

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2015

課題番号：23684020

研究課題名(和文) 海洋性光合成色素クロロフィルcの生体及び色素増感太陽電池における光励起状態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the excited-state properties of the oceanic photosynthetic pigment, chlorophyll c in both biological and dye-sensitized solar cell

研究代表者

藤井 律子 (Fujii, Ritsuko)

大阪市立大学・複合先端研究機構・准教授

研究者番号：80351740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 22,000,000円

研究成果の概要(和文)：クロロフィル(Chl) cは、海洋性光合成生物内で蛋白質に結合し、太陽光を吸収して光反応中心へ励起エネルギーを伝達する集光作用を担う天然ポルフィリン色素である。また、末端のカルボキシル基で酸化チタンと結合し、色素増感太陽電池では約5%の高い光電変換効率を示す。本研究は、これらの光応答の鍵となるChl cの光励起状態の解明を目的とした。まず、天然物から微量で分離困難な有機酸であるChl cを、高速逆流クロマトグラフィーにより純度良く単離精製する事に成功した。次に、Chl cの酸解離が光学応答に大きな影響を及ぼす事を初めて示した。さらに、そのフェムト秒時間分解吸収スペクトルを測定する事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Chlorophyll (Chl) c is the natural porphyrin widely distributed in the oceanic phototrophs. It harvests light energy and deliver it to the photoreaction center when bound to the photosynthetic pigment-protein complexes. Chl c also can make a chemical bond to TiO<sub>2</sub> through its carboxy end group to inject electron with as high as 5% of incident photon to current conversion efficiency when fabricated in a dye-sensitized solar cell. This work aimed to elucidate the excited-state properties of Chl c, which must be a clue to clarify those molecular mechanisms performed by Chl c. First, we have successfully purified Chl c, which is a hardly-separated organic-acid and is present as a minor component in the brown alga, by introducing a high-speed counter current chromatography. Second, we observed a systematic change in the optical properties of the Chl c depending on the pH of the organic solvent. Finally fs-time-resolved absorption spectroscopy of Chl c was recorded in several conditions.

研究分野：生物物理化学

キーワード：光物性 生体分子 光合成 クロロフィル 太陽電池

1. 研究開始当初の背景

(1) クロロフィル(Chl) *c* は海洋性光合成生物が広く生産するポルフィリン錯体である。その化学構造をみると、図1に示すように環状の共役系が17<sup>2</sup>位のカルボキシル基まで繋がった平板状のπ電子広がりを持つ。天然には図1に示したChl *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>を中心に、微細な構造が異なるChl *c*類が報告されているが、これらの構造の違いは、17<sup>2</sup>位のカルボン酸に由来する有機酸である性質に比べて極めて微細であることや、13<sup>2</sup>位の立体が塩基性溶媒下では容易に反転し、ラセミ体に変化する事より、Chl *c*類を単離精製するには特殊な分析系が用いられてきた[1]。

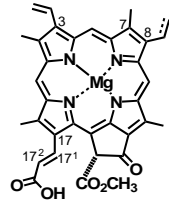


図1 Chl *c*の化学構造式(C8<sup>1</sup>とC8<sup>2</sup>の結合が二重結合の場合 Chl *c*<sub>2</sub>, 単結合の場合 Chl *c*<sub>1</sub>となる)

(2) 主たる海洋性光合成生物である珪藻や褐藻には、図に示したChl *c*<sub>1</sub>, Chl *c*<sub>2</sub>が存在する。これらは光合成アンテナタンパク質であるフコキサンチン-Chl *a/c* タンパク質(FCP)に結合し、フコキサンチン(Fx)と共に光を吸収してChl *a*へ伝達する集光作用を担うと考えられている[2]。図2に、FCP及び結合する色素の吸収スペクトルを示す。Chl *c*ではB帯が吸収した光エネルギーをQ帯から効率よくChl *a*に伝達すると考えられている。しかしながら、このB帯はFCP内のフコキサンチンの吸収帯と重なり、Chl *c*の選択励起ができないという分光学的難点より、その分子メカニズムは未解明であった。

