

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21282

研究課題名(和文)葉緑体電子伝達反応を利用した光合成発電デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of electric power generator using photosynthetic electron transport reaction

研究代表者

稲葉 丈人(Inaba, Takehito)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：00400185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：光合成電子伝達反応は、光エネルギーを利用して水を酸化し、生じた電子と水素イオン濃度勾配を利用することで光エネルギーを化学エネルギーに変換する反応である。本研究では、光合成で得た光エネルギーを電気エネルギーに直接変換する「光合成発電デバイス」作製のための分子基盤確立を目指した。発電デバイスに必要な植物の光合成関連タンパク質を大腸菌で発現させて精製し、これらを用いて微生物による発電に必須のタンパク質への電子伝達能を調べた。その結果、植物の光化学系タンパク質フェレドキシンから微生物OmcZタンパク質への電子伝達を再現良く実現する方法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続可能な「再生可能エネルギー」の確保は、人類が解決すべき最重要課題の一つであり、国連サミットで採択された「持続可能な開発目標(SDGs)」の一つにも掲げられている。すべての人類が持続的に電力の恩恵を受け続けるためには、新たな電力シーズの発掘・探索は不可欠である。本研究で得られた成果は、光合成で得た光エネルギーを電気エネルギーに直接変換する発電技術への応用が可能であり、持続可能な社会の構築に貢献しうるものである。

研究成果の概要(英文)：Photosynthetic electron transport reaction is a reaction that converts light energy into chemical energy by oxidizing water using light energy. In this study, we aimed to establish a molecular basis for the fabrication of "photosynthetic power generation devices" that directly convert light energy obtained through photosynthesis into electrical energy. Plant photosynthesis-related proteins necessary for power generation devices were expressed and purified in Escherichia coli, and their ability to transfer electrons to proteins essential for microbial power generation was investigated using these proteins. As a result, we were able to establish a method to reconstitute electron transfer from a plant photosystem protein to a microbial protein.

研究分野：植物生化学

キーワード：葉緑体 光合成 発電 鉄還元細菌

1. 研究開始当初の背景

産業の発展と共に石油などの化石燃料の使用が増加し、大気中の温室効果ガス濃度が急増している。増加した温室効果ガスは、地球温暖化を引き起こし、海水面の上昇や気候変動を誘発している。このような現状を踏まえて、化石燃料に代わる環境負荷が少ない技術や製品が注目を集めている。特に、微生物燃料電池は微生物の有機基質の代謝によって生成される還元力を電気エネルギーに変換することから、クリーンなエネルギーとされ(Ieropoulos et al., 2005)、20世紀前半に微生物から電気が検出されて以来、研究成果や知見が拡大しつつある。

微生物燃料電池の開発では、有機物を異化してその際に生じた電子を細胞外の物質に伝達できる鉄還元細菌が利用されてきた。鉄還元細菌は、嫌気性細菌であり、嫌気条件下で有機物を異化し三価の鉄イオンを電子受容体として利用している。鉄還元細菌の細胞外への電子伝達に中心的な役割を果たすのが、c型シトクロムである。*Geobacter sulfurreducens*(以下、*G. sulfurreducens*)の細胞外への電子伝達に關与するタンパク質 OmcB、OmcE、OmcZ はすべて c 型シトクロムであり、分子内に複数個の c 型ヘムを持つ(Mehta et al., 2005; Weber et al., 2006; Inoue et al., 2010)。

一方、植物の葉緑体では水の酸化により電子が生じ、これを利用して最終的に NADPH を産生することが知られている。光化学系IIにおける水の酸化で生じた電子は、*G. sulfurreducens* 同様、キノン(プラストキノ)を還元してキノール(プラストヒドロキノ)を生産するために使用される。電子はさらに c 型シトクロムを含むシトクロム *b₆f* 複合体に伝達され、プラストシアニンを介して光化学系I複合体へと伝達される。光化学系Iでは電子はフェレドキシン(Fd)に伝達され、この電子を利用してフェレドキシン-NADP⁺酸化還元酵素(FNR)が NADP⁺を還元する。

