

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870360

研究課題名(和文) 金属鉄から水素を発生する新奇ヒドロゲナーゼの反応機構の解明

研究課題名(英文) Study on novel hydrogenase which produces molecular hydrogen from metal iron

研究代表者

若井 暁 (WAKAI, Satoshi)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・特命助教

研究者番号：50545225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、鉄腐食性メタン生成菌において見つかった新奇ヒドロゲナーゼの機能と構造を明らかにすることであった。残念ながら、精製および立体構造決定には至らなかったが、本酵素に由来すると思われる水素発生条件の最適化と統合計算ソフトを用いた立体構造のシミュレーションを行った。至適水素発生条件は、本菌の生育条件とよく一致していた。また、立体構造のシミュレーションから、スモールサブユニットが特に既知ヒドロゲナーゼと異なり、金属材料からの電子伝達に機能していると推定された。今後は、非腐食性メタン生成菌を用いた異種発現系の確立とスモールサブユニットに焦点を当てた電気化学的解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In this work, I tried to clarify the function and conformation of novel hydrogenase from iron-corrosive methane producing archaeon *Methanococcus maripaludis* KA1. Although we could not purify it and determine the X-ray structure, I succeeded to determine the optimal condition of molecular hydrogen production from metal iron and simulate the structure by calculation using MOE (Molecular Operating Environment) program. The optimal condition was similar to growth condition of this microorganism. The simulation by MOE indicated the possibility that a small subunit has especially unique structure compared with known structure of homologous hydrogenase. In the future, I will perform heterologous expression of the hydrogenase in non-corrosive methane producing archaeon and electrochemical experiment focused on the small subunit in order to clarify the interaction between this hydrogenase and metal material.

研究分野：農学

キーワード：ヒドロゲナーゼ 微生物 金属 腐食 メタン生成菌 水素 酵素 微生物腐食

## 1. 研究開始当初の背景

微生物が関与して誘導される金属腐食は、微生物腐食と呼ばれる。微生物腐食に関する研究は腐食現場の微生物群集構造解析やバイオフィーム抑制といったものがほとんどで、海外では新しい腐食性微生物の分離等が進められている (Dihn et al., Nature 2005、McBeth et al., AEM 2011)。一方で、我々は、国内の石油タンクから鉄腐食性メタン生成菌を世界に先駆けて分離し、新規ヒドロゲナーゼの関与する推定腐食メカニズムを提唱している。

我々は、本菌の全ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析およびプロテオーム解析により、細胞外に分泌される新奇のヒドロゲナーゼを発見した。細胞を除去した培養上清だけで水素を発生しながら腐食が進行することを明らかにしており、この新奇ヒドロゲナーゼが腐食促進因子である可能性を生化学的にも確認している。この新奇ヒドロゲナーゼが金属腐食へ関与することの直接的な証明が出来ていないので、この新奇ヒドロゲナーゼを精製し、本酵素単独で金属腐食を証明することが必要である。さらに、これまでに金属表面から電子を受け取るヒドロゲナーゼの報告は無いので、反応機構として新奇性が高く、精製酵素の立体構造を解く必要があると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が発見した鉄腐食性のメタン生成菌のみが持っている新奇ヒドロゲナーゼを精製し、その反応機構を明らかにすることである。微生物による金属腐食の大きな問題は、反応機構が不明ということである。申請者は、世界に先駆けて金属腐食能とリンクした新奇ヒドロゲナーゼを発見している。本研究では、本酵素を精製して金属腐食能を直接証明し、さらに、立体構造を決定することで新奇反応機構の解明を目指す。

本酵素の反応機構の解明は、固体界面で機能する新奇酵素の開発や有効な微生物腐食防食剤の開発等の発展性を持っており、学術面と応用面から価値のある研究である。さらに、金属腐食のコストは日本で約2兆円/年も掛かっており、経済的な側面からも実社会への貢献が大きい。