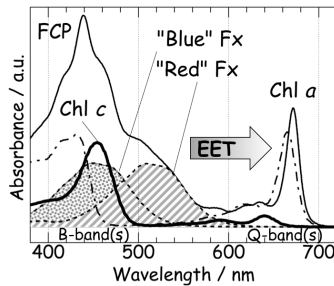


図2 FCP及びFCPに結合する色素の吸収スペクトル。ChlsのQ帯、B帯のおよその位置、励起エネルギー伝達(EET)の概念を示した。

(3) Chl *c*はカルボキシル基により酸化チタンと結合することが可能である。申請者が酸化した「光合成の原理を利用した色素増感太陽電池の開発」プロジェクト(2003-2005)において、Chl *c*<sub>2</sub>を用いてグレッツェル型の色素増感太陽電池を作成した場合に、天然物では最高の光電変換効率(4.6%)を示した[3]。このプロジェクトでは研究代表者が合成した一連の共役鎖長のカロテノイン酸については、酸化チタンへの粒子と結合させて時間分解分光を行い、カロテノイン酸から酸化チタンへの電子注入メカニズムを解明し[4]、電子注入と競争する電荷再結合のメカニズムも同時に明らかになり、電子注入効率向上への戦略を示すことができた。しかしながらChl *c*の

酸化チタンへの電子注入メカニズムは未だ解明されておらず、電子注入効率向上への戦略が示されていない。

(4) 研究代表者等は、大型の褐藻類であるオキナワモズクを数百マイクロスケールの盤状体といういわゆる種の状態で培養し、そこから光合成アンテナ FCP を効率よく単離精製する手法[5]及びその色素組成を正確に分析する手法[6]を開発してきた。さらに、フコキサンチンの有機溶媒中における時間分解分光及び二光子吸収分光を行い、フコキサンチンの溶液中における励起状態を解明してきた[7]。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光合成アンテナ内における高効率エネルギー伝達や色素増感太陽電池における高い光電変換効率の基礎となる Chl *c*の光励起状態を解明することである。

3. 研究の方法

(1) Chl *c*の大量精製方法の開発を行った。オキナワモズク盤状体を大量に培養し、これを素材として用いた。Chl *c*の難溶性、吸脱着による精製操作中の分解を克服するため、担体による急脱着の原理を用いない精製方法である向流クロマトグラフィー(HSCCC)を導入することにより、微量成分であるChl *c*の大量調製を実現した。

(2) Chl *c*はアクリレート基における酸解離状態が共役系に影響を及ぼすことが予測されるため、溶媒のpHに依存した光応答を解明した。

(3) 様々な溶媒条件で時間分解分光を行い、そのシグナルを解析することによりChl *c*の光励起状態を解明しようとした。

4. 研究成果

(1) 大量培養に際してクロロフィル分解物の蓄積により、Chl *c*の精製に不純物が混入する事態が発生した。これに対して、グロースチャンパーなどを導入してオキナワモズクの培養を制御することにより、Chl *c*の精製における不純物の混入を最小限に抑えながら、向流クロマトグラフィーとHPLCの併用により、純度の高いChl *c*<sub>1</sub>と*c*<sub>2</sub>を単離する事に成功した[論文準備中、学会発表6件]。

(2) 溶媒のpH変化による光応答の変化を定量的に解析するための実験系を確立し、測定点の数を増やすことにより、変化量を明確にする事に成功した。具体的には、図3に示すような酸性型[XH]と塩基性型[X<sup>-</sup>]において、モル分子吸光係数が異なる事、また蛍光量子収率が異なる事を実験的に初めて明らかに

した。

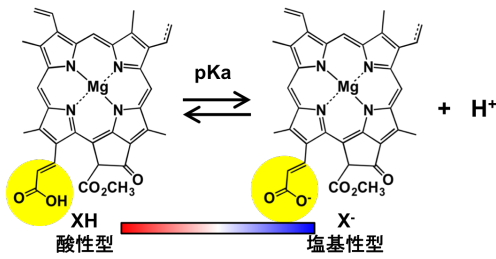


図3 Chl c の酸解離に際した構造変化。

### モル分子吸光係数

図3に示す酸解離平衡と実測の有機溶媒中の  $pH^*$  を用いると、実測値  $pH^*$  は、酸性型  $[XH]$  と塩基性型  $[X^-]$  の濃度の比に依存するため、濃度比で表される光学応答は  $pH^*$  に依存する。

$$pH^* = pKa^* + \log_{10} ([X^-]/[XH]) \quad (式 1)$$

波長  $\lambda$  における吸光度  $A$  は、モル分子吸光係数と濃度の積の和で示される。

$$A(\lambda) = \epsilon^{XH}(\lambda)[XH] + \epsilon^{X^-}(\lambda)[X^-] \quad (式 2)$$

