

研究報告書

「蛋白質工学的アプローチによる高効率ギ酸生産藻類の設計」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 伊原 正喜

1. 研究のねらい

本研究の狙いは、太陽光による安価で環境負荷の小さい再生可能エネルギー生産システムの構築である。この目標を実現するために、藻類の利用が、もっとも有効な方法の一つであると考えられる。なぜなら、藻類は簡単な水槽や池などで増殖できるために、広大な面積に展開することも容易であり、設置コストも低く抑えることができるからである。しかし、天然の藻類は、人類にとって有用なエネルギーを生産するように最適化されていない。そこで、蛋白質工学に基づいた代謝工学によって、藻類内に強力な人工的なバイオエネルギー生産系を構築することが求められている。

本研究では、全く新しい試みとして藻類による高効率ギ酸生産システムを目指す。ギ酸は高エネルギー物質であるが、水素と異なり水溶性であるために輸送や貯蔵が容易であり、必要時には水素に転換して気相に回収できるなど、エネルギー媒体として非常に優れている。またギ酸は、光合成過程で生じた還元力と、ギ酸脱水素酵素(FDH)の触媒能によって、二酸化炭素の直接的還元によって生産することが理論的に可能である。

天然の光合成過程では、2つの光合成反応中心(PSI及びPSII)での二段階光誘起電子移動によって、PSIから強い還元力が放出されるが、この還元力はNADPHを介してカルビン回路に伝達され二酸化炭素還元を利用される。この二酸化炭素還元反応は、光合成全体の律速であるために、効率化を目指した研究が進められている。我々は、二酸化炭素還元の新しい人工的な経路として、還元力を直接的にFDHへと伝達する経路を設計することで、高効率に二酸化炭素をギ酸というエネルギー物質に変換するシステムが構築できることを提案してきた(図1)。そのために、FDHの過剰発現やPSIとFDHとの複合体の設計などを試みる必要がある。さらには、

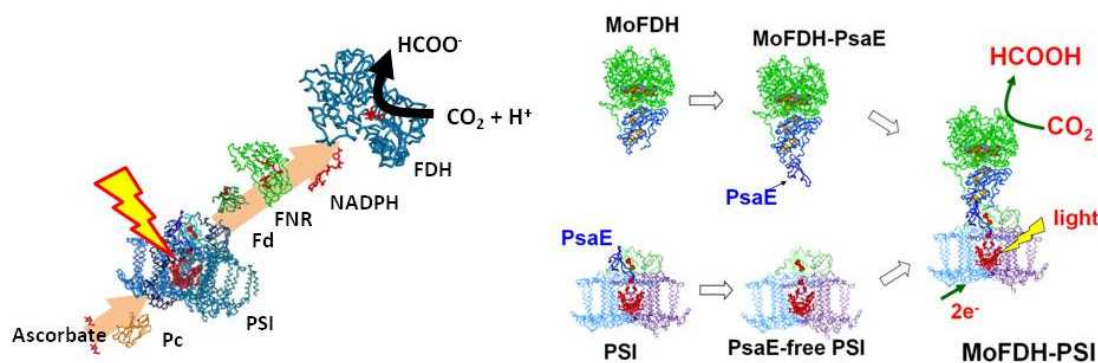


図1、本研究でめざす光駆動ギ酸生産系

NAD(P)H-FDHとPSI-Fd-FNR電子リレー系との組合せによるギ酸生産系(左)と、

Mo-FDHとPSIとの複合体によるギ酸生産系(右)

ギ酸の効率的な細胞外排出のためのイオンポンプの導入などを試みる必要がある。本研究では、これら実用化に向けた基本技術の開発に加え、*in vitro* や *in vivo* でのモデルシステムによるコンセプトの実証を行い、世界に先駆けて本提案を発信する予定である。

2. 研究成果

(1)概要

研究成果は、①ギ酸生産、②水素生産、③イソプレノイド生産に分けることができる。さらに、①については、NADPH を電子キャリア兼活性中心とする NADPH-FDH と、モリブデン錯体であるモリブドプテリンを活性中心に持つ Mo-FDH を利用したギ酸生産に分けることができる。

①-1、NADPH-FDH によるギ酸生産

光合成明反応で合成される NADPH を電子ドナーとした NADPH 依存型 FDH による光依存的ギ酸生産系構築のために、まず FDH にランダムなアミノ酸置換を導入し、NADPH に高い反応性を持ち且つギ酸生成能の高い FDH 変異体を創製した。さらに、この FDH 変異体と、PSI 及びフェレドキシン、フェレドキシン-NADP⁺還元酵素による NADPH 生成系とを組み合わせた光駆動系を検討し、細胞内外において、ギ酸生産に成功した。

①-2、Mo-FDH によるギ酸生産

PSI などの強い還元力を利用することができる Mo-FDH を利用することで、より効率的なギ酸生産系の構築を目指した。PSI と Mo-FDH は生理学的な電子伝達パートナーではないことから、生体内で PSI から Mo-FDH への効率的な電子伝達を実現するためには、両者をフレキシブルリンカーで連結する必要がある。そこで、Mo-FDH と PSI のサブユニットの一つである

