

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13863

研究課題名(和文) グラフェンプラズモニクスによる光合成単一超分子計測の確立

研究課題名(英文) Single molecule spectroscopy on a photosynthetic pigment-protein complex

研究代表者

小澄 大輔 (Kosumi, Daisuke)

熊本大学・パルスパワー科学研究所・准教授

研究者番号：70613149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物・藻類・細菌類における光合成機能は、自然が創出した最もエネルギー変換効率の良いナノバイオ集積フォトニックデバイスである。このような生体分子の一分子分光計測は、その本質的な電子・エネルギー輸送現象解明に向けた急務な課題である。本研究課題ではこのような要請から、単一光子レベルの検出が可能であり、光合成エネルギー伝達過程を実時間で観測可能なピコ秒の時間分解能を持つ分光システムの構築を行った。また、単一超分子分光を実現するために十分なサイズを持つフィコビリソーム超複合体をシアノバクテリア及び紅藻から調製する手法を確立し、そのエネルギー伝達過程の詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The photosynthetic organisms in plants, algae and bacteria are nano-bio integrated photonic devices with the most efficient energy conversion function in the earth. Single molecule spectroscopic measurements on such biomolecules are an urgent task to clarify their essential electron and energy transport phenomenon. In this project, we have developed a spectroscopic system with picosecond time resolution capable of single photon level detection and real-time observation of photosynthetic energy transfer process. We also established a method to prepare a phycobilisome supercomplex with sufficient size to realize single supramolecular spectroscopy from cyanobacteria and red algae, and clarified details of their energy transfer processes.

研究分野：光物性物理学

キーワード：光合成 プラズモニクス 単原子層ナノシート エネルギー伝達

### 1. 研究開始当初の背景

植物・藻類・細菌類の光合成アンテナでは、色素分子と周辺タンパク質が超分子会合体を形成し、光合成膜中で最密充填的に2次元配列することで(図1(A))、超高速 (~100 fs)かつ高効率 (~100%)な励起エネルギー移動を実現している<sup>1</sup>。当該分野においては、オランダ・フランスのグループによりAFMを用いた紅色細菌由来光合成膜のその場観測が報告された(図1(A))。ドイツのグループは紅色細菌由来の光合成アンテナLH2に対して、極低温下(1.2 K)で単一分子計測を成功させた(図1(C))。また、スペインのグループでは単一分子分光と超短光パルスを組み合わせることで、LH2における2つのリング会合体B800とB850の量子相関観測を報告した(図1(D))。国内における単一分子分光計測は、量子光学・量子情報分野を中心に盛んに行われ、光合成分野では東工大のグループが精力的に研究を行っている。しかしながら、生化学分野における単一分子分光計測では北米に後れを取っているのが現状であり、日本独自のアイデアを取り入れた研究が必要である。我々は様々な超高速分光計測技術を駆使し、光合成アンテナ系における励起エネルギー移動ダイナミクスに着目した研究を行ってきた。しかしながら、これまで行ってきたマクロ測定では、個々の光合成超分子の情報(光合成色素における電子・振動の微細構造、周辺タンパク質との相互作用等)がアンテナサンプルに埋もれてしまうため、本質的な問題を解決できない状況に直面していた。

### 2. 研究の目的

光合成のような生体分子の単一分子分光計測

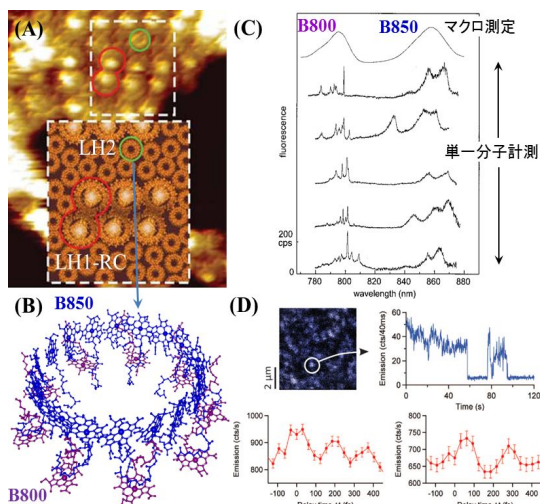


図1: (A)光合成膜中の光合成アンテナ LH1-RC と LH2 の空間配列、(B)LH2 の色素配列。単一分子分光で観測された(C)LH2 の電子構造及び、(D)B800-B850 間の電子コヒーレンス。

