

研究報告書

「好気条件下で水素 (H₂) 製造反応を触媒する [NiFeSe] 型ヒドロゲナーゼの分子構築」

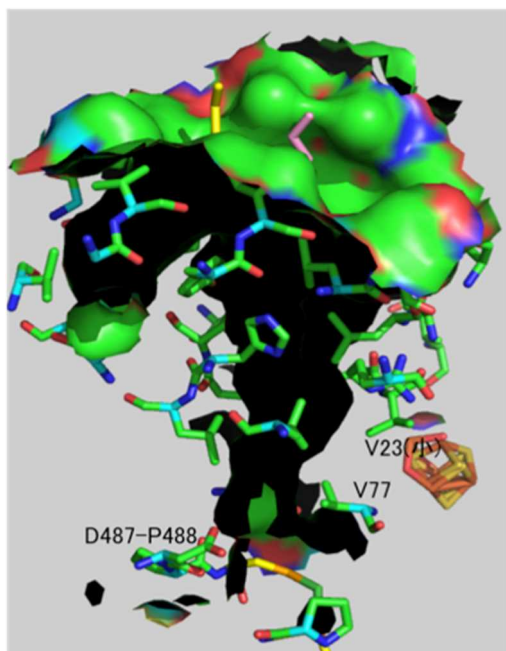
研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 田村 隆

1. 研究のねらい

燃料電池は、「もの」を燃やさずにエネルギー需給を図る発電法として、21 世紀のエネルギー戦略を描く上で重要な選択肢として期待されている。しかし水素社会の構築のためには、解決すべき技術的課題も多く残されている。水素と電力の相互変換を担う触媒として白金触媒に替わる安価で優れた触媒が必要であり、天然ガスの燃焼に依存しない水素製造法も求められる。水素の生産・消費を可逆的に触媒するヒドロゲナーゼは、僅かな濃度の分子状酸素 O₂ によって強く阻害されるので、微生物酵素を利用することの実現性は極めて乏しいとされてきた。近年、ごく少数の硫酸還元菌が生産する [NiFeSe] 型ヒドロゲナーゼ ([NiFeSe]Hase) は 2% 程度の酸素には耐性を示し、水素製造能力を維持できることが報告された。本酵素は活性中心の Ni-Fe 錯体の Ni を支える Cys 残基の 1 つがセレンシステイン (SeCys) 残基に置換されており、SeCys の強い還元力によりこのような酸素耐性を示す。この発見により、ヒドロゲナーゼには本質的に避けられない問題と思われていた酸素感受性が、活性中心への酸素の接近を阻止することで解決できることが示された。本研究では、[NiFeSe]Hase の酸素耐性をさらに高めるために、本酵素を頑強かつ隙間のない分子構造に改変する分子設計を目的とした。ヒドロゲナーゼはタンパク質の内部の活性中心と表面の間に gas cavity と呼ばれる水素/酸素の通り路を持つ。これまで [NiFe] 型ヒドロゲナーゼの酸素耐性を向上させるために、Gas Cavity を閉じる研究が取り組まれてきたが、数個のアミノ酸残基を置換しても限定的な効果しか得られず、もっと抜本的で斬新なタンパク質の



[NiFeSe]Hase の Gas Cavity 構造

分子設計法が望まれてきた。そこで本研究では、データベース上に蓄積された膨大な微生物ゲノム情報を収集して、[NiFeSe]Hase が経てきた分子進化を過去にさかのぼるシミュレーションを計画した。Gas Cavity は SeCys を獲得したことによって拡大してきたという仮説のもと、祖先型タンパク質の構造を復元できれば、Cavity が閉じた構造にたどり着くと考察したからである。本研究では、系統樹解析から予測された祖先型酵素のアミノ酸配列から立体構造を構築して、分子動力学計算により原子レベルでの精密な構造を算出する。そして硫酸還元菌を宿主として設計した酵素を発現させて、精製アフィニタグ付加を利用した簡便な酵素精製法を検討する、或いは組換え大腸菌による異種発現も検討し

てヒドロゲナーゼを取得する方法も検討する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究の成果として、目標として掲げた「Gas cavity を閉じた構造を設計する」ことは、当初の計画で見込んだとおり「分子進化を過去にさかのぼれば、Gas Cavity が閉じた構造に辿り着く」という予想に合致した。しかし、想定外の展開として、閉じた構造は過去に存在しただけでなく、現在でも Cavity が閉じた[NiFeSe]Hase が存在する事が示された。当研究開始時には、*D. vulgaris* 由来(結晶構造 2wpm.pdb)と *D. baculatum* 由来(1cc1.pdb)のみが[NiFeSe]Hase であったが、より高い有用性(=高い酸素耐性)を持つ[NiFeSe]Hase を持つ硫酸還元菌の存在を見いだした。



