

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：54601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06937

研究課題名（和文）人工光合成の実現を目指した脂質膜の相分離を利用した光捕集アンテナベシクルの調製

研究課題名（英文）Preparation of light-collecting antenna vesicles using phase separation of lipid membrane for the realization of artificial photosynthesis

研究代表者

中村 秀美（Nakamura, Hidemi）

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授

研究者番号：70198232

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：光合成が行われる葉緑体中のチラコイド膜では色素分子が集積することにより、光励起によって反応中心へのエネルギー伝達が起こる。本研究ではリン脂質や非イオン界面活性剤の脂質膜を利用して形成したモデルチラコイド膜上で起こる相分離を利用して、脂質膜を“ナノドメインサイズ”で制御することで、効率的にクロロフィルaの電子集積を行い、人工光捕集アンテナベシクルを調製した。電子集積を高める最適な膜組成や膜形状を明らかにし、クロロフィルaを用いた人工光合成の可能性について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工光合成をエネルギー生産体として活用するためのモデルチラコイド膜の膜特性の基礎的な知見・電子伝達メカニズムの解明を目標として、モデルチラコイド膜の「ナノドメインサイズ」の相分離を応用して、相界面にクロロフィルaを蓄積させることで、より効率的な電子伝達を達成するチラコイド膜を設計した。クロロフィルaのような色素分子を膜界面で自己組織化させることにより、高効率な光捕集アンテナを設計することが可能になれば、他の脂質への応用、さらには有用な光エネルギー変換体のシステム構築への道が開かれることになると思われる。

研究成果の概要（英文）：In the thylakoid membrane in the chloroplast where photosynthesis takes place, the photoexcitation causes energy transfer to the reaction center by aggregation of pigment molecules on membrane. In this study, by utilizing phase separation on model thylakoid membranes formed using lipid membranes of phospholipids or nonionic surfactants, the electron accumulation of chlorophyll a was efficiently performed by controlling the lipid membrane with "nanodomain size", and the artificial light collecting antenna vesicle was prepared. The optimal phase composition and shape of self-assemblies that enhance electron accumulation were clarified, and the possibility of artificial photosynthesis using chlorophyll a was investigated.

研究分野：環境化学工学，分離工学

キーワード：プロセス・化学工学 マイクロ・バイオプロセス 人工光合成 脂質膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の社会は化石燃料や原子力といった有限で危険なエネルギーにより支えられており、持続可能な社会に向けて、より無限でクリーンなエネルギーの開発が求められている。植物が行う光合成はこれらの条件を満たす方法として従来から研究されている。光合成は植物細胞内にある葉緑体という細胞小器官により行われる。さらに葉緑体の中には実際に光合成に関与する有用分子(色素やタンパク質)と、これらの分子を支える足場となる“チラコイド膜”が存在する(図1(a))。特に色素であるクロロフィル a (Chl a)は光合成において重要な働きをする分子の1つである。Chl a は 450 nm 付近と 700 nm 付近の光を吸収し、電子を他の色素やタンパク質に伝達する働きを有する。一方、チラコイド膜はこれらの分子を必要に応じて集積させ、より効率的にエネルギー生産を行うという役割を有する。従来の研究では Chl a や関連するタンパク質に着目した研究が多く、チラコイド膜はほとんど着目されてこなかった。

本研究では、チラコイド膜に着目して Chl a の効率的な電子集積について検討を行う。Chl a は単一分子ではなく、いくつかの分子のバクテリオクロリン環が重なり合った状態(J 会合体)において電子を伝達する。つまり、模倣したチラコイド膜上において、Chl a を効率的に集積させることで、電子を集積することが可能となる。この目的を達成するため、研究代表者らはチラコイド膜上の相分離に着目した。チラコイド膜は様々なリン脂質とステロイド類により構成されるが、これらの組成や温度を変化させることで、相状態や物理化学的特性がコントロール可能であることを報告している。本研究では、この相分離を応用してチラコイド膜をデザインし、相界面に Chl a を蓄積させることで、より効率的な電子伝達を達成することを目的とする(図1(b))。