は、その本質的な電子・エネルギー輸送現象解明に向けた急務な課題である。一方、アポガドロ数個の分子を計測するマクロ測定とは異なり、単一分子計測では得られる信号強度が極限的に微弱であるため、適用範囲が高収率な発光性材料に限られてきた。本研究課題では、単原子層ナノシート上に単離調製された単一光合成超分子を配置し、超短光パルスを用いた分光計測システムを構築し、マクロ光学系を用いた単一光合成超分子の励起状態ダイナミクスの観測を生体温度条件下で実現することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 単一光子レベルで検出可能な分光計測装置の構築

単一光合成超分子による微弱な信号の検出を行うため、単一光子レベルで検出可能な分光計測装置の構築を行った。試料を励起するための光源には、フェムト秒チタンサファイア再生増幅器 (Spitfire-Pro, SpectraPhysics) を使用し、光パラメトリック増幅器 (TOPAS-C, SpectraPhysics)により、100 フェムト秒波長可変パルスを得た。分光手法としては、高感度に信号を検出できる発光分光を採用した。試料前で光パルスを2分割し、一方は試料を励起するための励起光とし、もう片方を参照光とした。参照光は高速フォトダイオード (PDM-400, Becker&Hickel)で検出し、試料からの発光信号は分光器 (SP275, Acton Research)を通したのち、シングルフォトンアバランシェダイオード (PD-050-CTD, MPD)で検出した。参照光と発光信号を時間相関単一光子計測モジュール (SPC-130EM, Becker&Hickel)で読み込むことにより、20 ピコ秒の時間分解能を持つ発光分光測定が可能となった。

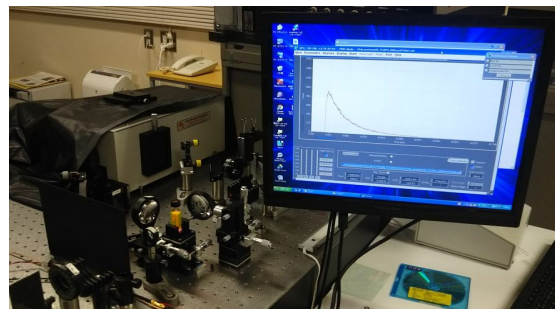


図2: 本研究で構築したピコ秒時間分解発光分光計測装置。

#### (2) 光合成色素たんぱく複合体の調製

光の持つ回折限界により、可視光を集光できるのは数百ナノメートルに限られる。そのため、単一超分子での分光を行うには、できるだけ大きなサイズを持つ色素たんぱく複合体が好ましい。シアノバクテリア及び紅藻が有する光捕集アンテナであるフィコピリソームは、分子量 1 MDa 以上、直径数十ナノメートルの巨大色素たんぱく超複合体である。フィコピリソームは多数の色素たんぱく

複合体が、たんぱく質間相互作用により超複合体を形成している。このため、光合成膜からフィコビリソームをタンパク質レベルで調整する生化学手法は完全には確立されていない。本研究では、新たな生化学手法を確立し、シアノバクテリア及び紅藻からフィコビリソームをタンパク質レベルで調整し、分光計測に用いた。

#### 4. 研究成果

高熱性シアノバクテリアから調製したフィコビリソームを電子顕微鏡により観察した画像を図に示す。画像からは、直径 70 nm ほどの大きさを持つ粒子が多数観測された。この結果から、本研究で確立した生化学手法により、フィコビリソームがタンパク質レベルで調整できたことが示される。