新規[NiFeSe]Hase
を生産する硫酸還元
菌の収集と利用

本研究では、上記の(A)[NiFeSe]Hase の Gas Cavity 構造計算に加えて、下記の3項目を具体的な研究成果として得つつあり、今後発表する見通しである。まず、すでに確立された[NiFeSe]Hase 以外にも9種類の硫酸還元菌が[NiFeSe]Hase を持つことを系統解析と構造計算によって予測したが、これを(B)実験によって証明しつつある。*D. alaskensis*, *D. salexigens* などからも[NiFeSe]Hase を同定しており、さらに解析データを蓄積している。つぎに[NiFeSe]Hase の分子進化を解析する過程において、これまでほぼ不可能とされてきたバクテリアの系統解析が、[NiFeSe]ヒドロゲナーゼをもつ種限定という制限つきながらも(C)系統進化の道筋が辿れることを示した。バクテリアでは、属・種の系統解析が不可能とされる主な理由は、遺伝子(群)が水平伝播によって種を越えて移行するためであり、親から子への垂直な遺伝だけで系統が成り立つ高等生物のように「種の起源」を遡ることができない。しかし、このセレン含有型酵素ではオパールコドン UGA 解読機構に関わる特殊事情によって垂直な系統関係が強く支持される。これは学術的発見なので、論文投稿している。最後に、高い酸素耐性を持つと予想された新規な[NiFeSe]Hase を簡便かつ低コストに調製するために [NiFeSe]Hase 遺伝子に(D)精製用のアフィニティタグ配列を導入する方法を検討した。大腸菌からの接合伝達によって人工遺伝子を送り込み、相同組換えによってわずか 24 bp の塩基配列(アミノ酸残基 8 個分)を[NiFeSe]ヒドロゲナーゼに書き込むだけで、酵素の一本釣りが可能になる。

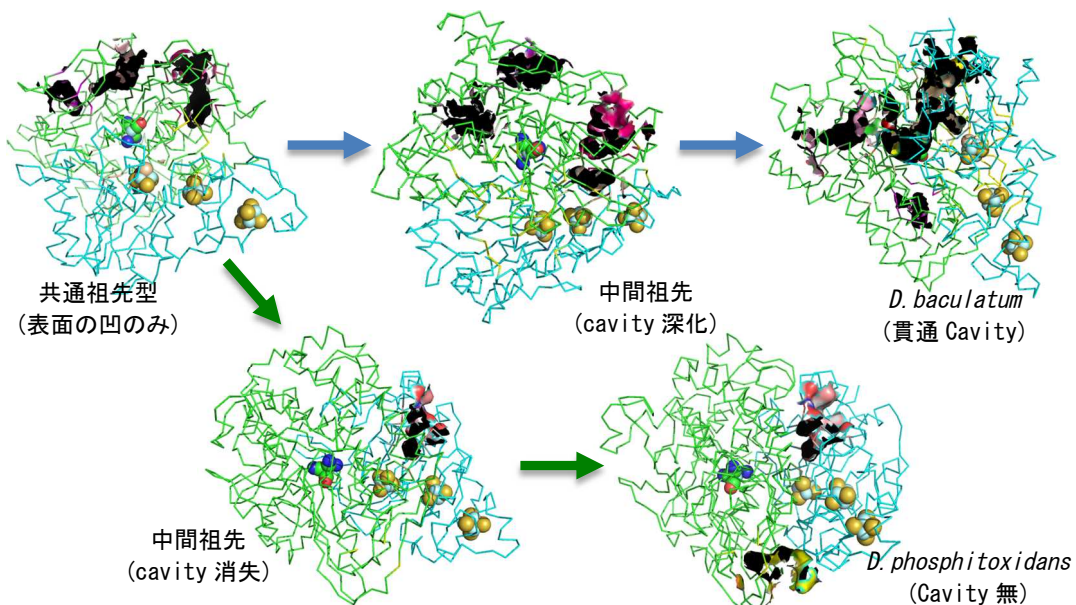
本研究により [NiFeSe]Hase の分子進化に関わる学術的な知見、新規[NiFe]Hase の発見や簡便調製法などの技術的なブレイクスルーがもたらされることが期待できる。

