

平成22年 5月 30日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20880022

研究課題名（和文） 遺伝子工学技術が導く未来水素社会を創る水素高度生産菌株の作製

研究課題名（英文） Construction of a genetically-engineered hyper hydrogen-producing strain useful to the future energy-supplying system by hydrogen gas

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・助教

研究者番号：00470592

研究成果の概要（和文）：本研究では、石油エネルギーに替わる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図るため、微生物が保持する「水素ガスを作る」という機能を可能な限り高めること、具体的には水素ガスを作る経路の活性化、水素を作る酵素の触媒活性の向上化などを行った。また、ランダム遺伝子変異導入による水素ガスの高度生産化や DNA マイクロアレイにより水素生産向上の究明にも取り組み、さらなる研究の進展に繋がる有用な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：It would be certainly required to develop a new energy-supplying system such as hydrogen energy in place of petroleum energy. This study attempted to enhance bacterial hydrogen production as much as possible by genetic engineering which allows to activate a metabolic pathway and to enhance the enzyme catalytic function related to hydrogen production. In addition, some interesting results obtained by random DNA mutation approach and DNA microarray approach would hold great promise for further improving bacterial hydrogen production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,330,000	699,000	3,029,000

研究分野：環境バイオテクノロジー

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

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

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 学術的背景

原油枯渇の危機の話題が日々話題となる中、石油代替エネルギーの創成技術に関する

研究は盛んに行われるようになってきた。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。そのため、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。また、水素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価値があり、水素ガスの生成に関する研究の社会的な貢献度は高い。

## （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的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。研究代表者は、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点、②DNA マイクロアレイ技術が発達している点や③DNA 組換えなどの遺伝子工学技術が進展している点などが挙げられる。さらに、大腸菌は、FHL (Formate Hydrogen Lyase) 複合体がギ酸を触媒する反応過程で水素ガスを生産することができる。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、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

### （１）これまでの成果

研究代表者は、大腸菌 KE10 変異株ライブラリー、選択マーカー欠失システム (KE10 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。

### （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）を駆使して、さらに高度に水素ガスを生産できる菌株の作製、および高度生産化に有効な知見を取得することを目的とした。本研究により、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

本研究では、代謝改変技術（微生物の持つ遺伝子の欠失などを行い、水素高度生産化を図る）、遺伝子改変技術（水素生産に関与する酵素の触媒機能を活性化することで水素高度生産化を狙う）により大腸菌の水素高度生産化を図った。本研究で使用した基本的な実験操作は、研究代表者の従来の公表論文と同様な手法を用いた。具体的な研究方法は以下に示した通りである。

### （１）水素ガス生産に関わったタンパク質の機能改変

本研究では、変異性ポリメラーゼ連鎖反応により、水素生成に関わる遺伝子の塩基配列を改変させて、その触媒機能の向上化を図っ

た。ここでは、水素生成酵素の活性部位である HycE、水素生成に必須なプロトン (H<sup>+</sup>) と電子イオン (e<sup>-</sup>) の発生に関与する FdhF、水素生成遺伝子群の転写活性の活性化に関わる FhlA をターゲット遺伝子として、遺伝子改変を行い、水素ガス生産の触媒機能が向上しているタンパク質変異体の探索を行った。探索方法は、最近米国で開発された水素センサ膜を使用した。そのセンサ膜は、水素ガスを補足すると青色を呈することにより水素を検知するため、その色の濃淡によりコロニーから発生する水素量を評価した。得たクローンに対しては、ガスクロマトグラフ分析により水素ガス発生量を測定した。また、HycE 変異体に対しては、部位特異的遺伝子変異手法を用いて水素ガスの向上に重要と考えられた変異したアミノ酸を組み合わせて、さらに水素生産活性が高まる変異体の作製にも取り組んだ。

#### (2) マイクロアレイ解析

水素生産活性が向上した HycE および FhlA の変異体に対して、識別式遺伝子発現解析 (マイクロアレイ) を行い、水素ガス生産効率が向上したときに、どのような遺伝子の発現が誘導されるのか、また抑制されるのかの解析を行い、水素高度生産化の原因究明に取り組んだ。

