

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：14602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14376

研究課題名(和文)光エネルギー駆動型の補酵素再生系を組み込んだ微生物を用いる生体光触媒の創製

研究課題名(英文)Creation of Bio-photocatalyst Using Microorganism with Artificial Light-driven Coenzyme Regeneration System

研究代表者

本田 裕樹 (Honda, Yuki)

奈良女子大学・自然科学系・助教

研究者番号：90583849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体化合物であるポルフィリン色素を大腸菌への遺伝子工学的手法によって大量生産し、その色素分子を光増感剤として機能させることで、物質生産用の酵素に必要なエネルギーを供給するという新規な光駆動型生体触媒反応系の構築を目指した。大腸菌による色素の大量合成、色素を用いた人工補酵素の光触媒還元、この人工補酵素の光触媒的還元と水素生成酵素の反応を組み合わせた光駆動型水素生産が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素反応の利用において、反応の進行に必要な補酵素の再生は重要な課題であった。グルコース脱水素酵素との共役反応などは古くから用いられる補酵素再生系であり、また種々の方法が考案されている。本研究では、安価に入手できる光によって、かつ生体分子によって酵素へのエネルギー供給を実現する新規な反応系を構築し、新たな方法論による補酵素再生の実現を目指した。補酵素再生という課題に対して、従来とは異なる方法論で解決を目指す点で学術的な意義があり、かつ、その効果は生体触媒の工業的利用による省エネルギープロセスの実現に寄与することが期待されることから、社会的な意義のある研究提案であった。

研究成果の概要(英文)：Biocatalysts, including enzymes or microorganisms, are capable of catalyzing highly selective and efficient reactions under environmentally friendly condition. This feature of biocatalysis would contribute to developing an energy-saving process in industry. In an industrial application of biocatalysis, supplying energy to proceed a certain reaction has been a problem in the enzymatic reaction which requires a coenzyme, such as NADH. This study addressed this problem by developing a light-driven biocatalysis system which consists of the combination of photosensitizer and enzyme. In such system, photosensitizer serves energy to enzyme from light energy, instead of costly coenzyme supplementation. This study achieved a large-scale synthesis of porphyrin dye by genetically engineered bacteria, the photoreduction of an artificial coenzyme (MV) by the dye, and one of the light-driven biocatalysis by coupling the photoreduction of MV and the hydrogen-forming enzyme.

研究分野：応用微生物学

キーワード：光触媒 生体触媒 水素生産 補酵素再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

持続可能な開発の実現に向け、省エネルギー型の工業プロセスの構築が求められており、これには優れた触媒の開発が必要となる。優れた触媒には高活性かつ高選択性、高安定性で触媒調製の手間やコストの小さいことが求められる。本研究は、酵素や微生物といった生体触媒の機能を巧みに活用することで優れた触媒を創製し、学術的および社会的な要請に応えようとする研究である。

生体触媒は、常温常圧条件下においても高活性かつ高選択的な反応を触媒することができる。また、例えば所望の酵素遺伝子を高発現する大腸菌細胞を培養・回収し、そのまま触媒として利用する反応は、菌体の破碎や酵素精製などの煩雑で高コストな操作が不要である。さらに、微生物細胞を“生きたまま”反応に供すれば、理論的には適切な栄養条件下において菌体の再増殖や酵素の再生産が可能であり、これは反応の進行に伴って劣化する触媒の自己修復や自己複製という無機触媒や有機分子触媒では実現できない生体触媒ならではの長である。したがって、生体触媒を用いた反応（とくに微生物細胞そのものを触媒とする反応）は、省エネルギー型の工業プロセスの基礎を担う優れた触媒として相応しいものと期待される。

一方、個々の酵素反応に目を向けると、シトクロム P450 酸素添加酵素によるアルカンの水酸化、ヒドロゲナーゼによる H^+ からの H_2 生成、またはギ酸デヒドロゲナーゼによる CO_2 からのギ酸生成のように、反応の進行に NADH や NADPH 等の補酵素や電子伝達体からのエネルギー供給が必要な酵素は、その反応の有用性が認められながらも、反応の進行に必要な補酵素や還元力をどのように反応系に供給し続けるかという課題が実用化を妨げている。本研究は、このような生体触媒を用いた工業プロセスの実用化を目指すなかで、反応の進行に必要な補酵素等のエネルギー投入に関する課題を解決するための新たな手法の提案を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究では、生体触媒の効果的な応用を目指す中で、反応の進行に必要な補酵素等のエネルギー投入に関する課題を解決するための新たな手法の提案を目的とした。とくに光エネルギー（理想的には無尽蔵の太陽光エネルギー）によって駆動する新規な生体触媒系の構築を目指した。