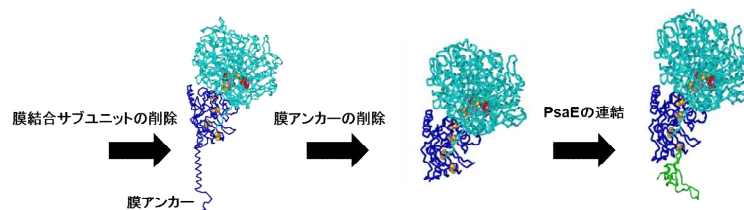
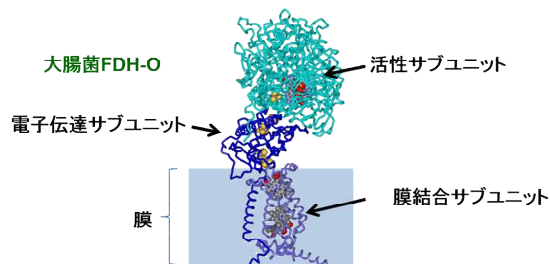


図2、膜結合FDH-Oの可溶化と、PsaE融合化

PsaE との融合蛋白質を作製し、PsaE を欠失した PSI に再構成することを考えた。これを実証するために、種々の Mo-FDH の組換え体発現系の構築を試み、大腸菌由来 FDH-O の発現系構築に成功した。大腸菌由来 FDH-O は膜蛋白質であるため、膜サブユニットを削除し、さらに PsaE を融合したところ、大きく不安定化することが明らかとなった(図2)。そこで、多数のアミノ酸置換を導入することで安定化に成功した。それによって、FDH-PSI 複合体の構築と光ギ酸生産に成功した。

②、ヒドロゲナーゼの改良

水素合成を触媒する酵素であるヒドロゲナーゼは、安定性向上が応用への課題とされている。そこで、ヒドロゲナーゼの分子進化工学手法による改良を目指して、発現系の開発、および変異ライブラリーの構築に成功し、活性が有意に向上した変異体の単離に成功した。

③、イソプレノイド生産

シアノバクテリアのイソプレノイド合成経路における律速酵素の改良にも成功し、さらに過剰発現によって、イソプレノイド生産性向上に成功している。

(2) 詳細

研究テーマ【①-1、NADPH-FDH によるギ酸生産】

光合成生物内で光依存的に合成された NADPH と NAD(P)H 型 FDH による光依存的ギ酸生産系(図1左)を構築するために、まず NADPH に高い反応性を持つ FDH 変異体の作製を行った。*Pseudomonas* sp. 101、*Candida boidinii*、potato、*Arabidopsis thaliana*、*Thiobacillus* sp.

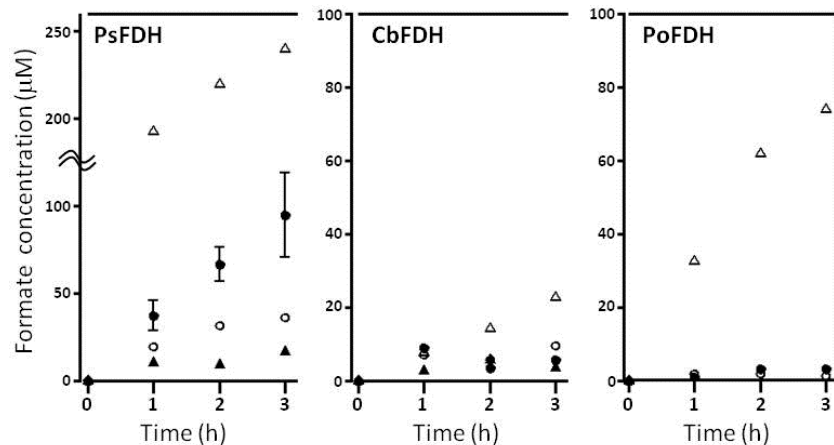


図3. FDH変異体によるNADPHを用いたギ酸生成活性

PsFDH: *Pseudomonas* sp. 101由来FDHの野生型および変異体(D222→Q)、CbFDH: *Candida boidinii*由来FDHの野生型および変異体(D197→Q)、PoFDH: Potato由来FDHの野生型および変異体(D199→Q)。△: 野生型FDH + NADH、○野生型FDH + NADPH、▲: 変異体FDH + NADH、●変異体FDH + NADPH。

KNK65MA の 5 種から NADH 依存型

FDH 遺伝子を単離し、大腸菌用発現系ベクターに組み込んだ。さらに、補酵素結合部位付近にランダムなアミノ酸変異を導入して、約30種類の FDH 変異体遺伝子を作製し、大腸菌内で発現させ、FDH 変異体蛋白質を精製した。それぞれの反応特性を調べた結果、NADPH に高い反応性を持ち且つギ酸生成能の高い *Pseudomonas* sp.101 FDH D222Q を見出した(図3)。このFDH変異体を、PSI及びフェレドキシン、フェレドキシン-NADP+還元酵素によるNADPH 生成系と組み合わせた結果、細胞外再構成系において、光駆動系ギ酸生産に成功した。