Fd 及び FNR による NADP⁺の還元反応は可逆的であり、NADPH を NADP⁺に酸化し、Fd への電子伝達も可能なことが知られている。シロイヌナズナの Fd は酸化還元中心として 2Fe-2S 型の鉄硫黄クラスターを持ち、分子種が 4 つ存在することが知られている。植物 Fd の酸化還元電位は OmcZs の酸化還元電位と比べてかなり低いことが文献で示されていることから、Fd は OmcZ の電子供与体となりうるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では光合成発電デバイスの作製を目指して、光合成電子伝達鎖から OmcZ への電子伝達の分子基盤の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 様々な植物種からの Fd および FNR 遺伝子のクローニングと組み換えタンパク質の大量精製

発電デバイスのパーツとして必要な Fd および FNR 遺伝子をエンドウ、シロイヌナズナ、トウモロコシ、ホウレンソウからクローニングし、タンパク質発現用 pET ベクターに導入した。さらにこれらのベクターを大腸菌 C41(DE3)株あるいは C43(DE3)株に導入し、発現を誘導した。誘導したタンパク質は His タグを用いて精製した。

(2) c 型シトクロムへの電子伝達効率が良い Fd および FNR 分子種の同定

大量精製したタンパク質を用いて、c 型シトクロムへの電子伝達効率が良い Fd および FNR 分子種の同定を試みた。具体的には、文献で報告されている酸化還元電位を参考に、様々な Fd および FNR の組み合わせを用いてシトクロム c 還元活性を調査した。還元活性は、還元型シトクロム c の生成に伴う吸光度変化を用いて評価した。また、検出されたシトクロム c の還元が組み換え型 Fd からの電子伝達によるものであることを確認するため、Fd 非存在下での吸光度の変化も測定した。

(3) Fd から OmcZ への電子伝達系の確立

発電デバイスの鍵となる Fd から OmcZ への電子伝達を検出した。まず、*G. sulfurreducens* より OmcZ タンパク質を精製した。これを用いて、Fd から OmcZ への電子伝達を検出した。具体的には、試験管内での電子伝達に伴う OmcZ の還元を、分光光度計を用いて調査した。また、固体電極への Fd の電子伝達能を評価するため、マイクロ分析セルおよびポテンショスタットを用いてフェレドキシンからグラファイト電極への電子伝達の条件検討を行った。

4. 研究成果

4-1. 様々な植物種からの Fd および FNR 遺伝子のクローニングと組み換えタンパク質の大量精製

エンドウ、シロイヌナズナ、トウモロコシ、ホウレンソウから RNA を抽出した後 cDNA を合成し、Fd および FNR 遺伝子をクローニングした。ここでは、代表例としてシロイヌナズナ Fd1 のデータを示した(図 1)。タンパク質を大腸菌 C41(DE3)株あるいは C43(DE3)株で発現させて、His タグを用いて精製した。その結果、C41 (DE3)株の方が C43 (DE3)株を用いた場合よりも発現量が多く、多くのタンパク質が精製できることが判明した。精製したタンパク質のうち、タンパク質濃度の高い画分を透析し、吸収スペクトルを調査した。その結果、矢印で示した Fd に特徴的なピークが検出された。

