

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23750002  
 研究課題名（和文） 光合成微生物を用いた光電変換システムのナノ構造とスピンドイナミクス  
 研究課題名（英文） Nanostructure and Spin Dynamics in Photoelectric Conversion System Based on Photosynthetic Cyanobacteria  
 研究代表者  
 松岡 秀人 (MATSUOKA HIDETO)  
 東北大学・多元物質科学研究所・助教  
 研究者番号：90414002

研究成果の概要(和文):本研究では、光合成タンパク質内の電子移動経路の双方向性について、高速 ESR 法と化学還元処理を併用した測定から、その妥当性を確認した。本研究ではさらに、単一電子移動系の高感度 ESR 測定を可能とするため、高周波 ESR に適用可能な微小セル型構造試料の作成を行った。人工の電子移動系をモデル化合物として用いることで、高周波共振器に適用可能な試料作成法を確立し、光照射による電流発生も確認することができた。

研究成果の概要(英文): In this work, bidirectional electron transfer in photosynthetic photosystem I proteins was experimentally observed by using high time-resolved ESR and chemically reduced proteins. In this work, moreover, to realize highly sensitive ESR measurements applicable to a single protein, microsamples applicable to high-frequency ESR were prepared. Using an artificial electron-transfer system as a model compound, we established the procedure for preparing microsamples applicable to a tiny cavity for high-frequency ESR.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野:化学

科研費の分科・細目:基礎化学・物理化学

キーワード:たんぱく質・磁気共鳴・光合成・バイオスピ

## 1. 研究開始当初の背景

本研究で注目する光合成反応中心のひとつ光化学系 I 複合体には、疑似 2 回回転対称軸に関連付けられる 2 つの電子伝達系が存在する。原子的な酸素非発生型光合成を行う紅色光合成細菌や、同じ酸素発生型光合成の光化学系 II 複合体では、その左右対称な 2 つの電子伝達系の内、一方しか電子が流れないことから、光化学系 I においても同様に一方しか電子が流れないと従来考えられてきた。しかし、キノン分子の過渡吸収スペクトル測定の time profile が 2 成分の時定数を考慮しなければ解析できず、両経路での電子伝達の可能性について、最近多くの議論がなされている。また、双方向性が単一のタンパク複合

体内で起こっているのか、あるいは個々の複合体ごとにはどちらか一方を利用するが(単方向性)、バルク試料を扱うために双方向性が観測されるのか(擬似的双方向性)についても議論が続いている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、光合成蛋白内の光化学系 I 複合体を対象としながら、(1)我々が所有する国内で唯一となる高時間分解高周波(95GHz)パルス ESR 装置を全面的に改良することで、蛋白内の光電変換に直接関わるラジカルイオン対を選択的かつ超高感度に観測し、(2)光合成初期過程における励起電子の生成および電荷分離過程について、その

ダイナミクスの分子論的解明を目指すことである。具体的には、高周波マイクロ波を用いてラジカルイオン対のスピンの状態を操作し、それに伴い変化する光電流を利用して ESR 測定の超高感度化を図る。最終的には、蛋白質単分子 ESR 測定を実現し、光化学系 I における電子移動経路をナノレベルで明らかにする。

### 3. 研究の方法

光合成タンパクについては、重水素化（全体の 99.7%）した好熱性シアノバクテリア *synechococcus lividus* の凍結乾燥試料をアメリカ・アルゴンヌ研究所の Marion Thurnauer 教授らの研究グループより提供を受けた。それを実験前に、凍結保護剤である重水素化グリセロール（体積濃度 50%）と重水素化トリス・塩酸緩衝剤（pH = 7.5）により再水和させ、実験を行った。デバイス状の試料については、ITO 基板（ $15\Omega/\text{cm}^2$ ）にポリマー（PEDOT-PSS）をスピンコート法で成膜し、その上に導電性ポリマー（P3HT）とフラーレン誘導体（PCBM）の混合溶液をディップコーティング法により活性層として成膜した。さらに、電極としてアルミ薄膜を真空蒸着法により成膜し、作成した。高周波（94GHz）EPR 測定は Bruker 社製 ELEXSYS E600 分光器を用いて行った。また、高時間分解測定を可能とするため、マイクロ波検出器のあとのプリアンプとして、Bruker 社のプリアンプ（帯域 6 MHz、時定数 150 ns 程度）よりも広帯域（140 MHz）な NF 社製プリアンプを用いた。また、パルス EPR 測定は、E600 分光器にマイクロ波パルスブリッジ（94.9GHz）と自作のパルス制御システムを組み込むことで構築した。