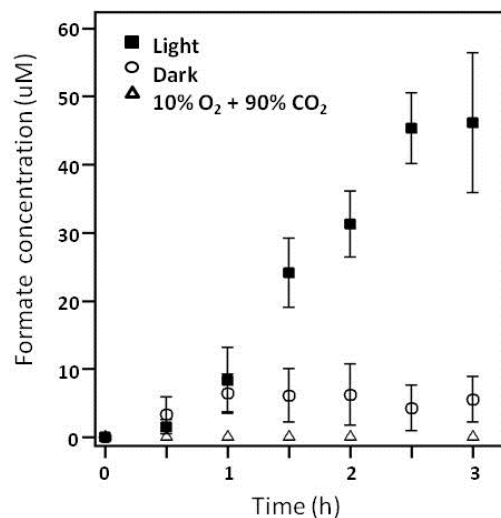


図4. FDH変異体と、PSI-FD-FNRによるNADPH光生成系との組合せによるギ酸生産

続いて、嫌気的な細胞内環境を持ち且つPSIを発現しているシアノバクテリア・ヘテロシスト内でFDH変異体を過剰発現することによって、細胞内光依存ギ酸生産系の構築を目指した。

そのために、FDH 変異体遺伝子をシアノバクテリア用シャトルベクターである pAM505 に挿入し、*Anabaena* sp. PCC7120 に導入した。形質転換体を窒素含有培地で培養した後に、窒素欠乏培地で培養することでヘテロシスト形成を促した。その結果、ヘテロシスト形成を顕微鏡観察によって、FDH 変異体蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで確認することができた。また、二酸化炭素 10%+アルゴン 90%雰囲気下の蛍光灯照射下でインキュベートした菌体を破碎し、破碎液をイオンクロマトグラフィーによって分析したところ、FDH 変異体遺伝子を導入していないコントロール細胞と比較して、ギ酸濃度が有意に増加していることが確認できた。さらなる改良として、ギ酸排出トランスポーターの導入を計画している。

研究テーマ【①-2、Mo-FDH によるギ酸生産】

FDHは触媒機構の違いから、2種類に分けることができる。1つは、NADH 依存型 FDH であり、もう一つは、モリブデン(Mo)もしくはタングステン(W)とプテリンから成る錯体を活性部位に持ち、電子供与体から電子を受け取り、活性部位を高い還元状態にすることで CO₂ をギ酸に還元する Mo 結合型 FDH である。NADH 依存型 FDH による CO₂ 還元反応は吸エルゴン反応であるため効率が悪いが、Mo 結合型 FDH による CO₂ 還元反応は、PSI 由来電子のような強い還元力を利用した場合は発エルゴンのためであり、効率的なギ酸生産が期待できる。

Mo-FDH に関する研究はこれまでほとんど報告されていないが、唯一、大腸菌由来のギ酸リアーゼの一部である FDH-H がよく研究されている。しかし、FDH-H は微量の酸素分子存在下で速やかに不可逆的に失活するために、触媒としての応用は困難である。我々は、今回様々な種の Mo 結合型 FDH について、酸素耐性(酸素分子によって不可逆的な失活が起こらない)、及び光耐性を評価したところ、大腸菌 (*E.coli*) 由来 FDH-O や *Desulfovibrio vulgaris* (*D.vulgaris*) 由来の Mo-FDH が比較的安定性が高いことを明らかにした。

そこで、それぞれの Mo-FDH を用いて、図1に示すような FDH-PSI 複合体を作製し、光エネルギーからの効率的にギ酸を生産できる系の構築を目指した。FDH-PSI 複合体作製は、まず FDH と PsaE との融合蛋白質(FDH-PsaE)を調製し、PsaE 欠失 PSI への再構成を行うことで可能となる。FDH-PsaE 融合蛋白質は、遺伝子レベルで FDH と PsaE を連結することで調製することができる。よって、我々は、遺伝子レベルでの *E.coli* FDH-O もしくは *D.vulgaris* Mo-FDH と PsaE との連結と、それらの発現系の構築から着手した。

E.coli FDH-O は、図2に示す通り、モリブデンを含む活性サブユニットと、電子授受を媒介する電子伝達サブユニットに加えて、膜結合サブユニットを有している。また、電子伝達サブユニットの C 末端ドメインは、膜や膜結合サブユニットとの結合に関与しているが、このドメインは PSI との電子伝達の障害になることが予想されるために、FDH-PsaE を作製する際には、膜結合サブユニットや電子伝達サブユニット C 末

