

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 19 日現在

機関番号： 16301
研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2009 年度～2011 年度
課題番号： 21612007
研究課題名 (和文) 光合成を利用したバイオテクノロジーによる水素生産技術の研究開発
研究課題名 (英文) Application to Hydrogen Production by Photosynthetic Organism
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 (和文)：

本研究の最終目標は、光合成微生物である好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* に H^+ を還元して H_2 にする酵素遺伝子を導入することによって、太陽光を当てれば光合成と同期して温泉水程度の貧栄養な条件下で、光合成微生物が水素を生産できる系を構築することである。そのためには、光合成による水の酸化機能を高めて H^+ の放出速度を上げた遺伝子組換え体を宿主細胞にして、 H^+ を還元する酵素遺伝子を導入・発現させて、チラコイドルーメンに輸送させる必要がある。本研究では、まず、水の酸化速度制御のメカニズムを明らかにし、次に、他の生物由来の遺伝子を好熱性ラン藻で機能的に発現させ、チラコイド膜を通過してチラコイド膜ルーメンに輸送できる系の確立を試みた。

水の酸化速度制御に関して最も効果的な段階は、光化学系 II 電子伝達系の最終ステップである Q_A から Q_B への電子伝達であり、 Q_B の酸化還元電位を上げるように周辺アミノ酸を置換すると、 Q_A と Q_B の間の電位差が大きくなり、この電子移動が速くなるために、電子を引き抜く最初のステップである水の酸化速度が上昇することが分かった。一方、酸化側においては、水の酸化で生じた電子は Tyr_z を介して P_{680} に渡されるが、 Tyr_z と水素結合する His の距離を長くする変異を施した光化学系 II では、 H^+ 放出と同期するステップの電子移動が遅くなっており、結果として水の酸化速度が遅くなっていた。以上の結果から、水の酸化および H^+ の放出速度は、還元側の電子の引き抜き速度のみならず、酸化側の電子移動速度に伴う H^+ の放出・移動速度に大きく依存することが明らかになった。

本研究によって、水の酸化を上昇させた組換え体を作製することができたので、これに他の生物由来の遺伝子を導入して発現させ、機能させたいチラコイドルーメンに輸送させる系の構築を試みた。安定に発現するプロモータを見つけ、輸送シグナルの下流にレポーター遺伝子を連結した組換え体を作製した。その結果、レポータータンパク質はチラコイド膜に挿入される時に切断され、構造を保持した状態でチラコイドルーメンに輸送されることを確認した。

本研究によって、ラン藻を用いた水素生産系の基盤ができたので、実際にこの系を用いて次の課題として H^+ 還元機能を付与することが次の課題である。

研究成果の概要 (英文)：

The goal of this study is construction of system that photosynthetic organism acquires production of hydrogen by coupled with photosynthetic electron transfer under the sun light without any nutrition. In this study, I tried, first, to elucidate control mechanisms of water oxidation in Photosystem II, next to produce mutants accelerated water oxidation rate, then to establish expression of foreign gene, and transport into luminal space of thylakoid membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：バイオマスエネルギー

キーワード：光合成電子伝達系

1. 研究開始当初の背景

水素は発電効率が高く、CO₂を放出しない化石燃料に替わるクリーンな新エネルギーとして注目されているが、現行では水素の97%を化石燃料から工業的に製造しているために、化石燃料の枯渇問題と製造過程におけるCO₂の排出という、根本的な水素製造方法の改善が課題となっている。地球上に無尽蔵に存在する水を分解して水素を製造するのが理想的であるため、触媒や人工金属錯体などの研究が進められているが、光の波長選択性や低い量子収率、コストなどの問題があり、実用化には至っていない。

生物に着目すると、植物やラン藻などの酸素発生型の光合成生物は、太陽光エネルギーを生体反応に利用できるNADPHおよびATPに変換するために、約90%の効率で水を分解して電子を得ている。この水の酸化反応は、チラコイド膜にある光化学系II複合体反応中心タンパク質に結合したマンガンとカルシウムの錯体(Mn₄Ca錯体)の触媒によって進む。水の酸化の分子機構と触媒中心の分子構造にはまだ不明な点が多いが、光があたると光化学系II反応中心の二量体クロロフィルP₆₈₀とフェオフィチンとの間で電荷分離が起こり、水を酸化して電子(e⁻)を引き抜き、コファクター間を電子が流れ、最終的にNADPHを合成する。

