

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006 年度～2008 年度  
 課題番号：18770116  
 研究課題名（和文） 生物による水素エネルギー生産を目指した光合成の水分解機構と分子構造に関する研究  
 研究課題名（英文） Molecular structure and function of water oxidation in Photosystem II: for application to hydrogen production  
 研究代表者 杉浦 美羽 (SUGIURA MIWA)  
 愛媛大学 無細胞生命科学工学研究センター・准教授  
 (研究者番号：80312255)

## 研究成果の概要：

光合成によるエネルギー変換機能を改良して新規エネルギー生産に応用することを目的として、その初発の反応である水の酸化機能を高めた組換え体の作製を試みた。遺伝子組換えによって遺伝子の発現を制御したり、光化学系 II 反応中心のアミノ酸を変えることにより、水の酸化機能を 1.8 倍高めることに成功した。更に機能を高める目的で、水の酸化で生じた電子を受け取る +1.2 V の高い酸化還元電位を持つ P<sub>680</sub> クロロフィルのリガンドアミノ酸を別のアミノ酸に置換したところ、水の酸化には殆ど影響しないことが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,800,000	0	2,800,000
2007 年度	500,000	0	500,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	150,000	3,950,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：(1) 生体エネルギー変換 (2) 光合成電子伝達系 (3) 酸素発生 (4) 部位特異的変異 (5) 好熱性ラン藻

## 1. 研究開始当初の背景

植物や藻類による光合成は、人類のエネルギー源を作る重要な反応である。食物のみならず、我々の生活に欠かせないエネルギー源となる化石燃料もまた、光合成

産物由来である。しかし、化石資源の枯渇の観点から、水素エネルギーやバイオマス等のクリーンな新しいエネルギーを主なエネルギー源として、実用化を考えなければならぬ。

エネルギー効率が良く、副産物が水のみ

である水素は新規エネルギーとして注目されているが、その製造方法には多くの解決すべき課題を抱えている。現在、水素の生産量は1年間に500億Nm<sup>3</sup>にのぼる。しかし、その97%は化石燃料を材料にして水蒸気を反応させて作られているため、クリーンな水素を得る為にCO<sub>2</sub>発生を伴う材料を使っているという矛盾がある。また、化石燃料を材料としているので、化石燃料の枯渇問題の解決にはなっていない。

CO<sub>2</sub>を排出せず、化石燃料を使わないで水素を製造するには、地球の7割を覆っている豊富な水から再生エネルギーを利用して水素を作ることが理想的である。実際、水を分解して水素を得るために、光触媒や金属錯体による技術の開発が進められているが、太陽光（可視光）の利用、分解効率の改善、低コスト化などが大きな課題となっており、実用化には至っていない。従って、水を材料として、太陽光、特に可視光を利用でき、低コストで、CO<sub>2</sub>発生を極力抑えた水素製造方法の開発が求められている。

光合成生物に着目すると、彼らは太陽光エネルギーを用いてまず、水から電子を引き抜き、酸素と水素イオンを作っている。つまり、太陽光で電気分解と同様の反応を行っているのである。この初発の反応で生じた水素イオンを取り出し、還元して水素ガスにし、水素エネルギーとして利用すれば、効率良いエネルギー生産の方法に応用できると期待できる。この時、より多く水素イオンを作る反応系を作る、つまり、より速い水分解反応システムを作れば、より効率的である。その為には、まず光合成の水の酸化機構について十分に知らなければならない。本研究では、光合成の水の酸化反応機能について、分子レベルで明らかにすることを目標とした。

## 2. 研究の目的

光合成による水の酸化については、4Mn-1CaのMnクラスターを触媒中心とした分子構造がようやく明らかにされつつあるだけで、分子機構、特に効率良く電子を引き抜く機構については全く分かっていない。水の酸化反応では、触媒中心の構造が鍵になっていることは事実で、申請者がクラスターの一部であるCaをSrに置換した変異体では、

細胞は生育するものの、酸素放出のキネティクスが2倍近く遅くなっていた。また、Mnのリガンドのアミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異体では酸素発生活性が無くなったという報告もある。しかし、酸素発生活性が高くなる変異体の報告は、これまでにない。野生型のクラスター構造は、既に水酸化の最適状態に仕上がっているように見える。

