

水素エネルギー生産を目指した光合成の水分解機構の 解明と改良

Analyses of Molecular Mechanisms of the Water Split on Photosynthesis ~For Application to Hydrogen Energy Manufacture~

研究代表者：大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 助教 杉浦 美羽
Department of Plant Biosciences, Osaka Prefecture University,
Assistant Professor Miwa SUGIURA

水素エネルギーは、排出物が水のみであるため、クリーンなエネルギーとして化石燃料に替わる新しいエネルギーとして注目されている。しかし、現在は水を電気分解して水素を取り出しているため、効率良いエネルギー生産方法ではない。

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なると考えられる。この時、より多く水素イオンを作る反応系を作る、つまり、より速く水を分解できる人工光合成システムを作れば、より効率的である。その為には、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、光合成による有機太陽電池を目指して、光合成の基礎的研究を行う。

Fossil fuels are the main energy source today. However, well known problems are linked to this use: 1) the probable end of this source in a near future, 2) production of tremendous CO₂ the increasing amount of which in the atmosphere inducing a global warming. Because its use only excretes water, "Hydrogen energy" is a remarkable new "clean energy" for the next generations. The process of this energy manufacture, however, required actually much more electric energy than H₂ can release. Therefore, we have to elaborate efficient new strategies.

By using solar energy, photosynthetic organisms generate protons (H⁺) and oxygen molecules as secondary products by extracting electrons from water molecules, a free and unlimited compound. In short, the first steps of the photosynthesis process carries out "electrolysis" with solar energy. In addition, the organisms uptake CO₂ from the earth to synthesize sugar. The photosynthetic process is a perfect model to produce both protons and electrons in a minimum cost, and to reduce CO₂. We can expect that biomimetic catalysts will have great advantages over the very expensive chemical catalyst used actually to produce molecular hydrogen. If we succeed to construct genetic engineered photosynthetic organism which is accompanied with production of H₂, we are able to solve both problem of energy production and CO₂ increasing. Although it is known that water molecule is oxidized by a cluster including Mn in Photosystem II reaction centre, the molecular mechanism remains to be elucidated.

I have investigated about the structure and mechanism of water oxidation in molecular level. In this study, I construct new photosynthetic organism which is invested the ability of reduction of H⁺ to H₂ by introduction of dehydrogenase gene and try to produce hydrogen by the organism and solar energy. Also, I try to accelerate water oxidation to release H⁺ for efficient H₂ production. This strategy can be resulting in ideal "bio-organic solar battery".

1. 研究目的

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、また、大気中のCO₂濃度の観点から、我々は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させる必要性に迫られている。

本研究では、近い将来、光合成生物を利用して太陽光のみのエネルギーで効率良く水素エネルギーを生産することを目指して、その基本反応である光合成の水の酸化機能を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

光合成電子伝達系は植物の葉緑体チラコイド膜に局在し、太陽光エネルギーの化学エネルギーへの変換反応を行っている(図1a)。その初発の反応は、20サブユニットタンパク質と70以上のコファクターから成る650 kDaの巨大なタンパク質複合体である光化学系IIで行われる。この複合体に光が照射されると、2量体クロロフィル分子でできたP₆₈₀が励起され、それが電荷分離されて電子を発生し、同時に、複合体の別の場所では水を酸化して酸素を発生させ、この時に生じた電子を励起状態のP₆₈₀^{*}に伝達することでP₆₈₀^{*}は基底状態に戻る(図1b)。

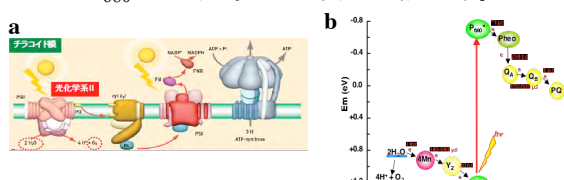


図1. 葉緑体チラコイド膜における光合成電子伝達系(a)および光化学系IIの電位に基づく電子伝達(b)。

水の酸化反応については、4原子のMnと1原子のCaから成るMn₄Ca₁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不明である。水の酸化反応速度はこのクラスター構造を含む触媒中心の反応のみによるものではなく、ここから電子を受け取る2量体クロロフィルP₆₈₀の極めて高い酸化力によるもの

