活性中心の酸化失活等、その安定性は実用上の課題である。我々は高酸素分圧下で良好に生育できる好気性水素酸化細菌 *H. marinus* を分離し[1]、活性中心に Ni と Fe をもつ膜結合型 [NiFe]-ヒドロゲナーゼ (Membrane-bound hydrogenase; MBH) は膜からの可溶性精製後も高い酸素耐性・耐熱性・触媒活性を併せもつことを見出した[2]。また、本酵素 (HmMBH) は大気中に放置しても酸化状態の不活性型 Ni に特有の電子スピン共鳴シグナルが観察されないという特筆すべき特徴を示した。大サブユニット (LSU) と小サブユニット (SSU) からなるヒドロゲナーゼ部位 (可溶性部分) の X 線結晶構造解析に成功し、活性中心近傍の Fe-S クラスタが新規の [4Fe-3S] 型構造をもつこと、強い酸化条件で本クラスタを配位する Cys26 のアミド窒素が脱プロトン化した超酸化構造に変化することを見出した。これにより活性中心から酸素を還元除去するための電子とプロトンを余分に供給できるようになり、活性中心の酸化を防ぐ仕組みが考えられた[3]。同時期に、同じく好気性水素酸化細菌である *Ralstonia eutropha* 由来の MBH (ReMBH) で同様の構造的特徴が示された[4]。これらは好気環境で機能する酸素耐性ヒドロゲナーゼの構造に関する最初の報告であり、ヒドロゲナーゼの改良や優れた人工酵素の開発に貢献するものである。一方、耐熱性に関しては両酵素で大きな相違があり、その構造的な要因を精査することは非常に興味深い。

(2) MBH の成熟化と機能的発現

構造解析の情報を活用して、HmMBH の高い酸素耐性や耐熱性との関連を実験的に検証するには変異導入実験が必須である。また、ヒドロゲナーゼにおけるプロトン伝達経路は未解明であり、HmMBH の Cys26 の脱プロトンと酸素耐性との関連や、活性中心への伝達経路の検証等も重要である。*H. marinus* は絶対独立栄養性であるという扱い難さがあり、HmMBH への変異が活性に影響する場合には水素培養ができなくなるため、実験が成立しない。そこで、構造の類似する酸素耐性 MBH を有し、遺伝子操作で実績のある *R. eutropha* のヒドロゲナーゼ欠損株を宿主として機能的発現を検討することにした。本菌は通性独立栄養性で、炭素源によっては有機物培養でも高レベルで MBH が発現するという実験上有利な性質をもつ。

MBH の成熟化は LSU の NiFe 活性中心の形成、LSU の特異的プロテアーゼによる C-末端の切断と高次構造形成、電子伝達を担う

SSU との会合による機能的酵素の形成、Tat システム依存的な膜透過[5]と Cytb との複合体形成という複雑な過程をとり、活性中心の形成だけで少なくとも 6 つの Hyp 蛋白質群が必要だといわれるが、成熟化蛋白質群の全容は未解明である。加えて ReMBH の成熟化には HoxL 等、大腸菌では見られない蛋白質群の必要性が示されており、酸素耐性構造との関連が示唆されている[6]。HmMBH では HoxL 相同蛋白質を含む成熟化関連蛋白質の遺伝子がいくつか取得されているが、ReMBH との高次構造および一次配列における高い類似性から (LSU; 72% identity, 83% similarity, SSU; 86% identity, 90% similarity)、ReMBH の成熟化システムが HmMBH に有効に働く可能性は高い。また、ヒドロゲナーゼの異種細胞での発現において、構造の類似するヒドロゲナーゼをもつ宿主での成熟化システムの有効性が示されている[7]。

(3) 本研究の特色と意義

一部の [NiFe] 型 MBH は酸素存在下でも触媒機能を発揮するため、そのメカニズムの解明はヒドロゲナーゼの改良や優れた人工酵素の開発に有用な情報を与える。酸素耐性 MBH のうち、結晶構造解析の情報が利用できるのは HmMBH と ReMBH のみである。

HmMBH は高い酸素耐性と耐熱性 (精製状態で反応最適温度 85、80 での半減期は約 75h) という実用的な特徴をもつ酵素である。同様のポテンシャルをもつ酵素として *Aquifex aeolicus* 由来 MBH が知られるが、構造解析は成されていない。