3. 研究の方法

1 つの微生物の中に、光エネルギーの化学エネルギーへの変換能力と、物質生産能力を遺伝子工学的に同時に付与することで、光駆動型の生体触媒反応系を構築することを目指した。光エネルギーの変換には、生体化合物であり有機分子光触媒として盛んに研究されているポルフィリン色素を大腸菌で大量に生合成し、これを光増感剤として用いることとした。これは大腸菌のポルフィリン合成系の遺伝子工学的な機能強化によって実現できる。この色素分子による光増感反応と、物質生産のための酵素（例えばヒドロゲナーゼ）の反応を 1 つの細胞の中で共役させることで、光駆動型の物質生産が可能になると期待できる。

具体的には、(1) 大腸菌におけるポルフィリン色素生合成系の強化による色素の大量生産、(2) ポルフィリン色素を分子光触媒とする電子メディエータ分子の光触媒的再生反応、(3) 色素を用いるメチルピオローゲンの光還元反応と水素生産反応への適用、について検討した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌におけるポルフィリン色素生合成系の強化による色素の大量生産

大腸菌 BL21(DE3)のポルフィリン生合成経路を強化することで、大腸菌細胞での色素合成を試みた。具体的には *Rhodobacter capsulatus* 由来のアミノレブリン酸合成酵素 ALAS、大腸菌由来 HemB, HemC, HemD をコードする 4 つの遺伝子を当該宿主内で発現させた。

組換え大腸菌を 2YT 培地で生育後、遺伝子発現誘導をかけ、培養を継続すると培養液が濃赤色に呈色することが確認できた（図 1A）。この培養上清を回収し、陰イオン交換樹脂 DEAE sephadex A-25 を添加し樹脂に色素を吸着させ、洗浄、溶出することで色素を精製した（図 1B）。吸光度測定、MS 測定の結果、ポルフィリン誘導体の合成が確認できた。さらに、各標準物質とともに HPLC 分析を実施したところ、合成された色素は主に亜鉛が配位したウロポルフィリン III (Zn-ウロポルフィリン III) であることが明らかになった（図 1C）。 Zn^{2+} は使用する培地に含まれており、合成されたウロポルフィリン III に容易に配位する。また、過去のポルフィリン系色素を用いた光増感反応の研究からも、Zn が配位したポルフィリンが大量に存在したことはその後の光増感反応への応用の観点からも望ましかった。

上述の通り、大腸菌の遺伝子工学的機能改変によって色素の大量合成に成功し、また、抽出精製条件を確立して、色素の同定をすることができた。また、培養条件、培地への Zn^{2+} の添加等を検討し、当該大腸菌を用いて Zn-ウロポルフィリンを大量合成する条件を見出した。

(2) ポルフィリン色素を分子光触媒とする電子メディエータ分子の光触媒的還元反応

大腸菌培養液から抽出した Zn-ウロポルフィリン III を用いて、天然の補酵素である NADH、あるいは人工補酵素として利用例があるメチルピオローゲンの光還元を試みた。

まず、抽出・精製した色素を用いて NAD^+ の光触媒的還元を検討した。中性緩衝液中に、 NAD^+ と電子供与体としてトリエタノールアミン (TEOA) を添加し、405 nm、420 nm の光照射を実

施した。光照射依存的に NADH の生成指標となる 340 nm の吸光度の増大が確認された。各種検討を重ねたところ、340 nm の吸光度の増大は酵素的に活性な NADH ではなく、NAD ダイマーへ変換された可能性が高いことが明らかになった。NAD⁺が還元されて生じる NAD[·]がさらにもう一段還元されるよりも、2つの NAD[·]分子から NAD ダイマーが生じる反応が優先的す起因する。NADH 生成等の検討は継続しているが、現状、NADH 再生系の構築には至っていない。

