

# 研 究 報 告 書

## 「メタンを水酸化するバイオ電極触媒の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 藤 枝 伸 宇

### 1. 研究のねらい

近年、石油資源の枯渇が囁かれる中、代替資源としての天然ガス、特に多く含まれるメタンの化学工業原料やエネルギーへの直截的変換系の構築が急務である。しかしながら、メタンの C-H 結合は非常に安定で( $435 \text{ kJmol}^{-1}$ )、直截的な官能基化は高難度反応であるため、現状の触媒では 200 度といった高温や極度の酸性など熾烈な反応条件が必須である。また、エタンやプロパンなどの低級アルカンを含め天然ガスを化学原料として用いるには、効率的な触媒の開発が必要である。一方で、微生物の中には低級アルカンを炭素源かつエネルギー源として活用可能な種が存在する。これらの生物は総じて常温常圧など温和な条件下で、副産物を出さず、アルカンの C-H 結合を活性化する酵素群を持っていることが知られている。これらの酵素は前述の分子触媒・無機触媒と比較し、エネルギー的に圧倒的な優位性がある。特にメタン酸化性菌が保有する膜結合型メタンモノオキシゲナーゼと可溶性メタンモノオキシゲナーゼはメタンに対して活性が高いとされる。しかしながら、メタン酸化性菌は一般的に工業利用される菌種に比べて生育が圧倒的に遅く、加えて、生育の早い宿主における異種発現系も構築されていない。こういった背景の下、本研究ではこれら酵素群の中から、可溶性メタンモノオキシゲナーゼに着目して、電気化学的還元との共役によって効率を向上したメタン水酸化バイオ電極触媒を開発することを目的とした。本触媒を達成するには、現在まで未解決であった 2 つの問題に対処する必要がある。一つ目は可溶性メタンモノオキシゲナーゼ系に含まれる 5 から 9 つのコンポーネントからメタン水酸化の機能に必要なタンパク質を探索し、まとめて工業利用可能な菌種(大腸菌等)内に発現させること、そして二つ目は反応推進に必要な高価な NADH の代わりとなる穏やかな還元剤供給法の確立が必要不可欠である。本研究ではタンパク質工学と電気化学的手法を組合せ、これら二つの問題を解決することを目標とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

天然に存在する水酸化酵素群は多岐にわたるが、メタンに対して活性を示すものは可溶性メタンモノオキシゲナーゼと膜結合型メタンモノオキシゲナーゼしか発見できておらず、これら以外の酵素群とは明確な差があると考えられる。結果として本研究対象は可溶性メタンモノオキシゲナーゼと膜結合型メタンモノオキシゲナーゼに絞られるが、これらは未だに異種宿主での発現が一つも報告されていない。本研究では対象を可溶性メタンモノオキシゲナーゼに絞り、大腸菌での発現に取組んだ。まず、結晶構造が決定されている *Methylosinus trichosporium* 由来の $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列を用いて NCBI/EMBL データベースを用いて相同性検索・遺伝子解析を行ったところ、可溶性メタンモノオキシゲナーゼファミリーは

遺伝子レベルで大きく2つのグループに分かれる(type I, type II(*M. trichosporium*が含まれる))ことが分かった(図 1)。また、それぞれのグループでは遺伝子がゲノム上で集まったオペロンの構成が異なるものの、タンパク質の構造を調節する役割を持つとされるシャペロニンをコードする遺伝子が存在することがわかった(図 1, G)。そこで、まず、大腸菌での発現に適したこの遺伝子を探索するため、様々な微生物種からこのシャペロニンをコードする遺伝子を選抜し(type I, 12 種; type II, 24 種)、スクリーニングを行った。その結果、type I ではグラム陽性菌や放線菌由来のもので可溶性での発現が確認され、type II ではプロテオバクテリアの一種から可溶性に発現が見られた。そこでこれらシャペロニンを精製し、生化学的な特性評価を行った。一方で、このシャペロニンとモノオキシゲナーゼ遺伝子を共発現することで組換え大腸菌がプロパンなどの低級アルカンに対して水酸化活性を示すことが明らかとなった。実際に、この大腸菌からモノオキシゲナーゼ分子を精製することにも成功した。さらに、 $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子に加えて、水酸化活性に必要な調節タンパク質と NADH 還元酵素、残りの未知遺伝子を用いて組換え実験を行った。