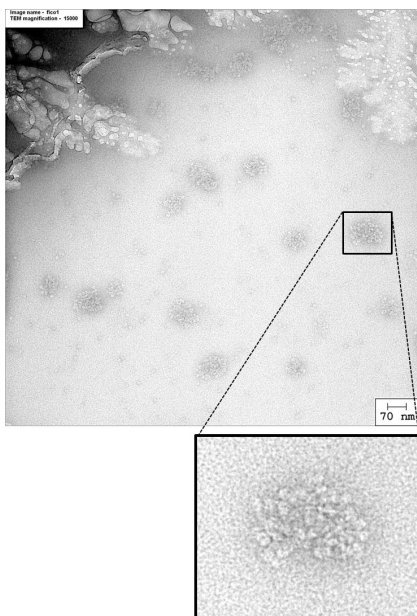


図 3: 好熱性シアノバクテリアから調製したフィコビリソームの電子顕微鏡画像。

図 4 に本研究で得られた試料に対し、ピコ秒時間分解発光分光を行った結果を示す。励起波長は 630 nm、励起光強度は 100 pJ/pulse として行った。630 nm はフィコビリソームを形成する複合体の一つである、フィコシアニンの吸収波長に対応する。フィコシアニンにより吸収された光エネルギーは、フィコビリソームの中核に位置するアロフィコシアニンに伝達されている。さらに、アロフィコシアニンと相互作用する光化学系 II へとエネルギー伝達していることが観測された。得られた蛍光信号の時間依存性に対し、グローバル解析を行ったところ、フィコシアニン、アロフィコシアニン、光化学系 II (アンテナ)、光化学系 II (反応中心) に由来する蛍光スペクトルが得られ、アンテナから電子伝達系へのエネルギー伝達過程の詳細が明らかになった。

本研究課題では、単一光子レベルで観測可能な分光計測システムを構築し、シアノバクテリア由来の光合成系におけるエネルギー伝達過程を明らかにした。紅藻由来の光合成系においても、同様の結果が得られている。

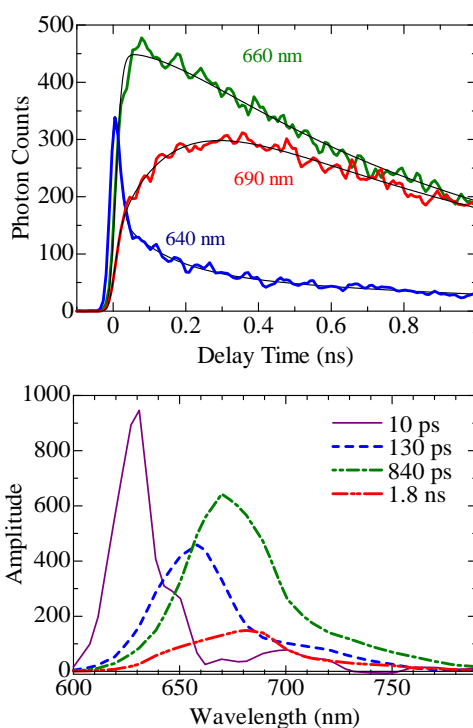


図 4: 好熱性シアノバクテリアから調製したフィコビリソームにおける時間分解発光分光の結果。(上) 蛍光信号の時間依存性、(下) グローバル解析による Evolution-associated fluorescence spectra (EAFS)。

一方、当初の研究目標としていた単一超分子レベルでの解明には至っていない。本研究課題では、グラフェンに代表される単原子層ナノシート上に超分子を配列し、プラズモン増強効果を利用して信号の増大を行うことを計画していたものの、ナノシートの面積が数マイクロメートル程度の物しか得られず、目標は達成されていない。一方、単一超分子分光を行うのに、十分な大きさを持つ (~70 nm) 色素たんぱく複合体を調製する手法は確立することができたので、今後は ~mm 程度の大きさを持つナノシートを作成する手法が確立されれば、常温で顕微鏡を使用しない単一超分子分光の実現が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Daisuke Kosumi, Tomoya Nishiguchi, Yutaka Amao, Richard J. Cogdell, Hideki Hashimoto, "Singlet and Triplet Excited States Dynamics of Photosynthetic Pigment Chlorophyll *a* Investigated by Sub-Nanosecond Pump-probe Spectroscopy", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **358**, 374-478, 2018. 査読有
2. Nao Yukihiro, Yuko Sugai, Masazumi Fujiwara, Daisuke Kosumi, Masahiko Iha, Kazuhiro Sakaguchi, Shigeo Katsumura,