Chl c 濃度の実測値  $C$  は、濃度の和で表される。

$$C = [XH] + [X^-] \quad (式 3)$$

式1~3より、波長  $\lambda$  における吸光度  $A$  は、酸性型と塩基性型のモル分子吸光係数の違いを反映する。

$$A(\lambda) = C \{ \epsilon^{XH}(\lambda) + 10^{pH-pKa} \epsilon^{X^-}(\lambda) \} / (1 + 10^{pH-pKa}) \quad (式 4)$$

有機溶媒中の  $pH$  を 4.8-9.0 の範囲で変化させた場合の B バンドの吸光度をプロットすると、図4のようになり、式4でフィッティングする事により、 $pKa = 6.45$  と決定できた。

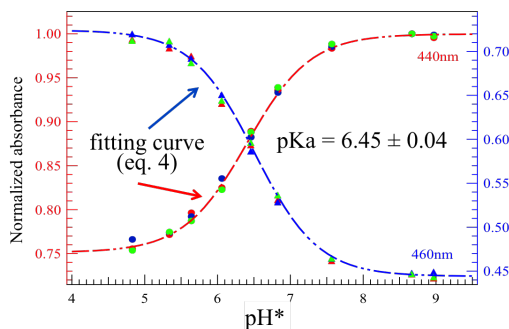


図4 Chl c の B バンドの吸光度の  $pH^*$  依存性

### 蛍光の量子収率

波長  $\lambda$  で励起した蛍光強度  $F$  は、波長  $\lambda$  におけるモル分子吸光係数と濃度、蛍光の量子収率の積の和に比例する。

$$F \propto I_0 \{ \Phi^{XH} \epsilon^{XH}(\lambda) [XH] + \Phi^{X^-} \epsilon^{X^-}(\lambda) [X^-] \} \quad (式 5)$$

波長  $\lambda$  を等吸収点 ( $\epsilon^{XH}(\lambda_i) = \epsilon^{X^-}(\lambda_i) = \epsilon(\lambda_i)$ ) にとると、

$$F \propto I_0 \epsilon(\lambda_i) \{ \Phi^{XH} [XH] + \Phi^{X^-} [X^-] \} \quad (式 6)$$

式1,5,6より、等吸収点で励起した蛍光強度は、酸性型と塩基性型の蛍光の量子収率の違いを反映する。

$$F \propto I_0 \epsilon(\lambda_i) C \{ \Phi^{XH} + 10^{pH-pKa} \Phi^{X^-} \} / (1 + 10^{pH-pKa}) \quad (式 7)$$

有機溶媒中の  $pH$  を 4.8-9.0 の範囲で変化させた場合に、等吸収点で励起した蛍光強度をプロットすると、図5のようになり、式7でフィッティングする事により、 $pKa = 6.47$  と決定できた。

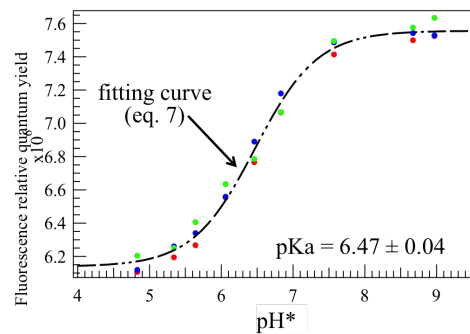


図5 Chl c の等吸収点で励起した蛍光強度の  $pH^*$  依存性 (蛍光の相対量子収率の変化を反映している)

### 酸解離平衡モデルの評価

これら2つの手法で求めた  $pKa$  が誤差の範囲で一致している事は、酸解離平衡のモデルが正しい事の裏付けとなった。

一方、有機酸の酸解離平衡 ( $R-COO^-$  と  $R-COOH$  の平衡)をおこす部位をメチルに置換した  $R-COOMe$  を用いた対照実験を行ったところ、こちらは  $pH$  に依存した変化を起こさなかった。

