

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18750157

研究課題名（和文） ベシクルを利用した人工光合成系の創製

研究課題名（英文） Artificial Photosynthetic Light-Harvesting Systems Prepared with Lipid Vesicles

研究代表者

宮武 智弘 (MIYATAKE TOMOHIRO)

龍谷大学・理工学部・准教授

研究者番号：10330028

研究成果の概要：光合成は太陽光の有効利用の観点から注目されており、人工の光合成システムを構築することは大変重要である。本研究では、生物の光合成システムが分子膜を利用しながら構築されている点に着目し、太陽光を効率よく吸収するクロロフィル分子を分子膜内に配置させたベシクル（小胞体）を作成した。化学修飾したクロロフィル分子を効率よく分子膜内で集積化させることによって、光合成システムを模倣した光捕集システムを作成することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	300,000	3,900,000

研究分野：生体関連化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：リポソーム、光合成、自己組織化、生体膜、エネルギー移動、アンテナ、クロロフィル、超分子

1. 研究開始当初の背景

近年、光合成の反応中心ならびに集光アンテナタンパクの構造解析が進んでいるが、こうした光合成器官においてはクロロフィルなどの色素分子はタンパクの支えによって機能発現に適した位置に並べられていることが明らかになってきた。すなわち、光合成明反応では分子間で励起エネルギーや電子がある決まった方向に移動することが重要

であり、例えば分子膜内に埋め込まれた反応中心タンパクでは一方向に電子が移動することにより、膜内外でプロトンの濃度勾配を形成している。このように天然の光合成系では脂質分子膜を反応の場として、効率よくクロロフィル色素分子を配列することによって光合成系を構築しており、同様に脂質分子膜を用いた光合成モデル系の作成が重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究においては脂質二重膜からなるリポソームベシクルを反応の場として、クロロフィル誘導体を分子膜内の機能発現に適した位置に並べた超分子系を構築し、光合成の初期過程を人工的に再現することを目指した。ここでは自己組織化の手法を用いて天然クロロフィルを改変したクロロフィル誘導体分子を以下の(1)および(2)の方法を用いて配列させ、人工の光捕集系を創製することを目的とする。

(1) 自己会合によるクロロフィルの組織化

光合成生物の一種である緑色光合成細菌は「クロロゾーム」と呼ばれる集光アンテナ系を有し、そこでは3'位に水酸基が導入されたバクテリオクロロフィル-*c*分子が含まれており、この水酸基を使ってクロロフィルの自己会合体を形成していることが知られている。これまで、このバクテリオクロロフィル-*c*をモデル化した分子(亜鉛クロリン)が生体外でクロロゾーム型の自己会合体を形成することが確認されている。そこで、本研究ではこの自己会合性クロロフィル誘導体を脂質二分子膜内に持つベシクルを調製するとともに、エネルギー受容体分子を組み入れたエネルギー移動モデルを構築することを目指した。

(2) ペプチドとの錯形成を利用したクロロフィルの組織化

多くの場合、光合成集光アンテナや反応中心ではクロロフィル分子はタンパクと錯形成することにより、機能発現に適した位置に並べられている。そこで、クロロフィル誘導体を特異的にタンパク(ポリペプチド)と錯形成させながら、クロロフィルを集積させた集光アンテナモデルの構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) 自己会合によるクロロフィルの組織化

まず、シアノバクテリアからクロロフィル-*a*を抽出し、3'位にメトキシ基、17位の側鎖にヒドロキシデシル基をもつ亜鉛クロリン分子1(図1左)を既法により合成した。つぎに、リン脂質Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)を用い、クロロホルム/メタノール=1/1の溶媒中で亜鉛クロリン1と混合し、溶媒を減圧留去してDPPCと色素を含む薄膜をフラスコ内に作成した。そこに緩衝溶液を加えてフィルムを剥離させてリポソームを作成し、100nmのポアサイズを持つメンブレンフィルターに通した後、ゲルろ過クロマトグラフィー(Sephadex G-50)により精製して、リン脂質のベシクルを調製した。そして、得られたベシクルの形態をAFMにより観測するとともに、ベシクル内での亜鉛クロリンの会合状態

を可視吸収、円二色性(CD)スペクトルによって調べた。さらに、本系がエネルギー移動媒体として機能するかどうかを検証するため、エネルギーアクセプター分子2(図1右)を加えて、蛍光スペクトルを測定した。