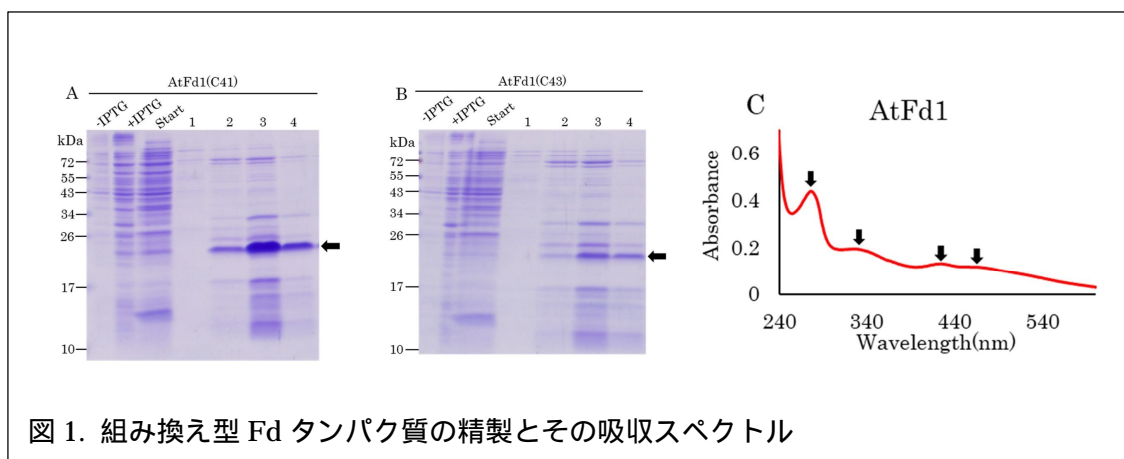


図 1. 組み換え型 Fd タンパク質の精製とその吸収スペクトル

同様の実験をその他の Fd および FNR について行った。FNR は C43(DE3)株を用いた場合の方が良好な結果が得られた。

4-2. c 型シトクロムへの電子伝達効率が良い Fd および FNR 分子種の同定

4-1 で精製した Fd および FNR の電子伝達活性を調査した。反応系では電子供与体として NADPH を用いた。その結果、今回の精製標品の中では、エンドウ PsFd およびシロイヌナズナ AtFd1 のシトクロム c 還元活性が高かった。そのため、OmcZ への電子伝達活性の評価にはエンドウおよびシロイヌナズナの Fd を用いて調査することにした。

4-3. Fd から OmcZ への電子伝達系の確立

発電デバイスの鍵となる Fd から OmcZ への電子伝達を検出した。具体的には、試験管内での Fd から OmcZ への電子伝達を、分光光度計を用いて調査した。また、マイクロ分析セルおよびポテンショスタットを用いてフェレドキシンからグラファイト電極への電子伝達の条件検討を行った。

Fd から OmcZ への電子伝達は、分光光度計を用いて再現良く電子伝達を検出できた。また、この電子伝達は明らかに Fd 依存的であった。一方で、マイクロ分析セルおよびポテンショスタットを用いたフェレドキシンからグラファイト電極への電子伝達測定の条件検討では、明確な電子伝達が観察できなかった。これは用いた Fd の濃度が十分でなかったためだと考えられ、今後も改善を試みる予定である。

<引用文献>

Ieropoulos IA, Greenman J, Melhuish C, Hart J (2005) Comparative study of three types of microbial fuel cell. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 238-245

Inoue K, Qian X, Morgado L, Kim BC, Mester T, Izallalen M, Salgueiro CA, Lovley DR (2010) Purification and characterization of OmcZ, an outersurface, octaheme c-type cytochrome essential for optimal current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 76:3999-4007

Mehta T, Coppi MV, Childers SE, Lovley DR (2005) Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 71: 8634-8641

Weber KA, Achenbach LA, Coates JD (2006) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol* 4:752-764

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maekawa Haruhiko, Otsubo Miyabi, Sato Mitsuhiro P., Takahashi Tomoko, Mizoguchi Koichiro, Koyamatsu Daiki, Inaba Takehito, Ito-Inaba Yasuko	4. 巻 41
2. 論文標題 Establishing an efficient protoplast transient expression system for investigation of floral thermogenesis in aroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 263 ~ 275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00299-021-02806-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirosawa Yoshihiro, Tada Akari, Matsuura Takakazu, Mori Izumi C, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Uehara Susumu, Ito-Inaba Yasuko, Inaba Takehito	4. 巻 62
2. 論文標題 Salicylic Acid Acts Antagonistically to Plastid Retrograde Signaling by Promoting the Accumulation of Photosynthesis-associated Proteins in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1728 ~ 1744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitawaki Kohei, Mihara Ryota, Kamimura Saori, Sato Akito, Ushiyama Mari, Ito-Inaba Yasuko, Inaba Takehito	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Chemical screening approach using single leaves identifies compounds that affect cold signaling in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiad280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山明、和田啓、加野帆駆斗、長友春花、内田健裕、井上謙吾
2. 発表標題 Geobacter sulfurreducens由来シトクロムOmcZの結晶構造解析及び電気化学的解析
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	井上 謙吾 (Inoue Kengo) (70581304)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------