

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23655196

研究課題名(和文) シリカナノ細孔内の「天然 人工ハイブリッド光合成系」の構築

研究課題名(英文) Construction of natural-artificial hybrid photosynthetic systems inside silica nanopores

研究代表者

伊藤 繁 (Itoh, Shigeru)

名古屋大学・遺伝子実験施設・名誉教授

研究者番号：40108634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体タンパク質をシリカナノ細孔中に入れ、生体外で安定に機能させる方法を開発した。光合成の光反応を担う巨大タンパク質複合体(直径21ナノメートルの光化学系と反応中心複合体)を各々精製し、そのサイズに合わせてシリカを自己会合させて作った細孔中に導入した。シリカ構造体は粒子状、ガラス板状、アルミナ薄膜上の3種を用い、いずれでもタンパク導入に成功した。光化学系シリカ複合体は光で水を分解して効率よく酸素をだした。光化学系シリカ複合体はアルミナ薄膜内に、光照射により強い還元力を作り出した。さらに光で色を自由に変える光センサー蛋白入りの基板も作成した。これらの応用も検討した。

研究成果の概要(英文)：Photosynthetic proteins were incorporated into silicananopores, which were made inside three types of mesoscopic silica materials with shapes of powder ( $\mu\text{m}$  size particles), glass plates and thin alumina-plates. As the protein materials, photosystem I and II reaction center complexes (PSI-, PSII-RCs) with molecular diameters of 21 nm containing 50-100 pigments were used. They were incorporated into silica nanopores with a 25-100 nm diameter made inside micrometer-size particles (FSM, SBA) or inside the large 300 nm pores that penetrates an alumina plate of 60- $\mu\text{m}$  thickness. PSI-RC was stable inside the nanopores and rapidly photoreduced methyl viologen. The reduced dye was stabilized inside nanopores and produced  $\text{H}_2$  by hydrogenase. PSII-RC in nanopores efficiently produced molecular oxygen from water by light energy. The hybrids of protein-silica mesoscopic materials provide new platforms for the photoreactions and artificial photosynthesis.

研究分野：生物物理学

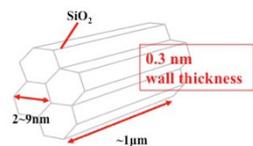
キーワード：光合成 人工光合成 光反応 メソスコピック 酸素発生 水素発生 シリカ ナノマテリアル

研究開始当初の背景

**(1)タンパク質の新しい反応場の検討：**

タンパク質の構造、機能が徐々にわかりつつある。生体中での反応に最適化されたタンパク質を人工環境下で、生命から切り離して働かせ、さらに変えることができれば、まったく新しい機能が出せるはずである。しかし、タンパク質の多くは生体外では不安定で、能力を十分発揮できない。水が供給され、なおかつタンパク質を集約し、安定に保持できる生体外環境が必要である。

**(2)シリカの自己集積で形成されるメソポーラス構造は、大きな内部表面積をもち、内部に数 nm サイズの細孔を多数もち、水とともに小分子を取り込むことが知られている。多数の-OH 基をもつシリカ表面は水よりやや疎水的で、タンパク質特に膜タンパク質との良好な相互作用が想定された。しかし、分子量の大きなタンパク質を取り込めるには大きな細孔径をもつ多孔体が必要である。内部で安定化できるか、反応を維持出来るかなどは未知であった。細孔の直径をさらに大きくして、巨大タンパク質を導入できるようにすれば、光合成や薬理、呼吸作用をもつような膜タンパク質を外部条件下で働かせることが可能となり、制御や応用の可能性も広がると。粒子状、ガラス板状、アルミナ板内に作成された貫通型細孔の3種類の基材の利用を計画した。**