そこで、本研究ではクラスターで生じた電子を受け取る2量体クロロフィルP<sub>680</sub>に着目した。この酸化還元電位は当然のことながら水のそれよりも高く、生物界で最も高い+1.2Vと推定されている。この酸化還元電位を更に上げることができれば、より速い水の酸化、あるいは光合成による効率良い水素イオンの発生、化学エネルギーへの変換を期待できると申請者は考えた。実際に研究代表者は、P<sub>680</sub>の近傍に存在するアミノ酸の水素結合ネットワークに着目し、アミノ酸置換によってネットワークを壊した光化学系IIでは、P<sub>680</sub>上のカチオンの平衡が片側に寄り、P<sub>680</sub><sup>+</sup>の還元速度、つまりMnクラスターからの電子伝達速度が速くなったことを既に報告している。

本研究課題では、光合成による水の酸化メカニズム、特に効率良く水の電子を引き抜くために、どのようにしてP<sub>680</sub>が高い酸化還元電位を保持しているのかについて、P<sub>680</sub>周辺のアミノ酸を置換した更なる遺伝子組換え体を作製し、その構造と水の酸化機能との関係について調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 部位特異的にアミノ酸を置換した *T. elongatus* 組換え体の作製および組換え体のゲノムDNAの解析

*psbA1* と *psbA2* をノックアウトするために、好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* の *psbA1* の ORF の上流約 1,000 bp と *psbA2* の ORF の下流約 1,000 bp をクリーニングし、それらの間に抗生物質耐性遺伝子カセットを挿入したプラスミド DNA を構築した。これをエレクトロポレーションによって *T. elongatus* 細胞に導入し、相同組換えによってゲノム DNA を置き換えた。組換え体は抗生物質を含む寒天培地で選抜し、全てのゲノムコピーが置き換わったことを、ゲノム DNA

を PCR で増幅させることにより、確認した。

D1-His332 を Gln および Ala に置換した変異体を作製するために、*psbA3* 遺伝子をクローニングし、そこに変異を導入した。それに、選抜のために、抗生物質耐性遺伝子カセットを挿入したプラスミドを構築した。*psbA1* と *psbA2* をノックアウトした変異細胞を宿主にして、部位特異的変異を入れたプラスミドを導入し、組換え体を得た。全てのゲノムコピーが置き換わっていることは、PCR で増幅させ、更に制限酵素で切断することにより確認した。

#### (2) 光化学系 II 複合体の精製

組換え細胞を 16 L 培養し、細胞を破碎してチラコイド画分を得た後に、界面活性剤で可溶化した。組換え体の光化学系 II の 1 つのサブユニットである CP43 には His-tag を付けてあるので、可溶化したものを Ni<sup>2+</sup>-アフィニティカラムクロマトグラフィによって精製した。溶出には、リガンドアミノ酸と Mg<sup>2+</sup> との距離を考慮し、P<sub>680</sub> 変異体では His を、それ以外はイミダゾールを用いた。

#### (3) 水の酸化活性の測定

クラーク電極を用いて、連続飽和光を照射しながら、電子受容体 2,6-DCBQ の存在下で、25°C、pH6.5 で測定した。測定試料には精製した光化学系 II 複合体を用いた。

#### (4) 熱発光の測定

精製した光化学系 II 複合体試料を暗所で 1 時間インキュベートすることによって S1 状態にした後に、QA から QB への電子伝達を阻害する化合物である DCMU もしくはプロモキシニルを添加した。そこにキセノン閃光を 1 回照射して、77 K まで急冷した後に、40° C/min で熱を与え、発光をフォトンカウンターで検出した。機器は、筑波大学大学院の野口巧准教授が構築したのものを使った。

### 4. 研究成果

#### (1) *T. elongatus* の遺伝子組換え体の作製

好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* のゲノム DNA には、光化学系 II 反応中心タンパク質 D1 をコードする遺伝子が

3 つ(*psbA1*、*psbA2*、*psbA3*)存在する。これらのうち、*psbA1* が恒常的に発現しており、強光や紫外光などの光ストレス条件下では *psbA3* の発現が誘導される。本研究では、*psbA1* にコードされる D1(D1-1)と *psbA3* にコードされる D1(D1-3)の水の酸化機能の違いを調べ、更に、第一電子供与体である P<sub>680</sub> クロロフィルの D1 側のリガンドである 198 番目の His を Ala および Gln に置換した部位特異的変異体を作製するために、まず、*psbA1* および *psbA2* をノックアウトした組換え体を作製した。更に、それを宿主細胞にして *psbA3* に部位特異的変異を導入した組換え体を作製した。細胞あたり約 100 コピーある遺伝子が全て置き換わったことを、PCR および DNA の配列を解析することにより確認した。