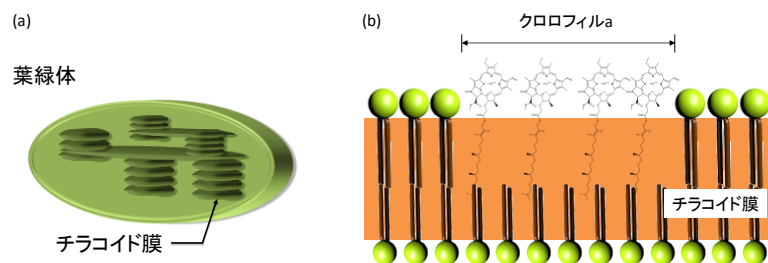


図1 (a) 葉緑体の構造. (b) 相分離を利用したクロロフィル a の集積.

2. 研究の目的

『植物の光合成機能を人工的に模倣するシステムの実現』は人類の夢の一つである。光合成が行われる葉緑体中のチラコイド膜では色素分子が集積することにより、光励起によって反応中心へのエネルギー伝達が起こる。従来の研究では、Chl a や光合成に関係するタンパク質を主体とした研究が行われていたが、本研究では、チラコイド膜自身に焦点を当てる。すなわち、リン脂質や非イオン界面活性剤の脂質膜を利用して形成したモデルチラコイド膜上で起こる相分離を利用して、脂質膜を”ナノドメインサイズ”で制御することで、効率的に Chl a の電子集積を行い、人工光捕集アンテナベシクルを調製する。さらに最適な膜組成や膜形状を明らかにし、電子伝達効率を高めて光エネルギー利用の高効率化を目指すとともに、Chl a を用いた人工光合成の可能性について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) リン脂質膜におけるクロロフィルの集合挙動の検討

2 mol% の Chl a に対してリン脂質 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), コレステロール(chol)を種々の割合で混合し、クロロホルム 10 mL に溶解した。エバポレーターにより有機溶媒を除去し、得られた薄膜を、デシケータを用いて減圧乾燥した。その後、薄膜に超純水を加え、凍結融解法により自己集合体を調製し、エクストルーダー法により粒径を 100 nm に調整したリン脂質ベシクルを調製した。

Chl a の吸収スペクトルの B band における、最も長波長側のピーク(B1)と近接するピーク(B2)を、紫外可視分光光度計を用いて、25 °C, 55 °C, 25 °C とおんどを変化させて測定し、凝集を評価する1つのパラメータとして知られている B1/B2 の値を算出した。

また、DOPC と DPPC、どちらの相に Chl a が分配しているかを確認するため、2 mol% の NBD-PE を添加したリポソームを用いて FRET 法により評価した。蛍光分光光度計を用いて、25 °C, 55 °C, 25 °C と温度を変化させて、Chl a を添加することによる励起波長 460 nm における NBD-PE の蛍光強度の減少率を測定した。

(2) 脂質膜場における光捕集系分子の会合挙動の評価と制御

両性リン脂質である DOPC、または DOPC とアニオン性リン脂質である 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG) を等モル量で混合した後、Dodecanedioic Acid, 1,1'-Carbonyl-diimidazole (CDI), Pyrenemethanol を用いて合成した脂質化 Pyrene (Pyrene-C11-COOH) を 0.1, 1, 5, 10 mol% の割合で混合し、クロロホルムに溶解した。エバポレーターにより有機溶媒を除去し、得られた薄膜を減圧乾燥した。その後、薄膜に超純水を 4 mL 加え、凍結融解法によりベシ

クルを調製し、エクストルーダーにより粒径を 100 nm に調整した。

調製したベシクルの各温度(10~50 °C)における pyrene の蛍光スペクトルについて、蛍光分光光度計を用い、励起波長 336 nm における 350 ~ 600 nm の蛍光波長を測定し、ベシクル膜内の特性評価を行った。また、重水を用いて調製したベシクルに対する各温度(20~50 °C) におけるアシル鎖の運動性評価を ¹H NMR を用いて行った。

(3) 光照射に伴う脂質過酸化の評価

DOPC に対して Chl a と、Chl a に類似したクロリン骨格を有する Cu-Chlorophyllin (Cu-Chln) の光捕集系分子を 2mol% 混合し、クロロホルムに溶解した。エバポレーターによりクロロホルムを除去し、得られた薄膜をデシケーターを用いて減圧乾燥した。薄膜に超純水を加えて凍結融解法によりリポソームを調製し、エクストルーダー法により粒径を 100 nm に調整した。

