

嫌氣的CO₂固定化のための金属酵素群を発現させた大腸菌細胞触媒の開発

藤城 貴史

埼玉大学大学院 理工学研究科

研究成果

嫌氣的 CO₂ 代謝系を担う金属酵素と、その補因子である鉄硫黄クラスター生合成酵素群をコードする遺伝子が大腸菌細胞内に種々の組み合わせで導入した大腸菌形質転換体を作製し、好氣的培養においては、作製した形質転換体は、野生株とで同程度に生育可能であり、一般的により生育が落ちる嫌氣培養条件でも使えることを確認した。引き続き、嫌氣培養の系でも、それらの生育と、CO₂ の代謝が可能であるかどうかを検討していく。

研究の目的

CO₂ は、温室効果ガス削減、また低炭素社会に向けた炭素資源再利用の観点から、大気中 CO₂ を固定化し炭素資源として再利用する触媒系が注目されている。その中でも、大腸菌などのモデル生物を宿主とし、種々の遺伝子を導入することで代謝系を改変、細胞触媒とする「合成生物学」の手法を用いた細胞触媒の構築が盛んである。細胞触媒系は、温和な環境かつ高効率で働く酵素を利用する上で、(1) 細胞内環境により、*in vitro* 系で不安定な酵素分子も安定に利用できる、(2) 補因子などを細胞の別の代謝系から供給できる、などの利点があり、注目を集める研究対象である。

本研究では、嫌氣性微生物の CO₂ 代謝系を担う金属酵素群、CO デヒドロゲナーゼ、アセチル CoA シンターゼ、ヒドロゲナーゼを大腸菌細胞内で同時に高発現させ、水素の還元力を利用して、CO₂ から CO、さらにアセチル CoA へと変換する細胞触媒系による人工嫌氣 CO₂ 固定化細胞触媒系の確立を目指している。まず初めの段階として、CO₂ と CO の変換を行う CO デヒドロゲナーゼと、水素とプロトン/電子の変換を行うヒドロゲナーゼの検討を行った。また、嫌氣系 CO₂ 固定系の酵素は鉄硫黄 (Fe-S) クラスター酵素であり、通常の大腸菌では活性体の調整が困難であるが、我々はこれまで Fe-S クラスター生合成遺伝子オペロン *isc* を高発現させ、Fe-S クラスター豊富な大腸菌を作り出すことに成功している。しかし、Fe-S クラスター遺伝子は他にも数種が存在し、生合成した Fe-S クラスターを渡す際の相性も問題となっている。そこで、CO デヒドロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼと共発現させるのに最適な Fe-S クラスター生合成系酵素群遺伝子の探索/検討も行なった。

方法

CO デヒドロゲナーゼは、細菌型と古細菌型の 2 種類に大別されることが知られて

いる¹⁾。そこで、COデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子として、細菌型 *Desulfovibrio vulgaris* 由来の *cooS* 遺伝子と、古細菌型 *Methanosarcina barkeri* 由来の遺伝子 *cooS ϵ* 遺伝子を、それぞれ大腸菌発現用ベクターにクローニングした pACYC-*cooS*、pCDF-*cooS ϵ* を作製した。ヒドロゲナーゼ遺伝子としては²⁾、大腸菌に元々存在する [NiFe]-ヒドロゲナーゼをコードする *hyaABCDEF* operon の触媒部位遺伝子 *hyaAB* と、大腸菌が持たない別種の [FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子である、*Clostridium pasteurianum* 由来 *hyaA* をそれぞれクローニングし、pRSF-*hyaAB*、pET21d-*hyaA* ベクターを作製した。また HydA の成熟化遺伝子 *hydE*、*hydF*、*hydG* もそれぞれ pACYC-*hydE-hydF*、pRSF-*hydG* ベクターとしてクローン化した。作製したプラスミドを大腸菌に導入し、CooS+HyaAB 系、CooS ϵ +HyaAB、CooS ϵ +HydAEFG 系を作製した。また、CooS ϵ と HydAB は、それぞれの酵素の立体構造上、融合タンパク質とすることで効率よく電子伝達、触媒が進行する可能性が考えられたため、融合タンパク質 CooS ϵ -fusion-HyaAB を発現する系を有する大腸菌も作製した。

一方、Fe-S クラスター遺伝子としては、これまで報告された *isc* operon を含む pRK-*isc* に加え³⁾、コピー数や耐性遺伝子が異なる pBBR5-*isc* ベクターを作製し、その Fe-S クラスター供給について検討した。また *isc* 以外の Fe-S クラスター生合成系遺伝子である大腸菌由来の *suf* operon、枯草菌由来の *suf-like* operon の pRK ベクター、pBBR5 ベクターへのクローニングも試みた。