光合成生物を利用すれば、非常に効率良く水素を生産できるように見えるが、光合成の水の酸化反応はe⁻を得ることが目的であるため、水素(H₂)ではなく、水素イオン(H⁺)が生成される(4 H₂O → 4 e⁻ + 2 O₂ + 4 H⁺)。放出された酸素は地球上の全ての生物の生存

を支えている。H⁺の殆どはATP合成に使われ、しかも、植物やラン藻にはH⁺を還元する機能は無いために、水素(H₂)を生産することはできない。

光合成生物を利用すれば、非常に効率良く水素を生産できるように見えるが、光合成の水の酸化反応はe⁻を得ることが目的であるため、水素(H₂)ではなく、水素イオン(H⁺)が生成される(4 H₂O → 4 e⁻ + 2 O₂ + 4 H⁺)。放出された酸素は地球上の全ての生物の生存を支えている。H⁺の殆どはATP合成に使われ、しかも、植物やラン藻にはH⁺を還元する機能は無いために、水素(H₂)を生産することはできない。

従って、ここで生じるH⁺を光合成生物の細胞内で直接水素に還元する機能を遺伝子工学的に付与すれば(4 H⁺ + 4 e⁻ → 2 H₂)、細胞を培養するだけで、容易に効率良く水素を生産できると期待できる。生物材料としては、水の分解能が高くて安定で、容易に培養(栽培)が可能な「好熱性の光合成微生物」が理想である。しかも、光合成生物は炭素同化を行うので、水素生産のみならず、CO₂を取り込んで、地球上のCO₂量の削減にも寄与できる利点がある。しかし、光合成生物はATPの合成にH⁺を必要とするため、余剰のH⁺を作らせない限り水素の産生は難しい。そのためには、まず、光化学系IIによる水の分解機能を高めなければならない。

これまで研究代表者は、光合成による「光→生体エネルギー変換機構」を分子レベルで明らかにする事を目的として、熱安定で高いエネルギー変換効率をもつ好熱性のラン藻を用いて研究を行ってきた。そのために、部

位特異的変異導入や特定タンパク質サブユニットの欠損変異、および他の生物由来の遺伝子を発現させて新しい機能を付加するなど、遺伝子組換え系を完全に確立した。そして、作製した変異体の光化学系 II を生化学的、量子化学的、分光学的に解析して、水の酸化機構とその触媒中心の構造、水の酸化で生じた電子を引き抜く P₆₈₀ の熱力学的性質と構造の関係などを明らかにしてきた。本研究では、まず、光化学系 II による水の酸化機能を高めて H⁺ の放出速度を上げた遺伝子組換え体を作製することを目的として、水の酸化速度制御のメカニズムを明らかにし、次に、他の生物由来の遺伝子を好熱性ラン藻で機能的に発現させ、チラコイド膜を通過してチラコイド膜ルーメンに輸送できる系を確立する。そして、水の酸化機能を高め、H⁺ の放出速度を上げた遺伝子組換え体に H⁺ を還元する酵素遺伝子を発現させて、温泉水程度の貧栄養な条件で、太陽光を当てれば水素を生産できる系を構築することを最終目的とする。

3. 研究の方法

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

D1 タンパク質の部位特異的変異体の作製は、*Thermosynechococcus elongatus* の *psbA3* 遺伝子を用いて行った。*T. elongatus* は *psbA3* の他に *psbA1*, *psbA2* の 3 つの D1 タンパク質をコードする遺伝子を持っているので、これら 2 つを抗生物質耐性遺伝子に置換してノックアウトした。目的の変異を導入できるように、プラスミド DNA 上で部位特異的変異を施し、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、それを分析することにより、確認した。

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 Ni²⁺-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 Mg²⁺ との距離を考慮し、P₆₈₀ 変異体では His を、それ以外はイミダゾールを用いた。

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. 研究成果

1) 水の酸化速度制御のメカニズムの解明

まず、水の酸化触媒中心である Mn₄Ca クラスターの配位子の構造・性質の影響を調べるために、Mn の配位子と考えられる D1-His332 を Aln および Gln に置換した好熱性ラン藻の部位特異的変異株を作製して解析を行った。その結果、水の取り込み速度が遅くなったので、リガンド His332 は水の酸化過程において、特に水分子の取り込み過程に関与していることが明らかになった。

