

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750059

研究課題名(和文)膜ドメイン構造を用いた三成分系光触媒場の構築

研究課題名(英文)Construction of catalytic reaction space based on membrane domain

研究代表者

越山 友美(Koshiyama, Tomomi)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30467279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂質二重層膜である球状リボソーム上に形成する膜ドメイン構造を基盤に、光反応に必要な金属錯体や有機分子等を膜表面、膜内部や内水相に精密に固定化し、膜の内外で異なる反応が進行する三成分系光触媒システムの構築を目指した。(1) リボソーム膜空間への機能分子の部位特異的導入法の確立、(2) 膜を介した二成分系光誘起電子移動反応、(3) 膜ドメイン構造を利用したエネルギー移動反応、(4) 膜表面での酸素発生触媒反応の制御、を達成した。特に、膜ドメイン構造への機能分子集積化による化学反応制御はこれまでに例はなく、従来に比べ拡張性の高い多元系反応場構築の手法を確立できた。

研究成果の概要(英文)：Creation of multifunctional reaction systems like photosynthesis in nature is of considerable interest. Although various chemical reactors consisting of polymers and proteins have been studied, it is still difficult to construct reaction systems in which different chemical reactions occur simultaneously. We focus on a liposome, which is an artificially-prepared spherical vesicle composed of a lipid bilayer of phospholipids, as a chemical reaction space. For the site-specific fixation of functional molecules into liposome space, we designed functional lipophilic units using a cholesterol derivative which has high affinity for phospholipids, and succeeded in the fixation of various functional molecules such as photosensitizers, light-harvesting pigments and oxidation catalysts. Electron transfer reaction, energy transfer reaction and catalytic reaction in liposome space have been demonstrated using functional lipophilic units.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：リボソーム 光反応 金属錯体 膜ドメイン 光誘起電子移動反応

## 1. 研究開始当初の背景

複数の金属錯体や有機分子等の機能分子の空間配置を制御した化学反応サイトの構築は、人工光エネルギー変換システムなどの多段階触媒反応の分子設計において重要である。様々な人工光誘起反応のターゲットである天然の光合成系は、膜厚 5 nm の空間に埋込めこまれた蛋白質複合体を用いて何十個ものコファクター分子を精密に固定化し、エネルギー移動、電子伝達反応や触媒反応などの異なる化学反応を協同的に進行させている。これまでに、共有結合や架橋配位子を用いた錯体の集積制御による、電子伝達体や光触媒の構築が国内外で盛んに行われてきた。しかし、合成化学を駆使した従来の手法だけでは、合成上の制限から望みの集積体構築が困難であるため、拡張性・汎用性の高い新たな手法の開発が望まれてきた。これまでの自身の研究である「蛋白質ナノ空間への金属錯体固定化による触媒反応制御」や、「蛋白質結晶の直径 4 nm の細孔空間を用いた異種金属錯体の精密配置による多段階電子移動反応」から、異なる機能分子を部位特異的、かつ高密度に集積化するには数 nm サイズの秩序空間が有用であることを見出してきた。そこで本研究では、新たな多段階化学反応場として、リン脂質分子の自己集積により形成される膜厚が約 5 nm の球状リポソーム空間に着目し、リポソーム膜上に形成する特定の脂質分子が秩序正しく配向した「膜ドメイン構造」を利用することで新たな化学反応場の構築が可能であると考えた(図 1)。

