

令和元年5月30日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04097

研究課題名(和文)フラビン酵素の光電荷分離過程に伴う立体構造変化

研究課題名(英文)Geometry changes by photoinduced charge-separations in flavoproteins

研究代表者

小堀 康博(Kobori, Yasuhiro)

神戸大学・分子フォトサイエンス研究センター・教授

研究者番号：00282038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：光入力による動物の地磁気感受性を起こすタンパク質複合体(クリプトクロム)を研究対象とし、酵素内部の電子、プロトンの移動によって起こるアミノ酸残基の立体構造変化を原子スケールで捉えた。部位特異的変異導入法と時間分解電子スピン共鳴法および、当研究室で開発した電子スピン分極イメージング法を駆使し、フラビン酵素の初期電子移動過程に伴う補酵素およびアミノ酸残基の立体的な位置と分子配向を決定する。さらに光電荷分離状態の電子的相互作用の値を特定し、長距離電荷分離に対してアミノ酸残基の水素結合や配位結合が電子伝達機能にどのように関わるのかについて分子論的機構を解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子動力学計算による予測(Solov'yov et al. Sci. Rep.2014)では二段階目の電荷分離に伴うタンパク質構造変化の重要性が示唆されていた。このような運動が、静電相互作用を乗り越える発熱的な電荷解離を引き起こしていることが仮説として提示される。今回、アミノ酸残基や水分子の運動が特異的な溶媒和を引き起こすことで、有効な反応場を提供していることが実証された学術的意義は大きい。本研究はタンパク質の特定のアミノ酸による環境場が分子論的にどのように効率のよいエネルギー変換機能を決定づけるかについて実証するものであり、数十億年に渡る生命進化の謎を解き明かす糸口になる。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism of navigating the Earth magnetic field by animals, we have clarified atomic-scale conformation changes in oxidized tryptophan residue in photoinduced charge-separated (CS) state in cryptochrome by using time-resolved electron paramagnetic resonance measurements with applying site directed mutagenesis for *Xenopus laevis* cryptochrome (Xcry) DASH. The intermediate charge-separated state as the secondary radical ion pair between reduced flavin adenine dinucleotide (FAD⁻) and the tryptophan377 (W377⁺) was characterized together with the terminal radical pair of FAD⁻-W324⁺. The relative position and the orientation of the charges were precisely determined by our recently developed tool of the electron spin polarization imaging derived by the magnetophotoselection measurement at low temperature. We have clarified that the conformation changes in W377⁺ play important role for the hole-transfer reaction from the secondary intermediate of FAD⁻-W377⁺.

研究分野：物理化学

キーワード：光電荷分離 立体構造 電子的相互作用 アミノ酸残基 クリプトクロム 時間分解電子スピン共鳴法
電子スピン分極

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成や DNA 修復など、生物はさまざまな活動において太陽光エネルギー変換を巧みに利用しており、数十億年にわたる持続的な生命進化の基盤となっている。近年特に注目されている次世代型太陽光発電や人工光合成、光触媒システムの開発など、環境負荷のない新エネルギー源の構築のためにも、タンパク質による光エネルギー変換機構の理解が欠かせない。しかしながら、タンパク質の光電荷分離過程など、光エネルギー変換の分子論的起源の多くは未解明のままである。近年、フラビン酵素の光電荷分離過程は、光入力による動物の地磁気感受性や植物の向光性に重要な役割を果たすと考えられ注目されている。例えばクリプトクロムでは、光入力直後にフラビン(FAD)の励起状態を経由した連続的な電荷分離過程により、正電荷(正孔: h^+)は3つのトリプトファン(W)残基群を段階的に通過し、長距離電荷分離状態を生成すると考えられている。近年 Weber らは、タンパク質表面近傍の末端トリプトファン残基(W324)が酸化された中性ラジカルによる中間体の対($FADH^{\bullet}$ W400W377 W324 \cdot)が光誘起プロトン共役電子移動反応によって生成することを時間分解電子スピン共鳴法で示した (Biskup et al. JPCB2010 他)。しかしながら、この前駆体として考えられる光電荷分離状態(FAD^{\bullet} W400 $^+$ W377W324 や、 FAD^{\bullet} W400W377 $^+$ W324)について、立体構造や電子的相互作用は全く知られていない。また、効率よく長距離電荷分離を起こすためには、初期電荷分離状態 FAD^{\bullet} W400 $^+$ に生じる静電相互作用の安定化を乗り越えた発熱的な正電荷の解離が必要である。アミノ酸残基による水素結合や配位結合による内部環境がどのように時々刻々と変化し、発熱的な電荷解離による伝導性やシグナル伝達に結びつくかについての実験的な研究例は皆無であり、このような生体反応に対する分子論的理解が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、部位特異的変異導入法と多周波時間分解電子スピン共鳴(TREPR)法および、時間分解赤外分光法を組み合わせ、フラビン酵素の初期電子移動過程に伴う補酵素およびアミノ酸残基の立体的な位置と分子配向の変化を観測する。さらに各光電荷分離状態の電子的相互作用の値を特定し、長距離電荷分離に対しアミノ酸残基の水素結合や配位結合が電子伝達機能にどのように関わるのかを具体的に示すことにより、タンパク質反応の分子論的機能の詳細を明らかにする。青色受容体タンパク質(BLUF)では、グルタミン残基変異体を用い、光電荷分離反応後の構造変化を観測する。シグナル状態として生成する FAD^{red} の前駆状態において、立体構造変化を突き止める