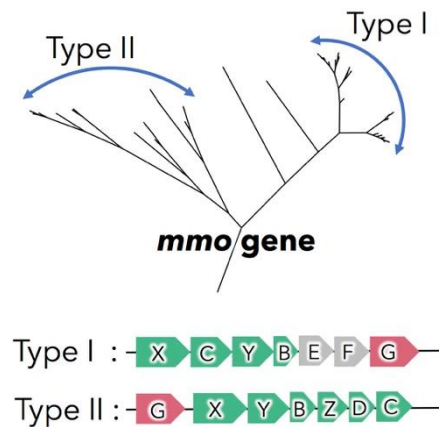


図 1. 遺伝子解析の結果とそれぞれの代表的オペロン構造

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「大腸菌でのモノオキシゲナーゼ特異的シャペロニン発現系の確立」

データベース解析(相同遺伝子検索と系統樹解析)によって、MMO 様タンパク質群におけるオペロン(関連の遺伝子が並んだ遺伝子クラスター)の構造には大きく分けて二種類あることが分かった。また、それぞれのグループにはシャペロニン様の遺伝子が見られ、必須のコンポーネントであることを示唆していた。そこで type I からは 12 種、type II(*M. trichosporium* を含む)からは 24 種のシャペロニン様タンパク質をコードする遺伝子をコドン最適化後、合成し、T7 プロモーターを持つプラスミドにクローニング後、発現確認を行った。結果として、type I ではグラム陽性菌や硫黄細菌など、type II では土壌細菌の一種から細胞抽出液中において可溶性画分への発現が見られた。分子レベルでの特性評価を行うため、これらのシャペロニン様タンパク質発現系・精製方法の最適化を進めた。金属アフィニティークロマトグラフィー用のヒスタグを C 末端に付与し、精製を進めた。アフィニティークロマトグラフィーを行い、第二段階として陰イオン交換クロマトグラフィーで最終精製を行ったところ、SDS-PAGE でほぼバンドが一つになり、均一の状態に単離することに成功した。ブルーネイティブ PAGE で解

析したところ、それぞれ 12-14 量体を水溶液中で形成していることが分かった。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーでも同様の結果が得られた(図 2A)。また、AFM で構造確認を行ったところ、直径約 15 nm の円柱状の構造をしていることが明らかとなった(図 2B)。現在までに最も研究されている大腸菌由来のシャペロニンタンパク質は 14 量体のシリンダー構造を形成していることが分かっており、今回単離したシャペロニン様タンパク質は四次構造レベルで大腸菌由来のものと構造が類似しており、分子シャペロンとしての機能があることが示唆された。

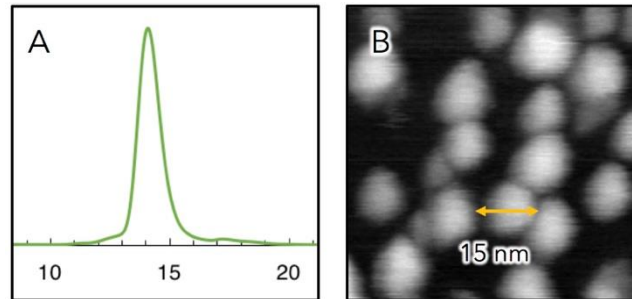


図 2. 単離されたシャペロニンホモログの特性評価  
A, ゲルろ過クロマトグラム(検出は  $A_{280}$ ); B, AFM 像

#### 研究テーマ B「水酸化活性の向上を目指したモノオキシゲナーゼ分子の特性評価」

立体構造に基づいた変異導入によるさらなるアルカン水酸化能の向上に向け、モノオキシゲナーゼ分子の特性評価を行った。水酸化活性を示すにはモノオキシゲナーゼの $\alpha$ ,  $\beta$ , ( $\gamma$ ) サブユニットだけでなく、調節タンパク質と NADH 還元酵素が必要とされている。そこでこれらの補助タンパク質および未知遺伝子から産出されるタンパク質についても単離・精製を行い、生化学的な特性評価を行った。テーマ A でシャペロニンの構造が確認できた硫黄酸化細菌由来のモノオキシゲナーゼ複合体の単離・精製を行った。モノオキシゲナーゼをコードする遺伝子をコドン最適化後、合成し、T7 プロモーターを持つプラスミドにクローニングした。テーマ A で最適化した発現条件により、シャペロニンを共発現させ、ヒスチジンタグを用いたアフィニティークロマトグラフィー、加えてさらに、イオン交換クロマトグラフィーを行い、によって、精製を行ったところ、 $\alpha$ サブユニットおよび $\beta$ サブユニット複合体を単離することに成功した(図 3)。シャペロニンを共発現させない大腸菌を用いて、同様に精製を行ったところ、複合体がみられなかったことから、やはり、可溶性に発現するにはシャペロニンが必要であることが分かった。最終的に、アフィニティークロマトグラフィーに加えてさらに、イオン交換クロマトグラフィーを行い、高度に精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーにより、分子量約 11 万であり、ICP 発光分析により、タンパク質一分子に対し、鉄が 4 当量、また、亜鉛が 4 当量含まれていることがわかった。