結果

作製したプラスミドをそれぞれ個別に大腸菌 C41(DE3)に導入し、IPTG による発現誘導を行ったのち、その細胞抽出液を SDS-PAGE で確認した結果、全ての場合において目的タンパク質の発現が見られた。ただし、その発現量は異なり、*D. vulgaris* CooS と、HydA、HydE、HydF、HydG は発現量が多く、一方、*M. barkeri* CooS ϵ 、HyaAB、融合タンパク質 CooS ϵ -fusion-HyaAB は発現量が低いことがわかった。一方、Fe-S クラスター生合成系遺伝子のスクリーニングでは、従来用いられてきた *isc* operon を持つ pRK-*isc* ベクターを用いた場合に比べ、pBBR5-*isc* ベクターの方が、より Fe-S クラスターを大腸菌内で合成していることが、大腸菌の Fe-S クラスター由来の呈色(褐色変化)により示された。また *suf* を持つ pRK、pBBR5 ベクター、pRK-*suf-like* ベクターを用いた場合、大腸菌の色は、pBBR5-*isc* より薄いことが示された。一方、pBBR5-*suf-like* ベクター構築が成功しておらず、現在も条件検討中である。ただし、*suf-like* オペロンを構成する各遺伝子を個別にクローニングでき、またそのタンパク質発現や、その遺伝子産物であるタンパク質の生化学的解析が可能であることを確認している⁴⁾。よって、今後はオペロンを構成する各遺伝子を個別に PCR で増幅し、*in vitro* でアッセンブルすることでクローニング行ったのち、その大腸菌内での Fe-S クラスター生合成能を pBBR5-*isc* ベクターの場合と比較し、用いる Fe-S クラスター生合成系の検討を進める予定である。次に、それらのプラスミドを、Fe-S クラスター

一遺伝子を含むベクターpBBR5-*isc* で形質転換した C41(DE3)に段階的に導入して、CooS+HyaAB 系、CooS $\Delta\epsilon$ +HyaAB 系、CooS $\Delta\epsilon$ +HydAEFG 系、CooS $\Delta\epsilon$ -fusion-HyaAB 系を作製し、1mM IPTG 存在下、37 °C、LB 培地で好氣的培養を行なった。その結果、どの系の大腸菌も、遺伝子を持つプラスミドを導入していない pBBR5-*isc* 導入 C41(DE3)大腸菌と同程度に生育可能であることを確認した。

結論

CO デヒドロゲナーゼとして、*cooS*、*cooS $\Delta\epsilon$* 遺伝子、ヒドロゲナーゼとして *hya* 系、*hyd* 系遺伝子、また HyaAB と CooS 両者の融合タンパク質をコードする融合遺伝子を導入した大腸菌の作製に成功した。また、同時に用いる Fe-S クラスター生合成系は pBBR5-*isc* が現在のところ最適であることがわかった。今後は、これら形質転換した大腸菌の M9 最小培地+グルコースの系で嫌気培養条件、例えば、炭酸源や二酸化炭素、水素やギ酸などの添加物の検討を行い、どの条件で水素-二酸化炭素の変換が起こるか、またその際の生育や代謝物解析などを検討していく予定である。また、Fe-S クラスター生合成遺伝子の検討では、*suf-like* オペロンを Gibson assembly などの方法で構築し、クローニングする予定である。また、生成する代謝中間体 CO を無害化しつつ、acetyl-CoA へと変換する acetyl-CoA synthase の遺伝子導入も検討し、CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase を利用する嫌気性微生物と同様のエネルギー獲得系を大腸菌内で構築する予定である。

文献

- 1) Adam, P. S., Borrel, G., Gribaldo, S., (2018) Evolutionary history of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, one of the oldest enzymatic complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**: E1166-E1173.
- 2) Vignais, P. M., Billoud, B., (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev.* **107**: 4206-4272.
- 3) M. Nakamura, Y. Takahashi, (1999) Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster. *J. Biochem.*, **126**: 10-18.
- 4) R. Nakamura, M. Hikita, S. Ogawa, Y. Takahashi, T. Fujishiro. (2019) Snapshots of PLP-substrate and PLP-product external aldimines as intermediates in two types of cysteine desulfurase enzymes. *FEBS J.*, accepted.