#### (3) 標的遺伝子欠失による水素高度生産化

さらに大腸菌の水素生成能の向上化を図るため、*dgsA*、*crp* や *cya* 遺伝子などをそれぞれ欠失させて、どの遺伝子の欠失が水素高度生産化に有用であるかを追究した。*dgsA* 遺伝子は、細胞内への糖の輸送に関わる *pts* 遺伝子の発現を抑制するといわれており、この遺伝子の欠失により糖が細胞内に多く取り込まれ、代謝活性が増加することで水素ガスの高度生産化が期待できる。次に、大腸菌はピルビン酸から糖を生合成する経路を持っているが、*crp* と *cya* 遺伝子の破壊はその経路を遮断する。したがって、これらの遺伝子の破壊により、ピルビン酸は効率良くギ酸へと変換されるので、水素の高度生産が期待できる。遺伝子の欠失は、前述のように、大腸菌 KEIO ライブラリーを用いて行った。

#### (4) ランダム遺伝子変異の導入および水素ガス高度生産変異株の探索

Epicenter EZ::TN™ Transposome™ Kit (トランスポゾンキット) により、これまでに作製していた水素高度生産菌株にトランスポゾンを導入し、さらに水素ガスの生産が向上した変異株を探索した。探索方法は、上述した方法と同様な手法を用いた。得たクローンに対しては、水素ガス発生量を試験した。

## 4. 研究成果

本科学研究費補助金による支援を受けて、平成 20 年度には、水素ガスを高度生産するため、主に HycE や FhlA タンパク質の機能改変およびマイクロアレイ解析を行った。また、平成 21 年度においては、主にランダム遺伝子変異導入による高度水素生産化に関して研究を進めた。具体的な研究成果は以下のとおりである。

### (1) 水素生産複合体ラージサブユニット HycE のタンパク質改変

変異性 PCR 法を用いて、HycE の遺伝子に対してランダムに塩基変化を引き起こし、その中から水素ガスの生産活性が野生型の HycE よりも向上した変異体の探索を行った。約 4,000 クローンをテストしたところ、4 株の顕著に水素ガス生産性が向上した変異体を得られた。特に変異体 epHycE95 は、野生型の HycE よりも 20 倍の触媒機能の向上が見られた (図 1)。これらの変異体におけるアミ

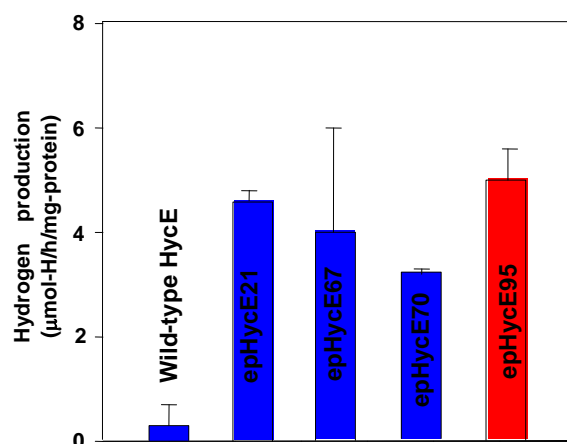


図 1. 変異性 PCR 法により触媒活性が向上した HycE 変異体の水素生産性

表 1. HycE 変異体におけるアミノ酸変化

HycE variants	HycE aa changes
epHycE21	Q32R, V112L, G245C, F409L
epHycE67	S2P, E4G, M314V, T366S, V394D, S397C
epHycE70	D202V, K492*
epHycE95	S2T, Y50F, I171T, A291V, T366S, V433L, M444I, L523Q

\*: 変異導入により終止コドンに変化

ノ酸変化は、表 1 に示した通りである。epHycE67 および epHycE95 において共通にアミノ酸が変化している第 2 番目および第 366 番目のコドンが、水素ガスの生産向上に重要

であると考え、これらの部位に対して、飽和変異を導入（全てのアミノ酸に置き換え、その中から活性が向上するものを見つける方法）したところ、第2番目のコドンに対しては、水素ガスの生産活性が向上するものは得られなかったが、第366番目に対しては epHycE95 変異体よりも水素生産性が向上した変異体が4株見つかった。これらの4株においては、全てそのコドン部分が終止コドンに変化した変異体であり、その水素生産活性は、野生型 HycE よりも30倍高かった。この得られた HycE 変異体 (satHycE12T366) に対して、さらに表1中のアミノ酸変異をそれぞれ組み入れ、水素ガス生産性を追究したところ、Q32R および Y50N のアミノ酸変異は、satHycE12T366 よりも20%の水素生産活性の向上をもたらした。また、M314N 変異も10%の改善効果があった。