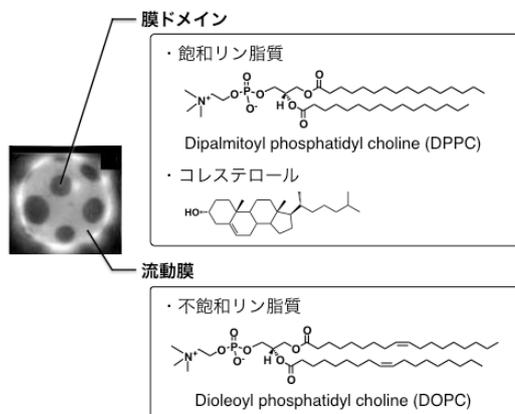


図 1. 膜ドメイン構造の脂質組成と共焦点レーザー顕微鏡像

## 2. 研究の目的

本研究では、リン脂質が形成する膜ドメイン構造を基盤に、金属錯体や有機分子等の複数の機能分子を適切な部位に配置して、新たな化学反応場を創製する。特に、「三成分系光触媒システム」として、光反応に必要な機能分子を組み込んだ「機能性脂質ユニット」を自己集積させて脂質二重膜の外表面および内表面に精密に固定化し、膜の内外で異なる反応が進行する高効率な多段階触媒反応場の構築を目指す。具体的には、(1) リポソーム膜空間への機能分子の部位特異的導入法の確立、(2) 膜を介した二成分系光誘起電子移動反応、(3) 膜ドメイン構造を利用したエネルギー移動反応、(4) 膜表面での酸素発生触媒反応の制御、を達成する。特に、膜ドメイン構造への機能分子集積化による化学反応制御はこれまでに例はなく、従来の手法に比べ拡張性の高い新たな多元系触媒の構築手法を確立できると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) リポソーム膜空間への機能分子の部位特異的導入法の確立 (平成 24 年度)

光触媒システムの構築では、光捕集分子、電子伝達体や触媒をリポソーム膜空間の適切な部位に合理的に配置する手法を確立する必要がある。界面である膜表面や膜ドメインへの部位特異的な機能分子導入では、リン脂質の頭部やリン脂質と高い親和性を有するコレステロールの親水部に機能分子を化学修飾した「機能性脂質ユニット」を用いる(図 2)。光捕集分子であるフルオレセイン、光増感剤である  $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 、水の酸化反応を触媒する  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  などを修飾した機能性脂質ユニットを設計した。そして、作成したユニットとリン脂質の混合脂質フィルムを水和することで、機能分子を膜表面や膜ドメインへ導入する。導入の確認は、共焦点レーザー顕微鏡観察や各種スペクトル測定により行う。さらに、凍結融解法による内水相への機能分子の取り込み、疎水性相互作用を利用した膜内部への機能分子の固定化も進め、膜空間の望みの部位への分子導入法を確立する。

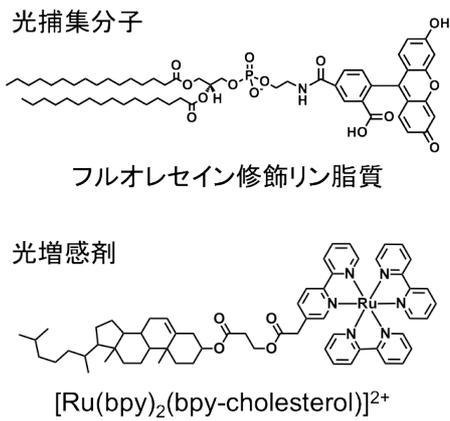


図 2. 機能性脂質ユニットの分子構造

### (2) 膜を介した二成分系光誘起電子移動反応 (平成 24 年度)

光誘起電子移動反応では、電子供与体と電子受容体間の距離が重要となる。そこで、リポソームの膜厚が約 5.0 nm であることを利用して分子間距離を制御し、逆電子移動の抑制による電荷分離状態の長寿命化を図る。(1)で確立した機能分子導入法を組み合わせることで、リポソーム内水相に電子受容体の  $MV^{2+}$ 、膜外表面に光増感剤の  $[Ru(bpy)_2(bpy\text{-}cholesterol)]^{2+}$  (Ru) を複合化したりポソーム (Ru/ $MV^{2+}$  lipo) (図 3a) と、内水相に  $MV^{2+}$ 、膜内部に光増感剤であるプロトポルフィリン (PP) を複合化したりポソーム (PP/ $MV^{2+}$  lipo) (図 3b) を作成し、二成分系電子移動反応を評価する。