と考えられる。このP₆₈₀⁺/P₆₈₀の酸化還元電位は推定+1.2 Vと推定されており、生物界で最も高い。

本研究では、熱安定なタンパク質を作る好熱性ラン藻を材料に用いて遺伝子組換えによるアミノ酸置換を加え、P₆₈₀周辺のアミノ酸の水の酸化反応速度とP₆₈₀の酸化還元電位への役割について調べた。更に、水の酸化反応の触媒中心であるMn₄Ca₁クラスターにおけるCaの機能における詳細な役割について調べるために、CaをSrに置換した組換え体を作製して、水の酸化反応の中間体をトラップして構造変化、水の酸化のキネティクス等を調べた。

2. 研究経過

P₆₈₀クロロフィルおよびMn₄Ca₁クラスターは、詳細の構造は分からないものの、光化学系II複合体タンパク質のコアとなる反応中心タンパク質D1およびD2に局在していることが、これまでの研究により分かっている。D1をコードする遺伝子は*psbA*と呼ばれており、本研究の材料に用いた好熱性ラン藻*Thermosynechococcus elongatus*のゲノムDNA上には3つのホモログが、D2遺伝子である*psbD*は2つのホモログが存在する(参考文献1)。遺伝子工学的にアミノ酸を置換する際に1つの遺伝子に変異を導入すると、別のホモログが発現することが分かっている(参考文献2)。そこで、本研究ではまず、*T. elongatus*ゲノムDNA上の別のホモログ遺伝子を抗生物質耐性遺伝子に置き換えることにより、1つの遺伝子しか発現しない組換え体を作製し、これを宿主細胞に用いて、部位特異的変異を導入した。

私は2004年にP₆₈₀の近傍に存在するD2のレドックスアクティブなTyr残基(Tyr_D)の水の酸化反応およびP₆₈₀の酸化還元電位への役割について報告しており(参考文献2)、このアミノ酸の正電荷が光化学系IIの電子伝達速度に重要な役割を持つことを明らかにした。このTyr_Dから約3 Åの距離にあるHis残基は、Tyr_Dと水素結合して機能を保っていると推測できるものの、その証拠はなかった。本研究では、*psbD2*をノックアウトした*T. elongatus*の*psbD1*遺伝子にHisをLeuに換えてTyr_Dと水素結合できなくなった部位特異的変異体を作製し、変異体細胞から精製した光化学系II

複合体を用いて、その性質について調べた。

一方、水の酸化反応は D1 と D2 にまたがって存在する Mn_4Ca_1 クラスターの触媒反応によって行われることは分かっており、エネルギー準位の異なる中間体 S_0 、 S_1 、 S_2 、 S_3 が存在することが知られている。これらの構造がどのように変化しているのかについては既に報告したが（参考文献 3）、Ca の機能への役割については不明である。本研究では、この役割について調べるために、クラスターの Ca を Sr に置換した変異体を作製し、この光化学系 II における Ca の役割および酸化反応の中間体をトラップして構造を調べ、また、酸素放出のキネティクスなどを測定した。

3. 研究成果

3-1. D2 の Tyr_D と His の構造と機能

D2 の His を Leu に置換した遺伝子組換え体 H189L から精製した光化学系 II 複合体は、野生型と同程度 ($\sim 3,000 \mu\text{mol O}_2/\text{mg chlorophyll/h}$) の高い水の酸化活性を持っていた。化学処理によって Mn_4Ca_1 クラスターを外した光化学系 II 複合体の Tyr_D ラジカル の 9 GHz EPR シグナルを測定すると、pH6.5 では Tyr_D が酸化されず、全くシグナルを得ることができなかった（図 2a）。pH10 で測定すると Tyr_D は酸化され、野生型のシグナルとは少し異なった形ではあるが、強いシグナルを得ることができた（図 2b）。