### (2) 水素生産の転写活性化タンパク質 Fh1A のタンパク質改変

上述の取組みと同様に、水素ガス生産に関与した遺伝子の転写調節タンパク質である Fh1A のタンパク質の調節活性を変化させ、野生型 Fh1A よりも水素ガス生産性を高めることができる変異体の作製に取り組んだ。2,200 クローンを試験したところ、1株のみ野生型の Fh1A よりも9倍の水素生産性を示した変異体が得られた。この Fh1A133 変異体のアミノ酸変化は、Q11H, L14V, Y177F, K245R, M288K, I342F であり、その他いくつかの変異体も探索した結果、アミノ酸変化が Fh1A の C 末端側よりも N 末端側に集約していることが明らかとなった。また、得られた Fh1A 変異体は、野生型 Fh1A とは異なり、ギ酸に対する感受性が低くなっていることを明らかにした。

### (3) HycE 変異体および Fh1A 変異体における識別式遺伝子発現解析

水素ガスの生産性向上のメカニズムの解明のため、HycE および Fh1A の変異体、およびその野生型に対して識別式遺伝子発現解析（マイクロアレイ解析）を行った。HycE においては、顕著に水素ガスの消費活性に関わる Hydrogenase 1 の遺伝子群などの発現が高まることが明らかとなった。この遺伝子群欠失株による水素ガス生産性は顕著な差がなく、HycE 自身の触媒活性が向上し、水素生産活性が高まったものと考えられる。次に、Fh1A 変異体においては、Fh1A が転写活性を調節している水素生産に関与している *fdhF* 遺伝子、*hyp* 遺伝子群、*hyc* 遺伝子群などの転写活性が2倍増加しており、これが水素ガス生産の向上化に関わっているものと考えられる。一方で、これらの2つのマイクロアレイのデータを解析したところ、表2に示し

た遺伝子は、高度水素生産において共通に遺伝子発現が向上しており、これらの遺伝子が水素ガスの高度生産化に有効であるかを追究していく必要がある。

表2. 識別式遺伝子発現解析により共通に遺伝子発現が増加した遺伝子

Gene name	Microarrays	
	Fh1A	HycE
<i>grxA</i>	2.8-fold	8-fold
<i>trxC</i>	1.7-fold	6.1-fold
<i>ahpF</i>	2.8-fold	3.5-fold
<i>oxyS</i>	1.9-fold	6.5-fold

(4) 標的遺伝子変異株による水素ガス生産 *cyaA*, *crp*, *dgsA*, *cyaY*, *rpe*, *rnf*, *ptaA* 遺伝子の水素ガス生産への影響を追究したところ、*cyaY*, *rpe*, および *rnf* 遺伝子変異においては20~40%の水素生産性が向上することがわかった。一方、その他の遺伝子変異および PtaA 遺伝子発現においては、顕著な水素ガスの生産向上が見られなかった。

### (5) ランダム遺伝子変異導入による水素ガスの高度生産化

予想もしない遺伝子の欠失が、水素ガスの高度生産に有用である可能性を考え、酵素度水素生産菌株およびその親株に、トランスポゾンランダム変異を誘発し、水素生成能が向上している変異株を探索した。現在までのところ、高度水素生産菌株に対しては460クローンを調べたところ、水素生産性が向上した変異株は出現しなかった。逆に3株の水素生産性が低下したクローンが得られ、現在解析を行っている。一方、同様に親株に対しても1,000クローンを試験したところ、水素生産性が向上したクローンが1株得られた。現在、これらのトランスポゾン変異株のトランスポゾン挿入位置周辺のDNA塩基配列をシーケンスすることにより、どの遺伝子に変異が導入されたのかを解析している。今までのところ、水素生産性が低下した1株、および向上した1株の菌株に対して遺伝子変異部位を特定したところ、前者は *dipZ* 遺伝子、後者は *malT* 遺伝子であることが明らかになった。これらの遺伝子変異の水素生産における効果を試験したところ、高度水素生産菌株 (*hyaB hybC hycA fdoG*) に対してさらに *dipZ* 遺伝子変異を導入した5重変異株では水素生産性が3倍低下した。一方、親株と *malT* 遺伝子変異株の比較においては、*malT* 遺伝子変異株は3.4倍高い水素生産性を示した (図2)。さらに、*dipZ* 遺伝子変異は、水素ガスの生産が低下したため、この遺伝子発現株を作製して、水素ガス生産が向上するか追究した。その結果、DipZ 発現株においては、対照