(2) 詳細

研究テーマ (A) 分子動力学計算による分子進化と Gas Cavity 構造計算

微生物ゲノム情報の中から[NiFeSe]Hase 遺伝子、および高い相同性を有する[NiFe]Hase の遺伝子配列を 88 本、Phi-BLAST により抽出した。Muscle と GUIDANCE を用いた精密なアライメント作業を経て、BootStrap300, GTR+GI 進化モデルを適応した精度の高い系統樹解析をおこなった。その結果、現存する[NiFeSe]Hase は、分子進化の中で[NiFe]Hase から発生、分岐した共通祖先に由来する子孫群と示された。共通祖先から現存のセレン型酵素に至る中間の祖先酵素の塩基配列も Ancescon プログラムによって算出した。ここまでは、タンパク質の分子進化を解析する基本に忠実なアプローチ。

当さがけ研究では、ここで得られたアミノ酸配列をすべてタンパク質の立体構造に起こす課題にチャレンジした。アミノ酸配列からタンパク質の立体構造を導くことは、相同性が高く X 線結晶構造解析がすでに完了した鋳型構造があれば「ホモロジーモデル」を得ることが出来る。しかし、ホモロジーモデルはかなり粗く予測された構造なので、本研究ではこれを出発点として、タンパク質分子内の物理化学的な相互作用を最適化するシミュレーションを取り入れ、大規模な分子動力学計算を導入して水溶媒中での安定構造に導く計算を行った。セレンシステイン(SeCys)という特殊なアミノ酸残基が含まれるために SeCys のための新しいパラメーターも開発した。またソフトウェアの工夫だけでなく、計算機の購入に際しては、ゲーム機のグラフィクス情報処理に使用される分散型プロセッサ-GPGPU を装備した先進的なマシンを特注して、これを十二分に活用した。計算効率をフルに上げて取り組んだが全構造計算を完了するまでに、3年の時間と労力を要した。

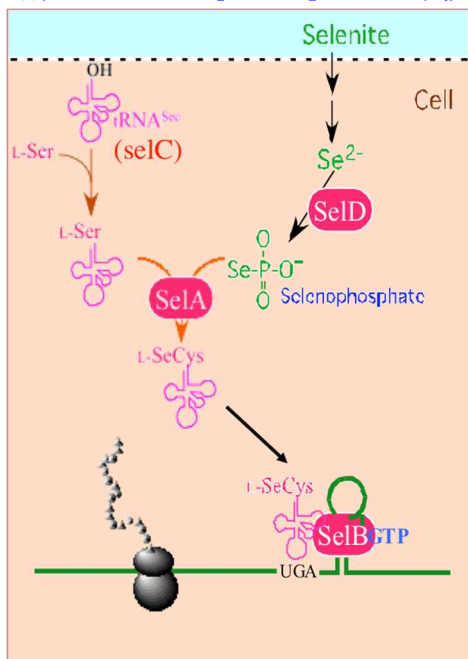


生育環境に対応して Gas Cavity が深化(青矢印)または消失(緑矢印)する分子進化の一例

研究テーマ B 新規[NiFeSe]Hase の検出と同定

[NiFeSe]ヒドロゲナーゼの SeCys 残基はオパールコドン UGA としてコードされており、ゲノムデータベース上では、大サブユニットの C 末端がトランケートされた形で登録されている。これを SeCys として読み直せば、UGA に続く相同配列を経て、新たな終止コドンに行き当たる。これらの新規[NiFeSe]Hase の実験的確認を得るために、超遠心分離機で膜画分に濃縮した [NiFeSe]Hase を Native PAGE 上で活性染色と ICP-MS によって化学的に同定する手法を確立した。ICP-MS を利用した超微量解析技術によりネイティブ酵素から Se を同定できた。*D. vulgaris*, *D. baculatum* など、すでに確立されたセレン含有ヒドロゲナーゼと共に *D. salexigens*, *D. africanus* から予想通りに [NiFeSe]Hase を同定した。数多くの新規ヒドロゲナーゼの発見を一網打尽に進めている。