次に、光化学系 II 電子伝達系の還元側のコファクターの周辺構造が水の酸化速度に及ぼす影響について調べた。電荷分離に関わる Pheo は、13 位の C と水素結合するアミノ酸の種類によってその酸化還元電位が変化することが分かった。相当するアミノ酸は D1-Gln130 であるが、これを強い水素結合する Glu に置換した組換え体では、Pheo/Pheo⁻ の酸化還元電位が 17 mV 高くなった。更に、光化学系 II 電子伝達の最終ステップのコファクターである QB の周辺構造 (QB とタンパク質の安定化に関わっている糖脂質の間であって糖脂質と水素結合するアミノ酸) を変えた組換え体では QB の酸化還元電位が高くなり、結果として QA と QB 間の電位差が大きくなった。その結果、光化学系 II 電子伝達の律速段階が速くなり、水の酸化速度が約 2 倍速くなった。

更に、水の酸化触媒中心と電荷分離に関わる分子の間の電子移動に関わる D1-Tyr160 について調べた。この Tyr は D1-His190 と 2.4 Å の距離で水素結合している。Tyr は D1 タンパク質の C ヘリックス、His190 は D ヘリックスにある。この水素結合距離を変えるために、これらのヘリックス間をつなぐルー

プの端にあつて骨格構造を曲げるのに関わっていると考えられる Pro173 を Met に変えた組換え体を作製して水の酸化速度を調べた。その結果、水素結合距離が長くなり、水の酸化速度も 1/2 倍遅くなった。更に詳しく調べたところ、プロトン放出ステップが遅くなっていることが明らかになった。これらの結果は、Mn からの電子移動がプロトン移動とカップルして起こっていることを示したものであり、電子移動がプロトン移動速度に制御されていることが明らかにされた。

2) 発現タンパク質のチラコイドルーメンへの輸送系の確率

目的遺伝子の目的の場所での発現系を確立するために、発現制御に適したプロモータを探索し、検出しやすいレポータータンパク質（重金属結合タンパク質）に光化学系 II の表在性タンパク質のチラコイド膜輸送シグナルを連結して好熱性ラン藻における発現場所を調べた。その結果、重金属結合タンパク質が構造を維持して機能的に発現し、目的の場所であるチラコイドルーメンに輸送されてプロセッシングを受けることが確認された。

3) プロトン還元酵素遺伝子の発現と輸送

外来遺伝子の発現とチラコイドルーメンへの輸送系を確立し、水の酸化速度を 2 倍に上げた好熱性ラン藻の組換え体を作製することまでできたが、プロトン還元酵素遺伝子導入までにはいたらなかった。

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 25 件）

1. Ogami, S., Boussac, A., and Sugiura, M. Deactivation processes in PsbA1-Photosystem II and PsbA3-Photosystem II under photoinhibitory conditions in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2012) 1817, 802-810
2. Sugiura M., Ogami S, Kusumi M, Un S, Rappaport F, Boussac A. Environment of TyrZ in Photosystem II

from *Thermosynechococcus elongatus* in which PsbA2 is the D1 protein
J. Biol. Chem. (2012) 287, 13336-13347

3. Boussac, A., Sugiura, M. and Rappaport, F. Probing the quinone binding site of Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* containing either PsbA1 or PsbA3 as the D1 protein through the binding characteristics of herbicides
Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics), (2011) 1807, 119-129
4. Sugiura, M., Iwai, E., Hayashi, H. and Boussac, A. Differences in the interactions between the subunits of Photosystem II dependant on D1 protein variants in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*
J. Biol. Chem., (2010) 285, 30008-30018
5. Sugiura, M., Harada, S., Manabe, T., Hayashi, H., Kashino, Y. and Boussac, A., Psb30 contributes to structurally stabilise the Photosystem II complex in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*
Biochim. Biophys. Acta, (Bioenergetics), (2010) 1797, 1546-1554
6. Sugirua, M., Kato, Y., Takahashi, R., Suzuki, H., Watanabe, T., Noguchi, T., Rappaprot, F. and Boussac, A. Energetics in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* with a D1 protein encoded by either the *psbA₁* or *psbA₃* gene
Biochim. Biophys. Acta, (Bioenergetics), (2010) 1797, 1491-1499
7. Vittadello, M., Gorbunov, M.Y., Mastrogiovanni, D.T., Wielunski, L.S., Garfunkel E.L., Guerrero F., Kirilovsky D., Sugiura, M., Rutherford, A.W., Safari A., and Falkowski, P.G. Photoelectron generation by photosystem II core complexes tethered to gold surfaces
Chem. Sus. Chem., (2010) 3, 471-475
8. Hughes, J.L, Nichola, C., Rutherford, A.W., Krausz, E., Lai, T.-L., Boussac, A. and Suguirua, M. D1 protein variants in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* studied by low temperature optical spectroscopy
Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics),