HmMBH の精製酵素の調製に水素での培養が不要になり、今後の酵素解析やバイオ燃料電池開発のための研究に有用である。また、HmMBH のユニークな複合体構造解明へのブレークスルーになることが期待される。

2. 研究の目的

好気環境で機能する *H. marinus* 由来の MBH は、酸素耐性 MBH として初めて X 線結晶構造解析が成された。その情報に基づく変異導入実験を可能にするために、HmMBH の *Ralstonia eutropha* における最適発現系の構築と簡易効率的な精製法の確立を目指し、*H. marinus* が元来もっている酵素と組換え発現酵素 (recHmMBH) との比較評価を行うことを目的とした。本来の細胞膜酵素としての発現を検討すると共に、MBH の局在化が Tat システム依存的であり、細胞質内で活性のあるヒドロゲナーゼ部位 (HoxKG) が形成されることから、精製の簡易化も考慮して二量体の可溶性酵素としての発現も試みた。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

表1 主な菌株とプラスミド

菌株・プラスミド	特徴	文献
<i>R. eutropha</i> HF424	<i>R. eutropha</i> H16 のヒドロゲナーゼ欠損株	[8]
<i>E. coli</i> S17-1	<i>R. eutropha</i> とのプラスミド接合伝達能	[9]
pCH591	<i>R. eutropha</i> hydrogenase promoter on Litmus 29	[10]
pEDY309	<i>R. eutropha</i> で利用可能なグラム陰性菌用ベクター	[10]

表1の他に HmMBH 構造遺伝子・成熟化蛋白質遺伝子として当研究室で取得しているクローンを使用した。また、市販の汎用大腸菌宿主・ベクターを使用した。

(2) 遺伝子実験

一般的操作は確立されたプロトコルに従った。HmMBH は *R. eutropha* H16 由来の可溶性ヒドロゲナーゼ・プロモーターにより、ヒドロゲナーゼ欠損株である *R. eutropha* HF424 にて発現させることを試みた。

HmMBH の構造遺伝子は 5' - *hoxK* (SSU) - *hoxG* (LSU) - *hoxZ* (Cytb) - *orf1* - 転写終結配列 - 3' となっており、ORF1 はその配列からヘム c 結合モチーフをもつ膜蛋白質であると推定される。pCH591 のヒドロゲナーゼ・プロモーター (P_{SH}) 領域は下流の SSU 開始コドンに合わせて *NdeI* サイトが作成されているため、HmMBH の *hoxK* 側も PCR を利用して開始コドン ATG に合わせて *NdeI* サイトを作成し、シークエンスを確認した後にプロモーター下流に導入した。HmMBH 由来成熟化蛋白質遺伝子として、*R. eutropha* の *hoxL*, *hoxM* と同様の高い配列が *orf1* 下流に逆向きにコードされていることが見出されている。*hoxK* 下流には構造遺伝子と共にこれら成熟化蛋白質遺伝子を同じ向きになるように組み込み、プロモーターとセットで pEDY309 に乗せかえた (pEDYMH31)。 *R. eutropha* HF424 への pEDYMH31 の導入は、*E. coli* S17-1 からの接合伝達により行った (形質転換株: HF424MH31)。また、シグナルペプチドを欠損する *hoxK* 遺伝子はシグナルペプチドのすぐ下流にある Met コドン (ATG) に合わせて *NdeI* サイトを作成し、シークエンスを確認した後に pCH591 の P_{SH} 下流に導入した。その下流に構造遺伝子と成熟化蛋白質遺伝子 (*hoxML*) を連結し、プロモーターとセットで pEDY309 に乗せかえた (pEDY-SdeI)。pEDY-SdeI は *R. eutropha* HF424 へ導入し、可溶性 HmMBH 発現株 (HF424-SdeI) とした。

(3) ヒドロゲナーゼ誘導条件での培養と細胞内局在性の解析

R. eutropha 形質転換株は基質としてフルクトースとグリセロールを含む培地で培養した。フルクトースを利用した増殖からグリセロールを基質とする遅い増殖へ移行した

後、ヒドロゲナーゼ・プロモータが高いレベルで機能することが報告されている[11]。細胞の超音波破砕物、高速遠心分離後の不溶性沈殿 (IP)、無細胞抽出液の超速心分離後の可溶性画分 (SF) および細胞膜画分 (MF) に存在するヒドロゲナーゼ活性を測定し、発現状態の評価を行った。