光捕集系分子を溶解した各種溶媒 0.01 mM の Q_y band における吸収極大波長と、溶媒の比誘電率の関係からクロリン骨格の周囲の比誘電率を求め、リポソーム膜内での光捕集系分子の配向位置を評価した。さらに、Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) を 5 mol% 加え調製した光捕集系分子含有リポソーム懸濁液([DOPC]= 20 μM) に対して白色 LED を照射し、生成された diphenyl-1-pyrenylphosphine oxide (DPPPO) の蛍光強度を測定することによりリン脂質初期濃度 C₀ に対する各時間経過後におけるリン脂質濃度 C_t の比より速度定数を決定した。

4. 研究成果

(1) リン脂質膜におけるクロロフィルの集合挙動の検討

リン脂質膜内において、Chl a は分散した状態と凝集した状態が存在する。各種 Chl a 含有リポソームの吸光度測定の結果を図 2 に示す。リン脂質が 3 成分系の場合に注目すると、コレステロールの増加に伴い、B1/B2 値が低下した。コレステロール相で Chl a が凝集していると仮定すると、コレステロール相が増加するにつれて B1/B2 値は高くなると予想される。しかし、実際には B1/B2 値が低下したことから、コレステロール相には Chl a が分配していないと考えられる。2 成分系においても、コレステロールが増加するにつれて B1/B2 の値が低下している。これは、Chl a がリン脂質相で凝集しており、リン脂質相の割合の減少に伴い、Chl a も集積したためと考えられる。また、NBD-PE を用いた FRET 法による検討を行った。NBD-PE はアシル鎖の構造の違いから DOPC 相に分配するので、FRET 効率が高い場合は、Chl a は DOPC に分配していることになり、FRET 効率が低い場合、Chl a は DPPC に分配していることになる。しかし、DPPC と DOPC の割合によって FRET 効率は変化していないことから、Chl a は DOPC 相、DPPC 相ともに特異的に分配していないと考えられた。

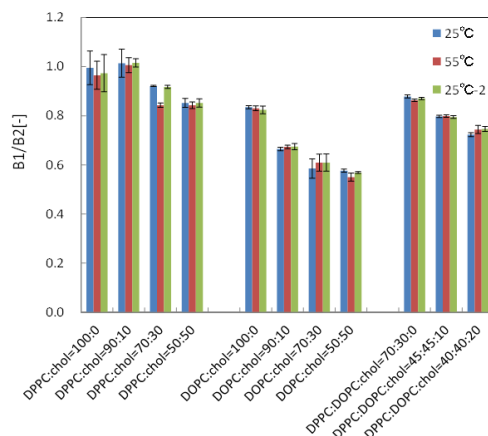


図 2 各種 Chl a 含有リポソームの B1/B2 値の比較

(2) 脂質膜場における光捕集系分子の会合挙動の評価と制御

DOPC/DOPG = 100 : 0, 50 : 50 の脂質組成を有するリポソームに Pyrene-C11-COOH を 0.1, 1, 5, 10% の割合で混合し、蛍光スペクトル測定よりベシクルの内部の親疎水性を評価するために、モノマー蛍光 I_f/I_m 値の変化を観察した。図 3 に DOPC リポソーム、および DOPC/DOPG リポソームに 0.1-10% Pyrene-C11-COOH を混合した場合のモノマー蛍光 I_f/I_m 値を示した。DOPC リポソームの場合では Pyrene-C11-COOH を 10% 含有することにより I_f/I_m 値は増加したが、DOPC/DOPG リポソームの場合では 10% Pyrene-C11-COOH を含有した場合でも I_f/I_m 値の変化は観察されなかった。また、¹H NMR によりベシクルを構成する分子の運動性を評価したところ、Pyrene-C11-COOH を混合することにより DOPC/DOPG リポソームの方が DOPC リポソームと比較してより分子の運動性が増加した。以上の結果から、DOPC リポソームの方がより固い膜構造を有しているの Pyrene-C11-COOH を混合することによってその構造は攪乱されやすく、一方で DOPC/DOPG リポソームにおいては Pyrene-C11-COOH を混合することでより分子の運動性は DOPC リポソーム