よって、これらの光学応答の変化が極めて良い近似として有機酸の酸解離平衡だけで記述できる事を初めて明らかにしたといえる[特許出願、論文準備中、学会発表6件]。

(3) 上記の結果を踏まえ、THF、エタノールという溶媒以外にも、エタノールに緩衝液を混合して  $pH$  を塩基性条件に調製した溶媒中 (Chl c は  $R-COO^-$  の状態) でフェムト秒時間分解吸収スペクトルを測定する事に成功した。スペクトルの解析は予想より格段に複雑であったが、現在これらのスペクトルを解析中である[論文準備中]。

### <引用文献>

- Zapata, M., et al., (2006) in Chlorophylls and Bacteriochlorophylls (Grimm, B., et al. Eds.) pp 39-53, Springer, The Netherlands.  
 Macpherson, A. N., and Hiller, R. G. (2003) in Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis (Green, B. R., and Parson, W. W. Eds.) pp 323-352, Kluwer Academic Publishers, The

Netherlands.

Wang, X.-F. et al. (2005) *Chem. Phys. Lett.* 447, 79-85.

Xiang, J.-F., R. Fujii et al. (2005), "Mechanism of Electron Injection from Retinoic Acid and Carotenoid Acids to TiO<sub>2</sub> Nanoparticles and Charge Recombination via the T<sub>1</sub> State As Determined by Subpicosecond to Microsecond Time-resolved Absorption Spectroscopy: Dependence on the Conjugation Length", *J. Phys. Chem. B*, 109, 17066-17077.

特願 2009-211721(H21.9.13)「フコキサンチン-クロロフィル a/c タンパク質の製造方法」、橋本秀樹、溝口律子、伊波匡彦、飯沼善朗

特願 2010-204632(H22.9.13)「色素化合物の定量方法」、橋本秀樹、溝口律子、伊波匡彦、飯沼善朗

D. Kosumi, R. Fujii et al., (2009) "One- and Two-Photon Pump-Probe Optical Spectroscopic Measurements Reveal the S1 and Intramolecular Charge Transfer States are Distinct in Fucoxanthin", *Chem. Phys. Lett.*, 483 (2009) 95-100.

## 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 28 件)

D. Kosumi, T. Kusumoto, R. Fujii, M. Sugisaki, Y. Inuma, N. Oka, Y. Takaesu, T. Taira, M. Iha, H.A. Frank, H. Hashimoto, "Ultrafast Excited State Dynamics of Fucoxanthin: Excitation Energy Dependent Intramolecular Charge Transfer Dynamics", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13** (2011) 10762-10770. (DOI: 10.1039/C0CP02568B)

Ritsuko Fujii, Mamiko Kita, Matsumi Doe, Yoshiro Inuma, Naohiro Oka, Yuki Takaesu, Tomonori Taira, Masahiko Iha, Tadashi Mizoguchi, Richard J. Cogdell, and Hideki Hashimoto, "The Pigment Stoichiometry in a Chlorophyll *a/c* Type Photosynthetic Antenna", *Photosynth. Res.*, **111** (2012) 165-172, (DOI: 10.1007/s11120-011-9698-1)

Ritsuko Fujii, Mamiko Kita, Yoshiro Inuma, Naohiro Oka, Yuki Takaesu, Tomonori Taira, Masahiko Iha, Richard J. Cogdell and Hideki Hashimoto, "Isolation and Purification of the Major Photosynthetic Antenna, Fucoxanthin-Chl *a/c* Protein, from Cultured Discoid Germilings of the Brown Alga, *Cladosiphonokamuranus* TOKIDA (Okinawa Mozuku)", *Photosynth. Res.* **111** (2012) 157-163 (DOI: 10.1007/s11120-011-9688-3)

D. Kosumi, M. Kita, R. Fujii, M. Sugisaki, N. Oka, Y. Takaesu, T. Taira, M. Iha and H.

Hashimoto, "Excitation Energy-Transfer Dynamics of Brown Algal Photosynthetic Antennas", *J. Phys. Chem. Lett.* **3** (2012) 2659-2664. (DOI: 10.1021/jz300612c)

