

令和元年6月23日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14036

研究課題名(和文)ヘムタンパク質集積体を用いた新規光捕集系の構築と物質変換触媒への応用

研究課題名(英文)Construction of Artificial Light Harvesting System Using Hemoprotein Assemblies

研究代表者

林 高史 (Hayashi, Takashi)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：20222226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンパク質を基盤として人工光捕集系の構築と触媒の導入による人工合成の達成を最終的な目標として、特に新規光捕集系の開発に重点を置いて研究に取り組んだ。その成果として、ヘムタンパク質の人工超分子集合体において、球体のミセル状集合体、らせん状集合体、感情集合体の構築を、それぞれ光捕集系における色素集合体として達成した。また天然ヘムタンパク質六量体を基盤として複数の色素を有する光捕集系を構築した。さらに物質変換を試行した触媒の合成を実施し、人工光合成のための予備的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、人工合成を最終ゴールとして、新規なタンパク質を基盤とする光捕集系と触媒の導入を研究した。近年のエネルギー問題を考える上で、人工合成の実現は非常に重要な課題であり、天然光合成系でも利用されているタンパク質は光捕集系の足場として、有用であることが本研究の学術的知見として得られた。今後、導入する触媒の検討や最適化により太陽光の効率的な利用によるエネルギー生産や物質変換への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study has focused on generation of artificial photosynthesis by the combination of protein-based artificial light harvesting systems and catalysts. To achieve this goal, we especially demonstrated the construction of the new-types of hemoprotein assemblies and an artificial light harvesting system. In the former, micelle-like, herical and ring-shaped assemblies were prepared and characterized as pigment-containing protein assemblies as scaffolds of light harvesting systems. In the latter, multiple photosensitizers were introduced to hexameric hemoprotein and its light harvesting function was evaluated. Furthermore, modification of the artificial light harvesting system by synthesized catalysts was attempted for the photo-induced catalysis.

研究分野：生物無機化学

キーワード：人工光合成 光捕集 ヘムタンパク質 触媒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成では、活性中心での酸化還元反応を円滑に進行させるために、大規模な光捕集系を用いて光子密度の低い太陽光エネルギーの効率的な利用を実現している。特に、紅色細菌の光化学系では光捕集系(LH1 および LH2)と反応中心の構造が明らかにされており、これらは比較的単純な構造であるため、作用機序の解析が進んでいる。光合成の初期段階において、光捕集に関わる LH2 内で環状に整列したクロロフィル分子は、光により励起したエネルギーを同一色素間での高速エネルギー移動(エネルギーマイグレーション)を介して活性中心へと集約させ、太陽光エネルギー利用の効率化を達成している(図1)。この興味深い性質に着目して、これまでにポルフィリン等の光増感剤を集積させる合成化学的手法を駆使した研究が報告されている。また近年ではウイルスキャプシドやタンパク質の多量体に共有結合的に色素を化学修飾させた系が報告されている。一方で、本研究者のグループでは、ポルフィリン鉄錯体(ヘム)を補因子とするヘムタンパク質において、ポルフィリン金属錯体とタンパク質(ヘムポケット)の相互作用を利用したタンパク質集合化を実施してきた。また環状六量体構造を有する天然ヘムタンパク質を用い、ヘムから亜鉛ポルフィリノイドへの置換に基づいた光捕集系構築法を報告している。

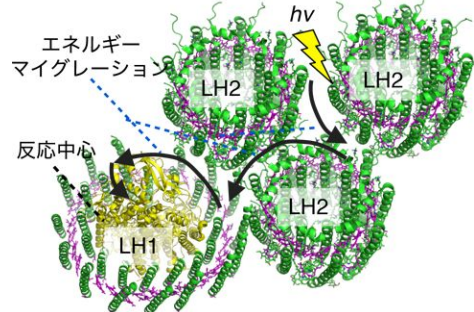


図1. 天然光捕集系の模式図

2. 研究の目的

光合成系のモデルの構築により、その機能を再現することは、人工光合成を達成する上で不可欠である。特に光合成の初期過程である光捕集系は、様々な系が報告されているが、光増感色素を自在に配置し、効率的な光捕集系を確立し、触媒反応まで展開した例はほとんどない。本研究では、天然の系と同様にタンパク質を用いた光捕集系の構築に重点を置き、構築した光捕集系に触媒を組み合わせることで人工光捕集系の展開を目指した。