### 4. 研究成果

これまでの報告によるとラジカルペア  $\text{P700}^+-\text{A}_1^-$  は低温領域において  $200\mu\text{s}$  程度の時定数で減衰する成分に加えて、数マイクロ秒程減衰する成分の存在が示唆されている。図 1b に示すように、EPR 信号の時間依存性（丸印）は、一種類のラジカルイオンペアを仮定したシミュレーション（実線）では再現することができず、もうひとつ配向の異なるラジカルイオンペアの存在を示唆した。なおフィッティングは、再結合過程とスピン格子緩和の速度定数に依存した 2 種類の時定数を考慮することで行った（図 1b）：

$$\text{Intensity} = A_1 \exp\left(-t/\tau_1\right) + A_2 \exp\left(-t/\tau_2\right)$$

$$\frac{1}{\tau_1} = \frac{ks}{4} + \frac{1}{T_1} - \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{1}{T_1}\right)^2 + \left(\frac{ks}{4}\right)^2} \quad (\tau_1 = 600 \mu\text{s})$$

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{ks}{4} + \frac{1}{T_1} + \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{1}{T_1}\right)^2 + \left(\frac{ks}{4}\right)^2} \quad (\tau_2 = 80 \mu\text{s})$$

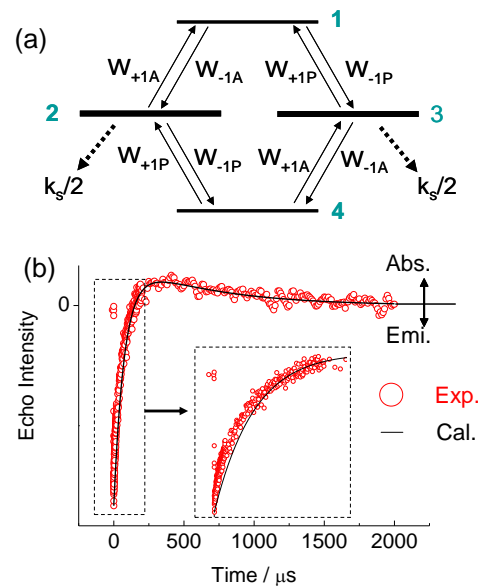


図 1 (a)ラジカルイオンペアのエネルギー準位と kinetics モデル. (b) 100K、3.38T 付近で観測した EPR 信号強度の時間依存性.

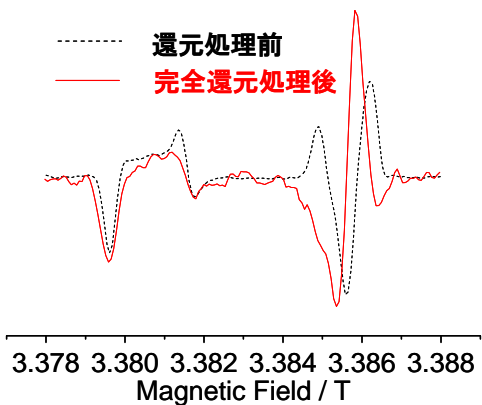


図 2 化学還元処理前後でのラジカルイオンペアの EPR スペクトル.

図 1b では新たに  $8\mu\text{s}$  の時定数を持つ指数関数をもうひとつ加えることで、実測を再現することができた。この事実を詳細に検討するため、化学還元処理前後での EPR スペクトルの比較を行った。図 2 は、化学還元処理前後でスペクトルの変化を示している。還元処理後の EPR 信号の時間依存性を測定したところ、およそ  $8\mu\text{s}$  で減衰することがわかった。この減衰時間は、図 1 の解析で、新たに加えた第三の寿命と良い一致を示していた。これは化学還元処理により、より長い寿命をもつラジカルイオン対の電子移動がブロックされたため、短い寿命のラジカルイオン対の EPR 信号のみが観測されたと考えられることで説明できる。化学還元処理前後のスペクトルは、X 線結晶構造解析の結果と比較したところ、それぞれ異なる二つの電子移動経路

をそれぞれ経由して生成したラジカルイオン対由来であることがわかった。これより、還元処理前の試料で観測された短寿命ラジカルイオン対は、還元処理後に顕著となったものと同じであり、二つの電子移動経路の存在が実験的に証明された。