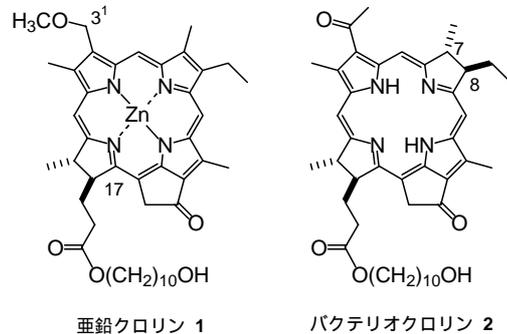


図1. 亜鉛クロリン 1 およびバクテリオクロリン 2 の構造

(2) ペプチドとの錯形成を利用したクロロフィルの組織化

クロロフィル-*a*から官能基変換を行い、17位の側鎖にカチオン性の四級アンモニウム塩を有する亜鉛クロリン3を合成した(図2)。つぎに、メタノール中で種々のポリペプチドと混和した後、pH = 8の緩衝溶液中に希釈して可視吸収スペクトルならびに円二色性スペクトルをそれぞれ測定して、亜鉛クロリンの集積化について検討した。

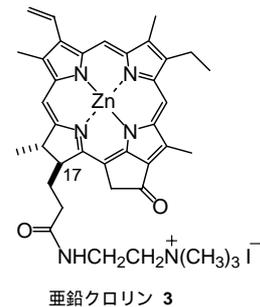


図2. 亜鉛クロリン 3 の構造

4. 研究成果

(1) 自己会合によるクロロフィルの組織化

亜鉛クロリンを含むベシクルの可視吸収スペクトルを測定したところ、660nmの亜鉛クロリン単量体の吸収に加えて、724nmに会合体に対応する吸収を示した(図3上点線)。また、CDスペクトルにおいては、724nmの長波長シフトした波長領域に強いシグナルが観測され、亜鉛クロリン1は分子間で強い励起子相互作用を持ちながらJ会合体を形成し、クロロゾーム様の自己会合体を形成していることが明らかとなった。加えて、ベシクルをガラス基盤上に展開してAFMを測定したところ、亜鉛クロリン1を加えて調製したベシクルも球状の形態を保っていることが確認できた。以上のことから、1はリポソームの脂質二分子膜内で集光アンテナモデルを

形成することがわかった。

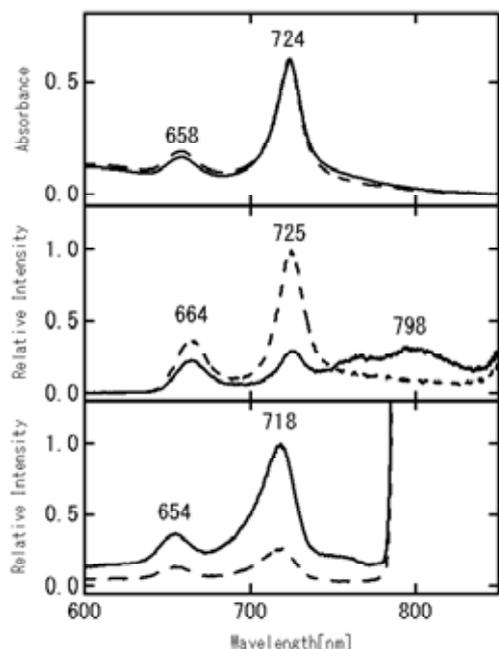


図3．亜鉛クロリン 1 の自己会合体を含むリポソームの可視吸収（上）蛍光（中）および蛍光励起（下）スペクトル。バクテリオクロリン 2 添加前（破線）および添加後（実線）

つぎに、1 の分子集合体が脂質分子膜内でエネルギー移動媒体として機能するかを検証するため、エネルギー受容体分子を組み入れた集光アンテナ系を調製した。エネルギー受容体分子としては、天然クロロゾームでのバクテリオクロロフィル-*a* と同様にテトラピロールの 7, 8 位が還元されたバクテリオクロリン 2 を用いた（図 1 右）。亜鉛クロリン 1 を含むリポソームの懸濁液に 2 の DMSO 溶液を加えて良く振り混ぜた。そして、蛍光スペクトルを測定したところ、バクテリオクロリン 2 を添加することにより、725 nm の亜鉛クロリン 1 会合体からの発光は著しく減少し、798 nm 付近に新たな蛍光発光が観測された（図 3 中）。また、800 nm における蛍光励起スペクトル測定から、その新たな蛍光発光は 1 の自己会合体の光吸収により起こっていることが確認された（図 3 下）。以上のことから、添加したバクテリオクロリン 2 は脂質二分子膜内に入り込み、エネルギーのアクセプターとして機能したと考えられる。こうして、天然の光合成系と同様に脂質分子膜内で光合成の初期過程である光捕集を行うことのできる分子システムの構築に成功した。これにより、天然系で見られるカロテノイド等の補助色素を用いた光捕集系や、さらに電子移動系を組み入れた系など光合成初期過程に見られる多段階の反応を再現した人工系への展開が期待できる。

