

■報告書■ 2004年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

光合成細菌を利用した環境保全のための基盤技術開発

井上和仁^{1,2,4} 桜井英博³ 増川 一¹ 中原昌明²

The Study of Basic and Technological Development for Environmental Preservation using Photosynthetic Prokaryote

Kazuhito Inoue^{1,2,4}, Hidehiro Sakurai³, Hajime Masukawa¹, Masaaki Nakahara²

¹ Department of Biological Sciences and

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293

³ Graduate School of Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8050

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: inoue@bio.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Technological development for environmental preservation is a subject of pressing need in the 21st century. The aim of this research is to develop a basic technology for environmental preservation using phototrophic prokaryotes.

keywords: photosynthetic bacteria, cyanobacteria, environmental preservation, iron-sulfur cluster, hydrogen production

水素発生、微生物ポリマー、廃棄物処理、環境修復など環境保全のための技術開発は急務の課題である。本研究は生理生化学、遺伝子工学などの基礎研究を通じ、光合成細菌やシアノバクテリアを利用した環境保全のための基盤技術の開発を目的とし、本年度は次のような研究を行った。

(1) 緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* の鉄硫黄クラスターアッセムブリファクターに関する研究

(2) シアノバクテリアの水素生産性向上に向けたニトロゲナーゼの改良に関する研究

(1) 緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* の鉄硫黄クラスターアッセムブリファクターに関する研究

鉄硫黄クラスターはフェレドキシン、鉄硫黄型反応中心、ニトロゲナーゼ等の電子受容体成分であるが、その合成過程についてはほとんど不明のままであった。最近、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* や大腸菌 *Escherichia coli* などの研究から IscR、IscS、IscU、IscA、HscA、HscB といった鉄硫黄クラスターの合成や鉄硫黄タンパク質のアッセムブリ過程に関与するファクターが存在することが明らかになってきた。*A. vinelandii* や *E. coli* などでは、これらのアッセムブリファクターをコードする遺伝子がゲノム上で *iscRSUA-hscBA-fdx* という遺伝子クラスターとして存在する。しかしながら *C. tepidum* のゲノム上には *iscRSUA-hscBA-fdx* 遺伝子クラス

ターは見られず、各遺伝子は数個の遺伝子のまとまりとして染色体上に散在している。また、*iscSU* は1コピーしか持たず、*iscA* は見つからない。本研究は、*C. tepidum* の鉄硫黄クラスターアッセムブリ過程を明らかにするために、*C. tepidum* の IscS と IscU の大腸菌内での発現系を構築し、次のような結果を得た。

C. tepidum の *iscS* を His-Tag が付加する形で発現ベクター pET23b ベクターにクローニングし、大腸菌株 BLR(DE3)pLysS 内に導入した。標準的な条件 (1 mM IPTG、25°C、5 時間) で誘導したところ、目的タンパクはすべて不溶性画分に封入体を形成してしまっただけで発現条件を検討し、より緩やかな発現条件 (10 μM IPTG、14°C、5 時間) で、目的タンパク質を可溶性画分に発現させることができた。His-Tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより IscS を精製し、SDS-PAGE によりほぼ均一のバンドになるまで精製できた。アフィニティークロマトグラフィーで分離された目的タンパク質を含む溶液は茶色をしており、そのまま数時間放置するとその色が薄くなり沈殿が生じた。しかし、溶出されたタンパク質画分を直ちに pH 9.0 の緩衝液に対して透析を行うことで色の変化も起こらず沈殿も見られなかった。これは、アフィニティークロマトグラフィーを行う際の pH が 8.0 であり、この pH では IscS が容易に変性してしまうことを示唆し

ている。続いて、精製過程で変性した IscS を用いてピリドキサルリン酸 (PLP) 存在下で再構成されるかを調べた。再構成前には 450 nm 付近に見られた吸収ピークが再構成後には PLP に特徴的な約 400 nm 付近にシフトした。これは PLP が IscS に結合し、再構成されたことを示唆する。