## 3. 研究の方法

本研究の目的は、鉄腐食性メタン生成菌のみに確認されている新奇ヒドロゲナーゼを精製し、その反応機構を明らかにすることである。したがって、まずは新奇ヒドロゲナーゼの生化学的な特徴を理解するとともに、酵素の精製を目指して、次の三つの項目を実施した。a) 水素発生条件の検討、b) メタン菌からの精製、c) 大腸菌での異種発現。次に、新規ヒドロゲナーゼの反応機構の解明を目指して、次の二つの項目を実施した。d) 結

晶作成条件のスクリーニング、e) 構造解析。

## 4. 研究成果

### (1) 水素発生条件の検討

精製を行う上で酵素活性の測定は必須である。したがって、最初に、酵素活性の至適条件 (pH、温度、塩濃度) を決定した。嫌気瓶に鉄ホイル (Fe=99.9%以上: 10×10×0.1 mm) の入った緩衝液を用意し、N<sub>2</sub> ガスで置換したところに、鉄腐食性メタン生成菌の培養上清を接種して、種々の条件 (pH 5~8、25~50、0~10% NaCl) で水素発生量を調べた。その結果、pH 7、40、3% NaCl を粗酵素液の至適条件として決定した。他の条件では、ケミカルに誘導される水素量の方が多くなるケースも観察され、培養条件に最も近い条件で安定的に水素生産が確認された。

一方で、以前の研究において培養上清のみで金属鉄から水素生産が確認できるということが報告されていたが、0.2 μm ポアサイズのフィルターメンブレンで濾過を行った培養上清で当初実験を行った結果、濾過物においてネガティブコントロールよりも高い水素発生量は観察されなかった。すなわち、以前の報告によれば細胞外にヒドロゲナーゼが分泌されるということであったが、死菌の壊れた細胞断片の膜上に存在する酵素によって反応が進んでいた可能性が考えられる。

本結果に加えて、以前の研究において高度鉄付着性微生物と共存した時に腐食が阻害されるという現象が確認されており、総合的に考察すると、鉄腐食性メタン生成菌による金属腐食現象には金属表面への接触が必要であると考えられる。

また、当初予定していなかったが、金属材料を変えた時にも本菌によって、水素発生や金属腐食が生じるかどうかを検討するために、鉄ホイル (Fe>99.9%) に加えて、ステンレス鋼 SUS301 (17%Cr-7%Ni: ばね、ナット、ネジなどに使用)、SUS304 (18%Cr-8%Ni: 耐熱鋼)、SUS316 (18%Cr-12%Ni-2.5%Mo: 耐孔食材料として使用)、および、クロム鋼 (SUJ-2: 耐摩耗性鋼材として広く使用) について試験を行った。その結果、鉄腐食性メタン生成菌は、SUS301、SUS304、SUS316 には腐食を生じなかった。一方、クロム鋼を腐食した。鉄腐食性メタン生成菌による腐食は、硫酸塩還元菌存在下において強くなることが知られており、今後硫酸塩還元細菌との共培養系での腐食試験も検討する。

### (2) メタン菌からの精製

本酵素が腐食原因の因子であることを直接証明するために、(1) で決定した条件を用いて活性を追跡することで、メタン菌培養液からの酵素精製を目指した。

ヒドロゲナーゼが酸素で失活する可能性があったため、簡易の嫌気グローブボックスを用いて操作を行っていたが、鉄腐食培養液

中に大量に存在する鉄イオンが酵素精製の操作において顕著に悪影響を及ぼした。また、(1)で明らかになったように、培養上清に存在するヒドロゲナーゼ量がかなり少なく、フィルター通過後の培養上清を出発材料として酵素精製が進められなくなったことも影響して、鉄腐食性メタン生成菌から直接精製する方法は諦めて、大腸菌での異種発現系を用いて酵素を獲得することとした。

### (3)大腸菌での異種発現

メタン菌からの精製が難しいこともあり、当該酵素の大腸菌での異種発現を検討した。ゲノム情報に基づき、当該酵素の推定アミノ酸配列から大腸菌のコドン使用頻度を持つ遺伝子を人工合成した。

