

二酸化炭素固定化触媒としてのギ酸デヒドロゲナーゼの高発現系構築と高機能化

所属： 立命館大学 生命科学部 応用化学科

助成対象者： 高木 一好

概要

Methylobacterium extorquens からタングステンを有するギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH1) とモリブデンを有するギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH2) を精製した。FDH1, FDH2 ともに NAD 依存性の酵素活性を示したが, 人工電子受容体であるフェナジンメトスルファートも電子受容体として機能した。

FDH1 の小サブユニット (Fdh1B) については, 大腸菌細胞を宿主とした異種発現系を用いた生産を行った。Fdh1B は, 精製直後は NADH デヒドロゲナーゼ活性を示したが, 本活性は急速に減少した。タンパク質の 2 量体化や補欠分子族の欠落が原因であると考えられる。

abstract

The tungsten-containing formate dehydrogenase (FDH1) and the molybdenum-containing counterpart (FDH2) were purified from *Methylobacterium extorquens* under oxic conditions. FDH1 and FDH2 were found to be a heterodimer and a heterotetramer, respectively. Both FDH1 and FDH2 showed NAD-dependent formate dehydrogenase activities, and also, phenazine methosulfate, an artificial electron acceptor, could replace NAD⁺.

The small subunit of FDH1 (Fdh1B) was heterologously expressed in *Escherichia coli* and then characterized. It possessed NADH dehydrogenase activity soon after the purification steps. However, this activity rapidly decreased probably due to the unexpected dimerization and the deletion of the prosthetic groups.

研究内容

「背景と目的」

二酸化炭素 (CO₂) の固定と資源化に関する技術開発は、現在、極めて重要な課題と考えられている。さまざまな反応系が提案される中で、CO₂/ギ酸の相互変換を触媒する酵素であるギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) を利用する方法が注目を集めている。

FDHとしては、主に大腸菌由来のものについて古くから研究が行われてきており、大腸菌が生産する3つの異なるFDHについては、酵素精製、酵素反応の特性評価、ならびに、X線結晶構造解析などが行われてきた¹⁻³⁾。しかしながら、大腸菌由来のFDHはO₂に対して極めて不安定であるという特徴を有し、FDHの応用を考えた場合は致命的な欠点となる。

我々は、バクテリア（細菌）におけるC1化合物（C-C結合を有さない化合物）の代謝反応を検討する中で、酵素の活性中心にモリブデン (Mo) あるいはタングステン (W) を有するFDHと出会い、諸特性の評価と応用について検討を行ってきた。

Methylobacterium extorquens はC1化合物資化性細菌（メチロトローフ細菌）として古くから知られ、典型的なメチロトローフ細菌として精力的な研究が展開されてきた。メタノールを唯一の炭素源とした場合のエネルギー獲得経路（異化経路）ならびにC1化合物を出発物質とした同化経路については、既に詳細な研究結果が報告されている⁴⁾。

一方、*M. extorquens* は通性メチロトローフ細菌であり、一般細菌培養用の豊富な炭素源・窒素源を含む培地でも良好に生育し、また、近年では、水道などに含まれる消毒剤としての塩素に対して耐性があるという特徴についても注目されている。

本研究では、*M. extorquens* が生産するFDHについて、その分子特性を明らかにするとともに、大腸菌細胞内での発現系を確立し、タンパク質工学的研究が展開できるよう、その基盤づくりを目指した。また、組み換えFDHを用いた生物電気化学的CO₂/ギ酸-変換系への考察を行うことを目的とした。

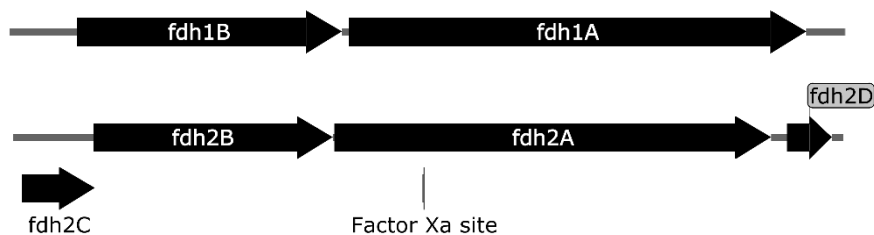
「結果」

(1) *Methylobacterium extorquens* が生産するギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) の確認