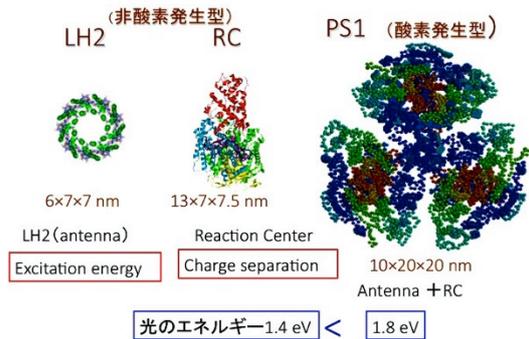


**(3) 多様な生体光反応系の利用：**絶対嫌気性や好気性の光合成細菌、酸素を出すシアノバクテリアや珪藻類 (Ikeda ら 2013)、亜鉛クロロフィルを使う細菌、藻類、植物、珊瑚、人工系など多様な光合成が知られている (伊藤 2013)。新型の青、赤、緑センサー蛋白質の反応機構もわかってきた。209 年までのトヨタ自動車との共同研究でシリカ多孔体 FSM, さらに大きな細孔径をもつ SBA などを利用してその内部に光合成タンパクをいれ光反応をする方法の特許 2 件を取得。さらに実用的な系を作りたいと考えた。

**(4)タンパク質の導入。**生体物質は地球上での 38 億年の生命進化により高度に進化し、細胞システムの作り出す環境の中に美しく調和している。しかし、生命もモノで、モノの集積物が組織体を創りだす。外部環境ではたらかせれば、新たな反応が生まれるだろう。

従来、市販の酵素、シトクロム、ヘム等のタンパク質をシリカ細孔内への導入例はあったが機能発現や評価は不十分であった。

**サイズの比較. FSMは7.9nm -> SBAは23nm**



我々は、光合成光反応の分子機構を研究し、種々の膜タンパク質を扱ってきた。膜タンパク質は機能性色素を結合し、その状態や反応の定量評価方法も確立され、さらに好熱性の紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* からは熱安定な光合成色素アンテナタンパク質と反応中心タンパク質 (pRC) を精製し、粒状のシリカメゾスコピック構造内への導入に成功していた。本計画ではこれを一層巨大な膜タンパク質 PSI や PSII にも適用した。

**2. 研究の目的**

**(1) 光合成反応タンパク質をシリカナノ細孔中にいれる。**

上図に示す光合成タンパクのうち細菌型光合成に働くアンテナ LH2 と反応中心 RC はシリカ FSM の 8 nm 細孔内に導入できたので、更に大きな植物光合成に働く光化学系 I、II 反応中心を、より大きな孔径をもつシリカ化合物 SBA を作成して、内部に導入する。

**(2) 不安定な光合成系を安定化して、水を発生するヒドロゲナーゼや、Ru 錯体などと組み合わせたエネルギー変換系を作る。**

**(3) 光センサータンパク質を、シリカ細孔内で働かせる。**

単純で安定な酵素のシリカ内への導入例は多いが、シリカ内でのタンパク質の反応様式は殆どわかっていない。光反応タンパク質は色素をもつので、反応を吸収スペクトルや蛍光スペクトルの変化でさぐりやすい。

**(4) 3 種のシリカ多孔体粒子・基板との組み合わせで、新しい人工光合成素子を作る。**

細孔径 2-10nm の FSM (fabricated silica)

mesoscopic material), 細孔径を 30nm 程度まで大きくできる SBA は共に、外径が数ミクロンの粉末状である。ホウ珪酸ガラス基板は孔径 2-30nm、厚さ 1 mm の板ガラス状であり、さらに NAM(孔径 13nm)は厚み 50-100 ミクロンで直径 4 cm のアルミナ円盤に 200nm の孔を電解であけ、その中にシリカ細孔を結晶成長させたものである。

FSM と SBA はこれまでの共同研究で豊田中央研究所から供給された、現在では市販品も入手可能となった。これ以外は産総研から提供を受けた。これらと上記タンパク質を組合せて、あらたな光反応系(素子)をつくる。

タンパク質-シリカの組合せで天然(有機)-人工(無機)のハイブリッド反応系を作り、人工光合成も検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 光合成タンパク質の作成。バクテリア型反応中心複合体とアンテナタンパク質複合体は、好熱性紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* を培養し、細胞破碎の後、表面活性剤 LDAO で処理して得た。光化学系 I と II 反応中心複合体は好熱性シアノバクテリアを培養、細胞破碎の後、表面活性剤ドデシルマルトシド処理した後精製した。水溶性フィトクロム様センサー AnPixJ 蛋白質は、これまでに東大池内昌彦教授の研究室と共同研究を進めて反応機構を解明してきた。His-tag 付き好熱性シアノバクテリア蛋白質の遺伝子を導入した大腸菌の提供を受けて培養精製した