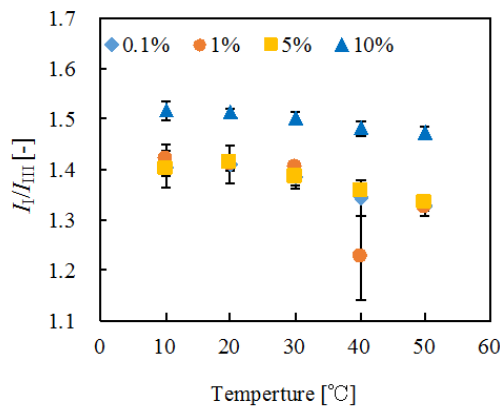


図 3 Pyrene-C11-COOH を混合した DOPC リポソーム内部の親疎水性評価

と比較して増加しやすいが、親水・疎水性はあまり変化しないため、膜構造を維持している。つまり、DOPC/DOPG リポソームの方が Chl a などの光捕集系分子をより封入できる可能性が示唆された。

(3) 光照射に伴う脂質過酸化の評価

一般的にポルフィリン骨格やクロリン骨格を有する化合物の Q_y band における吸収極大波長は、溶媒の比誘電率が高いほど red-shift することが知られている。この特性を用いてリポソーム膜内のクロリン骨格の配向位置を評価すると、Chl a のクロリン骨格は親水的でリポソーム膜の表面付近に、Cu-Chln のクロリン骨格は疎水的でリポソーム膜の内部に存在していることが明らかとなった。これは光捕集系分子の構造の違いに起因すると考えられる。

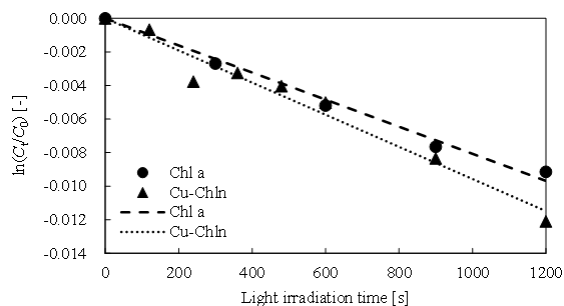


図3 リポソームの光照射に伴う脂質過酸化の反応速度定数

DPPP はそれ自体では蛍光を示さないが、過酸化脂質と反応して DPPPO へ変化すると蛍光を示す。この特性を用いて擬一次反応を仮定して脂質過酸化の反応速度定数を求めた結果を図4に示した。Chl a と Cu-Chln ではほとんど違いが確認されなかったことから、光捕集系分子のリポソーム膜内の配向位置は脂質過酸化速度に影響を及ぼさないことが明らかになった。よって、人工光捕集アンテナの脂質過酸化においては、リポソーム膜内での配向位置以外の観点、例えば異なる中心金属の比較や、ポルフィリン骨格とクロリン骨格の比較などから適切な光捕集系分子を検討する必要があることが分かった。

(4) 応用展開

さらなる Chl a の集積化を目指して、ディスク状脂質膜（バイセル）を用いた Chl a の二分子膜上での濃縮・会合を検討した。DPPC ベシクルでの Chl a の二分子膜上での挙動は膜の流動性によって配向位置が変化し、制御できる可能性が見出されたが、DMPC/DHPC の配合比率を変化させて作製したバイセルは、ベシクルに比べて形態が安定であることが明らかになった。図4は DMPC/DHPC = 1.5, Chl a = 1.2 mol% の条件で作製したバイセルにおいて、会合体の形成に由来する UV-Vis スペクトル (740 nm) を測定したものであるが、ディスク状バイセルの二分子膜領域が Chl a を濃縮させる場として有効に機能していることが明らかになった。さらに、Chl a 会合体を含むバイセルは濃度や温度に対する形態崩壊への体制が向上することが分かった。バイセルのディスク状構造は Chl a を濃縮する膜場として有効に働き、バイセルそのものが機能性材料として活用できる可能性が示された。