3. 研究の方法

フラビン酵素において、光照射直後に生成する電荷分離状態の立体構造・分子配向変化を特定し電子伝達機能を明らかにするため、X 帯マイクロ波による時間分解電子スピン共鳴システムを利用し、外部磁場に対する励起レーザー光の偏光効果を観測した。初期電荷分離状態において生じる電子スピン量子コヒーレンスを利用し、異なる偏光方向条件下で電子スピン分極を検出する。量子論による解析で精密立体構造、電子的相互作用の決定を行う。さらに特定のアミノ酸残基を同位体置換した変異体を作製し電荷分離状態を観測する。得られた電荷分離構造とアミノ酸残基の水素結合構造の変化から、電子伝達機能の関連を原子レベルで明らかにする。

4. 研究成果

得られたマイクロ波の吸収(A)や放出(E)を示す TREPR スペクトルとして 120 K では、磁場範囲 20 mT の広い領域に E/A/E/A のパターンを示す EPR 信号が得られた。一方、240 K の測定温度では、既報のデータと類似した E/A パターンを示す 5 mT 以内の幅の狭い信号が得られた。以上より低温領域で得られたスペクトルは、双極子間相互作用(D)やスピン交換相互作用(J)が高温の系よりも増大したスピン相関ラジカル対として解釈することができるため、 FAD^{\bullet} W400 W377 W324 $^+$ の前駆体である近距離電荷分離状態 FAD^{\bullet} W400 W377 $^+$ W324 の信号と解釈した。そこで各電荷分離状態について励起光偏光方向の効果を観測すると共に、確率 Liouville 方程式を用いた S-T₀ mixing の異方性と D および J の揺らぎ運動によるスピン緩和および、不均一幅を考慮したスピン分極モデルによるスペクトル解析を行い、電荷分離状態の立体配置と電子的相互作用を決定した。測定温度 120 K で得られた信号のシミュレーション結果より、(FAD^{\bullet} W400 W377 $^+$ W324)の電荷分離において、交換相互作用(J)の値が時間変化とともに減少する様子が観測された。これは、ラジカル間の電子軌道の重なりがこの時間領域で徐々に減少するように分子がわずかな構造変化を起こすことを示している。このような低温領域におけるアミノ酸残基の再配向運動は室温領域では高速化されることが期待される。このため室温領域で観測された FAD^{\bullet} W400 W377 W324 $^+$ の生成には、前駆状態である FAD^{\bullet} W400 W377 $^+$ W324 における W377 $^+$ の再配向運動が高速な電荷解離に重要な役割を果たすものと考察することができる。