（2）ペプチドとの錯形成を利用したクロロフィルの組織化

合成したカチオン性の亜鉛クロリン 3 を少量のメタノールを含む緩衝溶液中に溶解させた。そこへ、アニオン性の残基をもつポリアスパラギン酸を加えると、690 nm 付近に 3 の単量体（662 nm）よりも長波長シフトした吸収帯（図 4 右破線）が確認され、亜鉛クロリン 3 は分子間で相互作用しながら分子集合体を形成していることがわかった。この長波長側にシフトした吸収帯はポリアスパラギン酸を添加したときのみで確認され、ポリペプチドを含まない溶液（図 4 左）や、カチオン性のポリリシンなど他のポリペプチドの共存下では確認できなかった。このことから、亜鉛クロリン 3 の側鎖にあるカチオン部がアニオン性のポリアスパラギン酸残基と錯形成することにより、3 が集積化し、亜鉛クロリン部での分子間相互作用が発現したと考えられる。また、この色素タンパク複合体の系に少量（14%）のテトラヒドロフラン（THF）を添加したところ、683 nm に鋭い吸収帯を示すとともに、非常に強度の大きな円二色性スペクトルを示した（図 4 右実線）。このことから、亜鉛クロリン 3 の良溶媒である THF を添加することで 3 の会合体が再構成されて、より配列の整った分子集合体へと変化したものと考えられる。以上のように、多くの光合成集光アンテナ部が色素 - タンパク複合体を形成するのと同様に、ポリペプチドの支えによって、クロロフィル誘導体を並べた集光アンテナモデルを構築することに成功した。

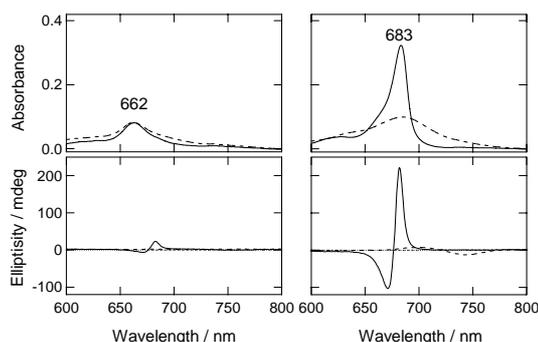


図4．カチオン性亜鉛クロリン 3 の可視吸収（上）および円二色性（下）スペクトル

ポリアスパラギン酸なし（左）、ポリアスパラギン酸添加時（右）；破線：1% MeOH, 10 mM Tris-HCl buffer (pH=8.0) 中、実線：1% MeOH, 7% THF, 10 mM Tris-HCl buffer (pH = 8.0) 中

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10件)

S. M. Butterfield, T. Miyatake S. Matile, "Amplifier-Mediated Activation of Cell-Penetrating Peptides with Steroids: Fluorogenic Cholesterol Sensing in Eggs and Blood", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 325-328 (2009). 査読有

宮武智弘, 「リポソームを使った味覚成分の光センシング」, 化学と工業, **61**, 876-877 (2008). 査読有

T. Miyatake, Y. Saitoh, S. Litvinchuk, S. Matile, "Flavor sensing with polyarginine-counteranion complexes in lipid bilayers", *Peptide Science*, 473 (2008). 査読有

T. Miyatake, "Optical transduction of enzyme reactions with polyarginine-counteranion complexes in lipid bilayers", *Photochemistry*, **38**, 130 (2007). 査読有

S. Litvinchuk, H. Tanaka, T. Miyatake, D. Pasini, T. Tanaka, G. Bollot, J. Mareda, S. Matile, "Synthetic pores with reactive signal amplifiers as artificial tongues", *Nature Materials*, **6**, 576-580 (2007). 査読有

R. Bhosale, S. Bhosale, G. Bollot, V. Gorteau, M. D. Julliard, S. Litvinchuk, J. Mareda, S. Matile, T. Miyatake, F. Mora, A. Perez-Velasco, N. Sakai, A. L. Sisson, H. Tanaka and D.-H. Tran "Synthetic multifunctional nanoarchitecture in lipid bilayers: Ion channels, sensors and photosystems", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 1044-1057 (2007). 査読有

T. Miyatake, S. Tanigawa, S. Kato and H. Tamiaki, "Aqueous Self-Aggregates of Amphiphilic Zinc 3¹-Hydroxy- and 3¹-Methoxy-chlorins for Supramolecular Light-Harvesting Systems", *Tetrahedron Lett.* **48**, 2251-2254 (2007). 査読有