3. 研究の方法

タンパク質の光捕集系を構築に対して二つのアプローチで取り組んだ。

(1) 色素含有ヘムタンパク質の単量体を素材として、自在集積化を実現し、光捕集系へ展開する。利点として、様々な集合体に展開できることが挙げられる。本研究代表者がこれまで従事してきた、ヘムタンパク質表面にヘムを共有結合的に連結する手法を用いて、光増感剤を挿入するための種々の集合構造の形成を実施した。

(2) 天然において六量体として存在するヘムタンパク質を用いて、ヘムの光増感剤による置換と複数の吸収波長の異なる光増感剤を共有結合的に修飾した光捕集系の構築を実施した。詳細な光エネルギー効率の評価とエネルギー移動の経路について評価した。

(3) 還元反応触媒部位の合成し、開発した光捕集系と組み合わせ、人工光合成システム開発を試みた。

4. 研究成果

(1) ヘムタンパク質として、構造が単純かつ分子量の小さなシトクロム b_{562} を選択し、システインを導入した変異体を作成し、このシステイン残基に合成ヘムを共有結合を介して修飾したモノマーユニットを調製して、ヘムタンパク質超分子集合化の系を構築し、その構造を評価した(図2)。下記の a-c の光増感剤集合化の土台となるヘムタンパク質集合化の成果を得た。

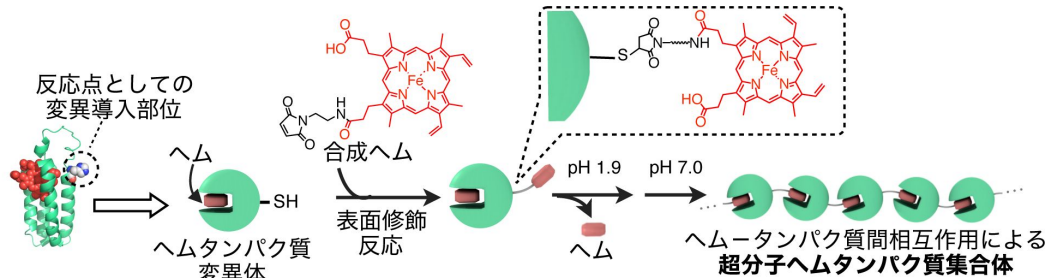


図2. ヘムタンパク質集合体の構築法の概念図

(a) シトクロム b_{562} とヘムを連結するリンカーを従来の柔軟なエチレングリコール等から剛直なアゾベンゼンに変換した。ユニークなことに、熱刺激(60度程度の加熱)に対して、ヘムが内側でタンパク質が外側を向いたミセル状の集合体を得られた。大きさは電子顕微鏡と動的光散乱により 15 nm ほどであることを示し、また加熱時のみだけでなく室温への冷却後も準安定であり、これまでのヘムタンパク質集合体では観測できない特

微的な挙動であることが明らかになった (図 3 a)。

- (b) シトクロム b_{562} のシステイン導入位置を従来の H63 から N80 に変更した変異体 N80C を調製し、短いリンカーを介してヘムを修飾した。結果として、本系はヘムとヘムポケットの相互作用以外にもタンパク質界面においてアミノ酸残基同士の水素結合を誘起し、剛直な構造を示すことが特徴的な円二色性スペクトルより明らかになった。さらにその詳細な構造は分子動力学計算により予測され、原子間力顕微鏡を用いて実験的に確認し、3 nm のピッチを有するらせん構造が得られた (図 3 b) 。さらに光増感剤として機能する亜鉛ポルフィリンを用いた系でも同様の構造を示す結果が示されている。さらに、亜鉛ポルフィリンとヘムを含む共集合体では 29 Å もの長距離における光誘起電子移動反応が観測され、本系が電子移動に有利な構造であることが明らかになった。
- (c) (b) で用いた変異体 N80C に対して、長いリンカーを介してヘムを修飾したところ、濃縮時は従来の柔軟な繊維状の集合体を形成し、希釈時は選択的に環状三量体を形成することを見出した。この環状集合体は原子間力顕微鏡により直接観察し、同定した (図 3 c) 。