しかしながら、水素発生能をもつタンパク質分子を獲得することは出来なかった。大腸菌での移出发現系では、反応中心のニッケルクラスターや分子内電子伝達に關与する鉄硫黄クラスターの形成などに問題があるのかもしれない。鉄腐食性を持たないメタン生成菌である *Methanococcus maripaludis* において形質転換方法が確立されているという既報が存在するので、今後は、発現宿主を変えてメタン生成菌上での異種発現を検討する。

### (4)ヒドロゲナーゼの構造予測

上述したように、鉄腐食性メタン生成菌からの直接精製や大腸菌を用いた異種発現による単一機能分子を獲得することが出来なかったため、対象のヒドロゲナーゼの結晶を作成するに至らなかった。しかしながら、新奇ヒドロゲナーゼのアミノ酸配列は既知ヒドロゲナーゼと比べてもかなり低い相同性しか示さず、その立体構造に興味を持たれる。

そこで、計算機シミュレーションを用いて構造予測を行った。構造予測には、統合計算ソフト (MOE: Molecular Operating Environment) を用いた。活性中心のニッケルを配位するラージサブユニットとの相同性は 24%とかなり低いが、ニッケルを配位する C 末端付近のシステイン残基は保存されていた。また、予測された 3D 構造もヘリックス傾向などがよく一致していた。一方で、別の生体分子などとインタラクションして電子を活性中に運ぶスモールサブユニットの相同性は、15%とさらに低く、 $\alpha$ -ヘリックスなどの二次構造があまりモデル化されなかった。このシミュレーション結果から、ヒドロゲナーゼにおいて、他の生体分子との電子授受に機能するスモールサブユニットが特にユニークな構造 (あるいは機能) を持っている と推定された。すなわち、スモールサブユニットの特異的な構造が、金属鉄との電子授受に寄与している可能性が高いと考察した。今後、このスモールサブユニットと金属材料とのインタラクションについても検討することとする。

### (5)今後の展望

本研究でターゲットとしたヒドロゲナーゼは、先に金属腐食性菌として Nature 誌に報告された硫酸塩還元細菌やメタン生成菌においても特定はされておらず、その構造モデルをシミュレーションした報告はなく、本研究が初めてである。本研究では、結晶構造作成から立体構造形成までを達成することは出来なかったが、スモールサブユニットの重要性が示されたことは今後の研究の方向性を決める上で重要である。

以上を踏まえて、今後は、非腐食性メタン生成菌に本ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入して腐食性の付与について検討すると共に、スモールサブユニットの機能について電気化学的な視点での研究を進める。

### 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 4 件)

- 1) S. Wakai, S. Fujii, M. Masanari, K. Miyanaga, Y. Tanji, and Y. Sambongi. Corrosion Test Using Bottom Water from Oil-storage Tank and Microbial Community Analysis by Next Generation Sequencer. *Zairyo-to-Kankyo*, 64: 540-544 (2015) (査読有)
- 2) 若井 暁、金属材料が患う微生物感染症—微生物腐食—、*化学と生物*, vol. 53(8), 515-520 (2015) (査読有)
- 3) T. Iino, K. Ito, S. Wakai, H. Tsurumaru, M. Ohkuma, and S. Harayama. Iron corrosion induced by non-hydrogenotrophic nitrate-reducing *Prolixibacter* sp. MIC1-1. *Appl. Environ. Microb.*, 81: 1839-1846 (2015) doi: 10.1128/AEM.03741-14. (査読有)
- 4) S. Wakai and S. Harayama. Isolation of bacteria rapidly adhering on the surface of metallic iron. *Mater. Technol.*, 30(B1):38-43 (2015) DOI 10.1179/1753555714Y.0000000220 (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1) 若井 暁、鉄腐食性メタン生成菌による金属腐食反応に付随する水素発生挙動の解析、腐食防食学会、材料と環境 2016、2016.5.26、つくば国際会議場 (茨城)
- 2) 若井 暁、伊藤 公夫、原山 重明、微生物変換能力を利用した金属廃棄物からの革新的な水素生産技術、日本農芸化学会、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.3.28、札幌コンベンションセンター (北海道)
- 3) 若井 暁、相界面科学から見た腐食菌による微生物腐食の挙動と対策、日本鉄鋼協会、第 171 回春季講演大会、2016.3.24、