続いて精製したポルフィリン色素を用いて、金属酵素などへの電子供与に頻りに利用されるメチルビオローゲン (MV²⁺) の光触媒的な還元を試みた。中性緩衝液中に、MV²⁺と TEOA を添加し、405 nm の光照射を実施した。光照射依存的に MV^{+·}が生成することが確認できた (図 2A, B)。MV は各種の金属酵素 (例えばヒドロゲナーゼ) に対する電子伝達体、人工補酵素としての使用例が知られており、大腸菌で生合成されたポルフィリン色素による MV の光還元反応は、酵素反応との共役による光駆動型生体触媒反応の構築につながる。

(3) メチルビオローゲン (MV) の光還元反応と水素生産反応への適用

大腸菌で生産した色素による MV の光還元反応が、物質生産と共役しうることを明らかにするため、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子を発現した大腸菌による還元型 MV からの水素生産との組み合わせた反応を検討した (図 2C)。色素溶液と、別に作製した大腸菌懸濁液 ([FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入し、水素生成能が付与されている) の混合溶液に対する光照射によって水素が生成することが確認された (図 2D)。これにより、生合成されたポルフィリン色素を分子光触媒とした反応系が構築可能であることを明らかにし、生合成した色素を用いる光駆動型物質生産の一部を実証した。

一方で、当初の目的とした、色素合成能と物質生産能の両方を同時に組み込んだ大腸菌を用いる生体光触媒系の構築は未達成である。これは大腸菌への導入遺伝子数が増えることによる困難さや、色素合成用の酵素と物質生産用の酵素の発現誘導条件が異なることが要因であると考えられる。遺伝子導入方法の検討 (プラスミドから染色体組み込み型へと転換) や、各遺伝子発現に用いるプロモーターの検討といった発現誘導法を検討する予定である。今後、ポルフィリン生合成能の強化と [FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子発現を同時に同じ大腸菌に対して行う条件の検討し、当初の目的とした、同一の細胞に対して光エネルギー変換能と物質生産能を付与することによる光駆動型生体触媒反応系の構築を続ける予定である。

(4) まとめと展望

本研究では、大腸菌のポルフィリン色素生合成の経路を強化することで、実際に著量の色素分子が生成されることを見出した。また、生合成された色素を用いる人工補酵素 MV の光触媒的還元反応と、ヒドロゲナーゼによる水素生産反応を共役させることによって、光駆動型の水素生産が可能であることを見出した。現状では、天然の補酵素である NADH 再生系の適用には成功していないが、大腸菌で大量生産した色素分子を光増感剤とし、物質生産酵素の反応と組み合わせることで光駆動型の生体触媒反応を実現するという研究目的の一部が達成された。

また、詳細は省略するが、本研究におけるポルフィリン生合成経路の強化に関連するものとして、大腸菌での当該生合成経路の強化は、大腸菌におけるヘムタンパク質遺伝子の効率的な異種発現に応用可能であることを見出し、関連成果として論文発表した。また、有機色素分子による光増感反応がヒドロゲナーゼによる水素生産と効果的に共役することをヒントにして、他の有機色素 (汎用されるエオシン Y など) と、ヒドロゲナーゼ遺伝子を発現させた組換え大腸菌細胞を組み合わせた色素 大腸菌系による光バイオ水素生産系の構築などにも発展し、学会や論文 (投稿中) 発表へとつながる成果を得た。

