

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	光エネルギー変換能と水素生産能を付与した微生物細胞を用いる光駆動型の水素生産				
研究テーマ (欧文) AZ	Light-driven hydrogen production using whole-cell biocatalysts with photoconversion and hydrogen formation activities				
研究氏 代 表 名 者	カナ字 CC	姓)ホンダ	名)ユウキ	研究期間 B	2017 ~ 2018 年
	漢字 CB	本田	裕樹	報告年度 YR	2018 年
	ローマ字 CZ	Honda	Yuki	研究機関名	奈良女子大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	奈良女子大学大学院自然科学系化学領域・助教				
概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。) 【背景・目的】水素エネルギー社会の実現に向け、自然エネルギーとくに無尽蔵の太陽光エネルギーを利用した水素生産系に期待が寄せられる。光触媒による水の分解反応は理想的な反応であり、実用化に向け高効率な反応系の開発が進められている。こうした背景のもと本研究では、生体触媒の機能を活用した新規な光駆動型の水素生産系の構築を目指した。具体的には光エネルギー変換能と水素生成能を同時に付与した組換え大腸菌を作製し、その培養菌体をそのまま“生きている”光触媒＝生体光触媒として水素生成に用いた従来とは異なる光駆動型の水素生産系の構築を目指し、その実現可能性を探った。 【結果・考察】本研究では、遺伝子工学を駆使して大腸菌に対して分子光触媒として機能するポルフィリン生合成能の強化と、高い水素生成活性を示す [FeFe]-ヒドロゲナーゼ生産能を付与し、生合成された色素による光エネルギーの化学エネルギーへの変換と、そこからの水素生成を目指している。この反応系は、2 つのステップから成る。1 段階目は光触媒反応による電子メディエーター(メチルビオロゲン、MV)の還元反応であり、2 段階目はヒドロゲナーゼによる還元型 MV を電子源とした水素生成反応である。とくに、1 段階目の反応を、大腸菌内のポルフィリン生合成遺伝子群の強化によって余剰に生合成されるポルフィリンを有機分子光触媒として利用する点に特徴がある。本構想の実現に向けて検討を進めた。 ポルフィリンはヘムの基本骨格であり、様々な生物の生体内に検出される生体化合物である。研究の第一段階として、大腸菌内でポルフィリン生合成経路を強化し、培養液中に蓄積するポルフィリンの種類・高生産条件を探り、生合成されたポルフィリンの分子光触媒としての機能の検証を目指した。紅色光合成細菌由来の遺伝子導入と種々の大腸菌内の反応経路の強化の結果、著量のポルフィリン誘導体の蓄積を確認した。種々の検討の結果、蓄積したポルフィリンは、Zn-uroporphyrin III が主要成分であることを明らかにした。培養液組成、金属塩の添加によるポルフィリン生成量の変化を確認し、適切な条件を設定した。さらに、生合成されたポルフィリンを培養液から精製し、照射下での MV 還元を検討した。生合成された Zn-uroporphyrin III が分子光触媒として機能し、中性条件、犠牲試薬存在下で可視光照射時に MV の光触媒的な還元反応が観察された。 次に第二段階として、精製ポルフィリンによる光触媒的な MV 還元反応と、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子発現大腸菌による還元型 MV からの水素生産を組み合わせた反応を検討した。両者を混合した溶液に対する光照射によって水素が生成することを確認した。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、本研究構想が実現可能であることを示した。一方で、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ことには成功していない。遺伝子構造の最適化などのさらなる検討が必要となっている。 また、本研究におけるポルフィリン生合成経路の強化が、ヘムタンパク質の効率的な異種発現に応用可能であることを見出した。P450 などのヘムタンパク質は化学的に困難な反応を触媒する点で注目される酵素である。一方で、宿主のヘム合成量が少ないことなどが原因で、活性なホロ酵素を遺伝子工学的に大量合成することは困難であった。本研究ではポルフィリン生合成経路すなわちヘム合成経路の上流部分の強化に成功した。この強化したヘム合成系と、P450 の異種発現を組み合わせたところ、従来と比較して P450 タンパク質の生成量およびホロ酵素の割合が向上することが明らかとなり、工業的にも有用なヘムタンパク質の異種発現における新たな手法を提案することができた。					
キーワード FA	水素	大腸菌	光触媒	ポルフィリン	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 _{GB}	Coexpression of 5-aminolevulinic acid synthase gene facilitates heterologous production of thermostable cytochrome P450, CYP119, in holo form in <i>Escherichia coli</i>							
	著者名 _{GA}	Y. Honda, K. Nanasawa, H. Fujii	雑誌名 _{GC}	ChemBioChem					
	ページ _{GF}	2156~2159	発行年 _{GE}	2	0	1	8	巻号 _{GD}	19
雑誌	論文標題 _{GB}								
	著者名 _{GA}		雑誌名 _{GC}						
	ページ _{GF}	~	発行年 _{GE}					巻号 _{GD}	
雑誌	論文標題 _{GB}								
	著者名 _{GA}		雑誌名 _{GC}						
	ページ _{GF}	~	発行年 _{GE}					巻号 _{GD}	
図書	著者名 _{HA}								
	書名 _{HC}								
	出版者 _{HB}		発行年 _{HD}					総ページ _{HE}	
図書	著者名 _{HA}								
	書名 _{HC}								
	出版者 _{HB}		発行年 _{HD}					総ページ _{HE}	

欧文概要 EZ

Photocatalytic water splitting using solar energy has attracted significant interest because such a system is an ideal hydrogen production system capable of producing hydrogen without forming carbon dioxide and without supplying other energy. With an aim to develop an efficient solar-driven hydrogen production system, many researches have been done mainly using inorganic semiconductor or organic dye molecules as photosensitizer; however, low efficiencies of such systems hamper the practical application of the photocatalytic water splitting for hydrogen production. The objective of this study is to develop a new photocatalytic hydrogen production system employing genetically engineered biocatalysts. In particular, the generation of new whole-cell biocatalysts with both photoconversion and hydrogen formation activities were investigated. First, the enhancement of porphyrin derivatives bioproduction in *Escherichia coli*, their isolation and purification from the culture, and their photocatalytic methylviologen reduction properties were investigated. By introducing the gene encoding aminolevulinic acid synthase, which catalyzing a rate limited step of porphyrin production pathway in *E. coli*, porphyrin derivatives were synthesized by the host and accumulated in the culture. The accumulated porphyrin was purified from the culture and identified as Zn-uroporphyrin III. Furthermore, the photocatalytic reduction of methylviologen by Zn-uroporphyrin was confirmed. Second, the combination of the photocatalytic MV reduction by biologically produced porphyrin and the hydrogen production reaction with reduced MV by recombinant whole-cell of *E. coli* expressing hydrogenase genes were tested. Hydrogen was produced under light irradiation from the reaction. This result demonstrated that the biologically produced porphyrin dye acted as photosensitizer in the system. On the other hand, generation of the recombinant cells with both enhancement of porphyrin production genes and introduction of hydrogenase genes in one *E. coli* cell is under investigation and will be reported in future work.