

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410021

研究課題名(和文)高周波ESRによる光合成水分解-酸素発生過程の構造研究

研究課題名(英文)Structural study of photosynthetic oxygen evolving process by high-frequency ESR

研究代表者

松岡 秀人(MATSUOKA, Hideto)

大阪市立大学・大学院理学研究科・客員准教授

研究者番号：90414002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：光合成タンパク質内に存在するMnクラスターは、光合成の最も重要な水を分解し、酸素を発生するプロセスに欠かすことができない。本研究では、そのMnクラスターのみを選択的かつ高感度に観測できる高周波電子スピン共鳴(ESR)装置の改良を行った。それにより、効率的に、希望するMnクラスターの状態を生成することができるようになり、水分解-酸素発生に重要な電子状態の変化を観測することができた。

研究成果の概要(英文)：Molecular oxygen is produced from water by a manganese cluster in photosynthesis. This process of the water splitting and oxygen evolution is the most important chemical process in photosynthesis. In this work, a high-frequency ESR spectrometer, which enables us to detect the manganese cluster selectively, was improved. This facilitated the ESR detection of desired electronic states for the manganese cluster.

研究分野：基礎化学

キーワード：磁気共鳴 電子スピン共鳴 光合成 光エネルギー変換

1. 研究開始当初の背景

光合成の水分解 - 酸素発生過程は、光駆動 4 電子サイクル(水分子の 4 電子酸化)であり、光化学系 II 複合体で行われている。その光駆動サイクルの活性中心が 4 核のマンガンクラスターであり、1 サイクルで 5 つの中間酸化状態(S0 - S4)をとることが古くから知られている。しかし、巨大な膜タンパク質複合体である光化学系 II は良質な結晶を得ることが難しく、高分解 X 線結晶構造解析は長年の課題であった。そのような中、連携研究者・沈建仁教授(岡山大)は、ドイツやイギリスとの熾烈な競争の末、均質な結晶の作成に成功し、高分解 X 線結晶構造解析からクラスターの構造が歪んだ椅子形であることを明らかにした。これにより、水分解 - 酸素発生過程を分子構造という観点から議論する素地は整ったが、ダイナミクス(反応機序)の解明には至っていない。特に、X 線結晶構造解析では酸化状態の選別が困難であり、観測された構造がどの酸化状態に相当するかについても多くの議論がなされている。本研究で中心的な研究手法となる電子スピン共鳴(ESR)法もまた、光化学反応中間体の同定・識別などを可能とする有用な手法であり、光合成研究においても初期から重要な役割を果たしてきた。研究代表者は、高時間分解高周波(95GHz) ESR 装置の改良を重ね、連携研究者とともに、光合成膜タンパク質の単結晶 ESR 実験を世界に先駆け成功させてきた。また、光合成タンパク質内のプロトン共役電子移動や電子移動ダイナミクスの解明や、光応答性を示す金属クラスターなどに対して、その電子・分子構造やダイナミクスを高時間分解高周波 ESR により明らかにしてきた。これまで培ってきた最新の高周波 ESR 技術を駆使し、さらに非常に質の高い光合成タンパク質試料を用いることで、高周波 ESR 研究による水分解 - 酸素発生反応の分子論的追跡が可能で段階に入ったと考え、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、国内で唯一の高時間分解・高出力 CW/パルス高周波(95GHz) ESR 分光器の改良を行い、高効率での光照射、超高感度測定、ならびに高品質な光合成タンパク質の作成を行い、光合成において最も重要な水分解 - 酸素発生過程を直接触媒する Mn クラスターの間酸化状態を選択的に観測することである。

3. 研究の方法

具体的な研究の方法は以下の通りである。
 (1)高周波 ESR 装置の共振器を改良し、横励起による高効率光照射を実現する。(2)パルス ESR 装置の検出系を改良し、超高感度での ESR 観測を可能とする。(3) Mn クラスター内で酸素発生に必要不可欠と考えられているカルシウムイオンを別のイオンに置換し、電

子・分子構造の差異を観測する。(4)改良した ESR 装置を、他の光エネルギー変換物質系へと応用し、その有用性を示す。

4. 研究成果

(1) 光照射効率の向上

高周波 ESR 共振器は非常に小さく(試料サイズは 0.9mm)、試料への光照射は従来、光ファイバーによって試料直上まで誘導した光により行ってきた(図 1)。しかし、光源からファイバーへの結合効率などの問題から、試料部では十分な光量が得られず、特に光捕集系として多数のクロロフィル分子を含んでいる光合成タンパクや、さらに密度の高い結晶試料では光がタンパク試料内/結晶内を透過せず、上側表面を照射しているに過ぎない。そこで、複数方向からの同時光照射を可能とする光照射窓を有した共振器の作成