- (2010) 1797, 11-19
9. Kato, Y., Sugiura, M., Oda, A. and Watanabe, T.
Spectroelectrochemical determination of the redox potential of Pheophytin a, the primary electron acceptor in Photosystem II
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (2009) 106, 17365-17370
 10. Sugiura, M., Rappaport, F., Hillier, W., Dorlet, P., Ohno, Y., Hayashi, H. and Boussac, A.
Evidence that D1-His332 in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* interacts with the S₃-state and not with the S₂-state
Biochemistry, (2009) 48, 7856-7866
 11. Suzuki, H., Sugiura, M. and Noguchi, T.
Monitoring proton release during photosynthetic water oxidation in photosystem II by means of isotope-edited infrared spectroscopy
J. Am. Chem. Soc., (2009) 131, 7849-7857
 12. 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
- [学会発表] (計 41 件)
- <招待講演>
1. 部分構造の異なる反応中心タンパク質で構成された光化学系 II 複合体の光合成機能
平成 23 年度 大阪市立大学複合体先端研究機構 年次総会 (2012 年 3 月 5 日-6 日、大阪市立大学)
 2. 光合成研究の最前線と課題
第50回 日本生物物理学会年会 シンポジウム「光合成研究で何が明らかにされ、これから何をできるか? ~光合成研究の最先端とエネルギー創製研究の現状~
(2011 年 9 月 16 日~18 日、兵庫県立大学)
 3. 光合成によるエネルギー変換のしくみと新エネルギー創製への応用
第2回 愛媛大学学術フォーラム (2011 年7月29日、愛媛大学)
 4. 光合成の高効率エネルギー変換機構と新エネルギー創製への応用
日本学術振興会 産学協力研究委員会・分子系の複合電子機能第 181 委員会・第 11 回研究会「人工光合成—分子・生体系」
(2011 年 7 月 14 日-15 日、東京工業大学)
 5. Energy Conversion by Photosystem II and Application to Energy Creation
5th International Symposium on Nanomedicine (March 2011, Nagoya, Japan)
 6. Comparison of *Thermosynechococcus elongatus* PSII composed of different D1
International Conference of "Photosynthesis Research for Sustainability"(2011 年 7 月) Baku, Azerbaijan.
 7. 光合成によるエネルギー変換と水の酸化機構
”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」
(2011年3月28日、神奈川大学)
 8. 部分構造の異なる反応中心タンパク質 D1で構成される光化学系IIのエナジェティックスの違い
大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子科学と生理学が解き明かす植物の光エネルギー変換の新展開」 (2011年3月9日~10日、大阪大学蛋白質研究所)
 9. 光化学系II複合体タンパク質の分子構造と機能の関係
2010年 ナノ学会第8回大会 未来を拓くナノサイエンス：理学、工学、医学への広がり (2010年5月13日~15日、岡崎コンファレンスセンター)
 10. Recent progress in Photosystem II research using mutagenesis of *Thermosynechococcus elongatus*,
Japanese-Finnish Seminar 2011 Future prospects of photosynthetic organisms: from genomes to environment (March 1-5, 2011, Okayama)
 11. Overview of Photosystem II and artificial photosynthesis research
The 70th Okazaki International Conference (December 4-6, 2010, Okazaki)
 12. Molecular structure and function of *Thermosynechococcus elongatus* Photosystem II composed of either D1:1 or D1:3

The 15th International Congress of
Photosynthesis (August 22-27, 2010,
Beijing)

13. Recent Progress in the Photosystem II enzyme
Seminar in CEA Saclay, Service de
Bioénergétique, Biologie Structurale et
Mécanismes (invited by Dr. Alain Boussac)
9, September 2009, Gif-sur-Yvette, France

[その他]

ホームページ等

<http://chem.sci.ehime-u.ac.jp/~biochem1/home.htm>

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

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し