#### (2) D1-1 および D1-3 で構成される光化学系 II の構造と機能の比較

光化学系 II 反応中心タンパク質である D1 は 360 アミノ酸から成るが、*psbA1* および *psbA3* にコードされる D1-1 および D1-3 の間で、21 アミノ酸残基が異なる。*psbA1* のみが発現する条件で培養した細胞、および、*psbA3* のみが発現するように *psbA1* と *psbA2* をノックアウトした組換え細胞を大量培養し、光化学系 II 複合体タンパク質を精製し、生化学的、分光学的、熱力学的解析により、D1-1 および D1-3 で構成される光化学系 II の構造と機能を比較した。

光合成によるエネルギー変換の初発の反応である水の酸化機能を調べたところ、D1-3 で構成される光化学系 II は、D1-1 で構成される光化学系 II よりも 1.8 倍の高い水の酸化活性を持っていることが明らかになった。両者の D1 のアミノ酸配列を比較すると、Pheo と水素結合できる距離にある 130 番目のアミノ酸が D1-1 では Gln、D1-3 では Glu である。また、Q<sub>B</sub> から約 10 Å の距離にある 212 番目と 270 番目のアミノ酸が D1-1 ではそれぞれ Cys と Ser であるのに対し、D1-3 では Ser と Ala である。そこで、Pheo-/Pheo の酸化還元電位の違いを熱発光で測定したところ、D1-3 の方が D1-1 よりも酸化還元電位が高くなっていることが分かった。更に P<sub>680</sub> と Pheo の電荷分離速度を測定したところ、D1-3 の方が速くなっていた。また、Q<sub>B</sub> 結合部位に結合できる化合物である DCMU およびプロモキシニルを単離した光化学系 II に結合させて電

子伝達を阻害して水の酸化活性を測定すると、D1-1 に比べて D1-3 へのブロモキシニルへの親和性が高かった。以上の結果より、D1-3 で構成される光化学系 II の方が D1-1 で構成されるものよりも高い水の酸化活性を持つのは、Pheo の電位が高いために P<sub>680</sub> との電荷分離が速くなるためであることが明らかになった。Q<sub>B</sub> 結合部位の違いが直接水の酸化速度に関係するとは考えられないが、この違いについては今後の課題としたい。

### (3) P<sub>680</sub> のリガンドアミノ酸の水の酸化機能における役割

光合成による水の酸化メカニズム、特に効率良く水から電子を引き抜くために、第一電子供与体となる P<sub>680</sub> が +1.2 V という生物界で最も高い酸化還元電位を保持していると考え、P<sub>680</sub> クロロフィル分子のリガンドであるアミノ酸 D1-His198 を Ala および Gln に置換した遺伝子組換え体を作製し、P<sub>680</sub> 周辺の分子構造と水の酸化機能への影響について調べた。

FTIR 測定により組換え体の分子構造を調べたところ、クロロフィルの Mg はそのまま残っており、Ala とクロロフィルの Mg<sup>2+</sup>の間には水分子が存在することを確認した。組換え細胞の表現型は、光に対して敏感になり、光アンテナの減少が認められたが、30 mV 程度の P<sub>680</sub><sup>+</sup>/P<sub>680</sub> の酸化還元電位の低下が認められたものの、予想よりも変化ははるかに小さく、P<sub>680</sub> のリガンドアミノ酸は構造の保持には必須であるが、P<sub>680</sub> の電位の保持には殆ど関わっていないことが分かった。また、水の酸化キネティクスやオシレーションパターン等を測定したが、野生型と部位特異的変異体の間で大きな影響の違いを認められなかった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