上述のとおり、双方向性実験的に確認されたが、これが単一のタンパク複合体内で起こっているのか、あるいは個々の複合体ごとにはどちらか一方を利用するが（単方向性）、バルク試料を扱うために双方向性が観測されるのか（擬似的双方向性）については、単一タンパクごとの超高感度 ESR 測定が不可欠である。しかし、現状の ESR 法の感度では、単一タンパクの測定は容易ではない。そこで、デバイス形状の試料に対して電流検出型 ESR 測定を行い超高感度化を実現することを最終目的として、高周波 ESR にも適用可能な微小試料の作成を行った。モデル化合物として、人工の光合成とも呼べる太陽電池を対象とした。



図3 太陽電池の写真

作成した微小太陽電池を図3に示す。作成した太陽電池が微小なサイズでも十分に機能しているのか電池のパフォーマンス計測と、さらに高周波 ESR に適用可能かどうかを確認するため、実際に作成したデバイスの ESR 測定も行った。

太陽電池の変換効率を決定する主要因として、製膜プロセスにおけるアニールの条件が挙げられる。アニール温度または時間を変化させることで有機薄膜内部の微視的な構造が変化し、太陽電池の性能に影響を与える。例えば有機薄膜太陽電池の構成要素として広く研究されているポリチオフェンは、基板に対して主鎖平面が平行な flat-on 配向(図4A)と垂直な edge-on 配向(図4B)をとることが知られており、その配向と変換効率の相関が最近指摘されている。そこで本研究では、高分解能高周波 ESR 装置を用いたポリチオフェンの分子配向決定と、太陽電池の性能評価を同時に行った。ゴニオメータを用いて試料を磁場に対して回転させることで、ESR の角度変化を観測した。図4には、ESR 測定と解析から決定した配向の分布を示す。ここで x 方向と基板とのなす角を  $\theta$  とした。これよりアニール時間を増やすことで、flat-on 配向が減

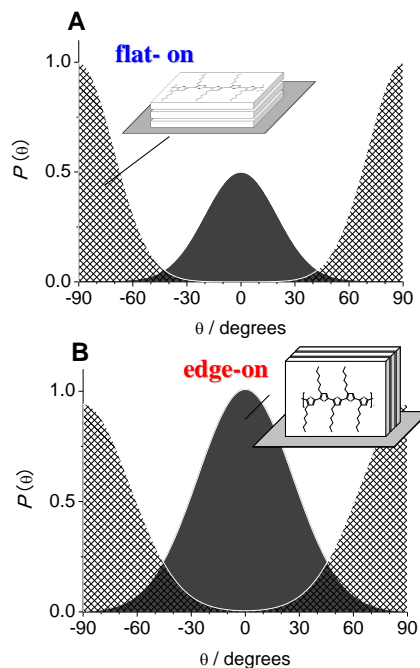


図4 A アニール無しと B アニール 10 min の配向の角度分布

少し、edge-on 配向が増大していくことが明らかとなった。また、同じアニール時間の条件で有機薄膜太陽電池の作製を行い、I-V 曲線から太陽電池の性能を測定した。アニール無しでは光電流は 0.4 mA であったものが、10 分間アニールすることで、2.84 mA まで増大し、アニールによる edge-on 配向の増大と光電流の増大に相関が見られたが、アニール時間をさらに増大させると劣化に転じることがわかった。

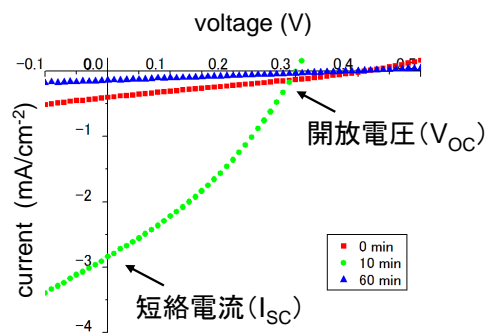


図5 P3HT:PCBM バルクヘテロジャンクションの I-V 曲線。

以上のように、高周波 ESR に適用可能なデバイス作成を可能とし、続けて電流検出 ESR 測定を可能とするよう、低周波 ESR については試料ホルダーの改良、高周波 ESR では共振器の改良を行ってきた。しかし、光合成試料を用いたデバイス作成について、生体試料の不安定性などに起因して、まだ測定に耐えうる状態には至っていないが、保護剤などの使用