- Alastair T. Gardiner, Richard J. Cogdell, and Hideki Hashimoto, "Strategies to enhance the excitation energy-transfer efficiency in the light-harvesting system using the intra molecular charge transfer character of carotenoids", *Faraday Discussions*, **198**, 59-71, 2017. 査読有
3. **Daisuke Kosumi**, Takayuki Kajikawa, Kazuhiko Sakaguchi, Shigeo Katsumura, and Hideki Hashimoto, "Excited State Properties of b-Carotene Analogs Incorporating a Lactone Ring", *Physical Chemistry Chemical Physics*, **19**, 3000-3009, 2017. 査読有
  4. 廣田悠真、藤本将吾、川上恵典、神谷信夫、**小澄大輔**、「シアノバクテリア由来光合成超複合体におけるエネルギー伝達過程」, 第 28 回光物性研究会論文集、63-66、2017 年 査読無
  5. 内村祐貴、西本徹、埜本真友華、伊藤亮孝、**小澄大輔**、「ナノイオンキャリアに担持させたフェオフォーバイド a における蛍光寿命の分子密度依存性」, 第 28 回光物性研究会論文集、347-350、2017 年 査読無
  6. **Daisuke Kosumi**, Tomoko Horibe, Mitsuru Sugisaki, Richard J. Cogdell, Hideki Hashimoto, "Photoprotection Mechanism of Light-Harvesting Antenna Complex from Purple Bacteria", *The Journal of Physical Chemistry B*, **120**, 951-956, 2016. 査読有
  7. **Daisuke Kosumi**, Takayuki Kajikawa, Kazuhiko Sakaguchi, Shigeo Katsumura, and Hideki Hashimoto, "Excited State Properties of b-Carotene Analogs Incorporating a Lactone Ring", *Carotenoid Science*, **21**, 36-41, 2016. 査読有
- 達過程」, 第 28 回光物性研究会、IA-15、京都、12 月 9、10 日、2017 年
4. 内村祐貴、西本徹、埜本真友華、伊藤亮孝、**小澄大輔**、「ナノイオンキャリアに担持させたフェオフォーバイド a における蛍光寿命の分子密度依存性」, 第 28 回光物性研究会、II B-86、京都、12 月 9、10 日、2017 年
  5. 藤本将吾、芳野修平、**小澄大輔**、「波長可変パルスレーザーを用いた時間相関単一光子計数法によるクロロフィル a の蛍光寿命測定」, 光合成セミナー2017、P-23、神戸、7 月 15、16 日、2017 年
  6. **Daisuke Kosumi**, Tomoya Nishiguchi, Yutaka Amao, Richard J. Cogdell, Hideki Hashimoto, "TRIPLET EXCITED STATE DYNAMICS OF CHLOROPHYLL A AS REVEALED BY SUB-NS PUMP-PROBE SPECTROSCOPY", *ICARP2017*, P1-19, Kyoto, March, 1-4, 2017.
  7. Nao Yukihiro, Yuko Sugai, Masazumi Fujiwara, **Daisuke Kosumi**, Masahiko Iha, Kazuhiro Sakaguchi, Shigeo Katsumura, Alastair T. Gardiner, Richard J. Cogdell, and Hideki Hashimoto, "RECONSTITUTION OF THE LIGHT-HARVESTING 1 COMPLEX FROM A PURPLE PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* G9+ WITH FUCOXANTHIN" *ICARP2017*, P1-02, Kyoto, March, 1-4, 2017.
  8. Hideki Hashimoto, Nao Yukihiro, Yuko Sugai, Masazumi Fujiwara, **Daisuke Kosumi**, Masahiko Iha, Kazuhiro Sakaguchi, Shigeo Katsumura, Alastair T. Gardiner, Richard J. Cogdell, "Tactics to enhance the excitation energy-transfer efficiency in the light-harvesting system using the intra-molecular charge transfer character of carotenoids", *Artificial Photosynthesis: Faraday Discussions*, 12339, February, 24-28, 2017.
  9. 清水章皓、伊藤亮孝、**小澄大輔**、橋本秀樹、手木芳男、「誘起ラジカルを利用した高い光耐久性を有する新規ペンタセンの創生と機構及びそのスピン物性」, 第 55 回スピンサイエンス学会年会、1C5、大阪、11 月 10~12 日、2016 年
  10. Nao Yukihiro, Yuko Sugai, Masazumi Fujiwara, Chiasa Uragami, **Daisuke Kosumi**, Kazuhiro Sakaguchi, Shigeo Katsumura, Alastair T. Gardiner, Richard J. Cogdell, and Hideki Hashimoto, "Energy-transfer efficiency fucoxanthin reconstituted into the light-harvesting 1 complex from a purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* G9+", *The 23th International SPACC Symposium*, P16, Okayama, November, 21-23, 2016.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. **小澄大輔**、「超高速分光手法による光合成エネルギー伝達機構の解明」, 2017 年日本動物学会・九州沖縄植物学会・日本生態学会 合同熊本例会、熊本、11 月 25 日、2017 年 招待講演
2. Hideki Hashimoto, Nao Yukihiro, Hiroki Sato, Masazumi Fujiwara, Yuko Suga, Tomoko Horibe, **Daisuke Kosumi**, Alastair T. Gardiner, Richard J. Cogdell, "EXCITATION ENERGY TRANSFER AND DISSIPATION DYNAMICS OF CAROTENOIDS IN PHOTOSYNTHETIC ANTENNA SYSTEMS", *ICARP2017*, IL4-06, Kyoto, March, 1-4, 2017. 招待講演
3. 廣田悠真、藤本将吾、川上恵典、神谷信夫、**小澄大輔**、「シアノバクテリア由来光合成超複合体におけるエネルギー伝