- 東京理科大(東京)
- 4) 若井 暁、海水性メタン生成菌による金属腐食、好塩微生物研究会、第 52 回好塩微生物研究会、2015.12.13、神戸大学(兵庫)
  - 5) 若井 暁、藤井 創太郎、政成 美沙、宮永 一彦、丹治 保典、三本木 至宏、国家石油備蓄基地石油タンク中に生息する微生物の群集構造解析と鉄腐食試験による腐食リスク評価、極限環境生物学会、第 16 回極限環境生物学会年会、2015.11.9、東京海洋大学(東京)
  - 6) 若井 暁、微生物を用いた金属廃棄物からの水素およびメタン発酵生産、日本鉄鋼協会、第 170 回秋季講演大会、2015.9.17、九州大学(福岡)
  - 7) 若井 暁、藤井 創太郎、政成 美沙、宮永 一彦、丹治 保典、三本木 至宏、石油タンク底水を用いた腐食再現試験の次世代シーケンサを用いた微生物群集構造解析、腐食防食学会、材料と環境 2015、2015.5.20、東京電機大学(東京)
  - 8) 若井 暁、日本発の腐食菌検出技術および防食技術の開発を目指して、日本農芸化学会、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.29、岡山大学(岡山)
  - 9) 若井 暁、産業と環境の視点での微生物との付き合い方、日本鉄鋼協会、「21 世紀の製錬/精錬技術、バイオテクノロジーが拓く未来」、2014.12.8、秋田大学(秋田)
  - 10) 若井 暁、微生物を用いた金属廃棄物からの水素およびメタン発酵生産、日本鉄鋼協会、日本鉄鋼協会第 168 回秋季講演大会『微生物が促進する鉄鋼材料の腐食 Microbiological acceleration of steel corrosion』、2014.9.25、名古屋大学(愛知)
  - 11) S Wakai, S Fujii, A Abe, M Masanari, T Watanabe, Y Tomoe, Y Sambongi. Evaluation of diagnosis methods for microbiologically influenced corrosion. 17th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, 2014.7.9、シンガポール(シンガポール)
  - 12) 若井 暁、原山 重明、分子生物学的な微生物腐食診断に必要な高効率 DNA 抽出法、腐食防食学会、材料と環境 2014、2014.5.18、一橋記念講堂(東京)

〔図書〕(計 4 件)

- 1) 若井 暁、日本鉄鋼協会第 170 回秋季講演大会—材料の組織と特性部会討論会鉄鋼材料の生物劣化を誘導する影響因子の解明—に参加して、腐食防食学会、材料と環境、vol. 65(7)、1-3 (2016)
- 2) S Wakai. Gene Analysis for the Evaluation of the Effect of Environmental Factors. Corrosion Control and Surface Control: Environmentally Friendly Approaches, Springer Japan, Kanematsu, Hideyuki,

Barry, Dana M. (Eds.), 169-184 (2016)  
DOI: 10.1007/978-4-431-55957-3

- 3) 若井 暁、日本農芸化学会 2015 年度大会シンポジウム—微生物と電子と金属の複雑な関係を解き明かす微生物腐食研究の最前線—に参加して、腐食防食学会、材料と環境、vol. 64(7)、297-299 (2015)
- 4) 若井 暁、微生物腐食研究の未来、腐食防食学会、材料と環境(創立 40 周年記念特集号) 63(4)、246 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/wakai.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若井 暁(WAKAI, Satoshi)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・特命助教

研究者番号: 5054225

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: