

	あじき しゅういち
氏名	安食 秀一
授与学位	博士(工学)
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科、専攻の名称	東北大学大学院工学研究科(博士課程) 生物工学専攻
学位論文題目	光合成タンパク質を用いた光エネルギー変換システムの構築に関する研究
指導教官	東北大学教授 野澤 庸則
論文審査委員	主査 東北大学教授 野澤庸則 東北大学教授 西野徳三 東北大学教授 宮下徳治

光合成反応の初期過程は、光合成タンパク質分子内において特定の配置に保持された光合成色素分子 2 量体による光エネルギーの吸収から始まり、電荷分離反応を経て電気化学エネルギー（酸化還元力）へと変換される。この光エネルギーから電気化学エネルギーへの変換と、それに引き続く電子伝達反応の量子効率、生体中においてほぼ 100%と極めて高く、高効率でかつクリーンなエネルギー変換システムと見なすことができる。

本研究では、生体から取り出した光合成タンパク質を光エネルギー変換システムとして *in vitro* で利用することを目的としている。光合成細菌由来の光合成タンパク質を用いて、太陽電池のように他の素子を駆動するためのエネルギー供給源となる光量子-電子変換素子を、また植物由来の光合成タンパク質を使用してバイオリクターを駆動するためのエネルギー供給源を構築した。どちらの場合も生体の光合成系がもつ光量子（フォトン）から電子（エレクトロン）への変換効率の高さをそのまま生かし、光合成細菌由来の光合成タンパク質では直接電流として、また植物由来の光合成タンパク質では高い還元力をもつ物質である NADPH としてエネルギーを取り出すことが可能となった。以下に本研究で得られた結果を各章ごとに要約する。

第1章 緒言

第1章では光合成生物をその光合成機能に着目して分類し、各々の光合成系の違いに関して、また光合成生物を利用した既往の研究を分類してまとめた。光合成細菌由来の光合成系と植物由来の光合成系の違いと特徴に言及し、目的に応じて利用する光合成系を選択する必要性があることを示した。

第2章 紅色光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来の光合成タンパク質複合体の単離と精製およびその性質

紅色光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* (*Rps. rubrum*) のクロマトフォアから、RC と LH1 からなる複合体である LH1-RC 複合体を、界面活性剤 Triton X-100 を用いて選択的に可溶化し、ワンステップのカラムクロマトグラフィーにより単離・精製した。可溶化時に、共存させる塩として KCl を添加することで、タンパク質可溶化効率が高まることを見いだした。精製した LH1-RC 複合体は Triton X-100 ミセル中で単分散の状態が存在し、含まれる光合成色素量は生体中での状態をほぼ保存

していることを確認した。界面活性剤を Triton X-100 から CHAPS に置換したのち、LH1-RC 複合体を人工脂質膜小胞であるリポソームに再構成した。脂質膜中に再構成することにより LH1-RC 複合体の LH1 に由来する BChl *b* の吸収ピークがレッドシフトする (1000 nm から 1006 nm へ) ことがわかり、LH1 の安定化が示唆された。

第3章 紅色光合成細菌 *Rps. viridis* 由来の光合成タンパク質を用いた光エネルギーから電気化学エネルギーへの変換素子の作製

LH1-RC 複合体をリポソームに再構成し、電着法により ITO (Indium-Tin Oxide) 電極基板上に固定化した。固定化膜中における LH1-RC 複合体分子の配向角を直線偏光二色性の測定により求めたところ、基板上にほぼ垂直 (2.4°) に配向固定化していることが明らかになった。

クロマトフォア乾燥膜を光電変換層に用いた乾燥系光電変換素子を作製し、光電気応答を測定した。開放端光電圧応答として光照射 3 秒後に 120 mV を示し、また短絡光電流応答では 52 nA/cm^2 というピーク値が得られた。この乾燥系光電変換素子は完全固体素子であり、素子の対向電極形成に必要な真空蒸着プロセス (真空度 10^{-5} Torr 台、約 1 時間) 後においても、その光合成初期反応である光電荷分離機能が保持されていることを実証した。

電子伝達メディエータ層を利用した半湿式系光電変換素子 (図 1) では、メディエータとして $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を 250 mM 添加した寒天層を使用し、クロマトフォア電着膜からなる光電変換層に積層して素子を作製した。この半湿式系光電変換素子からは、開放端光電圧応答として 120 mV (図 2A)、また短絡光電流応答として $450 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ (図 2B) がピーク値として得られた。この光電流値は、乾燥系光電変換素子において得られた値の 9000 倍近くに達した。

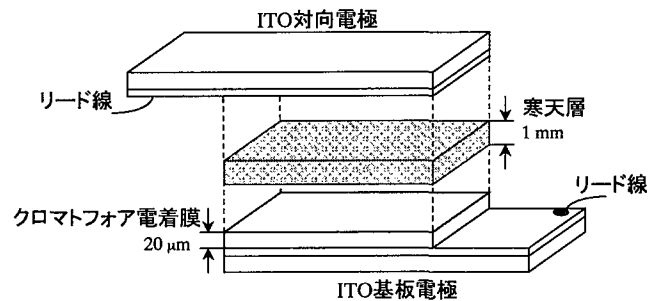


図 1 半湿式系光電変換素子の構造

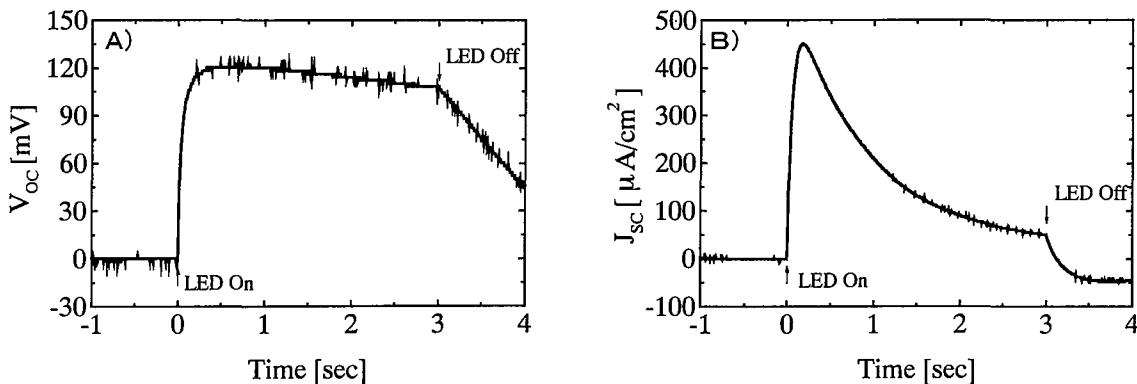


図 2 半湿式系光電変換素子の光電気応答

第4章 植物光合成タンパク質複合体の調製と固定化

光バイオリアクターのエネルギー供給源として利用するために、ホウレン草チラコイド膜をアビジン-ビオチン間の強固な特異的結合を利用してゲルビーズ上に固定化した。チラコイド膜溶液濃度に換算して $A_{680}=5\sim 10$ に相当する高い濃度でゲルビーズ上に固定化することができた。ゲルビーズ固定化チラコイド膜に赤色 LED 光を照射することで、NADPH 生成の Hill 反応活性を確認した。ビーズ容積 1 ml あたり約 5800 nmol/hr の NADPH を生成することが可能であった。光合成系において、4 光子を使って 1 分子の NADPH を生成できると仮定すると、この反応 1 時間の平均量子効率 は 2.3% であった。

第5章 植物光合成タンパク質複合体を用いた光エネルギーによる物質生産

NADPH 消費型の酸化還元酵素であるシトクロム P450 を駆動する光バイオリアクターを構築した。ホウレン草光合成系とシトクロム P450 酸化還元酵素系を組み合わせる光共役酵素反応系を構築した光により酸化還元酵素を駆動するシステムである。シトクロム P450 の基質として 7-ethoxycoumarin を使用し、P450 により O-脱エチル化された代謝物 7-hydroxycoumarin の生成量から光共役酵素反応系の評価をおこなった。チラコイド膜への光照射 (光照射強度 2.1 mW/cm² の場合) 開始から 1 時間で、P450 ミクロソームを固定化したゲルビーズ容積 1 ml あたり 3.3 nmol の 7-hydroxycoumarin が、また光照射後 3 時間では 4.5 nmol の 7-hydroxycoumarin が生成した (図 3)。エネルギー供給系である固定化チラコイド膜は、P450 の代謝物生成量に比べて 1000 倍以上の NADPH を供給することができ、光合成系は十分に働いていることが確認できた。

第6章 総括

生体から取り出した光合成タンパク質を光エネルギー変換システムとして、その機能を *in vitro* で利用した。光合成細菌由来の光合成タンパク質を用いて光電変換素子を、また植物由来の光合成タンパク質を用いてバイオリアクターを駆動するための光によるエネルギー供給源を構築した。生体が有する高度な機能を人為的に抽出し、その機能を利用することに成功した。