M. extorquens AM1株を、1%ペプトン、1%酵母エキス、0.5% NaClを含む培地で好氣的に培養したところ、既に諸特性が報告されているFDH1（活性中心にWを有する酵素）に加えて⁵⁾、遺伝子の存在が明らかにされているFDH2（活性中心にMoを有する酵素）を精製することが可能であった。*M. extorquens* のゲノムDNAについては、既に全配列が明ら

かにされており，FDH1，FDH2に加えて，さらに，FDH3，FDH4と，合計4種類の異なるFDHが存在することが示唆されているが⁶⁾，本研究において*M. extorquens* AM1株を用いた実験では，FDH3とFDH4の確認はできなかった．FDH3とFDH4については，培養条件など，さらにいくつかの検討が必要であると考えられる．

FDH1ならびにFDH2は，下の図に示すように遺伝子が確認されているが，細胞内でのタンパク質構成に関しても，それぞれ，ヘテロダイマーならびにヘテロテトラマーとして細胞内で機能していることが明らかとなった．精製酵素のタンパク質量をSDS-PAGEによって確認したところ，ゲノムDNA上にコードされている通りのアミノ酸配列であることが確認された．また，FDH1，FDH2ともに，活性中心に金属イオン（それぞれWならびにMo）とフラビンモノヌクレオチド（FMN），さらに数個のFe-Sクラスターを有する．金属イオンの確認はICP-MSを用いて，FMNの確認は酵素から抽出後HPLCで解析する方法を用いてそれぞれ行ったが，ポリペプチド1つあたりの数を正確に見積もることは困難であった．



今回，精製されたFDH1ならびにFDH2の酵素活性は，基質としてギ酸イオンを，電子受容体としてNAD⁺を用いた反応系で測定を行なった．また，NAD⁺の代わりに，電子受容体としてフェナジメトスルファート（PMS）を用い，最終的に2,6-ジクロロインドフェノール（DCIP）の還元反応にリンクさせた反応系でも良好な酵素触媒活性が観測された．

FDH2の未解決な特性として，pH 7.0のリン酸緩衝液中に保存すると一晩で活性を失うということが挙げられる．一方で，pH 6.0のリン酸緩衝液中で保存すると活性を安定に保つことができ，この点に気づくまで酵素精製は非常に難航した．

FDH1ならびにFDH2ともに，O₂に対しては極めて安定で，どちらともCO₂/ギ酸-変換系への応用が可能であると判断した．

(2) FDH1の各サブユニットの異種発現系の構築

*M. extorquens*が生産するFDHについて，まず，ヘテロダイマーとして発現して細胞内で

機能している FDH1 に注目した。FDH1 は大小 2 つのサブユニットから構成され、ゲノム DNA 上では、それぞれ *fdh1A* ならびに *fdh1B* として存在している。FDH1 の小サブユニットをコードする *fdh1B* については、クローニングを行い、宿主大腸菌細胞内での発現を試みた報告が既にあるため⁷⁾、本研究でも同様な方法を用いて Fdh1B の発現を計画した。

はじめに、*M. extorquens* のゲノム DNA を鋳型として、*fdh1A* ならびに *fdh1B* を含む DNA 断片を PCR 法を用いて増幅し、この DNA 断片を pET-22b(+) のマルチクローニングサイトへ挿入したコンストラクトを作製し、宿主大腸菌細胞内でのタンパク質高発現を試みた。また、*fdh1A* のみ、あるいは、*fdh1B* のみを含む DNA 断片を含むコンストラクトも同時に作製した。しかしながら、結果としては、上記の方法を用いた場合は、宿主大腸菌細胞内において有意なタンパク質発現が観られず、*M. extorquens* 独特のコドン使用頻度などが原因であると考えた。

そこで、*fdh1B* について、大腸菌のコドン使用頻度に最適化した人工遺伝子の合成を依頼し、この DNA 断片を pET-22b(+) のマルチクローニングサイトへ挿入したコンストラクトを作製した。本プラスミド DNA を用い、大腸菌 DL21(DE3) 株を形質転換し、IPTG 添加によって Fdh1B の発現を試みたところ有意なタンパク質発現が確認された。ただし、通常の培養温度 (37 °C) では、ほとんどが封入体へ移行していたため、菌株の検討、培養条件の検討を行った。その結果、大腸菌 KRX 株 (プロメガ社) を用い、0.1% ラムノース、0.1 mM IPTG 添加によりタンパク質発現を誘導し 25 °C で 24 時間培養することにより、目的タンパク質を宿主大腸菌細胞の可溶性画分に高発現させることに成功した。このようにして発現可能となった Fdh1B については、大腸菌細胞を超音波破碎機で破碎して無細胞抽出液を得て、アフィニティークロマトグラフィー (Ni Sepharose 6 Fast Flow カラム)、続いて、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200 Increase 10/300 GL カラム) を用いて精製し、SDS-PAGE を用いて純度とタンパク質質量の確認を行った。