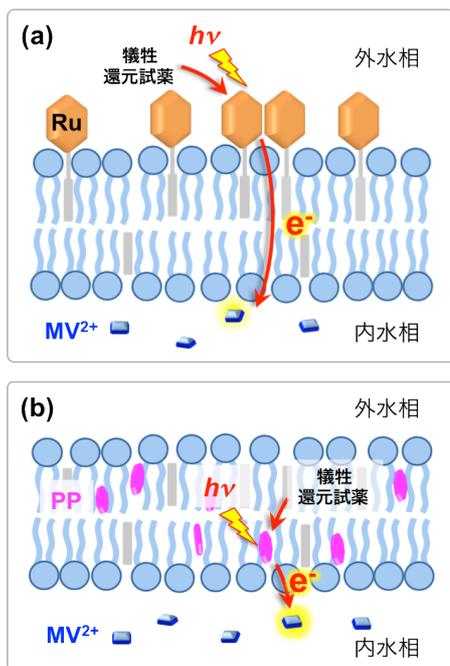


図 3. Ru/ $MV^{2+}$  lipo (a)と PP/ $MV^{2+}$  lipo (b)の模式図

### (3) 膜ドメイン構造を利用したエネルギー移動反応 (平成 25 年度)

エネルギー移動反応を効率化する方法の一つとして、光捕集分子の集積化が考えられる。そこで、膜ドメイン構造により光捕集分子の集積化が可能であると考え、膜ドメイン表面を光捕集アンテナとしたエネルギー移動反応を検討する。本研究では、光捕集分子としてフルオレセイン、エネルギー受容体として亜鉛プロトポルフィリン錯体を用いる。膜ドメインは飽和リン脂質とコレステロールに富んだ構造を有していることから、飽和リン脂質にフルオレセインを修飾した機能性脂質ユニット (FLU) を用い膜ドメイン外表面にフルオレセインを集積化し、膜内部に疎水性の亜鉛プロトポルフィリン錯体 (ZnP) を組込んだ二成分系のエネルギー移動場を作成し (FLU/ZnP lipo)、膜ドメインに形成した光捕集アンテナの有無によるエネルギー効率を評価する。

### (4) 膜表面での酸素発生触媒反応の制御 (平成 24-25 年度)

光反応と触媒反応を連動した多段階反応システムの構築に向けて、膜表面での触媒反応制御が重要と考えた。そこで、金属錯体の配向や集積状態を制御して膜表面に組み込むことで、高効率な酸素発生触媒場の構築を検討した。水の酸化反応を触媒する  $[Ru(terpy)(bpy)(OH_2)]^{2+}$  を修飾した機能性脂質ユニットを用い、リポソームとの複合化、および触媒評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) リポソーム膜空間への機能分子の部位特異的導入法の確立 (平成 24 年度)

リン脂質のアミノ基とスクシンイミド基とのカップリングによるアミド結合形成反応を利用したフルオレセイン修飾リン脂質、エステル化により bpy を修飾したコレステロール配位子 (bpy-cho) を用いた Ru 錯体修飾コレステロールなど、機能性脂質ユニットの基本的な合成手法を確立した。 $[Ru(terpy)(bpy\text{-}chol)(L)](PF_6)_2$  については、単結晶 X 線構造解析に成功し、その構造は反応部位がコレステロールとは逆方向に配向しており (図 4)、リポソームに埋込まれた時、活性中心が膜表面に露出できることが示唆

された。機能性脂質ユニットを含む脂質フィルムの水和により膜表面へ機能分子が導入されることを、共焦点レーザー顕微鏡観察や各種スペクトル測定で確認した。機能性脂質ユニットは、膜表面への機能分子の導入を容易し、かつ様々な機能分子に応用可能な汎用性の高い化合物であることが示された。

加えて、凍結融解法による内水相への電子受容体であるメチルビオオロゲン( $MV^{2+}$ )の取り込みでは、リン脂質の親水部位が負電荷であるリン脂質を用いることで、静電的相互作用により正電荷の  $MV^{2+}$  の内包量が格段に向上した。さらに、疎水性のプロトポルフィリン、亜鉛プロトポルフィリン錯体を用いることで膜内部の疎水領域へ固定化にも成功し、これらの手法を組み合わせることで、膜空間への異なる複数の機能分子の固定化が可能となった。