研究テーマ C [NiFeSe]Hase の系統解析が示す硫酸還元菌の「種の起源」



セレン含有酵素が持つ特異な事情として、UGA を SeCys と翻訳する際にセレノソームと呼ばれる遺伝子群 (*selA*, *selB*, *selC*, *selD*) が働く。さらに UGA に続く mRNA の配列が SECIS エlement と呼ばれる特殊なステムループ構造を持つことも、分子認識に必須である。これら因子は互いに接触しながら作動するので、共進化の拘束を強く受ける。実際にセレノソーム遺伝子群の系統解析を行うと、系統関係は並行していた。さらに決定的なことは、これらの諸因子をコードする遺伝子はゲノム上に広くばらばらに散在しているので、水平伝播による「丸ごとの移行」は起こりえない。つまり [NiFeSe]Hase と関連遺伝子群は細菌でありながら、「種の系統」を辿ることが許される、極めて重要なマーカー遺伝子であることが示された。

研究テーマ D 簡易な[NiFeSe]調製法の開発

[NiFeSe]型ヒドロゲナーゼの構造計算の結果、現存する硫酸還元菌の中には、タンパク質の表面から活性中心への Gas Cavity を持たないものが見つかった。それらは腸内細菌 *D. piger*, *B. wadsworthia*, そして、浅海から分離された *D. phosphitoxidans* などである。Gas Cavity が大きな酵素は水素を効率的に電気に変換する能力が期待される。Gas Cavity を持たない酵素はさらに高い酸素耐性が期待できるので水素製造には有用と期待できる。これらの塩基配列を一部、書き換えて 8 アミノ酸残基(24bp)を書き込むだけでタンパク質の精製アフィニティタグ配列を導入することが出来るので、そのような改変を行うための接合伝達ベクターを構築した。嫌気チャンバー内で大腸菌から *D. vulgaris*, *D. baculatum*, *D. alaskensis* への接合伝達を接合を行うことにより遺伝子を送り込む方法は確立した。さらに1回目の相同組換えを起こしてタグ配列を含む遺伝子断片をゲノム上の [NiFeSe]ヒドロゲナーゼと結合させることも成功したようなので、「DNA 配列の軽微な変更による酵素調製の大きな成果」が期待できる

3. 今後の展開

研究テーマ A 及び C 計算化学を活用したタンパク質分子進化研究の開拓

タンパク質の分子進化は塩基配列、アミノ酸配列などの一次構造で議論されており、本研究で取り組まれたように、配列情報を立体構造に起こして分子進化の意義を考察したのは、初の取り組みである。現存しない祖先型酵素、現存するが構造解析がなされていない未同定のホモログ酵素について立体構造をシミュレーションした。本研究では、棲息する環境に適應してその形を大きく変えてきた Gas Cavity にターゲットを絞ったことが、成功の鍵であったと考えられる。

酵素の分子進化を立体構造に基づいて考察するこのような取り組みをさらに[NiFe]ヒドロゲナーゼの分子進化にも適應して、そこに形成される Gas Cavity の変遷として考察を拡げたい。タンパク質の分子進化研究は国内外に厚い研究者層があるが、一次構造から立体構造を予測することは、まだ懐疑的な研究者も少なからず含まれると予想される。新しい解析手法を持った新参の挑戦者としてこの分野で研究を展開して行きたい。立体構造から分子進化を考察する新しい発想と、その裏付けとなる計算化学に関わる技術を深めたい。

研究テーマ B および D [NiFeSe]ヒドロゲナーゼの生産工場としてのタグ付加

ヒドロゲナーゼは、優れた生体触媒であるがそれを調製するためのコストを削減するには1段階で簡便に酵素精製ができることが重要である。本研究で完成間近なタグ付加型酵素は、培養した菌体を超音波破碎して、アフィニティタグカラムに通すだけで精製が可能である。生産菌は嫌気性菌なので培養に当たっては攪拌を必要とすることもなく、温度も室温程度で生育可能なので熱源も必要ない。培養ボトルを密閉して静置して培地が黒く濁れば、そこから[NiFeSe]Hase を迅速に調製できる。タグ付加の遺伝子改変を受けた生産菌のそのものは生物特許として権利化が出来るので、開発者は独占的实施権を確保して、第三者と競合するリスクを負うことなく開発に取り組むことが出来る。生体触媒の優れた点は、燃焼による完全償却が可能で、価格が安いこと、さらに酸化還元両方向に触媒となる可逆性、酸素には弱い、汚水、硫化物などに侵されることなく、下水・海水からでも水素を生産することができるなど白金系人工触媒にはない利点が多い。付加したタグは、精製だけでなく電極への固定と配向制御にも使うことが出来る。