端ドメインを削除した上で、PsaE を融合する必要がある(図2)。まず発現系の宿主として、FDH-O 及びホモログである FDH-N をコードする遺伝子をすべて破壊した *E.coli* を作製した。次に *E.coli* FDH-O の活性サブユニットをコードする遺伝子と、C 末端ドメインを削除した電子伝達サブユニットに PsaE を融合させた蛋白質をコードする遺伝子をプラスミドに乗せて導入した。この際、電子伝達サブユニットと PsaE の間には、5、10もしくは15残基のアミノ酸を有するリンカーを挿入した。その結果、アミノ酸10残基のリンカーを有する FDH-PsaE 融合蛋白質のみが活性型として発現することを見出した。しかし、この融合蛋白質の精製を試みたところ、活性が急激に失われていた。

そこで、電子伝達サブユニットの C 末端ドメインや膜結合ドメインが欠失したことで、露出したと予想される部分にランダムなアミノ酸置換を導入して、約30種類の変異体を調製し、安定性を評価した(図5)。また、精製の効率化のために、Strep Tag II やヒスチジンタグの付加を検討した。その結果、精製後数日間活性を維持できる変異 FDH(A111T/A114S/I134E/Y138S/A141S/L150E)-10Link-PsaE-His を見出した。この変異体は、PsaE 欠失 PSI と会合体を形成し、さらに光照射によってギ酸生産が確認できた。

研究テーマ【②、ヒドロゲナーゼの改良】

水素合成を触媒する酵素であるヒドロゲナーゼは、酸素感受性の酵素である。この酵素を利用した水素生産において、酸素感受性問題はもっとも大きな課題であるが、その解決方法については全く手がかりが得られていない。そこで、ヒドロゲナーゼの分子進化学による改良を目指して、変異ライブラリーの構築に適した発現系の開発を行った。これまでも、宿主ベクター系によるヒドロゲナーゼ発現系は報告されているが、サイズの大きな広宿主域ベクターに、ヒドロゲナーゼ構造遺伝子と翻訳後修飾関連酵素遺伝子群を合わせて挿入していたため、ベクターサイズは非常に大きくなっていった。そのために、多様性の高い変異ライブラリーを作製することが不可能であった。そこで、今回、ヒドロゲナーゼ構造遺伝子のみを欠失させた水素細菌を宿主として利用し、ヒドロゲナーゼ構造遺伝子のみを挿入した小型の広宿主域ベ

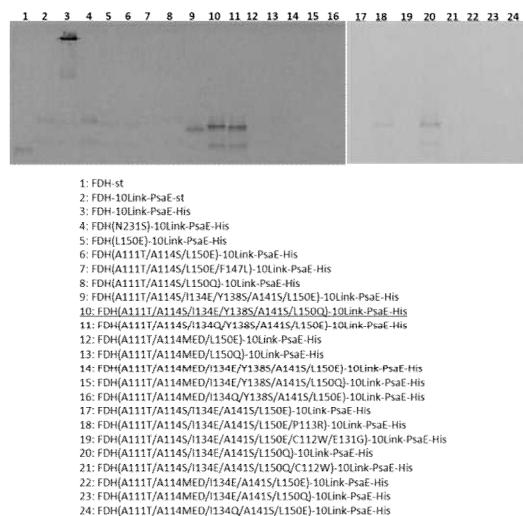


図5、様々なFDH-PsaE融合蛋白質変異体の評価
それぞれのサンプルは、NATIVE-PAGE後、ギ酸とベンジルビオローゲン、ニトロブルーを加えて、活性染色を行った

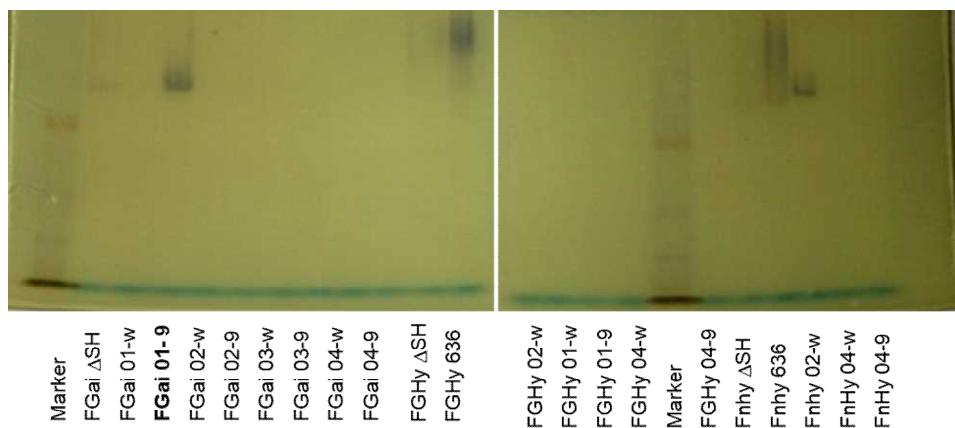


図6、様々な宿主とベクターの組み合わせでのヒドロゲナーゼ活性評価
それぞれのサンプルは、NATIVE-PAGE後、水素雰囲気下でベンジルビオローゲン、
ニトロブルーを加えて、活性染色を行った