ー査読有りの論文ー

1. Boussac, A., Sugiura, M., Rutherford, A.W. and Dorlet, P.  
Complete EPR spectrum of the S3-state of the

oxygen-evolving Photosystem II  
*J. Am. Chem. Soc.* (2009) 131, 5050-5051

2. Rappaport, F. Boussac, A., Force, D. A., Peloquin, J., Brynda, M., Sugiura, M., Un, U., Britt, R. and Diner, B.  
Probing the coupling between proton and electron transfer in Photosystem II core complexes containing a 3-fluorotyrosine  
*J. Am. Chem. Soc.* (2009) 131, 4425-4433
3. Szczepaniak, M., Sugiura, M. and Holzwarth, A.R.  
The role of TyrD in the electron transfer kinetics in Photosystem II  
*Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* (2008) 1777, 1510-1517
4. Suzuki, H., Sugiura, M. and Noguchi, T.  
Monitoring water reactions during the S-state cycle of the photosynthetic water-oxidizing center: Detection of the DOD bending vibrations by means of Fourier transform infrared spectroscopy  
*Biochemistry* (2008) 47, 22024-11030
5. Murray, J.W., Maghlaoui, K., Kargul, J., Sugiura, M., and Barber, J.  
Analysis of xenon binding to photosystem II by X-ray crystallography  
*Photosynth. Res.* (2008) 98, 523-527.
6. Inoue-Kashino, N., Takahashi, T., Ban, A., Sugiura, M., Takahashi, Y., Satoh, K. and Kashino, Y.  
Evidence for a stable association of Psb30 (Ycf12) with photosystem II core complex in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803  
*Photosynth. Res.* (2008) 98, 323-335
7. Hughes, J. L., Rutherford, A. W., Sugiura, M. and Krausz, E.  
Quantum efficiency distributions of photo-induced side-pathway donor oxidation at cryogenic temperature in Photosystem II  
*Photosynth. Res.* (2008) 98, 199-266
8. Murray, J.W, Maghlaoui, K., Kargul, J., Ishida, N., Lai, T.-L., Rutherford, A.W., Sugiura, M., Boussac, A. and Barber, J.  
X-ray crystallography identifies two chloride binding sites in the oxygen evolving centre of Photosystem II  
*Energy & Environmental Science* (2008) 1, 161-166

9. Boussac, A., Verbavatzand, J.-M., and Sugiura, M.  
Isotopic labelling of Photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*  
*Photosynth. Res.* (2008) 98, 285-292
  10. Ishida, N, Sugiura, M., Rappaport, F., Lai, T.-L., Rutherford, A.W., and Boussac, A.  
Biosynthetic Exchange of Bromide for Chloride and Strontium for Calcium in the Photosystem II Oxygen-evolving Enzymes.  
*J. Biol. Chem.* (2008) 283, 13330-13340
  11. Aoyama, C., Suzuki, H., Sugiura, M. and Noguchi, T.  
Flash-induced FTIR Difference Spectroscopy Shows No Evidence for Structural Coupling of Bicarbonate to the Oxygen-Evolving Mn cluster in Photosystem II  
*Biochemistry*, (2008) 47, 2760-2765
  12. Sugiura, M., Boussac, A., Noguchi, T. and Rappaport, F.  
Influence of Histidine-198 of the D1 subunit on the properties of the primary electron donor, P<sub>680</sub>, of Photosystem II  
*Thermosynechococcus elongatus*  
*Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2008) 1777, 331-342
  13. Boussac, A., Sugiura, M., Lai, T.-L. and Rutherford, A.W.  
Low temperature illuminations of Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* by visible and near-infrared lights  
*Philos. Trans. R. Soc. Lond.: B. Biol. Sci.*, (2008) 363, 1203-1210
  14. Takahashi, R., Sugiura, M. and Noguchi, T.  
Water molecules coupled to the redox-active tyrosine Y<sub>D</sub> in Photosystem II as detection by FTIR Spectroscopy,  
*Biochemistry*, (2007) 46, 14245-14249
  15. Kashino, Y., Ikeda, Y., Ban, A., Inoue-Kashino, N., Satoh, K. and Sugiura, M.  
Ycf12 is a core subunit in photosystem II complex  
*Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2007) 1767, 1269-1275
  16. Sugiura, M., Georgescu, M. N. and Takahashi, M.  
A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts  
*Plant Cell Physiol.* (2007) 48, 1022-1035
  17. Okubo, T., Sugiura, M., Tomo, T., and Noguchi, T.  
Perturbation of the structure of P<sub>680</sub> and the charge distribution on its radical cation in isolated reaction center complexes of photosystem II as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy  
*Biochemistry*, (2007) 46, 4390-4397
  18. Un, S., Boussac, A. and Sugiura, M.  
Characterization of the tyrosine-Z radical and its environment in the spin-coupled S<sub>2</sub>Tyr<sub>Z</sub>' state of Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus*  
*Biochemistry*, (2007) 46, 3138-3150
  19. Suzuki, H., Taguchi, Y., Sugiura, M., Boussac, A. and Noguchi, T.  
Structural perturbation of the carboxylate ligands to the Mn cluster upon Ca<sup>2+</sup>/Sr<sup>2+</sup> exchange in the S-state cycle of photosynthetic oxygen evolution as studied by flash-induced FTIR difference spectroscopy  
*Biochemistry*, (2006) 45, 13454-13464
- ー査読無し of 論文ー
20. 杉浦 美羽 (2009) 酸素発生型光合成微生物による光—水素生成、新エネルギーの開発の現状と将来特集、KEC 情報 (関西電子工業振興センター発刊) , 208, 28-31
- [学会発表] (計 9 件)
1. 杉浦美羽、大野陽平、Alain Boussac、Fabrice Rappaport、鈴木博行、野口巧、林秀則  
水の酸化反応における D1-His332 の役割  
第 50 回 日本植物生理学会年会 (名古屋大学, 3 月 21 日〜24 日, 2009 年)
  2. 光化学系 II タンパク質複合体の分子構造の解析の現状  
杉浦 美羽  
平成 20 年度 愛媛地区分析化学講演会 (2009 年 1 月 29 日 愛媛大学)
  3. The water splitting enzyme: recent advances  
A., Boussac, N., Ishida, T.-L., Lai, A.W., Rutherford, F., Rappaport, Y., Pushkar, M., Sugiura  
第 46 回 日本生物物理学会 シンポジウム—光合成の新たなる潮流— (2008 年 12 月 3-5 日 福岡国際会議場)