(2) シリカ試料の入手。内部細孔の孔径を変えた粒子状シリカ細孔体 (FSM, SBA) は、トヨタ中央研究所から提供された。ホウ珪酸ガラス多孔体は関西産総研より提供をうけた。アルミナ-シリカ多孔体(NAM)は東北大学より提供をうけた。

(3) タンパク質吸着の評価。シリカ細孔の孔径、その中へのタンパク質複合体の吸着は N<sub>2</sub> の吸着曲線から計算した。

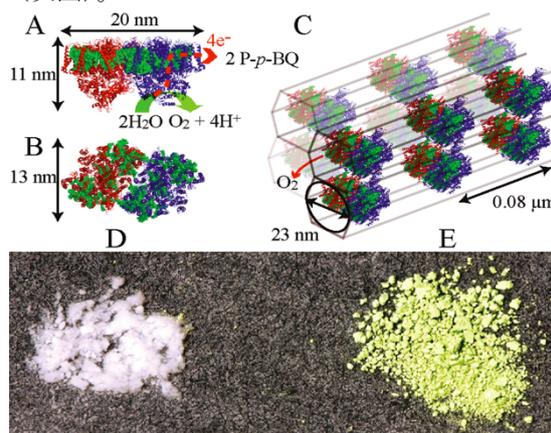
(4) シリカ細孔内でのタンパク質機能の評価。タンパク質の吸着は共焦点顕微鏡による直接観察、低温蛍光スペクトル法による色素系の状態の評価、閃光励起後の過渡吸収測定による色素の吸収変化=電子移動反応の追跡、ピコ秒蛍光寿命測定による光エネルギー移動過程の追跡、極低温電子スピン共鳴法による電子スピンの測定と分子配向の測定、などの光合成研究で光化学反応

を評価する高度な方法で行った。

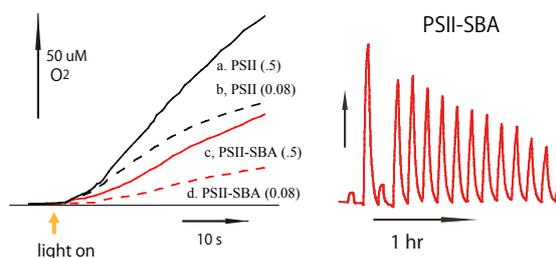
### 4. 研究成果

(1) 様々な形状のシリカ多孔体(マイクロ粒子状、ガラス基板、アルミナ基板中に)内に形成したシリカナノ細孔中に、光合成反応中心膜タンパク質複合体である光化学系II反応中心(PSII)二量体、光化学系I反応中心(PSI)3量体、あるいは、TiO<sub>2</sub>などの光機能分子を、光反応活性を維持して導入する技術を確認した。これらにより、大気酸素中で、太陽光で機能する光駆動の電子移動系、水分解系、水素発生反応系をつくりだすことができる。また、拡散律速条件を利用した特異な反応環境をナノ細孔内に形成することに成功し、その特性を報告した(Nojiら 2013)

(2) PSIIは、光反応により水から電子を取り出し酸素を出す植物の巨大タンパク質複合体である。二量体で分子量756 kDa、サイズ20 nm x 12nmの色素、電子担体分子40以上をふくむ(次図)。

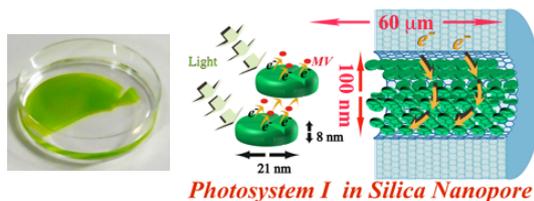
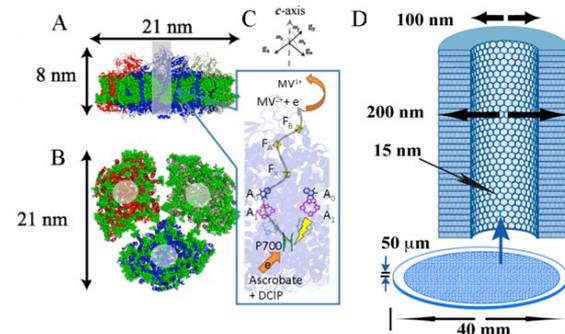