次に、*C. tepidum* の *iscU*(CT1994) を発現ベクター pET-23b にクローニングして IscU 大量発現系 (pET-23b::*iscU*) を作製した。pET-23b::*iscU* を導入した BLR(DE3)pLysS は $Abs_{600} = 0.5$ になるまで振盪培養し、最終濃度 1 mM の IPTG を加え 20°C、120 rpm で 5 時間振盪した。菌体は 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM DTT に懸濁し、超音波破碎装置を用い 50 W で破碎した。粗抽出液は 55°C、30 分間熱処理し、硫酸アンモニウム (硫酸) 分画法により粗精製し、Ether-トヨパール 650M (Tosoh)、DEAE-トヨパール 650M (Tosoh) 及び Mono Q 5/50 GL (Amersham Biosciences) カラムを用い精製した。Ether-トヨパールカラムは 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM DTT / 1.5 M $(NH_4)_2SO_4$ で、DEAE-トヨパールカラムと Mono Q カラムは 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM DTT で平衡化し、それぞれ $(NH_4)_2SO_4$ と NaCl の直線的濃度勾配でタンパク質を溶出した。Mono Q カラムを用いた精製には ÄKTA FPLC システム (Amersham Biosciences) を使用した。ESR スペクトルの測定は ESR 装置 (E500-10/12, Bruker Biospin) を用いた。pET-23b::*iscU* を導入した BLR(DE3)pLysS は $Abs_{600} = 0.5$ になるまで振盪培養し、最終濃度 1 mM の IPTG を加え 20°C、120 rpm で 5 時間振盪した。回収した菌体を懸濁し、超音波破碎後に遠心分離して得た可溶性画分に大量発現した約 24 kDa の目的タンパク質を確認した。粗抽出液を熱処理し、遠心分離して回収した上清に対し 35・50% 飽和の硫酸で分画し目的タンパク質を含む沈殿を得た。回収した沈殿は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM DTT / 1.5 M $(NH_4)_2SO_4$ に溶解し、Ether-トヨパールカラムに吸着させた。 $(NH_4)_2SO_4$ 濃度 1 M 付近で溶出した目的タンパク質を含む画分を回収し、硫酸濃縮、透析脱塩後に DEAE-トヨパールカラムに吸着させた。NaCl 濃度 180 mM 付近で溶出した目的タンパク質を含む画分を回収し、透析脱塩後に Mono Q カラムに吸着させた。溶出した画分を回収

し、SDS-PAGE により目的タンパク質の精製度を確認した。精製したタンパク質の吸収スペクトルは、[2Fe-2S] クラスターの存在に特徴的な 330、420 及び 460 nm 付近に吸収極大を示した。また ESR 測定から精製された IscU には [2Fe-2S] 型の鉄硫黄クラスターが結合していることが示唆された。

(2) シアノバクテリアの水素生産性向上に向けたニトロゲナーゼの改良に関する研究

大気中の CO_2 を始めとする温室効果ガス濃度の顕著な上昇を受けて、地球温暖化に対する懸念から再生可能エネルギー源の開発に対する関心が世界的に高まりつつある。再生可能エネルギーの生物的生産方法としては、木材などバイオマスの直接燃焼のほか、発酵微生物を利用したメタン、水素の生産、光合成生物を利用した水素の生産などがある。われわれは長期戦略的視点から、ラン色細菌の光合成系、ニトロゲナーゼ系を利用した水素生産の研究開発計画を提案している。これまでに *Anabaena* PCC 7120 株で生成した水素を再吸収するヒドロゲナーゼの遺伝子 *hupL* 変異株を作製し、水素生産性を野生株の 4-7 倍に増大させることが出来た。本研究では、*hupL* 変異株を基に、水素生産性をさらに向上させると同時に高い活性を長期間持続させるため、*Anabaena* PCC 7120 野生株と *hupL* 株を親株として、ニトロゲナーゼの活性中心クラスターに配位するホモクエン酸の合成酵素遺伝子 (*nifV*) 破壊株を作製した。*Anabaena* PCC 7120 は、*nifV1* と *nifV2* の 2 コピー持つため、それらの一方または両方を破壊した 3 種の変異株、*nifV1*、*nifV2*、*nifV1/nifV2* 株を野生株と *hupL* 変異株のそれぞれから作製し、破壊株の水素生産の活性、持続性をガスクロマトグラフィーにより調べた。その内の一株は、*hupL* 株と比べ水素生産の最大活性がアルゴン気相下で約 2 倍増大し、窒素ガスを含む気相下ではさらに顕著に増大する結果を得た。さらに、基質還元を触媒する活性部位を持つニトロゲナーゼ α サブユニットに部位特異的変異を導入した株を作製するため、*Anabaena* PCC 7120 のゲノムライブラリーを作製し、ニトロゲナーゼ構造遺伝子 *nifH*、*nifD*、*nifK* を単離し、まず *hupL* 変異株から *nifD* 変異株を作製した。