を行った。問題は窓からマイクロ波が漏れ出すことで、本研究ではまず、理論計算(電磁場解析)により、マイクロ波への光学窓の影響を検討した(図 2)。その結果、直径が 0.5mm 程度までの穴径であればマイクロ波の漏れが無視できることが明らかとなった。

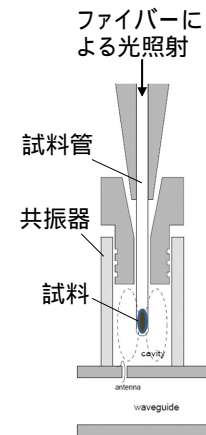


図 1 通常の共振器

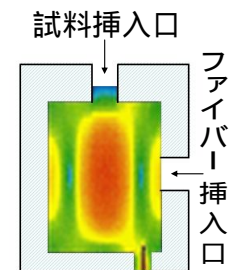


図 2 穴あき共振器の電磁場解析。

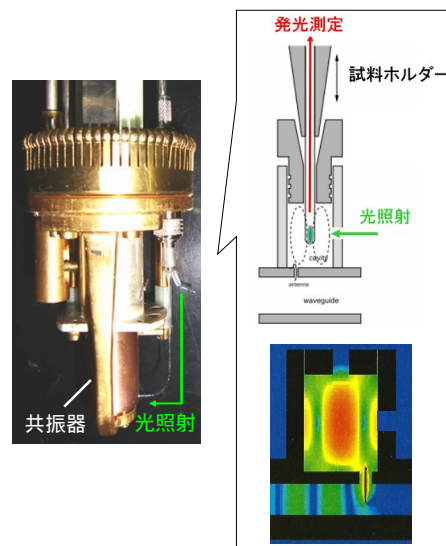


図 3 製作した横励起型共振器の写真と模式図。

次に、実際に穴あき共振器の製作を行った。実験的にマイクロ波の漏れを調べたところ、実際には理論計算よりもわずかに大きな窓サイズ(0.7 mm)が可能であることがわかった。共振器の材質や、表面研磨法を最適化することで、図3に示すような共振器を作成した。標準試料として C_{60} を用いて、光照射効率を見積もったところ、従来の3倍以上の効率を得られることがわかった(図4a)。また、横励起用の光学窓から試料を光照射し、従来の直上からの光ファイバーにより試料からの発光を観測することも可能となった。これにより、高磁場下での発光検出、ならびに光検出磁気共鳴測定が可能となり、光合成試料の磁気共鳴測定の可能性を広げることができた。

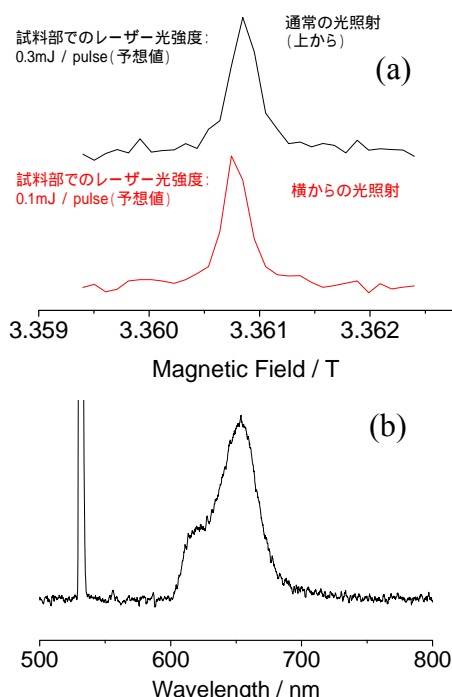


図4 (a)直上励起および横励起の光照射効率の比較。標準試料として C_{60} を用いた。(b)横励起により試料(亜鉛ポルフィリン)を光照射し、従来の直上からの光ファイバーによって検出した高磁場下での蛍光スペクトル。

(2) Sr 置換型酸素発生中心の高周波 ESR

酸素発生中心の補酵素として働く Ca を、Sr に置換することで酸素発生能が半減することが知られている。そこで本研究では、Ca/Sr 置換効果を調べるため、Sr 置換型酸素発生中心を含有した高品質な光合成タンパク質を作成し、高感度高周波 ESR 測定を行った。図5には PSII 凍結溶液中の酸素発生中心に対して観測した高周波 ESR スペクトルを示した。なお、(a)は補酵素として Ca を、(b)は補酵素として Sr が結合しており、Sr 置換型酸素発生中心の高周波 ESR 観測は世界最初の例である。明らかに、Sr への置換により、観測されるスペクトルの位置(磁場)がシフトして