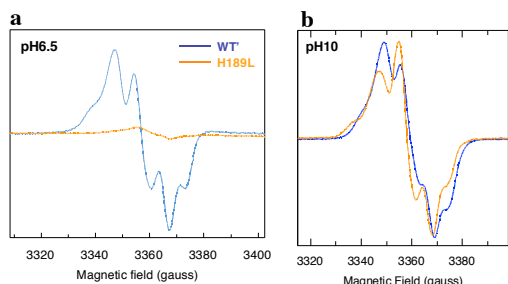


図 2. 野生型(WT:青)およびHisをLeuに置換した(H189L:オレンジ)光化学系 II 複合体の Tyr_D の 9 GHz EPR シグナル。(a) pH6.5 (b) pH10 で測定。

更に、 Tyr_D とこの His の分子構造上での関係を調べるために、Tyr から生じる EPR シグナルを 3 方向に分けるために高磁場(285 GHz)で測定したところ、図 3 に示すように、His を Leu に置換した光化学系 II では、野生型よりもずっと高磁場側の、これまでに報告のない g_x 方向に高いバンドが現れた。

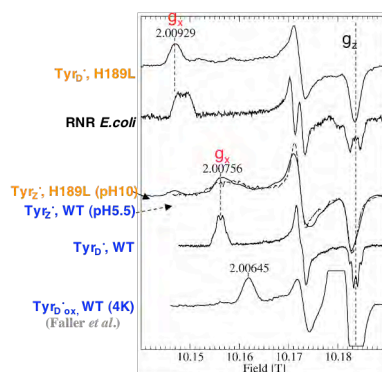


図 3. 285 GHz EPR における Tyr_D シグナル。

この結果は、His を Leu に置換することによって、 Tyr_D の水酸基方向の周辺環境には全く水分子が無くなったことを示している。これらの結果から、野生型では、His は Tyr_D と水素結合を形成しており、 Tyr_D の酸化は H^+ の放出に伴ってされることが初めて明らかになった（図 4）。

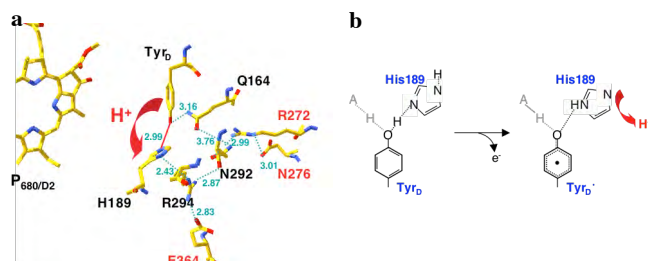


図 4. Tyr_D 周辺の分子構造(a)と H^+ 放出に伴う Tyr_D の酸化(b)。

3-2. Mn_4Ca_1 クラスターを Mn_4Sr_1 に置換した光化学系 II の水の酸化反応

水の酸化過程には S_0 から S_3 のエネルギー準位の異なる 4-5 つの反応中間体が存在することは既に分かっており、遷移に伴ってクラスターを構成する Mn の価数が変化し、クラスター構造も変わることが明らかになってきた（図 5a）。本研究では、クラスターにおける Ca の構造的および機能的な役割を調べるために、水の酸化触媒中心の Mn_4Ca_1 クラスターの Ca を Sr に置換して光化学系 II を精製し、水の酸化中間体の分子構造変化を調べた。精製した光化学系 II 複合体における Mn は完全にインタクトであることを確認したが、定常光照射下での酸素発生活性は野生型の光化学系 II の約半分 ($\sim 1,500 \mu\text{mol O}_2/\text{mg chlorophyll/h}$) であった。水の酸化キネティクスを測定するために、 S_0 状態にした光化学系 II に 100 ns の間隔で閃光を照射し、 S_3 状態から S_0 状態に戻

る際に生じる酸素の放出キネティクスを測定すると、野生型が $t_{1/2}=1-2$ ms だったのに対し、Sr 置換した光化学系 II では $t_{1/2}=5-7$ ms で、Sr にすることにより 5 倍程度遅くなった(図 5b)。