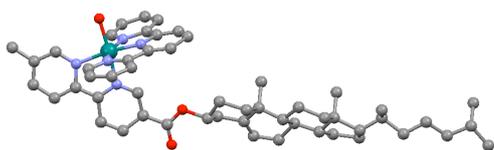


図 4.  $[Ru(terpy)(bpy-cholesterol)(L)](PF_6)_2$  の結晶構造

## (2) 膜を介した二成分系光誘起電子移動反応 (平成 24 年度)

作成した  $Ru/MV^{2+}$  lipo と  $PP/MV^{2+}$  lipo はカラム精製し、吸収スペクトルと共焦点レーザー顕微鏡により各成分の導入を確認した。外水相に還元剤を加え、Xe ランプの光照射による光誘起電子移動反応を評価したところ、 $Ru^{2+}/MV^{2+}$  lipo では電子移動は起こらず、 $PP/MV^{2+}$  lipo では電子移動が進行し電子還元種の  $MV^+$  の生成が確認できた。つまり、電子供与体と電子受容体間の距離が長い外表面から膜を貫通する電子移動反応は起こらないが、リポソーム膜内部から内水相への電子移動は可能であることが明らかとなった。以上の結果から、膜を介した電子移動反応では、膜内部への仲介分子の導入が必要であることが分かった。

## (3) 膜ドメイン構造を利用したエネルギー移動反応 (平成 25 年度)

作成した  $FLU/ZnP$  lipo を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、 $FLU$  は膜ドメインに集

積化しリポソーム上に不均一に分布しているのに対して、 $ZnP$  は膜上で均一に分布していることが確認された。 $FLU/ZnP$  lipo の蛍光スペクトルから、 $FLU$  から  $ZnP$  へのエネルギー移動が進行しており、 $FLU$  の膜ドメインを形成させていないリポソームのエネルギー移動と比較すると、 $FLU$  の蛍光強度減衰がより大きく、 $ZnP$  の蛍光強度がより増大していることが明らかとなった。したがって、光捕集分子の膜ドメインによりエネルギー移動の効率が向上し、膜ドメイン構造による機能分子集積化の有用性が示唆された。

## (4) 膜表面での酸素発生触媒反応の制御 (平成 24-25 年度)

酸素発生触媒である  $Ru$  錯体の膜表面での配向を制御するため、 $Ru$  錯体とコレステロール間のリンカー部の長さの異なる 2 種類の機能性脂質ユニット、 $Ru$ -Long と  $Ru$ -short を作成し、リポソーム膜表面に複合化した (図 5)。酸化剤として硝酸セリウム(IV)アンモニウム( $Ce^{4+}$ )を用い、 $Ru$  錯体-リポソーム複合体の水の酸化反応を検討したところ、 $Ru$ -Long は酸素発生が進行したのに対し、 $Ru$ -short の場合はほとんど酸素発生しなかった。これは、 $Ru$ -Long の場合は、触媒部である  $Ru$  錯体がリン脂質の頭部に埋もれる  $\beta$  ことなく、 $Ce^{4+}$  がアクセスできたためと考えられ、膜表面を利用した触媒反応において触媒の固定位置の重要性が明らかとなった。また、PEG 修飾リン脂質や炭化水素鎖の長いリン脂質を用いることで、塩濃度や pH に対するリポソームの安定性を向上させることができた。これらの結果は、膜表面が触媒反応制御に有用であることを示しており (論文執筆中)、現在、(2)と(3)で得られた光反応と触媒反応を連動した三成分系光触媒システムの構築を進めている。

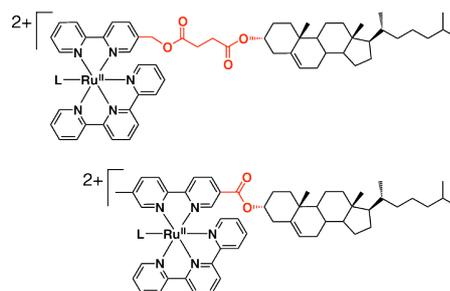


図 5. 機能性脂質ユニット  $Ru$ -Long と  $Ru$ -short の分子構造

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件) 査読有り

① K. Kajitani, T. Koshiyama, A. Hori, R. Ohtani, A. Mishima, K. Torikai, M. Ebine, T. Oishi, M. Takata, S. Kitagawa, M. Ohba

「Guest Responsivity of a Two-Dimensional Coordination Polymer Incorporating a Cholesterol-Based Co-Ligand」 *Dalton Trans.*, 42, 15893-15897 (2013).