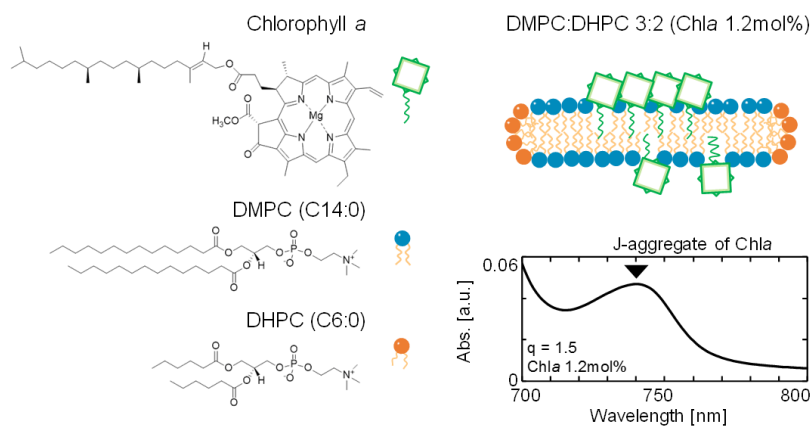


図4 DMPC/DHPC バイセルによる Chl a の濃縮

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shogo Taguchi, Keishi Suga, Keita Hayashi, Makoto Yoshimoto, Yukihiro Okamoto, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi	4. 巻 175
2. 論文標題 Aggregation of Chlorophyll a Induced in Self-Assembled Membranes Composed of DMPC and DHPC	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B	6. 最初と最後の頁 403-408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shogo Taguchi, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Characterization of Liposome Membrane Containing Chlorophyll a and Its Photosensitized Functions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Nanosci. Nanotechnol.	6. 最初と最後の頁 4888-4893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shogo Taguchi, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Ho-Sup Jung, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Systematic Characterization of DMPC/DHPC Self-Assemblies and Their Phase Behaviors in Aqueous Solution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Coll. Interfaces	6. 最初と最後の頁 Article ID 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田口 翔悟, 菅 恵嗣, 林 啓太, 岡本 行広, 中村 秀美, 馬越 大
2. 発表標題 クロロフィルa会合体の形成に対するディスク状脂質膜の効果および会合体の光捕集
3. 学会等名 化学工学会 第83年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shogo Taguchi, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Hidemi Nakamura and Hiroshi Umakoshi
2. 発表標題 Characterization of chlorophyll a incorporated liposomes and bicelles as photosynthesis platform
3. 学会等名 The 11th International Conference on Separation Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口 翔悟, 菅 恵嗣, 林 啓太, 岡本 行広, 中村 秀美, 馬越 大
2. 発表標題 ディスク状脂質膜の相挙動制御に基づくクロロフィルaの分子配向性制御とその応用
3. 学会等名 化学工学会 第49回秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口 翔悟, 菅 恵嗣, 林 啓太, 岡本 行広, 中村 秀美, 馬越 大
2. 発表標題 クロロフィル修飾脂質ディスク膜のミクロ相平衡
3. 学会等名 分離技術会 年会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口 翔悟, 菅 恵嗣, 林 啓太, 岡本 行広, 中村 秀美, 馬越 大
2. 発表標題 Control of Orientation of Chlorophyll a on Lipid Bilayer Membrane and Its Photo-Function
3. 学会等名 化学工学会 第81年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shogo Taguchi, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Hidemi Nakamura and Hiroshi Umakoshi
2. 発表標題 Characterization of Orientation and Photochemical Functions of Chlorophyll a Molecules in Self-Assembled Membranes
3. 学会等名 2017 AIChE Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>中村研究室・林研究室 ホームページ http://chemhp.chem.nara-k.ac.jp/content/images/Private%20Directory/Hayashi/index.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 啓太 (Hayashi Keita) (10710783)	奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・講師 (54601)	
連携研究者	馬越 大 (Umakoshi Hiroshi) (20311772)	大阪大学・基礎工学研究科・教授 (14401)	
連携研究者	菅 恵嗣 (Suga Keishi) (00709800)	大阪大学・基礎工学研究科・助教 (14401)	