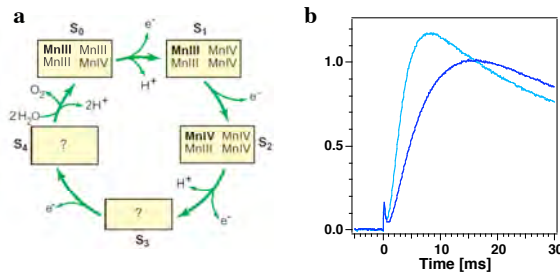


図 5. 水の酸化の中間体 (S 状態遷移) (a)および S_3 から S_0 へ遷移するとき生じる酸素生成のキネティクス(b)。水色は野生型、青は Ca を Sr に置換した触媒中心を持つ変異体。

更に、これらのそれぞれの中間体をトラップし、FTIR 差スペクトルによってそれらの分子構造変化を調べる事に成功した (図 6)。

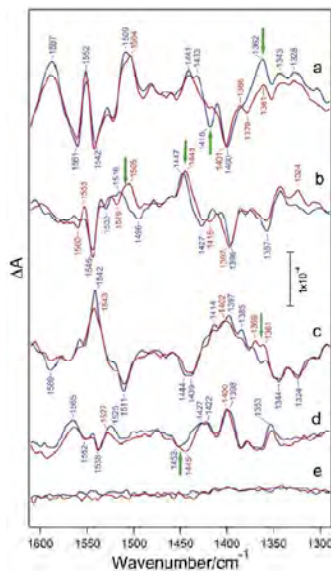


図 6. S 状態遷移に伴う Mn クラスター周辺構造の FTIR 差スペクトル (COO 伸縮振動領域)。青は野生型 Mn_4Ca_1 クラスター、赤は Mn_4Sr_1 クラスター持つ光化学系 II。(a) $S_1 \rightarrow S_2$ 、(b) $S_2 \rightarrow S_3$ 、(c) $S_3 \rightarrow S_0$ 、(d) $S_1 \rightarrow S_2$ 、(e) dark-minus-dark。

4. 今後の課題と発展

本助成研究開始時の目的である、“熱安定なタンパク質を作る好熱性ラン藻を用いて遺伝子組換えによるアミノ酸置換を加え、水の酸化反応速度と P_{680}^+/P_{680} の酸化還元電位の関係を調べ、光合成の基礎研究に学問としての進歩をもたらす”ことを達成しつつある。次に、これらの結果を応用して、光合成を最大限に利用し、本助成の最終目的である“大気中の CO_2 削減を目指した太陽エ

ネルギーの有効利用”への応用研究に取り組みたい。

【参考文献】

1. <http://bacteria.kazusa.or.jp/cyano/Thermo/index.html>
2. Sugiura, M., Rappaport, F., Brettel, K., Noguchi, T., Rutherford, A.W., and Boussac, A. Site-directed mutagenesis of *Thermosynechococcus elongatus* photosystem II: the O_2 evolving enzyme lacking the redox active tyrosine D, *Biochemistry*, (2004) 43, 13549-13563
3. Noguchi, T., and Sugiura, M. Flash-induced fourier transform infrared detection of the structural changes during the S-state cycle of the oxygen-evolving complex in photosystem II, *Biochemistry* (2001) 40 (6), 1497-1502

5. 発表論文リスト

1. Un, S., Boussac, A. and Sugiura, M. “Characterization of the tyrosine-Z radical and its environment in the spin-coupled S_2Tyr_Z state of Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus*” *Biochemistry*, (2007) 46, 3138-3150
2. Suzuki, H., Taguchi, Y., Sugiura, M., Boussac, A. and Noguchi, T. “Structural perturbation of the carboxylate ligands to the Mn Cluster upon Ca^{2+}/Sr^{2+} exchange in the S-state Cycle of Photosynthetic oxygen evolution as studied by flash-induced FTIR difference spectroscopy” *Biochemistry*, (2006) 45, 13454-13464