

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288004

研究課題名(和文)植物光合成の光化学系IIにおける初期電荷分離状態の立体構造

研究課題名(英文)Geometry and Orientation of Photoinduced Primary Charge-Separated State in the Photosystem II Reaction Center

研究代表者

小堀 康博 (Yasuhiro, Kobori)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00282038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：量子論を駆使し、電荷分離状態の立体構造や電子密度分布、磁氣的相互作用を電子スピン共鳴法によって解析する実験的手法を独自に確立し、多周波時間分解電子スピン共鳴法により植物の光合成タンパク質による太陽光エネルギー変換の根源的な仕組みを原子レベルで明らかにした。ホウレン草から抽出した光合成光化学系II(PSII)タンパク質や、バクテリア光合成反応中心において、光照射直後の第一段階目に生成する電荷分離状態の立体構造を実験的に精密決定し、タンパク質による高効率な電子伝達機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method to analyze geometries and molecular orientations of photoinduced charge-separated states by detections of the magnetic interactions by using the time-resolved paramagnetic resonance (TREPR) methods. We have employed multi-frequency TREPR spectroscopy to characterize the geometries and the electronic coupling of the photoinduced primary charge-separated states generated in the photosynthetic reaction centers and in the photosystem II reaction center of spinach. We have clarified molecular mechanisms of the efficient charge generations and of the preventions of the energy-wasting charge-recombinations.

研究分野：物理化学

キーワード：光合成 光電荷分離 立体構造 電子的相互作用 電子スピン共鳴法

1. 研究開始当初の背景

酸素発生型の光合成は生命の進化や地球環境を大きく支えてきた極めて重要な化学反応である。近年において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には、光合成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、光合成タンパク質による化学エネルギー生産の分子論的起源の多くは未解明のままである。沈らは、藍藻における酸素生成系タンパク質(光合成光化学系 II: PSII)の X 線構造解析を高空間分解能で行った。水分子を分解する触媒部位であるマンガンクラスターの立体構造が初めて示され世界的な注目を集めている(*Nature* 2011)。一方で、特に高等植物において、膜タンパク質によるプロトン輸送を促しエネルギー伝達物質を生産するために中心的な役割を果たす PSII 内部の光励起初期過程やそれに後続する段階的電子移動過程の経路、仕組みのほとんどが明らかになっていない。近年 Lubitz らはホウレン草から取り出した PSII 反応中心の初期電荷再結合過程で生成する励起三重項状態($^3\text{Chl}_{\text{D1}}^*$)を電子スピン共鳴法で観測し、光の受容により電子を放出する色素 P680 はクロロフィル二量体部位(P)ではなく、アクセサリークロロフィル(Chl_{D1})であることが示唆された(*BBA* 2003)。一方で、PSII の光励起直後に生成する初期電荷分離状態は $\text{P}_{\text{D1}}^+-\text{Pheo}_{\text{D1}}^-$ であることが示され(Noguchi et al. *Biochemistry* 2001)、励起状態からどのような経路で電子の移動が起こっているのか詳細は分かっていない。小堀は、光電荷分離状態や励起三重項状態の磁氣的相互作用によって生じる電子スピン量子コヒーレンスが電子移動反応によってどのように発展するかを初めて量子論で表した。この結果、時間分解電子スピン共鳴法を用いて光電荷分離状態の精密立体構造と電子的相互作用の同時解析が可能であることを種々の反応系で実証した(Kobori et al. *JPCB* 2009, *JPCB*2010, *JACS* 2011, *JACS* 2012)。これまで PSII 反応中心において光入力直後に生成する初期電荷分離状態の立体配置を実験で直接的に観測した例は皆無であり、PSII が関わる電子伝達初期過程の仕組みのほとんどが明らかになっていない。このため、小堀らによる理論に基づいた新たな実験的構造解析手法の確立とその応用には大きな期待がかかる。

2. 研究の目的

本研究では、多周波時間分解電子スピン共鳴分光法を駆使し、ホウレン草から抽出した PSII タンパク質や、光合成バクテリアにおける光合成反応中心において、光照射直後の第一段階目に生成する電荷分離状態の不对電子軌道を特定し、その立体構造と電子的相互作用を実験によって精密に決定する。このために、PSII タンパク質に含まれるキノン分子を除去した D_1D_2 cytb コア反応中心複合体や

