

微生物による物質生産と共役させる光駆動型の NAD(P)H 再生系

本田 裕樹

奈良女子大学大学院 自然科学系

研究成果

大腸菌のポルフィリン色素生合成系の強化により、培養液および菌体に著量のポルフィリン色素（主に亜鉛が配位したウロポルフィリン III）を蓄積できることを明らかにした。精製した Zn-ウロポルフィリンと NAD⁺、トリエタノールアミンを含む反応溶液に光照射をしたところ、NAD⁺は酵素的に不活性な NAD ダイマーへと変換され、光駆動型 NADH 再生系の構築には至らなかった。一方、精製した色素によって、人工補酵素として利用されるメチルビオローゲンの光触媒的還元には成功し、当該反応とヒドロゲナーゼ反応を組み合わせることで光駆動型の水素生産が可能であることを示した。

研究の目的

反応の進行に NADH や NADPH 等の補酵素や電子伝達体からの還元力の供給を要求する酵素は、そ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。本研究では、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補酵素再生系の構築を模索した。

方法

光触媒的な補酵素の還元に向け、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新規な補酵素再生系の構築を目指した。具体的には、第一に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、第二にポルフィリン色素を分子光触媒とする NAD(P)H の光触媒的再生反応、第三に色素を用いるメチルビ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。

結果

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した。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 つの遺伝子を導入した。当該大腸菌を 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した（図 1A）。この培養上

清に対して、陰イオン交換樹脂 DEAE sephadex A-25 を添加し樹脂に色素を吸着後、洗浄、溶出することで色素を精製した (図 1B)。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 であることが明らかになった (図 1C)。培養条件、培地への亜鉛の添加等を検討し、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ことに成功した。

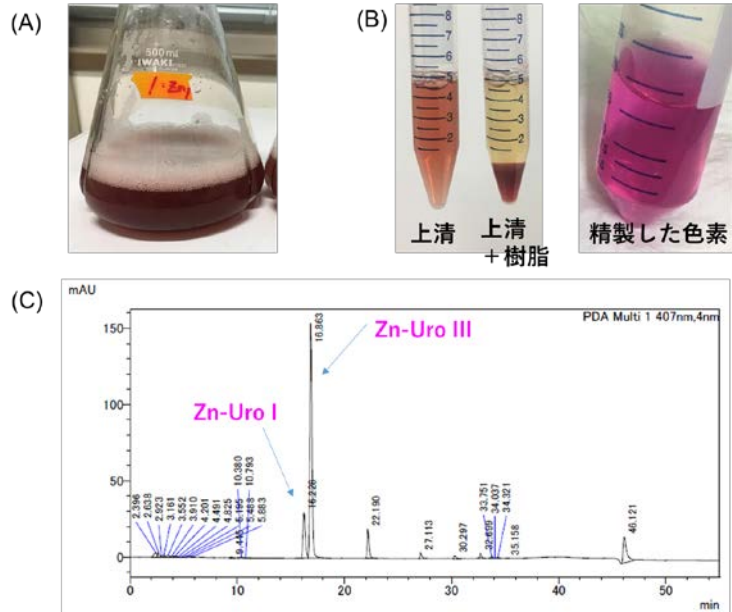


図 1 ポルフィリン色素合成系を強化した大腸菌による色素の生成
(A) 大腸菌培養液の様子、(B) 培養上清からの色素精製、(C) HPLC 分析

2. ポルフィリン色素を分子光触媒とする NAD(P)H の光触媒的再生反応

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^\cdot がさらにもう一段還元されるよりも、2つの NAD^\cdot 分子から NAD ダイマーが生じる反応が優先することに起因する。 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。

3. メチルビオローゲンの光還元反応と水素生産反応への適用

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繁に利用されるメチルビオローゲン (MV^{2+}) の光触媒的な還元を試みた。中性緩衝液中に、 MV^{2+} と TEOA を添加し、405 nm の光照射を実施した。光照射依存的に $\text{MV}^{\cdot+}$ が生成することが確認できた (図 2A, B)。この MV 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発現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)。色素溶液と大腸菌懸濁液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)。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。今後さらに、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

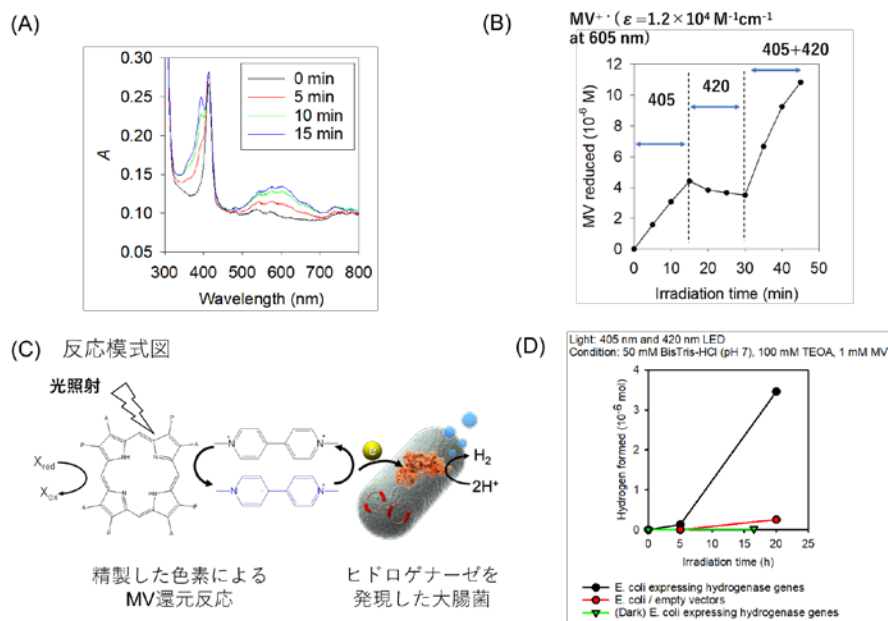


図2 精製したポルフィリン色素を用いるMV還元と水素生産
 (A) 反応溶液への光照射によるスペクトル変化、(B) MV還元量、
 (C) 水素生産反応の模式図、(D) 水素生産量

菌に対して行うことを検討したい。

結論

大腸菌に対してポルフィリン色素合成を強化することで、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。現状では本研究で目指したNADH再生系の適用に成功していないが、生合成させた色素を分子光触媒として用いることで、物質生産用の酵素反応を光によって駆動するという本研究の目指す方向性の一部を実証することができた。

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た¹⁾。

文献

- 1) Honda, Y., Nanasawa, K., and Fujii, H. (2018) Coexpression of 5-aminolevulinic acid synthase gene facilitates heterologous production of thermostable cytochrome P450, CYP119, in holo form in *Escherichia coli*. *ChemBioChem* **19**: 2156-2159.