菌株よりも 80%水素生産性が増加した。

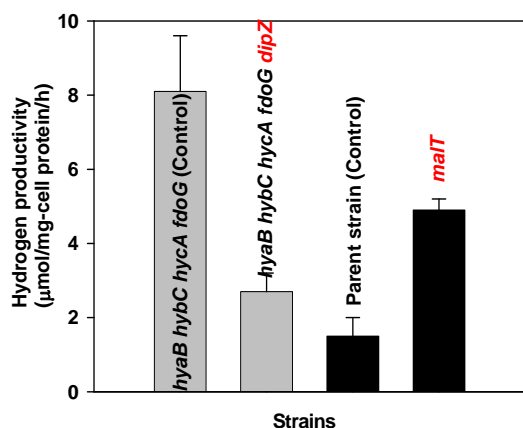


図2. トランスポゾン変異によって同定された遺伝子の水素生産性の影響

これらの結果は、さらに水素生産化に有効な遺伝子が存在することを意味しており、さらに研究を進めていく必要がある。

#### 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12件)

- ① 前田憲成、尾川博昭、大腸菌の代謝改変およびタンパク質改変による水素ガスの高度生産化、Journal of Environmental Biotechnology、査読有、Vol. 9、No. 2、2009、pp. 69-74
- ② SANCHEZ-TORRES V.、MAEDA T.、WOOD T.、Protein engineering of the transcriptional activator FhlA to enhance *Escherichia coli* hydrogen production, Applied and Environmental Microbiology、査読有、Vol. 75、No. 17、2009、pp. 5639-5646
- ③ Maeda T.、Wood T. K.、Formate detection by potassium permanganate for enhanced hydrogen production in *Escherichia coli*, International Journal of Hydrogen Energy、査読有、Vol. 33、No. 9、2008、pp. 2409-2412
- ④ Maeda T.、Sanchez-Torres V.、Wood T. K.、Wood、Protein engineering of hydrogenase 3 to enhance hydrogen production, Applied Microbiology and Biotechnology、査読有、Vol. 79、No. 1、77-86、2008.
- ⑤ Vardar-Schara G.、Maeda T.、Wood T. K.、Metabolically-engineered bacteria for producing hydrogen via

fermentation, Microbial Biotechnology、査読有、Vol. 1、No. 2、2008、pp. 107-125

- ⑥ Maeda T.、Sanchez-Torres V.、Wood T. K.、Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production, Microbial Biotechnology、査読有、Vol. 1、No. 1、2008、pp. 33-39

[学会発表] (計18件)

- ① MAEDA T.、Metabolic Engineering to Enhance Bioenergy Production, The 9th International Symposium on Clean Technology and Green Energy、2009年11月13日、Yeungnam University、Gyeongbuk、Korea
- ② 前田憲成、大腸菌の代謝改変およびタンパク質改変による水素ガスの高度生産化、第37回シンポジウム「バイオエネルギー生産の最前線」、環境バイオテクノロジー学会、2009年6月24日、東京大学
- ③ 前田憲成、尾川博昭、Wood T. K.、Protein Engineering of Hydrogenase 3 to Enhance Hydrogen Production、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学大会合同大会BMB2008、2008年12月12日、神戸ポートアイランド
- ④ 前田憲成、尾川博昭、Wood Thomas K.、シアノバクテリアの水素生成酵素による大腸菌の水素消費活性の阻害、第60回日本生物工学会大会、2008年8月27日、東北学院大学

[その他]

ホームページ等

<http://horyu.jimut.kyutech.ac.jp/kit/AnnualReport2010.nsf>

#### 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・助教

研究者番号：00470592

##### (2) 研究協力者

SANCHEZ-TORRES VIVIANA

テキサス A&M 大学・化学工学科・博士後期学生

WOOD THOMAS K

テキサス A&M 大学・化学工学科・教授

##### (3) 研究分担者

( )

研究者番号：

(4)連携研究者 ( )

研究者番号：