T. Miyatake, M. Nishihara and S. Matile, "A Cost-Effective Method for the Optical Transduction of Chemical Reactions. Application to Hyaluronidase Inhibitor Screening with Polyarginine-Counteranion Complexes in Lipid Bilayers," *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12420-12421 (2006). 査読有

T. Miyatake, S. Kato, T. Onishi, S. Tanigawa, T. Matsushita and H. Tamiaki, "Self-assemblies of amphiphilic zinc chlorins for supramolecular light-harvesting antenna," *J. Porphyrins Phthalocyanines* **10**, 347 (2006). 査読有

Y. Saga, S. Akai, T. Miyatake and H. Tamiaki, "Self-Assembly of Natural Light-Harvesting Bacteriochlorophylls of Green Sulfur Photosynthetic Bacteria in Silicate Capsules as Stable Models of Chlorosomes," *Bioconjugate Chem.* **17**, 988-994 (2006). 査読有

[学会発表](計49件)

宮武智弘, 平井 良児, 民秋 均, 「両親媒性亜鉛クロリンの自己組織化ナノ分子集合体の構築」, 日本化学会第89春季年会, 3E2-49 (船橋, 2009年3月29日).

宮武智弘, 佐々木 郁佳, 平井 良児, 民秋 均, 「構造の異なる亜鉛クロリン混合物からの自己組織化」, 日本化学会第89春季年会, 3E2-50 (船橋, 2009年3月29日).

宮武智弘, 向井 祐美 「ポリペプチドとの錯形成における亜鉛クロリンの置換基効果」, 日本化学会第89春季年会, 2J3-01 (船橋, 2009年3月28日).

宮武智弘, 竹原 雅俊, 民秋 均, 「PEG鎖を導入した両親媒性亜鉛クロリンの自己会合における3'位の立体効果」, 日本化学会第89春季年会, 1J3-31 (船橋, 2009年3月27日).

宮武智弘, 齋藤泰彦, 中村守孝, 村井裕貴, Svetlana Litvinchuk, Stefan Matile 「蛍光色素を封入したリポソームとカチオン性ポリマーを用いた酵素反応の追跡」, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 1B-13 (横浜, 2008年9月20日).

宮武智弘, 織田あさ美 「脂質二分子膜内で調製したクロロゾーム型アンテナモデルの構築」, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 3P-59 (横浜, 2008年9月20日).

宮武智弘, 長谷川俊介 「長鎖アルキル基をもつ両親媒性クロロフィル誘導体の合成と自己組織化」, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 3P-60 (横浜, 2008年9月20日).

宮武智弘, 齋藤泰彦, Svetlana Litvinchuk, Stefan Matile 「ポリアルギニンの膜透過現象を利用した味覚成分の検出」, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 3P-01 (横浜, 2008年9月18日).

宮武智弘, 竹原雅俊, 井上和也, 民秋均 「3'位にキラルな1-ヒドロキシエチル基を有する両親媒性亜鉛クロリンの自己組織化」, 2008年光化学討論会, 3P108 (堺, 2008年9月13日).

宮武智弘, 向井祐美 「親水性基をもつ亜鉛クロリンの合成とポリペプチドとの錯形成」, 2008年光化学討論会, 3P109 (堺, 2008年9月13日).

宮武智弘, 織田あさ美 「3'位にメトキシ基をもつ亜鉛クロリン自己会合体を用いたクロロ

ゾームモデルの構築」、第21回配位化合物の光化学討論会、B13 (相模原, 2008年8月6日).

T. Miyatake, A. Oda and S. Tanigawa, "Artificial Light Harvesting Antenna with Self-Assembled Zinc Chlorins in Lipid Bilayers," Joint International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry, P87 (ラスベガス・アメリカ, 2008年7月16日).

T. Miyatake, Y. Saitoh, S. Litvinchuk and S. Matile, "Flavor Sensing with Cell-Penetrative Polyarginine Counteranion Complexes in Fluorogenic Vesicles," Joint International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry, P103 (ラスベガス・アメリカ, 2008年7月16日).

宮武智弘、長谷川俊介「アニオン性の置換基を導入した両親媒性クロロフィル誘導体の合成と自己会合」、第16回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー、P23 (京都, 2008年6月15日).

T. Miyatake and Y. Mukai, "Synthesis of Amphiphilic Zinc Chlorins and Their Complexation with Polypeptides," Fifth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, P17 (草津, 2008年6月10日).

T. Miyatake, Y. Saitoh, S. Litvinchuk and S. Matile, "Flavor Sensing with Fluorogenic Vesicles and Cell Penetrative Polypeptides," Fifth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, P21 (草津, 2008年6月10日).

他に33件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮武 智弘 (MIYATAKE TOMOHIRO)

龍谷大学・理工学部・准教授

研究者番号：10330028