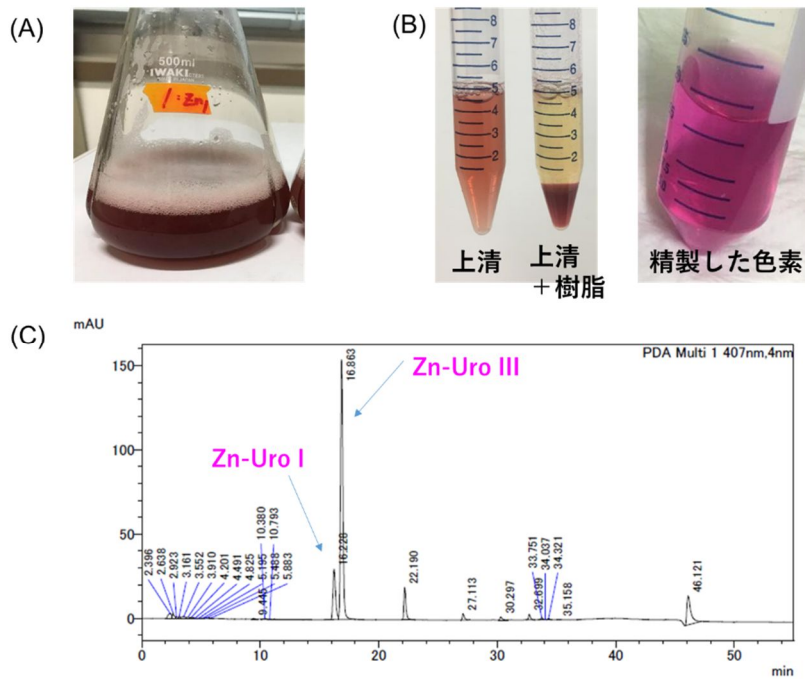


図1 ポルフィリン色素合成系を強化した大腸菌による色素の生成
 (A) 大腸菌培養液の様子、(B) 培養上清からの色素精製、(C) HPLC 分析

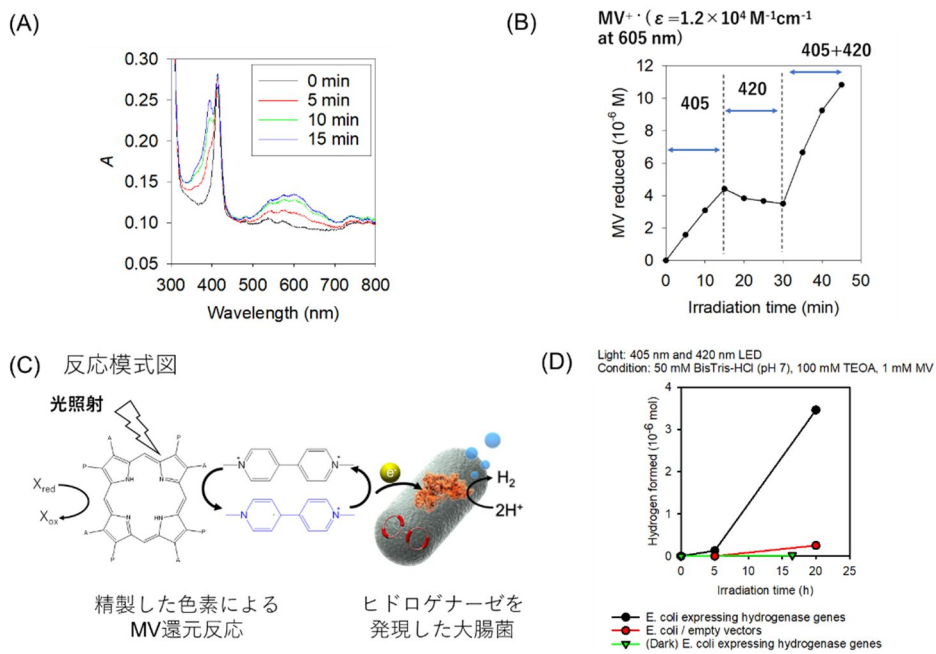


図2 精製したポルフィリン色素を用いる MV 還元と水素生産
 (A) 反応溶液への照射によるスペクトル変化、(B) MV 還元量、(C) 水素生産反応の模式図、(D) 水素生産量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda Yuki, Nanasawa Kii, Fujii Hiroshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Coexpression of 5-Aminolevulinic Acid Synthase Gene Facilitates Heterologous Production of Thermostable Cytochrome P450, CYP119, in Holo Form in Escherichia coli	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2156 ~ 2159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201800331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuki Honda, Yuka Shinohara, Hiroshi Fujii
2. 発表標題 Light-driven and mediator-free hydrogen evolution using a combination of a photosensitizer and a recombinant Escherichia coli whole-cell biocatalyst
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田裕樹、篠原優佳、藤井浩
2. 発表標題 光増感剤/組換え大腸菌細胞系を用いた光触媒の水素生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原優佳、本田裕樹、渡邊源規、石原達己、藤井 浩
2. 発表標題 微生物の金属硫化物生成能と遺伝子工学的な水素生成能付与を組み合わせた光駆動型水素生成
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----