11. **小澄大輔**、堀部智子、杉崎満、橋本秀樹  
「フェムト秒からマイクロ秒領域における光合成光保護過程の観測」、第10回分子科学討論会、1F10、神戸、9月13～15日、2016年
12. Yoshio Teki, Akihiro Shimizu, Yusuke Kawanaka, Akitaka Ito, **Daisuke Kosumi**, Hideki Hashimoto, "Using Excited-State Spin Dynamics of p-Radicals Toward Molecular Spintronics", *The 15th International Conference on Molecule-Based Magnets* (ICMM2016), 8C8, Sendai, September, 4-8, 2016.
13. 行平奈央、須貝裕子、藤原正澄、浦上千藍紗、伊波匡彦、**小澄大輔**、坂口和彦、勝村成雄、橋本秀樹、「紅色光合成細菌由来の LH1 複合体に海洋藻類由来のカロテノイドを再構築したスーパー人工光合成アンテナの創生」、新学術領域研究(人工光合成) 第5回合同班会議、山形、8月21～23日、2016年
14. **小澄大輔**、西口智也、橋本秀樹、「サブナノ秒ポンプ・プローブ分光による励起三重項クロロフィルの観測」、光合成セミナー2016、O-6、京都、7月9,10日、2016年
15. **小澄大輔**、堀部智子、橋本秀樹、「サブ30 フェムト秒分光手法による光合成アンテナ LH2 におけるエネルギー移動の観測」、光合成セミナー2016、P-10、京都、7月9,10日、2016年
16. **小澄大輔**、梶川敬之、坂口和彦、勝村成雄、橋本秀樹、「モデルカロテノイドにおける分子内電荷移動状態の解明」、光合成セミナー2016、P-11、京都、7月9,10日、2016年
17. **小澄大輔**、梶川敬之、坂口和彦、勝村成雄、橋本秀樹、「カルボニル基を導入した b-carotene 類縁体の光学応答」、第30回カロテノイド研究談話会、O-07、沖縄、6月25, 26日、2016年
18. 行平奈央、須貝裕子、藤原正澄、浦上千藍紗、**小澄大輔**、伊波匡彦、坂口和彦、勝村成雄、橋本秀樹、「紅色光合成細菌 *Rs. rubrum* G9+ の LH1 サブユニット型複合体とフコキサンチンを用いた LH1 複合体の再構成」、第30回カロテノイド研究談話会、O-26、沖縄、6月25, 26日、2016年

〔その他〕

ホームページ等

<http://phys.ipps.kumamoto-u.ac.jp/kosumi/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小澄 大輔 (KOSUMI DAISUKE)

熊本大学・パルスパワー科学研究所・准教

授

研究者番号：70613149

### (2) 研究分担者

瀧尾 進 (TAKIO SUSUMU)

熊本大学・くまもと水循環・減災研究教育センター・教授

研究者番号：60188109

原 正大 (HARA MASAHIRO)

熊本大学・大学院先端科学研究部・准教授

研究者番号：50392080

### (3) 研究協力者

川上 恵典 (KAWAKAMI KEISUKE)

藤本 将吾 (FUJIMOTO SHOGO)

廣田 悠真 (HIROTA YUMA)