さらに TREPR 測定から、アミノ酸残基 W377 を含む電荷分離状態種の確実な同定とラジカル対の構造の詳細を示すため、当研究グループが独自に開発した電子スピン分極イメージング法を用いた解析を行った。S-T₀ mixing による電子スピン分極には g 値の異方性や核結合定数および電子スピン双極子間相互作用の異方性が関与するため、ラジカル対を構成するアミノ酸残基の位置と分子配向を映像化することができる。FAD の g 軸に対し、取り得るすべての外部磁場空間方向にスペクトル強度を投影することで電荷分離状態の精密立体構造に関する情報が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Y. Kobori, T. Ako, S. Oyama, T. Tachikawa, K. Marumoto “Transient Electron Spin Polarization Imaging of Heterogeneous Charge-Separation Geometries at Bulk-Heterojunction Interfaces in Organic Solar Cell” *J. Phys. Chem. C* in press. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b02672
2. S. Nakamura, H. Sakai, H. Nagashima, Y. Kobori, N. V. Tkachenko, T. Hasobe, “Quantitative Sequential Photoenergy Conversion Process from Singlet Fission to Intermolecular Two-Electron Transfers Utilizing Tetracene Dimer” *ACS Energy Lett.* 4, 26-31 (2019).
3. D. Lubert-Perquel, E. Salvadori, M. Dyson, P. N. Stavrinou, R. Montis, H. Nagashima, Y. Kobori, S. Heutz, C. W. M. Kay “Identifying Triplet Pathways in Dilute Pentacene films” *Nat. Commun.* 9.4222 (2018). [Top 10% paper]
4. H. Nagashima, S. Kawaoka, S. Akimoto, T. Tachikawa, Y. Matsui, H. Ikeda, Y. Kobori, “Singlet-Fission-Born Quintet State: Sublevel Selections and Trapping by Multiexciton Thermodynamics” *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 5855-5861 (2018). [Top 10% paper]
5. H. Nagashima, S. Kawaoka, Y. Matsui, T. Tachikawa, H. Ikeda, Y. Kobori, “Time-Resolved EPR Study on Singlet-Fission Induced Quintet Generation and Subsequent Triplet Dissociation in TIPS-Phenyl-Tetracene Aggregates” *J. Photopolym. Sci. Technol.* 31, 163-167 (2018).
6. H. Sakai, R. Inaya, H. Nagashima, S. Nakamura, Y. Kobori, N. V. Tkachenko, T. Hasobe, “Multiexciton Dynamics Depending on Intramolecular Orientations in Pentacene Dimers: Recombination and Dissociation of Correlated Triplet Pairs” *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 3354-3360 (2018). [Top 10% paper]
7. F. Ema, M. Tanabe, S. Saito, T. Yoneda, K. Sugisaki, T. Tachikawa, S. Akimoto, S. Yamauchi, K. Sato, A. Osuka, T. Takui, Y. Kobori, “Charge-Transfer Character Drives Möbius Antiaromaticity in the Excited Triplet State of Twisted [28]Hexaphyrin” *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 2685-2690 (2018).
8. Y. Yamamoto, T. Ako, T. Tachikawa, I. Osaka, Y. Kobori, “Time-Resolved EPR Study on Photoinduced Charge-Transfer Trap State in Thiophene-Thiazolothiazole Copolymer Film” *J. Photopolym. Sci. Technol.* 30, 551-555 (2017).
9. M. Hasegawa, H. Nagashima, R. Minobe, T. Tachikawa, H. Mino, Y. Kobori, “Regulated Electron Tunneling of Photoinduced Primary Charge-Separated State in the Photosystem II Reaction Center” *J. Phys. Chem. Lett.* 8, 1179-1184 (2017).
10. M. Nakamura, K. Kishimoto, Y. Kobori, T. Abe, K. Yoza, K. Kobayashi, “Self-Assembled Molecular Gear: A 4:1 Complex of Rh(III)Cl Tetraarylporphyrin and Tetra(p-pyridyl)cavitand” *J. Am. Chem. Soc.* 138, 12564-12577 (2016).
11. T. Miura, T. Tachikawa, Y. Kobori “Morphology Effect on Geometry of Photoinduced Charge-Separated State in P3HT:PCBM Blend Films as Studied by Time-Resolved EPR Spectroscopy” *J. Photopolym. Sci. Technol.* 29, 561-564 (2016).
12. M. Fuki, H. Murai, T. Tachikawa, Y. Kobori, “Time Resolved EPR Study on the Photoinduced Long-Range Charge-Separated State in Protein: Electron Tunneling Mediated by Arginine Residue in Human Serum Albumin” *J. Phys. Chem. B* 120, 4365-4372 (2016).
13. T. Miura, R. Tao, S. Shibata, T. Umeyama, T. Tachikawa, H. Imahori, Y. Kobori “Geometries, Electronic Couplings, and Hole Dissociation Dynamics of Photoinduced Electron-Hole Pairs in Polyhexylthiophene-Fullerene Dyads Rigidly Linked by Oligophenylenes” *J. Am. Chem. Soc.* 138, 5879-5885 (2016). [Top 10% paper]
14. T. Higashino, T. Yamada, M. Yamamoto, A. Furube, N. V. Tkachenko, T. Miura, Y. Kobori, R. Jono, K. Yamashita, H. Imahori “Remarkable Dependence of the Final Charge Separation Efficiency on the Donor-Acceptor Interaction in Photoinduced Electron Transfer” *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 629-633 (2016). [Top 10% paper]

〔図書〕(計 3 件)

1. 小堀康博 研究室訪問「神戸着任から新規な中間体磁気イメージング法の開発まで」*電子スピンスイエンズ*, 15, 104-108 (2017).
2. 小堀康博 トピックス「有機半導体界面の光電荷解離機構」*電子スピンスイエンズ*, 14, 96-102 (2016).
3. 小堀康博「電子スピニコヒーレンスによる有機太陽電池基板の電子伝達機能の解明」*太陽光と光電変換機能-分野融合から生まれる次世代太陽電池- シーエムシー出版* pp.148-155 (2016).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
プレスリリース

H29年3月1日「植物光合成による効率的な電荷生成の仕組みを解明 人工光合成系への応用に期待」

H30年5月9日 光をあてると高いエネルギーを保持し磁性を発現する「メビウスの帯」分子
高エネルギー化の仕組み解明で有機電子材料開発に道

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩田達也

ローマ字氏名：Iwata Tatsuya

所属研究機関名：東邦大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20569917

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。