DOI: 10.1039/C3DT51465J

[学会発表] (計 13 件)

① 越山友美、本庄正幸、三島章雄、大場正昭  
「抗生物質チャネルを利用した金属錯体-リポソーム複合体の創成」日本化学会第 94 春季年会、名古屋、2014 年 3 月 27-30 日 (名古屋)、優秀講演賞 (学術) 受賞

② 越山友美 「ベシクルと金属錯体の融合による機能性空間の構築」九州錯体化学懇談会第 245 回例会、2014 年 3 月 8 日 (福岡) 招待講演

③ M. Ohba, T. Koshiyama, R. Ohtani, A. Mishima, A. Hori, M. Takata, S. Kitagawa  
「Programmed Functional Space: from Porous Coordination Polymers to Liposome」International Symposium on Coordination Programming 2014 (ISCP2014), 2014 年 1 月 20-22 日 (東京)

④ T. Koshiyama, K. Iwata, M. Honjo, T. Hatae, K. Nakanishi, S. Asada, M. Ohba  
「Construction of a Chemical Reaction System using Liposome」第 3 回統合物質国際シンポジウム、2014 年 1 月 10-11 日 (福岡)

⑤ 越山友美、本庄正幸、大場正昭  
「配位高分子によるリポソーム内水相の機能化」錯体化学会第 62 回討論会、2013 年 11 月 2-4 日 (沖縄)

⑥ T. Koshiyama 「Construction of a Novel Reaction System using Liposome Space」International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, 2013 年 9 月 28-30 日 (仙台) 招待講演

⑦ 越山友美 「ベシクルを基盤とした高機能化学反応空間の創製」 「生物無機化学の新潮流と展望」研究会、2013 年 5 月 25 日 (名古屋)

⑧ 越山友美、岡村朋哉、岩田浩輝、中西契太、波多江 達、吉田将己、正岡重行、大場正昭  
「リポソーム空間への金属錯体の部位特異的固定化による新規反応場の構築」日本化学会第 92 春季年会、2013 年 3 月 22-25 日 (滋賀)

⑨ 越山友美 「ベシクル空間を基盤とした高機能化学反応場の創製」新学術領域研究 若手合同シンポジウム 「配位プログラム」×「融合マテリアル」、2012 年 12 月 20 日 (東京) 招待講演

⑩ 越山友美、岩田浩輝、波多江 達、岡村朋哉、吉田将己、正岡重行、大場正昭  
「親脂質性金属錯体とリポソームによる酸素発生触媒場の構築」錯体化学会第 62 回討論会、2012 年 9 月 22-23 日 (富山)

⑪ 越山友美、岩田浩輝、波多江達、岡村朋哉、吉田将己、正岡重行、大場正昭  
「リポソームを利用した酸素発生触媒場の構築」第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 6-8 日 (札幌)

⑫ 越山友美、大場正昭  
「リポソームへの金属錯体組込みによる新規触媒場の構築」統合物質創製化学推進事業 第 3 回若手研究会、2012 年 7 月 23-24 日 (滋賀)

⑬ 越山友美、波多江 達、岡村朋哉、大場正昭  
「リポソームへの金属錯体組込みによる新規触媒場の構築」統合物質創製化学推進事業 第 3 回統合物質シンポジウム「新エネルギーと物質創製」、2012 年 6 月 1-2 日 (福岡)  
[図書] (計 1 件)

① 越山友美 「光で細胞機能をコントロール 光誘起電荷分離分子が膜電位を制御する」月刊化学 (化学同人) 2013, 68(2), 66-67.

[産業財産権]

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/Sakutaibu/ssei/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

越山 友美 (KOSHIYAMA, TOMOMI)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：30467279

(2) 研究分担者：該当なし

(3) 連携研究者：該当なし