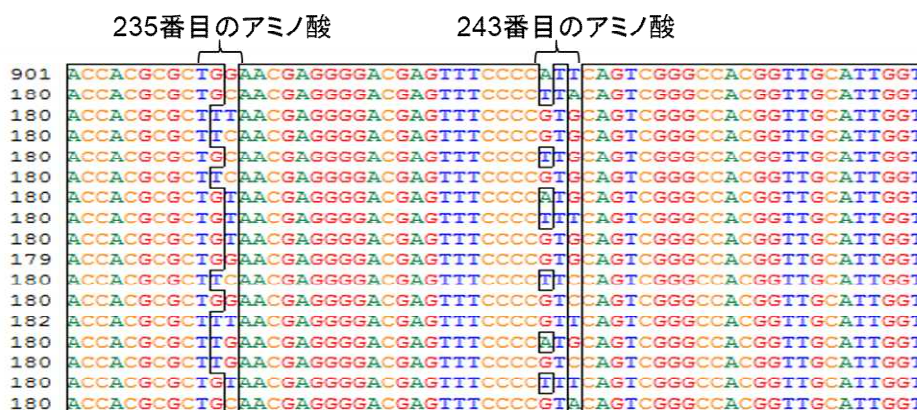


図7、鉄硫黄クラスター近傍へのランダム変異導入
無作為に選抜した16株のクローンの塩基配列を調べたところ、すべ
てに設計通りの変異が導入されていることが確認された

クターを導入する発現系を考案した。この発現系では、ベクターのサイズが7Kbp と小さく、電気穿孔法による遺伝子導入も可能であるために、多様性の高い変異ライブラリー作製が可能となる。しかし、実際に形質転換株内のヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、全く活性が観察されなかった。野生株では、ヒドロゲナーゼ構造遺伝子と翻訳後修飾関連酵素遺伝子はオペロンを形成しており、転写量はほぼ同じであるのに対して、我々の発現系では、ヒドロゲナーゼ構造遺伝子の発現量は、翻訳後修飾関連酵素遺伝子の約 7 倍と非常に高いレベルであった。そのため、ほとんどのヒドロゲナーゼが未成熟のまま分解されていることが考えられた。そこで、ベクターから提供されるヒドロゲナーゼ構造遺伝子と、宿主から提供される翻訳後修飾関連酵素遺伝子の転写量のバランスを取るために、ヒドロゲナーゼ上流のプロモーター領域に変異を導入して、ヒドロゲナーゼ転写活性を変えたベクターを数種類作製し、また翻訳後修飾関連酵素遺伝子上流のプロモーターに新たなプロモーターを挿入した宿主を作製し、それらを組み合わせた発現系を調製した。それぞれについて様々な条件で網羅的に評価を行ったところ、図6に示す通り、天然型と同等のヒドロゲナーゼ活性を示す組み合わせを見出すことに成功した。

続いて、ヒドロゲナーゼの酸素耐性に関与しているとされている近位鉄硫黄クラスターの近

傍にランダム変異を導入した変異ライブラリーを作製した(図7)。数千クローンの変異株の活性を確認したところ、水素酸化速度が 2 倍近く上昇した変異ヒドロゲナーゼの単離に成功した。この成果は、[NiFe]-ヒドロゲナーゼにおける初めての分子進化工学的実験の成功例である。

研究テーマ【③、イソプレノイド生産】

イソプレノイドは、イソプレンを構成単位とした化合物群であり、エネルギー物質や生理活性物質など重要な化合物を多く含むが、天然より得られる量は少なく、また合成も困難であることから、遺伝子工学などによって改良した藻類による生産が望まれている。すべてのイソプレノイドは、イソプレン骨格であるイソペンテニル2リン酸(IPP)とジメチルアリル 2 リン酸(DMAPP)を原料として合成されることから、IPP と DMAPP の合成経路である非メバロン酸経路(MEP 経路)の改良が生産向上の鍵を握っている。そこで、MEP 経路の律速段階を触媒する 1-デオキシキシルロース-5-リン酸合成酵素(Dxs)の過剰発現を、シアノバクテリア内で試みた。その結果、対数増殖期の前半において、野生型と比較して約4倍の転写量の増加と、約 1.5 倍の Dxs 蛋白質発現量の増加が観察されたが、対数増殖期の中ごろから急激に低下した。その結果、対数増殖期の前半においては、野生型と比較して、約 1.5 倍のイソプレノイド含有量の増加が観察されたが、対数増殖期中期以降はほとんど同じレベルであった。

以上の結果から、転写活性の低下が課題であることが明らかとなった。そこで、対数増殖期の前半から、定常期、死滅期までの様々な培養ステージから mRNA を抽出し、次世代シーケンズによるトランスクリプトーム解析を行っており、定常的に発現が期待できるプロモーターや、転写制御 ncRNA をいくつか見出した。