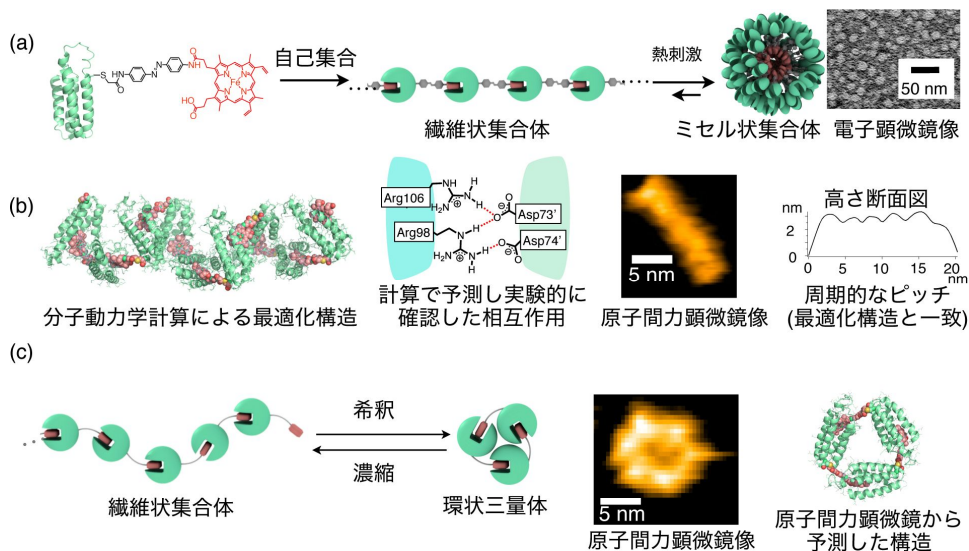


図 3. 本研究で構築した新規なヘムタンパク質集合体とその構造観察データ (a) 熱にตอบสนองしてミセル状に変化するヘムタンパク質集合体 (b) 周期的ならせん構造を有するヘムタンパク質集合体 (c) 環状構造を形成するヘムタンパク質集合体

(2) 天然ヘムタンパク質六量体である HTHP のヘムを亜鉛ポルフィリンに置換した再構成タンパク質を基盤に、三種類の光増感剤からなる新規人工光捕集系を開発した。亜鉛ポルフィリンのドナーおよびアクセプターとして機能する色素としてフルオレセインおよびテキサスレッドを選択した。一分子のテキサスレッドと五分子のフルオレセイン、六分子の亜鉛ポルフィリンを有する HTHP を調製した (図 4) 。まずジスルフィド結合を有する二量化した HTHP をサイズ排除クロマトグラフィーで単離し、フルオレセインの修飾、ジスルフィド結合の開裂を経て、ヘムを亜鉛ポルフィリンに置換した。同定は MALDI MS および吸収スペクトルにより行った。吸収スペクトルおよび励起スペクトルを比較し、エネルギー移動効率を評価した。この際、六分子のフルオレセインあるいは六分子のテキサスレッドを有する光捕集系で得られた蛍光寿命、エネルギー移動効率および移動速度を近似的に割り当て、それぞれのエネルギー移動現象の速度を見積もった (図 5) 。結果として、フルオレセインからテキサスレッドに直接エネルギー移動するパス 1 と亜鉛ポルフィリンを介して移動するパス 2 の比は 39:61 であることを示した。このことから本系が連続的なエネルギー移動によりアクセプターに幅広い波長の光励起エネルギーを

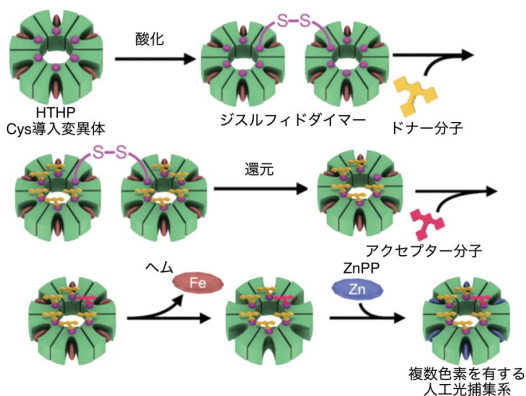


図 4. 複数の色素を有する人工光捕集系の調製

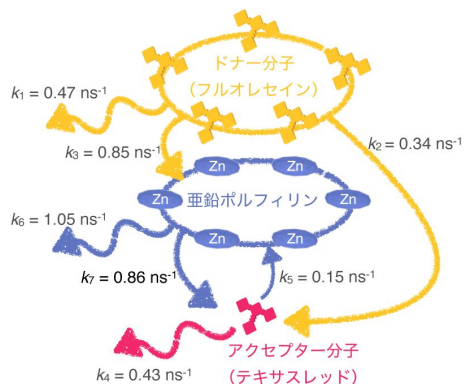


図 5. 人工光捕集系におけるエネルギー移動速度

捕集可能な系であることが示された。

(3) 触媒部位として、水素発生触媒として機能する、Ni や Co の錯体を合成し、(2) の HTHP を基盤とする光捕集系と組み合わせた。Ni の錯体を用いた場合、予備的ではあるが、光照射により犠牲剤の存在下、水素が発生することを確認した。光増感色素の分解を伴いながら、反応が進行するため、最適化が必要である。