(4) ヒドロゲナーゼ活性の測定

水素酸化活性はプシルゴム栓により密閉できるガラスセルを使用して、水素ガス存在下でのベンジルビオローゲン (BV) の還元を分光光度計により経時的に測定した。還元型 BV の 604nm における吸光度 (モル吸光係数; $8.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の変化から活性を算出した。1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の BV を還元する酵素量を 1 U とした。活性測定用バッファーは 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) を使用し、活性測定用ガラスセルの気相を水素ガスにて置換して 50 で 30 min インキュベートした後、BV を 10 mM になるように添加して反応を開始した。

(5) ヒドロゲナーゼの精製

H. marinus からの HmMBH、および *R. eutropha* 形質転換株 (HF424MH31) の膜画分からの組換え HmMBH (recHmMBH) の可溶化と精製は[2]に記載の方法に従って行ったが、無細胞抽出液にフェリシアン化カリウムを終濃度 20 mM になるように添加した後、細胞膜画分を調製し、可溶化後の操作は好氣的に行った。ヒドロキシアパタイト、Q-Sepharose high performance、Superdex 200 を組み合わせたカラムクロマトグラフィーにより精製を行った。

4. 研究成果

(1) *R. eutropha* における HmMBH 発現株の作製と活性の発現

図1に示したように、*R. eutropha* 由来の可溶性ヒドロゲナーゼ・プロモーター (P_{SH}) 下流に4つの HmMBH 構造遺伝子および *R. eutropha* 由来成熟化蛋白質 Hox L と Hox M とそれぞれ高い同様の配列のある ORF4 と ORF5 遺伝子を連結して pEDY309 に導入し、組換え HmMBH (recHmMBH) 発現ベクター pEDYMH31 を構築した。また、図2のようにヒドロゲナーゼ小サブユニットのシグナルペプチド部分を欠損する組換え HmMBH (recHmMBH-sig) の発現を試みるために、当該遺伝子領域を削除した発現ベクター pEDY-SdeI を構築した。

それぞれの発現ベクターを *R. eutropha* HF424 (H16 株の SH, MBH 欠損株) へ導入し、ヒドロゲナーゼ誘導条件にて培養を行って各画分の水素酸化活性を測定した (図3)。H16 株の MF で検出された活性 4.34 U/ml に対して、形質転換株である HF424MH31 株では 33.2% に相当する活性 (1.44 U/ml) が検出された (測定温度: 30°C)。また、SF にも局在化される前の recHmMBH 由来と考えられる活性

(0.60 U/ml) が検出された。宿主である HF424 株では、有意な活性は検出されなかった。一方、シグナルペプチドを削除した HmMBH 遺伝子を導入した HF424-SdeI 株では SF に検出される活性 (0.67 U/ml) の割合が高くなったが、MF にもなお、0.29 U/ml の活性が検出された。

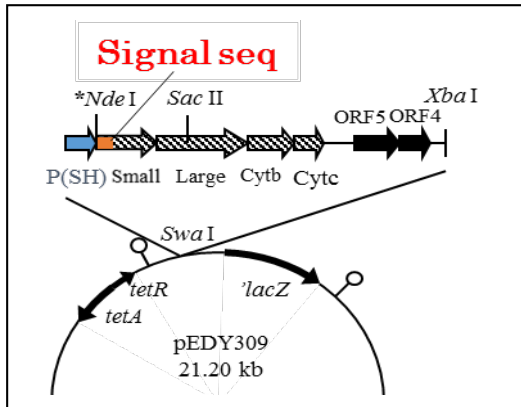


図 1 発現ベクター pEDYMH31 および pEDY-SdeI の模式図
pEDY-SdeI はシグナルペプチドに相当する遺伝子部位を削除。

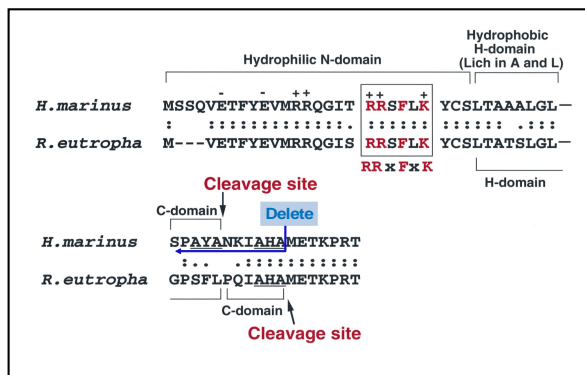


図 2 *H. marinus* および *R. eutropha* 由来 MBH 小サブユニットのシグナルペプチド
図中に recHmMBH- sig における削除部分を示す。