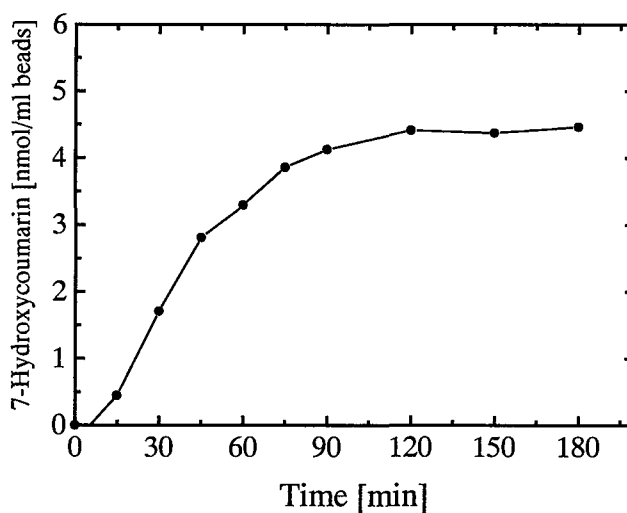


図 3 光共役酵素反応による酵素活性

論文審査の結果の要旨

本学位論文は光合成細菌 *Rhodospseudomonas(Rps.) viridis*, 高等植物ホウレン草 *Spinacia oleracea* L.を対象にして、その光合成膜および光合成タンパク質複合体である光捕集系Ⅰ-反応中心複合体(LHI-RC)を用いた光エネルギー変換素子ならびに光エネルギー変換システムを構築して、光エネルギーの電気エネルギーならびに化学エネルギー(還元力)への変換を行うための基礎的研究を行っている。

第1章は緒論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第2章では光合成細菌 *Rps. viridis* からの光合成タンパク質複合体の単離と精製およびその性質を検討した結果をのべている。界面活性剤および添加塩を巧みに選択することにより従来法より効率的に変性のない状態で単離、精製できる条件を見いだした。

第3章においては、光合成細菌 *Rps. viridis*より単離・精製したLHI-RCをリポソームに再構成した膜顆粒ならびに光合成膜(クロマトフォア)を用いて、キャスト法および電着法により、光エネルギーを電気エネルギーに変換する光電変換層の作製とそのキャラクタリゼーションについて述べている。再構成リポソームによる電着膜においてはLHI-RC複合体は基板に分子軸をほぼ垂直に固定されるものの光電応答はクロマトフォアを電着した場合を超えられなかった。クロマトフォアを光電変換層に使用した場合はITOとAuでサンドイッチした場合52nAの電流と120mVの電圧が発生する固体素子が得られた。さらに、光電変換応答を増大させるためにクロマトフォア層にフェロシアンカリを含むメディエーターを重層することにより開放端電流が450 μ Aと光電変換能を乾燥系素子に比較し8000倍以上に飛躍的に増大させることが出来たもので、高く評価できる。

第4章においては、高等植物の光合成膜すなわちホウレン草葉緑体のチラコイド膜を光変換システムとした光バイオリアクターの構築を試みた結果を述べている。アビジン-ビオチン法によるチラコイド膜のゲルビーズへの固定化し、この固定化担体を用いてNADP⁺を還元して、光エネルギーを化学エネルギー(還元力)に変換するカラム系を構築した。発光ダイオードを励起光源として使用してゲルビーズ1mlあたり5,800nmol/hrのNADPHを生成することが出来、平均量子効率2.2%を達成した。

第5章では前章で得られた光エネルギーによるNADPH生成系にこれと共役する酵素反応系を組み合わせる試みを行った。酵素反応系として種々の有機生理活性物質の代謝反応で重要な役割を果たしているシトクロムP450を用い、これをカラム材ゲルビーズに固定して、独立したカラムに構築し、NADPH生成カラムとの組み合わせたチラコイドによる光共役酵素反応系を構築した。検出方法の感度、操作性を考慮して7-ethoxycoumarinに1原子酸素を添加して7-hydroxycoumarinを生成する反応を用いて反応効率を評価した。その結果P450ゲルビーズ1mlあたり3.3nmol/hrの7-hydroxycoumarinを生成することが確認され、光-化学エネルギー変換系から供給される化学エネルギー(還元力)は十分に光共役酵素反応を駆動し得ることを実証した。

第6章では以上の研究を総括した。

以上要するに本論文では、光合成タンパク質を用いた光エネルギー変換システムの構築に関する基礎的研究を行い、光エネルギーの電氣的エネルギーならびに化学的エネルギー変換系構築のための基礎的条件を明らかにしたものであり、生物工学の発展に寄与するところが大である。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。