PSII 膜に還元剤を加えた系を取り出し、キノン分子への後続電荷分離過程をブロックさせたタンパク質を調製する(分担者:三野)。レーザー励起時間分解電子スピン共鳴を用いて、初期電荷分離状態およびその電荷再結合過程によって生成する励起三重項状態を観測する。PSII 反応中心において予想される初期電荷分離状態 $\text{P}_{\text{D1}}^+-\text{Pheo}_{\text{D1}}^-$ の磁気双極子間相互作用の主軸 Z' とその電荷再結合で生成する励起三重項状態 $^3\text{Chl}_{\text{D1}}^*$ の主軸(X,Y,Z)の配置を明らかにする。電荷分離状態において生成する電子スピン量子コヒーレンスがナノ秒領域で発展する。三重項電荷再結合によって、この量子コヒーレンス効果が電荷再結合状態の電子スピン共鳴信号に現れる。このコヒーレンスの位相と周波数が異方性を持つため、(X,Y,Z)に対する主軸 Z' の方向と磁気双極子間相互作用定数 D' が決定され、初期電荷分離状態における精密立体配置(距離、位置、分子配向)が得られる。ナノ秒時間分解計測により得られる励起三重項状態の量子コヒーレンス効果を様々な共鳴磁場条件において測定する。特に励起三重項状態は比較的大きなスピン双極子間相互作用による異方性を持つため、共鳴磁場からタンパク質内部にかかる外部磁場の方向を有効に選別することが可能であり、量子コヒーレンスに対する方向依存性の観測が容易である。量子論に基づき時間分解電子スピン共鳴スペクトル信号の解析を行い、電荷分離状態の立体構造と不对電子軌道の重なりによる交換相互作用を高い精度で決定する。交換相互作用の値から電子的相互作用を求め軌道の重なりによる電子伝達機能を明らかにする。以上の構造解析から、PSII における初期光電荷分離の反応経路と電子伝達機能の特徴づける。これまで、植物の光合成反応中心において光入力直後に生成する初期の電荷分離状態を実験で直接的に捉えた例はない。本研究は、この活性種の同定を行うだけでなく、中間体分子の立体的な位置、距離、分子配向および軌道の広がりや重なりによる電子的相互作用を量子論に立脚した手法により正確に求める点がこれまでには全く着想されていなかった際立った特色であり、極めて独創性が高い。電荷分離状態の形成による電子状態変化により、周囲のアミノ酸残基や水和構造など、タンパク質環境の変化が生じ、中間体分子の位置・配向変化が起こることが予想される。このようなタンパク質環境の変化が極めて効率のよいエネルギー変換機能を決定づける重要な因子となることが実証されれば、数十億年に渡る生命進化の謎を解き明かす重要な糸口になる。また人類喫緊の課題として目指す人工光合成系の分子設計にとっても重要な意義を持つ。

3. 研究の方法

光合成反応中心において、光照射直後の第一段階目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、Q帯のマイクロ波発信器とマイクロ波共振器を装備した時間分解電子スピン共鳴システムを構築した。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が三重項電荷再結合状態の電子スピン共鳴遷移に現れることを利用し、様々な共鳴磁場条件下で量子コヒーレンス効果を測定する。量子論による解析により精密立体構造、電子的相互作用の決定を行う。この初期電荷分離状態の解析について、膜配向試料の調製も進め、外部磁場方向に対する配向角度の効果を検討し、不對電子軌道の広がりや分子配向変化が電子伝達機能にどのような役割を果たすかについて、構造と電子伝達機能の関連を原子レベルで明らかにした。

4. 研究成果

バクテリア光合成反応中心において、紅色細菌(*Rhodobacter sphaeroides* R26)のキノン分子を還元処理した試料について時間分解電子スピン共鳴スペクトルを観測した(図1)。

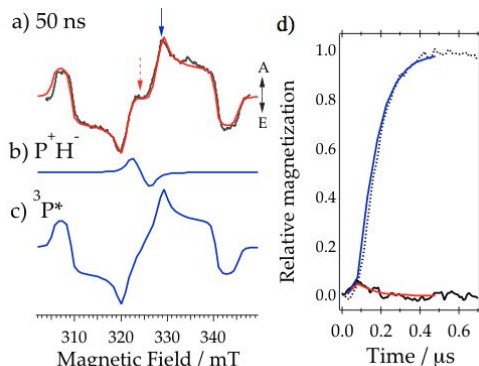


図1. a) *Rhodobacter sphaeroides* R26 キノン還元体の時間分解EPRスペクトル(85 K) b),c)初期電荷分離状態(P^+H)およびその電荷再結合で生成した励起三重項($^3P^*$)のスペクトルシミュレーション d) P^+H および $^3P^*$ によるEPR信号の経時変化とそのシミュレーション