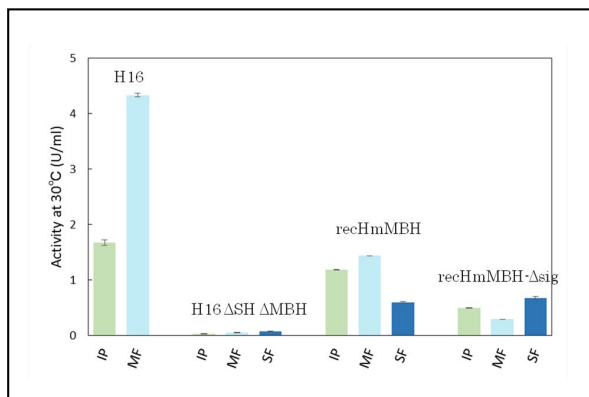


図 3 組換え HmMBH の活性発現の結果
IP: 細胞破碎後の高速遠心分離沈殿物
MF: 細胞膜画分
SF: 可溶性画分

(2) 発現した HmMBH の特徴

R. eutropha H16 株由来 MF、*R. eutropha* HF424 株を宿主として HmMBH の発現を試みた HF424MH31 株 および HF424-SdeI 株 (recHmMBH- sig) から調製した MF と SF について、ヒドロゲナーゼ活性と温度との関係調べた (図 4)。発現株の MF に検出された活性は H16 株の MF とは明らかに異なり、HmMBH の特徴である 80 付近に最適反応温度を示した。しかしながら SF に検出された活性はより低い温度を示したため、高い耐熱性をもつ立体構造を形成するためには膜への局在化の過程が必須であると考えられた。recHmMBH- sig の局在性は期待通り SF の割合が高くなったが、それでもなお、少ない割合で検出された MF の活性のみ HmMBH 同様の好熱性を示した。