また、多くの Dxs 蛋白質は不溶型(不活性型)として存在していることが明らかとなり、転写量を増やしても活性型蛋白質発現量の増加に繋がらないことが示唆された。そこで、多くの種から Dxs 遺伝子をクローニングし、大腸菌での異種発現性や、活性、安定性、DMAPP による阻害効果を評価した結果、有望な Dxs の特定に成功しており、現在新たに見出したプロモーターとともに、シアノバクテリアに導入する予定である。

3. 今後の展開

①、ギ酸排出系の構築

水溶性であるギ酸は、細胞の脂質二重膜を通過できない。そのために、効率的な排出系は存在しない場合、細胞内に蓄積して悪影響を及ぼすことになる。そこで、大腸菌由来のギ酸排出系である FocA のシアノバクテリア内発現を試みている。特にヘテロシスト内膜と、栄養細胞外膜に、局在化させることで、ヘテロシスト内で生産されたギ酸をペリプラズム経由で細胞外に排出することが期待されるために、蛋白質の局在化に関与する様々なシグナルペプチドを付加した FocA 発現系を設計している。

②、Mo-FDH のさらなる改良

今回我々は可溶型の組換え Mo-FDH の発現系構築に成功し、安定化や PsaE 融合化に成功している。しかし、発現量は低く、純度の高い精製蛋白質を得ることが困難である。そこで、さらな

る改良のために、ランダム変異の導入とともに、ハイスループットスクリーニング系の開発を行う。具体的には Mo-FDH 活性依存的な増殖を示す大腸菌宿主の創出や、Mo-FDH 発現株のカプセル化とギ酸生成活性依存的な呈色系の開発を目指す。

③、Mo-FDH 翻訳後修飾遺伝子の同定と、シアノバクテリア内発現系の構築

Mo-FDH は翻訳後修飾によって活性型と成熟するが、その過程は全く不明のままになっている。そのために、大腸菌遺伝子破壊株ライブラリーを利用して Mo-FDH 翻訳後修飾に必須と推定できる遺伝子の同定を目指す。

④、酸素耐性評価方法の開発

ヒドロゲナーゼや FDH は、酸素存在下では活性を発揮できない。この酸素感受性は、ヒドロゲナーゼや FDH と PSI を組み合わせたエネルギー生産系における最大の障害である。しかし、それらの酸素感受性について、様々な種由来のヒドロゲナーゼもしくは FDH 間で直接的に比較評価された報告例はない。これは、現状において、酸素感受性を正確且つ直接的に評価できないために、アミノ酸変異導入と酸素感受性の相関関係を明らかにされず、研究を前に進めることができていないことを反映している。そこで、ヒドロゲナーゼや FDH の活性中心錯体の酸化還元に伴う振動スペクトル変化を経時観測することで、酸素感受性を正確且つ直接的に評価できると考え、時間分解 IR 測定や時間分解共鳴ラマン測定を試みている。

⑤、強力なイソプレレン合成系の構築

IPP と DMAPP の合成経路である非メバロン酸経路 (MEP 経路) の改良をめざし、MEP 経路を構成するすべての酵素について、安定性・活性ともに高い酵素の探索を行う。それら高安定性・高活性酵素でオペロンを構築し、様々なプロモーターや転写制御機構と組み合わせた強力な MEP 経路を構築する。

⑥、実用的な宿主の探索

藻類による物質生産の最も重要なボトルネックの一つは、大規模培養である。しかし、これまで大規模培養という実用化からの視点に立脚した宿主の選択は行われていない。宿主が決まっていない中で、代謝工学や蛋白質工学による改良を進めても、出口を見据えていないことから、開発が無駄になることが懸念される。そこで、安い培地で純粋培養が可能で、生産物の回収も容易な宿主の探索を行い、大規模培養に有利な宿主を決定し、これをグローバルスタンダードとして確立することを目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

当初の予定であった、NADPH 型 FDH による細胞内外光ギ酸生産と、Mo-FDH と PSI との複合体による細胞外光ギ酸生産の実証に成功した。また、ギ酸デヒドロゲナーゼやヒドロゲナーゼといった発現がこれまで非常に困難とされてきた酵素の発現系構築に成功し、さらに分子進化工学的手法による改良にも成功したことは特筆できる成果であると自負している。また、シアノバクテリアの改良にも着手し、イソプレノイドの増産という困難な取り組みにおいて一定の成果を挙げたことは、今後の実用化に向けた取り組みへの足掛かりになったと考える。しか

し、さがけ採用と同時に信州大学への異動となり、研究室の立ち上げ(途中耐震工事による引っ越しも含む)に時間を費やしたことや、研究室運営に不慣れであったこと、ほとんどが新しい実験系であったことなどから、研究の進行速度は期待通りとはいかず、特に論文として成果を発表することが遅れていることは大きな反省点である。研究成果の科学技術への波及効果については、独自の蛋白質ベースの物質生産方法を提案できたことや、有用な発現系や分子進化工学的手法を構築できたことは、意義があったと考える。社会・経済への波及効果については、ギ酸デヒドロゲナーゼやヒドロゲナーゼという産業上有用な酵素の改良方法や調製方法を確立したことで、ある一定の効果はあると考えるが、酸素耐性などについての評価の必要があることから、実用化にはまだ時間がかかると思われる。しかし、藻類内に人工的で効率的なシステムを構築することは、究極の物質生産方法の一つであり、今後も取り組むべきテーマであるとする。