[学会発表](計 65 件)

Ritsuko Fujii, Naoki Senju, Masahiko Iha, and Hideki Hashimoto, "Dissociation equilibrium constant of chlorophyll *c*", Eighth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments (SNCP12), 22-24 June, 2012, EPOC Ritsumei 21, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga, Japan,

藤井律子, 千住直輝, 市村彰男, 伊波匡彦, 橋本秀樹, "海洋性光合成アンテナ色素クロロフィル *c* の解離定数", 第 20 回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー, 2012 年 6 月 30 日-7 月 1 日, 大阪大学豊中キャンパス, 豊中, 大阪

Naoki Senju, Ritsuko Fujii, Tadashi Mizoguchi, Masahiko Iha, Akio Ichimura, Hideki Hashimoto "Optical properties of photoexcited states of oceanic photosynthetic antenna pigment, chlorophylls *c* (Chls *c*)", 2012 OCARINA Annual International Meeting-Launch of the Artificial Photosynthesis Research Center-, Osaka, Japan, 2013.3.4-6.

藤井律子, 千住直輝, 溝口正, 伊波匡彦, 市村彰男, 橋本秀樹, "褐藻類の光合成アンテナ色素クロロフィル *c* の pH-光センサー機能", 日本化学会第 93 春季年会(2013), 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 草津、滋賀, 2013 年 3 月 22-25 日.

藤井律子, 千住直輝, 溝口正, 伊波匡彦, 市村彰男, 橋本秀樹, "褐藻類の光合成アンテナ色素クロロフィル *c* の pH-光センサー機能", 日本物理学会春季年会(2013), 広島大学東広島キャンパス, 東広島, 広島, 2013 年 3 月 26-29 日.

藤井律子, 千住直輝, 溝口正, 伊波匡彦, 市村彰男, 橋本秀樹, "褐藻類の光合成アンテナ色素クロロフィル *c* の pH-光センサー機能", 第 3 回ポルフィリン-ALA 学会, 東工大すずかけ台キャンパス, 横浜, 神奈川, 2013 年 4 月 27 日.

[図書](計 4 件)

藤井律子・小澄 大輔・橋本 秀樹、「光合成反応の動作機構の解明と制御」、月刊 *BIO INDUSTRY*, vol. **29**, 特集「バイオ技術を用いた人工光合成」, pp. 7-17、シーエムシー出版 2011 年 12 月 12 日発行、ISSN 0910-6545

藤井律子、"褐藻類の光合成アンテナに結合した色素の構造と機能の解明"、シ

リーズ連載「人工光合成を目指して」, 「革  
新的技術に新しい発想で挑戦」採択研究  
者、*化学経済*, 12月号 2011年12月1日、  
p.78. ISSN 0453-0683

**藤井 律子**、” 褐藻類の光合成アンテナ  
に結合した色素の構造と機能 ”、*化学工  
業*、9月号、2012、p.12-18

橋本 秀樹・**藤井 律子**・小澄 大輔・杉崎  
満、"光合成反応における励起エネルギー  
移動ダイナミクス"、*光学*, 43(6) (2014)  
249-259.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：pH 指示薬

発明者：**溝口律子**、橋本秀樹

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：特開 2015-49188(P2015-49188A)

特願 2013-182188

出願年月日：特開 2015/3/16

特願 H25(2013).9.3

国内外の別：国内

\*=藤井律子(研究者名は旧姓)

〔その他〕

ホームページ等

大阪市立大学複合先端研究機構

[http://www.ocarina.osaka-cu.ac.jp/research\\_j.html#introduction](http://www.ocarina.osaka-cu.ac.jp/research_j.html#introduction)

大阪市立大学人工光合成研究センター

<http://recap.osaka-cu.ac.jp/activity/index.html>

大阪市立大学理学研究科

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/grad/M0LMS/member.html>

藤井グループ

<http://www.ocarina.osaka-cu.ac.jp/site/fujii/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 律子 (FUJII, Ritsuko)

大阪市立大学・複合先端研究機構・准教授

研究者番号：80351740