PSIIを好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* より表面活性剤添処理で、単離・精製し、外径約5μmの粉末状多孔質材料(SBA)と混合した。この内部への吸着パターンの解析と、PSIIの活性と熱安定性評価を行った。SBA内部の径23 nmの細孔中に5%重量のPSIIが吸着されると、活性と熱安定性が強化された。長時間の酸素発生活性を確認した。(Nojiら 2013)



(3) 非酸素発生型の絶対嫌気性光合成細菌ヘリオバクテリアのI型反応中心の吸着にも成功した。光化学系I(PSI)複合体のSBA内への吸着に成功した(論文準備中)。

(4) 0.05mm厚のアルミナ基板を貫通する細孔中に自己会合させて作った13nmシリカ細孔中に、*T. vulcanus* PSI反応中心三量体を吸着させた(Kamidakiら 2013)。細孔内では、PSI三量体のc2中心軸をほぼ薄膜面に平行(細孔軸に垂直)させる規則的配列をとることを、電子スピン共鳴法により確認した。このような細孔内で分子を並べる技術が生まれた。

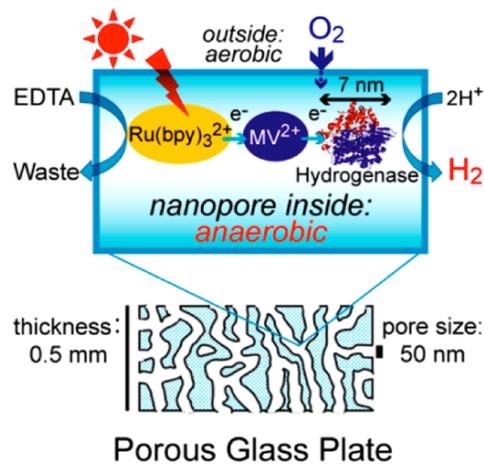


(5) 光センサータンパク質(Narikawaら2015)をホウ素珪酸ガラス板内に吸着し、光照射で色が変わる基板を作った(未発表)。



(6) ナノ細孔内に複合反応系を構築した。内部に無数の細孔をもつ、ホウ素珪酸ガラス板内にRu化合物と小分子メデエーター(DCIPやヴィオローゲン)、ヒドロゲナーゼ酵素タンパクを同時に導入した(Nojiら2014)。

これにより光で作られる反応産物が外部拡散せず、逐次反応するマイクロ反応系を構築した。さらなる効率増加、反応最適化を検討している。



(7) 本研究では、1)光反応タンパク質をナノメートルサイズのシリカナノ細孔中へ導入し機能させる、2)タンパク質機能を生体外で発揮させる。3)シリカは光をよく通すので、光合成や光センサータンパク質を入れた無機-生体ハイブリッド反応系を構築できた。4) これを利用して、光エネルギーで、水から電子を取り出し、電力や水素の発生をする天然/人工ハイブリッドの「人工光合成系」を作り出す基礎が出来た。

(8) 拡散速度が分子サイズで異なる細孔内での特異な反応環境についての基礎データを得た。

(9) タンパク質複合体やヒドロゲナーゼを規則的に内部配列させ強い還元力を発生する「シリカ-アルミナ薄膜系」(Nojiら2014)、「シート状に配列させたPSI」(Koedaら2013)等の、新機能素材の作成に成功した

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件 全て査読あり)

① Narikawa R, Nakajima T, Aono Y, Fushimi K, Enomoto G, Itoh S, Sato M, Ikeuchi M. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll *d*-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Scientific Reports* 5, 2015, 7950. DOI:10.1038/srep07950

② Noji T, Kondo M, Jin T, Yazawa T, Osuka H, Higuchi Y, Nango M, Itoh S, Dewa T, Light-Driven Hydrogen Production by Hydrogenases and a Ru-Complex inside a Nanoporous Glass Plate under Aerobic External Conditions, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 5, 2014, 2403-240. dx.doi.org/10.1021/jz5008164

③ 伊藤 繁, 科学の進歩と未来. 光合成研究. 23(3), 2013, 157-162. (http://photosyn.jp/journal/sections/kaiho68-12.p

df)