創薬ターゲットとしてのヒドロゲナーゼの構造研究

本研究では、藻類バイオ領域の研究課題として水素エネルギーの製造または活用に関わるヒドロゲナーゼの構造研究に取り組んできた。その一方、本酵素はピロリ菌やサルモネラ菌がヒトに感染する上で、重要な役割を担う病原因子でもある。ピロリ菌が pH の低い胃の中で生存する戦略としてウレアーゼを介したアンモニア生産がよく知られているが、[NiFe]Hase もまたピロリ菌の酸耐性には欠かせない生存戦略の1つである。ピロリ菌の宿主であるヒトはヒドロゲナーゼを持たないので、これを強く阻害する薬剤は選択毒性を発揮することが期待できるので、ヒドロゲナーゼは創薬のターゲットとなる。同様にサルモネラ菌が胃の中で生存する上でも、やはり[NiFe]型ヒドロゲナーゼが必須の遺伝子であることも報告されている。これら病原菌の[NiFe]ヒドロゲナーゼは、ネイティブな酵素の精製も異種発

現も実現していない。創薬デザインには、立体構造予測と化合物ライブラリを用いた in silico のドッキングシミュレーションによるリード化合物探索が有用な知見となる。本研究で確立したヒドロゲナーゼの立体構造シミュレーション技術は、医薬品開発などの方面でも社会的インパクトをもたらす可能性がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究課題(A)として掲げた Gas Cavity 構造計算は、大筋、予想通りの展開になったので、ストーリーそのものを破綻させずに構造計算を完結することが出来た。タンパク質の構造計算そのものは比較的、順調に進展したといえる。投稿論文を期間内に投稿しなかったが、「現存する[NiFeSe]ヒドロゲナーゼが、共通祖先[NiFeSe]Hase から派生した子孫達である。」という大前提そのものを支持する解析データが必要になった。そのような、サポートデータの整備に、さらに日数を要したため、論文投稿は予定より遅れてしまった。しかし論文を強化する上で避けることは出来ないヤマだったと思われる。このサポート解析とは、研究テーマ(C)として上記に記述した内容で、これは MD 計算の投稿論文の中に含めて投稿する。

研究テーマ B とそれに派生したテーマ D は、完成間近ではないかと思われる。アフニティタグを付けた酵素を発現し続ける宿主は、水素社会構築にむけた開発研究にも寄与できることが期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

タンパク質の機能改変を目的とする分子設計において、一部のアミノ酸を置換するというミクロな視点ではなく、タンパク質全体の構造を対象として、タンパク質の分子進化という時間軸を過去にさかのぼるという斬新な発想で取り組んだことは、さきがけ研究に相応しいユニークな取り組みといえる。既存の[NiFeSe]ヒドロゲナーゼだけでなく未同定のセレン含有型もまだ多数存在することに着眼したことも、貪欲な情報収集と柔軟な発想の証左といえる。

学術的な基礎研究と共に社会のニーズ、将来的な技術開発も考慮したシーズ的な開発にも着手しており、こちらの展開も将来的に波及効果が期待できる。

残念ながら、研究期間内に研究成果を投稿論文にできなかった。困難な課題設定に集中して研究に取り組むことも大切であるが、中長期的な時間で計画的に研究成果を論文発表することにも配慮しなくてはならない。今後の研究の展開とともに発表促進をはかられたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 田村 隆, 量子化学が解き明かすヒドロゲナーゼの触媒機構, ビタミン/バイオフィクターと生命科学 86 (7), 412-414 (2012)

2. 田村 隆, 浅野香織 鉄硫黄クラスター形成に関わる硫黄輸送システム, ビタミン/バイオ
ファクターと生命科学 88(2) in press (2014)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(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)

招待講演

富士通計算化学ユーザーフォーラム 2012

「スパコンはタイムマシン? ~蛋白質の分子進化を過去に遡るシミュレーション~」

2012 年 12 月

国際学会発表

1. Molecular evolution of [NiFeSe]Hydrogenase simulated by phylogeny and Molecular Dynamics. 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine. (第 10 回セレンの生物・医学シンポジウム) ドイツ・ベルリン, 2013 年 9 月 14-18 日
2. Molecular evolution of gas cavity in [NiFeSe]Hydrogenase resurrected *in silico* by ancestral sequence estimation and 3D modeling by molecular dynamics simulation. The Fourth International Conference on Cofactors (ICC4) (第 4 回 国際補酵素会議) イタリア・パルマ, 2014 年 8 月 25-28 日