以上のように、タンパク質を足場として新規な光捕集系を構築し、その複雑な挙動を詳細に評価した。今後の高効率な光捕集系の構築と適切な触媒の付与による人工光合成の実現が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

“Arginine Residues Provide a Multivalent Effect for Cellular Uptake of a Hemoprotein Assembly” Koji Oohora, Ryota Kajihara, Misa Jiromaru, Hiroaki Kitagishi, Takashi Hayashi *Chem. Lett.* 査読有 48, 295-298 (2019), DOI: 10.1246/cl.180897

“Photoinduced electron transfer within supramolecular hemoprotein co-assemblies and heterodimers containing Fe and Zn porphyrins” Ryota Kajihara, Koji Oohora, Takashi Hayashi *J. Inorg. Biochem.* 査読有 193, 42-51 (2019), DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.01.001

“A ring-shaped hemoprotein trimer thermodynamically controlled by the supramolecular heme-heme pocket interaction” Koji Oohora, Ryota Kajihara, Nishiki Fujimaki, Takayuki Uchihashi, Takashi Hayashi *Chem. Commun.* 査読有 55, 1544-1547 (2019), DOI: 10.1039/C8CC09314H

“Supramolecular Hemoprotein Assembly with a Periodic Structure Showing Heme-Heme Exciton Coupling” Koji Oohora, Nishiki Fujimaki, Ryota Kajihara, Hiroki Watanabe, Takayuki Uchihashi, Takashi Hayashi *J. Am. Chem. Soc.* 査読有 140, 10145-10148 (2018), DOI: 10.1021/jacs.8b06690.

“Successive Energy Transfer within Multiple Photosensitizers Assembled in a Hexameric Hemoprotein Scaffold” Tsuyoshi Mashima, Koji Oohora, Takashi Hayashi *Phys. Chem. Chem. Phys.* 査読有 20, 3200-3209 (2018), DOI:10.1039/C7CP05257J.

“A supramolecular assembly based on an engineered hemoprotein exhibiting a thermal stimulus-driven conversion to a new distinct supramolecular structure” Koji Oohora, Yoshitaka Onuma, Yuta Tanaka, Akira Onoda, Takashi Hayashi *Chem. Commun.* 査読有 53, 6879-6882 (2017), DOI:10.1039/C7CC02678A.

[学会発表](計5件)

Takashi Hayashi, “Supramolecular Hemoprotein Assemblies” Bionano2018(招待講演)(国際学会) 2018年

Takashi Hayashi, “Supramolecular Hemoprotein Assemblies via Heme-Heme Pocket Interaction” 11th Japan-China Joint Symposium on Metal Cluster Compounds(招待講演)(国際学会) 2017年

Takashi Hayashi, “Supramolecular Hemoprotein Assembly toward Photoinduced Catalysts” 1st Molecular Technology Workshop: “Energy and Electron Transfers in Molecular Engineered Materials”(招待講演)(国際学会) 2017年

Takashi Hayashi, Koji Oohora, “Preparation, Characterization and Photochemical Properties of Supramolecular Hemoprotein Assemblies” BIONANO2016(招待講演)(国際学会) 2016年

Takaashi Hayashi, Tsuyoshi Mashima, Shota Hirayama, Koji Oohora, “Construction of Hemoprotein Assembly via Heme-heme Pocket Interaction and its Photochemical Property” 229th ECS Meeting(招待講演)(国際学会) 2016年

[図書](計1件)

Artificial Hemoprotein Assemblies in Development of Nanobiomaterials

Koji Oohora, Takashi Hayashi

In Niobinspired Chemistry From Enzymes to Synthetic Models, M. Réglér, Ed., World Scientific, 71-88 (2019).

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻林 研究室

http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~haya_shiken/index.html

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：大洞 光司

ローマ字氏名：Koji Oohora

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院工学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：10631202

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。