(3) Fdh1B の特性評価

上記のようにして得られた Fdh1B は、活性中心に FMN と Fe-S クラスタを有し、構造的には NADH デヒドロゲナーゼに類似する。Fdh1B が NADH デヒドロゲナーゼ活性を有することは、NADH を電子供与体、DCIP を人工電子受容体とした酵素触媒反応系において確認した (ジアフォラーゼ活性の確認)。しかし、本酵素活性は Fdh1B の精製後、次第に減少し、4 °C で一晩保存後、酵素活性は精製直後の半分以下となった。この原因を確かめる

ため、保存後の Fdh1B についてゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行った。本タンパク質は単量体と 2 量体の混合物として存在していることが明らかとなった。さらに、単量体、2 量体それぞれの成分を分画し保存後、もう一度、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行ったところ、どちらも再び単量体と 2 量体の混合物になっており、同時に、補欠分子族である FMN のかなりが解離してしまっている状態であることが明らかとなった。

「今後」

本研究においては、当初の目的であった *M. extorquens* が生産する FDH の大腸菌細胞内での高効率な発現系の確立は達成できなかったと言える。タンパク質発現とタンパク質精製が可能であった Fdh1B に関しても、2 量体化や補欠分子族である FMN の脱落という問題が明らかとなり、本タンパク質を触媒として応用するには多くの課題がある。一方で、*M. extorquens* そのもの（野生株）からは、ある程度の量の FDH1 と FDH2 が精製可能であり、条件を検討することにより、より高効率に発現させ精製することが可能ではないかと考える。また、*M. extorquens* の細胞そのものを生体触媒として利用する例についても既に報告はあるが⁸⁾、FDH1 と FDH2 の発現調節メカニズムの解明と絡めて検討していく価値があると思われる。

「引用文献」

- 1) Sawers, G., The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*, *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**, 57–88 (1994)
- 2) Boyington, J. C., Gladyshev, V. N., Khangulov, S.V., Stadtman, T. C., Sun, P. D., Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster, *Science* **275**, 1305–1308 (1997)
- 3) Jormakka, M., Törnroth, S., Byrne, B., Iwata, S., Molecular Basis of Proton Motive Force Generation: Structure of Formate Dehydrogenase-N, *Science* **295**, 1863–1868 (2002)
- 4) Ochsner, A. M., Sonntag, F., Buchhaupt, M., Schrader, J., Vorholt, J. A., *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 517–534 (2015)
- 5) Laukel, M., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E., Vorholt, J. A., The tungsten-containing

formate dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1: purification and properties, *Eur. J. Biochem.* **270**, 325–333 (2003)

- 6) Chistoserdova, L., Crowther, G. J., Vorholt, J. A., Skovran, E., Portais, J. C., Lidstrom, M. E., Identification of a fourth formate dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 and confirmation of the essential role of formate oxidation in methylotrophy, *J. Bacteriol.* **189**, 9076–9081 (2007)
- 7) Choe, H., Lee, S., Hwang, H., Joo, J., C., Cho, D., H., Kim, Y., H., Expression of the NAD-dependent FDH1 β -subunit from *Methylobacterium extorquens* AM1 in *Escherichia coli* and its characterization, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **19**, 613–620 (2014)
- 8) Jang, J., Jeon, B. W., Kim, Y. H., Bioelectrochemical conversion of CO₂ to value added product formate using engineered *Methylobacterium extorquens*, *Sci. Rep.* **8**, 7211 (2018)

本助成に関わる成果物

[論文発表]

Xia, H., Sakai, K., Kitazumi, Y., Shirai, O., Takagi, K., Kano, K., Carbon-nanotube-caged microbial electrodes for bioelectrocatalysis, *Enzyme. Microb. Technol.* **117**, 41–44 (2018)

[口頭発表]

なし

[ポスター発表]

なし

[その他]

なし