一方、調節タンパク質(B)、NADH 還元酵素(R)、未知遺伝子 orfX と orfY の発現精製も行った。未知遺伝子は遺伝子解析により、それぞれ鉄・硫黄クラスター形成補助タンパク質、金属加水分解酵素のホモログであることが分かった。まず、これら 4 種のタンパク質をコードする遺伝子をコドン最適化後、合成し、T7 プロモーターを持つプラスミドにクローニングした。大腸菌で発現後、タンパク質を単離し、特性評価を行った。最終的にこれら 4 種について SDS-PAGE 上で単一の状態まで精製されていることを確認した。NADH 還元酵素(R)におい

て、鉄・硫黄クラスターおよびフラビン補酵素を有していることが確認された。また、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いることにより、それぞれのタンパク質についてのサブユニット構造を得た。

#### 研究テーマ C「コンポーネントシャッフリングによるモノオキシゲナーゼ系の創出」

まず、アルコールやアルデヒド類を GC 上で同時定量するため、パルス放電選択性光イオン化検出器(PDPID, Valco)を用いた。条件を最適化し、水を大量に含むサンプルでも、水のシグナルを低減させて、メタノールやホルムアルデヒド、ギ酸を一度のクロマト解析で定量できることが分かった。大腸菌細胞に水酸化活性を発揮させる第一段階として、硫黄酸化細菌由来の一連の遺伝子、モノオキシゲナーゼ、調節タンパク質(B)、NADH 還元酵素(R)を一つの大腸菌に導入し、発現確認を行い、モノオキシゲナーゼはやはりシャペロニン様タンパク質を共発現させた場合にのみ可溶性に発現が見られた。そこで、これらの遺伝子を発現させた細胞を用いて低級アルカンの水酸化反応を行なった。プロパンと酸素 1:1 の混合ガス 0.1Mpa 存在下で反応を行った。犠牲還元剤としてはグルコース 40 mM を添加した。GC で検出したところ、シャペロニン様タンパク質を共発現させた場合にのみ、1-プロパノールが検出された。この結果より、硫黄酸化細菌由来のメタンモノオキシゲナーゼホモログはアルカン水酸化活性を示すことが示唆された。また、未知遺伝子の鉄・硫黄クラスター形成補助タンパク質、および金属加水分解酵素のホモログは共発現させても活性に影響がなかった。これは間接的ではあるものの、シャペロニン様タンパク質が分子シャペロンとして機能したこと、これら二種の未知タンパク質、鉄・硫黄クラスター形成補助タンパク質、および金属加水分解酵素のホモログはモノオキシゲナーゼ分子の成熟には関連がないことを示唆している。また、放線菌由来のものでも 1-プロパノールが検出され、さらに 2-プロパノールおよびアセトンが検出された。アセトンはプロパンが水酸化された 2-プロパノールが大腸菌由来のアルコール脱水素酵素で酸化されたと推測した。このように、それぞれ、アルカンに対し、末端、内部選択性が現れた。そこで、さらなる活性向上および活性改質を目的に硫黄酸化細菌と放線菌の遺伝子を用いて、コンポーネントシャッフリングに取り組んだ。その結果、異種間での組み合わせに対し、総活性だけでなく、1-プロパノールと 2-プロパノールの検出量が変化した。すなわち、コンポーネントの組み合わせを変えることによって反応の選択性を変化させることに成功した。また、同様の系でベンゼンとの反応を検討したところ、フェノールが検出され、ベンゼンの水酸化にも成功した。