(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)

本研究は、ヒドロゲナーゼによる水素発生についての伊原博士の先駆的な業績を基礎にしながらも、新たにエネルギーキャリア物質としてのギ酸に注目し、その生産を太陽光により蛋白質工学的アプローチにより最適化した藻類生物系システムでおこなうという大変意欲的な提案である。藻類の機能改変による人工光合成の試みは数多いが、その多くはヒドロゲナーゼを利用する水素発生に限られているので、本研究が目的通りに展開すれば当該領域に非常に大きいインパクトを与えるものである。しかしながら、細胞内でギ酸を生成する際の細胞毒性、ギ酸脱水素酵素(FDH, Mo-FDH など)を新規に細胞内に適用する困難さ、還元酵素は極めて酸素耐性が低いことの困難さ、最適の酵素変異体作成方法(発現系)をいかに早く、効率よく開発するか課題、などを始め多くの困難が予想された。研究開始時の異動や研究環境の整備などによる若干の誘導期間はあったが、これまでに細胞外再構成系において、光照射によるギ酸生産に成功し、細胞内でも、シアノバクテリア・ヘテロシスト内で FDH 変異体を過剰発現させ、光照射によるギ酸生成に成功している。さらに進んで、光化学系 I (PSI) が光照射で汲み出す還元力の高い電子を直接利用し得る Mo-FDH 系の構築に挑戦した。光化学系 I (PSI) と PsaE サブユニットを介した Mo-FDH 直接接合系ではより高効率のギ酸生成が期待される。さがけ研究期間の後半は、多くの困難を逐次、タンパク質工学手法を駆使し熱意溢れる研究努力と科学センスで見事に乗り切り Mo-FDH 系でも光照射によるギ酸生産に成功した。ギ酸生成以外に、水素発生、イソプレノイド生成への取り組みも同時進行させており興味深い多くの成果が得られている。特に水素生成に関連する[NiFe]-ヒドロゲナーゼについて、変異株でその活性を2倍近くに高めることに成功している。これは分子進化工学の実験の成功例として特筆されるものであろう。以上のように井原博士は研究開始当初の誘導期間を経て、着実に各段階を踏んで加速度的に研究進展させておりその熱意溢れる挑戦姿勢は高く評価される。さらなる高効率化や細胞内で生成したギ酸を細胞から排出する経路の構築など今後の一層の加速度的な研究進展を期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M. Ihara, H. Takagi, T. Hoshika and H. Ueda ““Quenchbodies”: quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence” J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 17386–17394.
2. M. Ihara, Y. Kawano, M. Urano and A. Okabe “Light Driven CO₂ Fixation by Using Cyanobacterial Photosystem I and NADPH-dependent Formate Dehydrogenase” PLOS one, 2013, 8, e71581.
3. Y. Kawano, M. Sekine and M. Ihara “Identification and characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase in Anabaena sp. PCC 7120” J. Biosci. Bioeng., 2013, 117, 531–538.
4. K. Kudoh, Y. Kawano, S. Hotta, M. Sekine, T. Watanabe and M. Ihara “Prerequisite for highly efficient isoprenoid production by cyanobacteria discovered through the over-expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and carbon allocation analysis” J. Biosci. Bioeng., 2014, 118, 20–28.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件(内、平成 27 年 6 月現在で非公開 2 件)

1.

発 明 者: 伊原正喜、河野祐介

発明の名称: [NiFe]-ヒドロゲナーゼの発現系

出 願 人: 信州大学

出 願 日: 平成 25 年 1 2 月

出 願 番 号: 特願 2013-249437

2.

発 明 者: 伊原正喜、河野祐介

発明の名称: 可溶型ギ酸デヒドロゲナーゼの発現系

出 願 人: 信州大学

出 願 日: 平成 25 年 1 2 月

出 願 番 号: 特願 2013-255225

(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)

1, M. Ihara “Protein engineering to create algae with high formate productivity” International Symposium on Chemical Conversion of Light Energy, Kinki University, Mar 2010.

2. 伊原正喜、河野祐介「光合成を利用した直接的光-水素変換系の設計」CREST 有機太陽電池シンポジウム、京都大学、2011 年 7 月

3. 伊原正喜「藻類の物質生産能の改良」理化学研究所バイオナノ科学セミナー、理化学研究所和光本所、2011 年 11 月

4. M. Ihara “Protein engineering to create algae with high formate productivity” 「人工光合成研究の最前線 -挑戦する若手研究者-」JST さきがけ「光エネルギーと物質変換」研究成果報告会、立命館大学、2013 年 3 月