④ Koeda S, Itoh S, Umezaki K, Noji T, Ikeda A, Kawakami K, Kondo M, Yamamoto Y, Shen JR, Taga K, Dewa T, Itoh S, Nango M, Tanaka T, Mizuno T. Application of Peptide Gemini Surfactants as Novel Solubilization Surfactants for Photosystems I and II of Cyanobacteria *Langmuir*. 7, 2013, 11667-80.  
DOI:10.1021/la402167v

⑤ Kamidaki C, Kondo T, Noji T, Itoh T, Yamaguchi A, Itoh S. Alumina plate containing photosystem I reaction center complex oriented inside plate-penetrating silica nanopores. *J Phys Chem B*. 117, 2013, 9785-92.  
DOI:10.1021/jp406589u

⑥ Noji T, Kamidaki C, Kawakami K, Shen JR, Kajino T, Fukushima Y, Sekitoh T, Itoh S. Photosynthetic oxygen evolution in mesoporous silica material: adsorption of photosystem II reaction center complex into 23 nm nanopores in SBA. *Langmuir*. 27, 2013, 705-13.  
DOI:10.1021/la1032916

⑦ Sakai S, Noji T, Kondo M, Mizuno T, Dewa T, Ochiai T, Yamakawa H, Itoh S, Hashimoto H, Nango M, Molecular Assembly of Zinc Chlorophyll Derivatives by Using Recombinant Light-Harvesting Polypeptides with His-tag and Immobilization on a Gold Electrode. *Langmuir* 29, 2013, 5104-5109.  
DOI:10.1021/la400059h

⑧ Ikeda Y, Yamagishi A, Komura M, Suzuki T, Dohmae N, Shibata Y, Itoh S, Koike H, Satoh K, Two types of fucoxanthin-chlorophyll-binding proteins I tightly bound to the photosystem I core complex in marine centric diatoms. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 2013, 529-539.  
DOI:10.1016/j.bbabi.2013.02.003

[学会発表] (計 7件)

①浅井 智広、近藤 徹、伊藤 繁、大岡 宏造. タイプ1光合成反応中心の保存されたアンテナクロロフィルの役割 第56回植物生理学会年会 2015/3/16-18 東京農業大学

②野地 智康、渡辺 麻衣、出羽 毅久1、伊藤 繁、池内 昌彦. シアノバクテリアのアンテナ-光化学系I超分子複合体におけるフィコビリソームから光化学系I四量体へのエネルギー移動. 第56回植物生理学会年会 2015/3/16-18 東京農業大学

③大岡宏造、野地智康、浅井智広、武藤梨沙、栗栖源嗣、伊藤繁. 多孔性シリカ粒子中のナノ空間に安定的に保持されたヘリオバクテ

リア反応中心. 第56回植物生理学会年会 2015/3/16-18 東京農業大学

④浅井智広、Kwang Kim, 近藤徹, 原田二朗, 伊藤繁, 大岡宏造. ホモダイマー光合成反応中心複合体の人工的ヘテロダイマー化. 第62回日本生化学会近畿支部例会 2015/5/16 立命館大学

⑤浅井 智広、近藤 徹、伊藤 繁、大岡 宏造 緑色硫黄細菌のタイプ1光合成反応中心は2系列のエネルギー移動系をもつ札幌. 第52回生物物理学会 2014/9/25-27

⑥大岡宏造、野地智康、浅井智広、武藤梨沙、栗栖源嗣、伊藤繁. 多孔性シリカ粒子に吸着したヘリオバクテリア反応中心コアタンパクの分光学的諸性質 日本植物生理学会 2013年度年会 2014/3月 富山

⑦伊藤繁、山川壽伯、U. Heber. コケの光障害耐性：低温蛍光寿命が示す光エネルギー制御機構の違いが異なる光環境適応を生み出す. 日本植物生理学会 2013年度年会 2014/3月 富山

[図書] (計 1件)

①伊藤繁 (他39名と共著、編集) 光合成のエネルギー変換と物質変換 人工光合成をめざして. 化学同人 2015年4月

[その他]

参照ホームページ

[https://www.researchgate.net/profile/Shigeru\\_Itoh](https://www.researchgate.net/profile/Shigeru_Itoh)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 繁 (ITO, Shigeru)  
名古屋大学・遺伝子実験施設・名誉教授

研究者番号：40108634