### 3. 今後の展開

本研究では困難な C-H 結合の直接的水酸化に細胞触媒を用いることで成功した。また、遺伝子のシャッフリングによりその選択性や活性を変化させることに成功した。モノオキシゲナーゼ分子本体を異種発現系から単離することに成功したため、これを利用した詳細な機構解明など、種々の展開が期待できる。また、今後はこれらの細胞触媒を基本に、さらなる活性の向上を目指す。別の遺伝子とのシャッフリングや構造に基づく部位変異的導入によってモノオキシゲナーゼ分子の活性向上や、調節タンパク質(B)、NADH 還元酵素(R)も対象にモノオキシゲナーゼ系全体の活性向上に取り組んでいく。電気化学系の電極材料や固定化材等の最適化により系の一体化を行いコンパクトなデバイス作製にも挑戦したい。、さらには別の細胞触媒と



のハイブリッド可により、天然ガスと別のバイオマスを同時に変換し、物質生産する系に展開したい。

#### 4. 自己評価

当初設定した2つの要素技術の内、メタンを水酸化する細胞触媒の構築は非常に困難なC-H結合を水酸化するところまで達成できたと考えている。加えて、現在までシャペロニンホモログの機能がシャペロニンもしくは遺伝子調節タンパク質であるのか、ここ20年来の謎とされていた。本研究で得られた分子論的な構造情報はこのタンパク質が特異的シャペロニンとして機能することの決め手となるものであり、その学術的意味は大きい。また、新規なアルカンモノオキシゲナーゼ分子を異種発現・単離することに成功し、その特性評価から得られる情報は、バイオ触媒としての利用範囲を更に広げるものと期待している。一方の電気化学的手法は現在も試行錯誤中であり、より一層の取り組みが必要である。

その研究の進め方に関してはラボ移転があったものの、研究費の執行状況はほぼ予定通りで、研究の実施体制はむしろ研究協力者が増えて進捗は良好であったと考えている。また、その中で、領域内外も含めた議論を通して、多様な考え方・手法を身に付け、自身の視野を広げることができた。本研究にて得られた成果のいくつかは論文準備中であり、速やかに発表できるように取り組むとともに、残りの課題についても積極的に挑戦していきたい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1.
2.
3.
4.
5.

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

###### 学会発表

- 井上千裕、安部欣高、藤枝伸宇、「メタンモノオキシゲナーゼホモログ発現に関連するGroEL様タンパク質の単離と特性評価」、日本農芸化学会2018年度大会、名城大学天白キャンパス、2018年3月、口頭発表
- 安部欣高、井上千裕、藤枝伸宇、「可溶性メタンモノオキシゲナーゼホモログの異種発現系の構築」、日本農芸化学会2018年度大会、名城大学天白キャンパス、2018年3月、口頭発表
- 安部欣高、井上千裕、山之内渉、永山友紀、藤枝伸宇、「低級アルカンモノオキシゲナ

一ゼ単離と特性評価」、日本農芸化学会 2019 年度大会、東京農業大学世田谷キャンパス 2019 年 3 月、口頭発表

4. 山之内渉、永山友紀、安部欣高、井上千裕、藤枝伸宇、「低級アルカンモノオキシゲナーゼに関わる補助タンパク質の単離と特性評価」、日本農芸化学会 2019 年度大会、東京農業大学世田谷キャンパス 2019 年 3 月、口頭発表
5. 安部欣高、井上千裕、山之内渉、藤枝伸宇、「低級アルカン水酸化酵素の単離と特性評価」、第 13 回バイオ関連化学シンポジウム、東北大学青葉山東キャンパス、2019 年 9 月、ポスター発表

#### 受賞

1. 藤枝伸宇、平成 30 年度 大阪府立大学優秀教職員表彰、2018 年 8 月 10 日
2. 藤枝伸宇、第 33 回若い世代の特別講演証、「タンパク質を機能性配位子とする非対称反応場の開発」、2019 年 3 月 18 日
3. 藤枝伸宇、日本農芸化学奨励賞、「特異な翻訳後修飾アミノ酸を有する金属酵素の機能解析および新規創製」、2019 年 3 月 25 日
4. 藤枝伸宇、平成 31 年度 長瀬研究振興賞、「立体異性体の作り分けを実現するタンパク質配位子ライブラリーの開発」、2019 年 4 月 25 日
5. 藤枝伸宇、2019 年度大阪府立大学学長顕彰、2019 年 8 月 09 日

#### 著作物、プレスリリース

特になし。