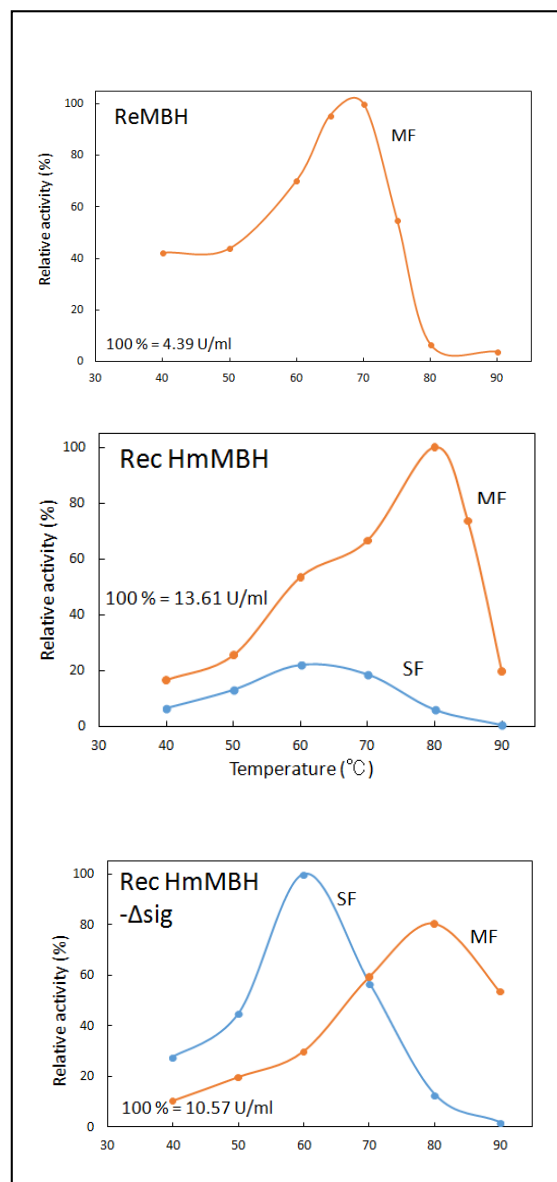


図 4 ReMBH および発現した HmMBH の活性と温度との関係。

そこで、HF424MH31 株の MF から recHmMBH の精製を行い、酸素耐性に関する特徴について *H. marinus* から精製した HmMBH との比較を行った(図5)。活性測定の反応系に還元剤としてジチオナイトを入れない場合、水素のバブリングだけでは溶存酸素が完全に除去されないため、酵素量が少ない条件では酸素を還元して除去するのに時間がかかり、BV 還元が始まる前の Lag time として観察される。各精製酵素を3つの濃度レベルに設定して反応を行ったところ、同程度の酵素濃度では HmMBH と recHmMBH で観察される Lag time に相違がなく、recHmMBH の酸素還元活性はオリジナルの酵素と同程度であることが確認された。

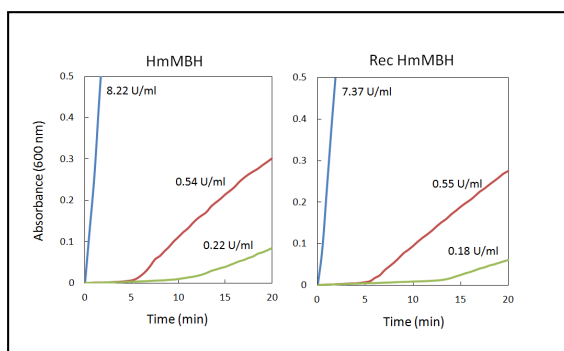


図5 ReMBH および発現した HmMBH の活性と温度との関係。

(3)総括

耐熱性と酸素耐性に優れる HmMBH の *R. eutropha* における機能的発現が可能になった。発現酵素の精製を容易にするために小サブユニットのシグナルペプチドを除去して、可溶性酵素として発現させることも試みたが、高い耐熱性をもつ立体構造を形成するには膜への局在化が必要であることが示唆された。膜酵素として発現を行った場合、オリジナルの HmMBH 同様の耐熱性と酸素耐性が確認された。従って今後、変異酵素の創生による構造と機能に関する研究やヒドロゲナーゼの改良に活用されることが期待される。

<引用文献>

[1] Nishihara, H. Genus III *Hydrogenovibrio* Nishihara, Igarashi and Kodama 1991b, 132^{VP}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd edn.), Vol. 2: The Proteobacteria (Part B), D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity (eds.), Springer-Verlag New York, pp.188-189 (2005)

[2] Yoon, K. S., Fukuda, K., Fujisawa, K., Nishihara, H. Purification and characterization of a highly thermostable, oxygen-resistant, respiratory [NiFe]-hydrogenase from a marine, aerobic

hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus*. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 36: 7081-7088 (2011)

[3] Shomura, Y., Yoon, K. S., Nishihara, H., Higuchi, Y. Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature*, 479: 253-256 (2011)

[4] Fritsch, J., Scheerer, P., Frielingsdorf, S., Kroschinsky, S., Friedrich, B., Lenz, O., Spahn, C. M. T. The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*, 479: 249-252 (2011)

[5] Palmer, T., Berks, B. C. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10: 483-496 (2012)

[6] Ludwig, M., Schubert, T., Zebger, I., Wisitruangsakul, N., Saggiu, M., Stack, A., Lenz, O., Hildebrandt, P., Friedrich, B. Concerted action of two novel auxiliary proteins in assembly of the active site in a membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 284: 2159-2168 (2009)

[7] Lenz, O., Gleiche, A., Strack, A., Friedrich, B. Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J. Bacteriol.*, 187: 6590-6595 (2005)

[8] Massanz, C., Schmidt, S., Friedrich, B. Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, 180: 1023-1029 (2000)

[9] Priefer, U. B., Simon, R., Puhler, A. Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J. Bacteriol.*, 163: 324-330 (1985)

[10] Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Friedrich B. The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J. Bacteriol.*, 182: 2716-2724 (2000)

[11] Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, 145: 1144-1149

(1981)

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)

〔学会発表〕(計1件)

遠藤遼平、川島真人、野口真治、梅村奈那実、西原宏史「*Hydrogenovibrio marinus* 由来膜結合型ヒドロゲナーゼの *Ralstonia eutropha* における発現」、第67回日本生物工学会大会、2015年10月28日、城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

〔その他〕

ホームページ等

<https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/4/000335/profile.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

西原 宏史 (NISHIHARA HIROFUMI)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：10260465