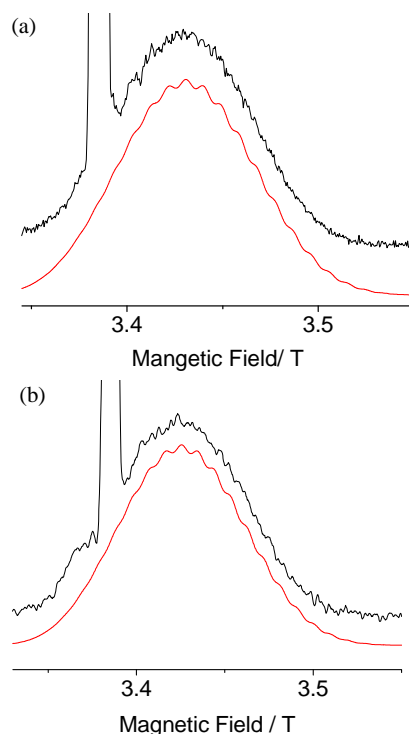


図5 PSII 凍結溶液中の酸素発生中心に対する高周波 ESR スペクトル:(a) Ca、(b) Sr。黒が実測、赤がシミュレーション。

いることがわかる。これは、電子・分子構造を反映した g 値の違いによって説明される。スペクトルシミュレーションの結果、 g 値を次のように決定した:

($CaMn_4O_5$) $g_x = 1.983$, $g_y = 1.965$, $g_z = 1.997$

($SrMn_4O_5$) $g_x = 1.989$, $g_y = 1.968$, $g_z = 1.997$

S_2 状態の Mn クラスタは Mn(III) が1つと Mn(IV) が3つから構成されると考えられている。配位子場理論から Mn(IV) イオンの g 値は異方性が小さいと期待されることから、決定した g 値の違いは Mn(III) イオンの配位環境の違いを反映していると考えられる。量子化学計算により、この g 値の違いを詳細に検証することで、酸素発生能と Mn クラスタの電子・分子構造との相関を明らかにできると期待できる。

(3) 酸素発生中心内の磁氣的相互作用

各 Mn 核間に働く6種類の交換相互作用 J は、Mn クラスタの分子構造および電子構造を直接反映したパラメータである。しかし、それらを実験的に識別して、決定することは不可能なため、本研究では基底スピン状態と励起スピン状態とのエネルギー差 Δ から間接的に交換相互作用の決定を行った。まず Δ の決定は、スピン格子緩和時間の温度変化を測定し、それをアレニウス型(Orbach 過程)の理論式を用いて解析することで決定した。その結果、シアノバクテリア *T. vulcanus* 由来光化学系 II の単結晶

試料では $\Delta = 32\text{cm}^{-1}$ と求められた。ここで得られた Δ 値を見ると、別の種のシアノバクテリア *T. elongatus* と比べて一桁大きい値であり、種による違いが示唆された。しかし、 Δ 値を strong exchange limit で解析して求めた交換相互作用 J は、*T. elongatus* のそれとほぼ一致しており、 Δ 値の違いの由来については、さらなる検証が必要だとわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Mark Kerzhner, Dinar Abdullin, Jenifer Wiecek, Hideto Matsuoka, Gregor Hagelueken, Olav Schiemann, and Michael Famulok, Post-synthetic Spin-Labeling of RNA through Click Chemistry for PELDOR Measurements, Chem. Eur. J., 査読有, 22, 2016, 12113 - 12121 [Hot Paper].

DOI: 10.1002/chem.201601897

Tobias Heurich, Zheng-Wang. Qu, Senada Nozinovic, Gregor Schnakenburg, Hideto Matsuoka, Stefan Grimme, Olav Schiemann, and Rainer Streubel, Synthesis and Rearrangement of P-Nitroxyl-Substituted PIII and PV Phosphanes: A Combined Experimental and Theoretical Case Study, Chem. Eur. J., 査読有, 22, 2016, 10102 -10110.

DOI: 10.1002/chem.201504900

Wolfram Ratzke, Lisa Schmitt, Hideto Matsuoka, Christoph Bannwarth, Marius Retegan, Sebastian Bange, Philippe Klemm, Frank Neese, Stefan Grimme, Olav Schiemann, John M. Lupton, and Sigurd Hoeger (The authors W. R., L. S., and H. M. made equal contribution to the work), Effect of Conjugation Pathway in Metal-Free Room-Temperature Dual Singlet-Triplet OLED Emitters, J. Phys. Chem. Lett., 査読有, 7, 2016, 4802-4808.