を検討しながら、作成法の改良を行いつつある。今後、超高感度光検出 ESR 装置を用いた単分子測定から、その問題を明らかにしていく予定である。

#### 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 3 件)

① Fedin M.V., Bagryanskaya E.G., Matsuoka H., Yamauchi S., Veber S.L., Maryunina K.Y., Tretyakov E.V., Ovcharenko V.I., Sagdeev R.Z., W-band time-resolved electron paramagnetic resonance study of light-induced spin dynamics in copper-nitroxide-based switchable molecular magnets, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, **2012**, *134*, 16319-26. DOI: 10.1021/ja306467e

② Tanabe M., Matsuoka H., Ohba Y., Yamauchi S., Sugisaki K., Toyota K., Sato K., Takui T., Goldberg I., Saltsman I., Gross Z., Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance and Phosphorescence Studies of the Lowest Excited Triplet States of Rh(III) Corrole Complexes, *J. Phys. Chem. A*, 査読有, **2012**, *116*, 9662-9673. DOI: 10.1021/jp3071037

③ Matsuoka H., Shen J.-R., Kawamori A., Nishiyama K., Ohba Y., Yamauchi S., Proton-Coupled Electron-Transfer Processes in Photosystem II Probed by Highly Resolved g-Anisotropy of Redox-Active Tyrosine Y<sub>Z</sub>, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, **2011**, *133*, 4655-4660. DOI: 10.1021/ja2000566

[学会発表] (計 10 件)

① H. Matsuoka, Multifrequency EPR Studies of Photosynthetic Oxygen-Evolving System, 8th Asia-Pacific EPR/ESR Symposium 2012, 2012 年 10 月 12 日, 北京 (中国)

② 松岡秀人, 光合成酸素発生系の多周波 ESR 研究, 第 6 回分子科学討論会, 2012 年 09 月 21 日, 東大 (東京) .

③ 松岡秀人, 光化学系 II における酸素発生中心の多周波 ESR 研究, 2012 年光化学討論会, 2012 年 09 月 14 日, 東工大 (東京)

④ H. Matsuoka, Photosynthetic Oxygen-Evolving System as Studied by Electron Paramagnetic Resonance, International Workshop on Solar-Chemical Energy Storage, 2012 年 7 月 28 日, 仙台 (宮城) .

⑤ H. Matsuoka, Multi-Frequency EPR studies of

Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> and Mn<sub>4</sub>SrO<sub>5</sub> Clusters, The 2nd International Symposium on Electron Spin Science, 2012 年 07 月 25 日, 松島 (宮城) .

⑥ 松岡秀人, シアノバクテリア光化学系 II における酸素発生中心の高周波パルス EPR 研究, 第 92 回日本化学会年会, 2012 年 3 月 26 日, 慶応大 (東京) .

⑦ 松岡秀人, 高周波 ELDOR-detected NMR の Mn 錯体への応用, 第 50 回電子スピンスイェンス学会年会, 2011 年 11 月 18 日, 仙台区際センター .

⑧ H. Matsuoka, Multiple Electron Resonance Studies of Photosystem II Reaction Center, V Japanese-Russian Workshop "Open Shell Compounds and Molecular Spin Devices", 2011 年 11 月 14 日, 淡路 (兵庫) .

⑨ H. Matsuoka, Proton-Coupled Electron Transfer Processes in Photosystem II Probed by Highly Resolved g-Anisotropy of Redox-Active Tyrosine Y<sub>Z</sub>, Spin Physics, Spin Chemistry, and Spin Technology, 2011 年 11 月 2 日, カザン (ロシア) .

⑩ 松岡秀人, 光合成酸素発生反応におけるプロトン共役電子移動の高周波 ESR 研究, 分子科学討論会 2011, 2011 年 9 月 21 日, 北大 (札幌) .

[図書] (計 1 件)

① Takui T., Nakazawa S., Matsuoka H., Furukawa K., Sato K., and Shiomi D., Springer, Molecule-Based Exchange-Coupled High-Spin Clusters: Conventional, High-Field/High-Frequency and Pulse-Based Electron Spin Resonance of Molecule-Based Magnetically Coupled Systems *In EPR of Free Radicals in Solids II*, 2012, 71-162.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松岡 秀人 (MATSUOKA HIDETO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号: 90414002