5. 伊原正喜「分子進化工学的手法によるギ酸デヒドロゲナーゼ及びヒドロゲナーゼの改良」理研シンポジウム第 9 回「バイオものづくり」シンポジウム、理化学研究所和光本所、2014 年 3 月
6. M. Ihara “Protein Engineering to create algae with high formate productivity” The 2013 OCARINA Annual International Meeting, Osaka City University, Mar 2014.
7. M. Ihara “Prerequisite for highly efficient isoprenoid production by cyanobacteria discovered through the over-expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and carbon allocation analysis” Second International Symposium on ENERGY CHALLENGES & MECHANICS, Aberdeen, Scotland, Arg 2014.
8. 伊原正喜「光化学系 I と酸化還元酵素との組み合わせによる水素およびギ酸光駆動生産系」2011 世界化学年”記念 JST さきがけ研究領域合同シンポジウム-人類の危機に挑む研究開発 光と太陽エネルギー-、神奈川大学横浜キャンパス、2011 年 3 月
9. 河野祐介、早乙女敏行、伊原正喜、池内昌彦「好熱性シアノバクテリアにおけるセルロース生成とその機能」日本光合成学会第2回年会、京都大学百周年時計台記念館、2011 年 6 月
10. 伊原正喜「光合成と酸化還元酵素の新たな組み合わせによる光駆動物質生産系の設計」日本光合成学会第2回年会、京都大学百周年時計台記念館、2011 年 6 月
11. 伊原正喜「光合成と酸化還元酵素の新たな組み合わせによる光駆動物質生産系の設計」第 1 回「フォーラム：人工光合成」、科学技術振興機構東京本部、2012 年 1 月
12. M. Ihara “Light-driven hydrogen and formate generation systems composed of photosystem I and redox enzymes” JST-PRESTO International Joint Symposium on Photo-Science Leading to a Sustainable Society: Environment, Energy, Functional Materials、慶応義塾大学日吉キャンパス、2012 年 3 月
13. 河野祐介、伊原正喜「シアノバクテリアにおける糖ヌクレオチドピロホスホリラーゼの基質特異性とセルロース大量生産株の設計」日本光合成学会第3回年会、東京工業大学すずかけホール、2012 年 6 月
14. 藤原祐輔、河野祐介、伊原正喜「Anabaena sp. PCC 7120 ヘテロシスト内におけるヒドロゲナーゼ-光化学系 I 複合体構築」日本光合成学会第3回年会、東京工業大学すずかけホール、2012 年 6 月
15. 工藤海、河野祐介、伊原正喜「Synechocystis sp. PCC 6803 の非メバロン酸経路改変によるイソプレノイド生産増加」日本光合成学会第3回年会、東京工業大学すずかけホール、2012 年 6 月
16. 伊原正喜「蛋白質工学的アプローチによる高効率ギ酸生産藻類の設計」第2回「フォーラム：人工光合成」、東京工業大学蔵前会館、2012 年 12 月
17. 工藤海、河野祐介、伊原正喜「Synechocystis sp. PCC 6803 の非メバロン酸経路改変によるイソプレノイド生産増加」日本光合成学会第4回年会、名古屋大学野依記念学術交流館、2013 年 5 月
18. 工藤海、河野祐介、伊原正喜、大津巖生、高木博史「Anabaena sp. PCC 7120 における UDP グルコースピロホスホリラーゼの同定と生化学的解析」日本光合成学会第4回年会、名古屋大学野依記念学術交流館、2013 年 5 月
19. 藤原祐輔、河野祐介、伊原正喜「Anabaena sp. PCC 7120 ヘテロシスト内におけるヒドロ

ゲナーゼ-光化学系 I 複合体構築」日本光合成学会第4回年会、名古屋大学野依記念学術交流館、2013 年 5 月

20. 伊原正喜「可溶性ギ酸デヒドロゲナーゼの創出」第3回「フォーラム：人工光合成」、立命館大学、2013 年 10 月

21. 伊原正喜「蛋白質工学的アプローチによる高効率ギ酸生産藻類の設計」第4回「フォーラム：人工光合成」、名古屋大学東山キャンパス、2014 年 3 月

22. M. Ihara “Protein engineering to create algae with high formate productivity” 「人工光合成研究の最前線 -挑戦する若手研究者-」JST さきがけ「光エネルギーと物質変換」研究成果報告会、名古屋大学東山キャンパス、2014 年 3 月

23. 工藤海、河野祐介、堀田真吾、関根翠、渡邊敬文、伊原正喜「シアノバクテリアにおけるイソプレノイド生産を目指した DXS 過剰発現および炭素局在解析」日本光合成学会第5回年会、近畿大学奈良キャンパス、2014 年 5 月

24. 関根翠、河野祐介、工藤海、伊原正喜「Anabaena sp. PCC7120 におけるセルロース生産能の改善」日本光合成学会第5回年会、近畿大学奈良キャンパス、2014 年 5 月

25. M. Ihara, T. Kudo, M. Mizuguchi, I. Matsuno “Soluble-type Escherichia coli Formate dehydrogenase and its application for the light-driven carbon dioxide reduction” 2014 International Conference on Artificial Photosynthesis, Awaji Umebutai International Conference Center, Nov 2014.