4. 光化学系 II の構造と機能の解明から応用まで  
杉浦 美羽  
 第 46 回 日本生物物理学会 シンポジウムー光合成の新たなる潮流ー (2008 年 12 月 3-5 日 福岡国際会議場)
5. 光化学系 II における水の分解メカニズム  
杉浦 美羽  
 2008 年度 日本化学会 中国四国支部会 (2008 年 12 月 4 日 愛媛大学)
6. Effects of P<sub>680</sub> ligand substitution in the oxygen-evolving Photosystem II of *Thermosynechococcus elongatus*  
Miwa Sugiura, Alain Boussac, Takumi Noguchi, and Fabrice Rappaport  
 Protein Island Matsuyama International Symposium (2008.9.26, Matsuyama)
7. 酸素発生型光合成微生物による光ー水素生成  
杉浦 美羽  
 2008 年度 KEC セミナー 新エネルギー開発の現状と将来 ～更なる CO<sub>2</sub> 削減を目指して～ (2008 年 7 月 18 日 (社) 関西電子工業振興センター)
8. *Thermosynechococcus elongatus* 光化学系 II における P<sub>680</sub> リガンドの酸化還元電位への影響  
杉浦 美羽、Alain Boussac、野口 巧、Fabrice Rappaport  
 第 48 回日本植物生理学会年会 (2007 年 3 月 28-30 日 愛媛大学)
9. 光化学系 II における酸素発生の分子機能と構造: 部位特異的変異を導入した好熱性シアノバクテリアが解明のブレークスルーになる  
杉浦 美羽  
 第 87 回 日本化学会春期年会 特別企画シンポジウム (光合成機能の分子メカニズムと工学応用 ～分子レベルの探求から太陽光エネルギー変換系への応用まで～) (2007 年 3 月 26 日 関西大学)

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 1 件)  
 発明の名称: 光合成を利用した酸素発生型光合成微生物による水素生産方法  
 発明者: 杉浦 美羽  
 権利者: 杉浦 美羽  
 産業財産権の種類: 特許権  
 出願番号: 特願 2008-6011  
 出願日: 平成 20 年 1 月 15 日 (国内)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 杉浦 美羽 (SUGIURA MIWA)  
 愛媛大学 無細胞生命科学工学研究センター・准教授  
 研究者番号: 80312255

(2) 研究分担者  
 無し

(3) 連携研究者  
 無し