DOI: 10.1021/acs.jpcclett.6b01907

Hideto Matsuoka, Shinichi Mizutani, Chika Watanabe, Seigo Yamauchi, High-Frequency EPR Studies on Polymer Chain Morphology in Dip-Coated Films of Poly(3-hexylthiophene)/Fullerene Bulk-Heterojunctions, Bull. Chem. Soc. Jpn., 査読有, 89, 2016, 378-384. [Selected Papers]

DOI: 10.1246/bcsj.20150400

Hideto Matsuoka, Takuya Kotaki, Seigo Yamauchi, Influence of C_{60} Aggregation on Pseudorotation in the Excited Triplet State Probed by Multifrequency Time-Resolved EPR, Appl. Magn. Reson., 査読有, 45, 2014, 901-909.

DOI:10.1007/s00723-014-0569-8

〔学会発表〕(計10件)

Hideto Matsuoka, Lisa Schmitt, Marius Retegan, Frank Neese, Sigurd Hoeger, Olav Schiemann, Time-resolved EPR and theoretical investigations of metal-free dual singlet-triplet OLED emitters, 38th FGMR Discussion Meeting, 2016年9月13日, デュッセルドルフ(ドイツ)

Hideto Matsuoka, Lisa Schmitt, Marius Retegan, Frank Neese, Sigurd Hoeger, Olav Schiemann, Time-Resolved EPR and Theoretical Investigations of Metal-Free Dual Singlet-Triplet Emitters in OLEDs, Xth EFEP Conference, 2016年9月6日, トリノ(イタリア)

Hideto Matsuoka, Lisa Schmitt, Marius Retegan, Wolfram Ratzke, Christoph Bannwarth, Stefan Grimme, John M. Lupton, Frank Neese, Sigurd Höger, Olav Schiemann, Metal-Free Dual Singlet-Triplet Emitters in OLEDs As Studied by Time-Resolved EPR and Quantum Chemical Calculations, AWEST 2016, 2016年6月21日, 淡路夢舞台国際センター(兵庫県・淡路市)

Hideto Matsuoka, Lisa Schmitt, Marius Retegan, Frank Neese, Christoph Bannwarth, Stefan Grimme, Sigurd Höger, Olav Schiemann, Time-Resolved EPR and Theoretical Investigations of Thiophene-Decorated Phenazines in Excited Triplet States, 9th Japanese-Russian Workshop on Open Shell Compounds and Molecular Spin Devices, 2015年11月9日, 淡路夢舞台国際センター(兵庫県・淡路市)

Hideto Matsuoka, Lisa Schmitt, Marius Retegan, Frank Neese, Christoph Bannwarth, Stefan Grimme, Sigurd Höger, Olav Schiemann, チオフェンオリゴマーによって修飾されたフェナジンの励起三重項状態の時間分解 EPR および理論的研究, SEST2015, 2015年11月2日, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

Hideto Matsuoka, Lisa Roeck, Marius Retegan, Frank Neese, Christoph Bannwarth, Stefan Grimme, Sigurd Höger, Olav Schiemann, Time-Resolved EPR and Theoretical Investigations of Excited Triplet States of Thiophene-Decorated Phenazines, 37th FGMR Discussion Meeting, 2015年9月8日, ダルムシュタット(ドイツ)

Hideto Matsuoka, Time-Resolved EPR and Theoretical Investigations of Thiophene-Decorated Phenazines in Excited Triplet State, AWEST 2015,

2015年6月15日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

Hideto Matsuoka, Excited Triplet States of Thiophene-Decorated Phenazines Probed by Time-Resolved EPR, APES-IES-SEST 2014, 2014年11月14日, 東大寺総合文化センター(奈良県・奈良市)

Hideto Matsuoka, Lisa Roeck, Sigurd Höger, Olav Schiemann, Time-Resolved EPR and DFT Studies of Organic Electroluminescent Materials, 36th FGMR Discussion Meeting, 2014年9月30日、ベルリン(ドイツ)

Hideto Matsuoka, Lisa Roeck, Christoph Bannwarth, Stefan Grimme, Sigurd Hoeger, Olav Schiemann, Time-Resolved EPR of Thiophene-Decorated Phenazines in Excited Triplet State, AWEST 2014, 2014年6月17日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

[図書](計1件)

Hideto Matsuoka 他, Springer, Molecular Spins in Biological Systems, 2016, 51-77.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 秀人(MATSUOKA, Hideto)
大阪市立大学・大学院理学研究科・客員
准教授
研究者番号: 90414002

(3) 連携研究者

沈 建仁(SHEN, Jian-Ren)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 60261161

(4) 研究協力者

佐藤 和信(SATO, Kazunobu)
工位 武治(TAKUI, Takeji)
Olav Schiemann (SCHIEMANN, Olav)