得られたスペクトルは、初期電荷分離状態(P^+H)およびその電荷再結合で生成した励起三重項($^3P^*$)の和として説明された。初期電荷分離状態および三重項励起状態のスピンスピン系について量子論に基づき時間分解電子スピン共鳴スペクトル信号の解析を行い、電荷分離状態の立体構造と不對電子軌道の重なりによる交換相互作用を高い精度で決定した。特に電荷再結合による励起三重項($^3P^*$)に生成するスピンスピン分極は、スピンスピン量子コヒーレンス発展の影響により P^+H の立体配置に大きく依存することを見だし(図2a)、図1の実測を再現する電荷分離構造を決定することに成功した(図2b)。得られた立体配置は、X線結晶構造とほとんど差が見られないことから、Pに生じる正孔はスペシャルペア全体に非局在化していることが示された。さらに図1dに現れる横方向磁化の定量的解析によって電荷分離状態の交換相互作用を決定した。その結果、一重項電荷分離状態の電子的相互作用が三重項電荷分離状態に対する値

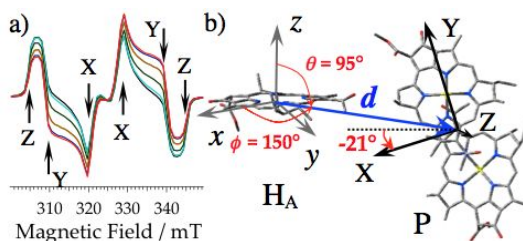


図2. a) *Rhodobacter sphaeroides* R26 キノン還元体の時間分解EPRスペクトルに対する初期電荷分離状態 P^+H のフェオフィチン(H_A)回転角度の効果 b)図1aの実測を再現する初期電荷分離構造

よりも三倍程度増強されていることがわかった。一重項電荷分離状態に対する大きな電子的相互作用は、状態混合を起こす励起一重項状態との強いカップリングを示すものである。電荷再結合三重項状態($^3P^*$)の不對電子軌道はスペシャルペア全体に非局在化していることが知られており、三重項再結合に対する電子軌道の重なりが大きく抑制されることが期待される。一方で、励起一重項状態($^1P^*$)においては、スペシャルペアにおいてクロロフィル間の電荷移動状態($^1P_L^+P_M^-$)となることが知られている。電子的なトンネル効果(超交換機構)を媒介するバクテリアクロロフィル B_A が励起一重項 $^1P^*$ の中の局在化した電子分布(P_M)の近傍に位置し、強い相互作用を持つため三倍程度に増強された電子的相互作用を示すことが明らかになった。以上の結果は、光合成における進化の過程でクロロフィル分子の電子雲の広がりを巧みに調整し、高効率な電荷分離とエネルギー損失過程である再結合の抑制の両者を達成したことを示すものであり、今後の人工光合成や有機太陽電池に対する分子設計に重要なインパクトを与えるものである。

ホウレンソウから抽出したPSII膜に還元剤を加えた系においても同様に時間分解電子スピン共鳴計測を行った。得られたスペクトルは、図1同様に、初期電荷分離状態($P^+Pheo_{D1}^+$)とその再結合過程で生成した励起三重項状態の和として再現された。初期電荷分離状態および三重項励起状態のスピンスピン系について量子論に基づき時間分解電子スピン共鳴スペクトル信号の解析を行い、電荷分離状態の立体構造と不對電子軌道の重なりによる交換相互作用を高い精度で決定した(図3)。特に電荷分離状態に生成する量子コヒーレンスの効果は、初期電荷分離状態のEPR信号に顕著に現れることが明らかになり、図3aの量子コヒーレンスモデルによるスペクトル解析によって図3bに示される電荷分離状態の立体配置が明らかになった。

さらに、本研究ではPSII膜をプラスチックシート上に配向させた試料を作成し、時間分解電子スピン共鳴スペクトルに対する外部磁場方向の変化によるPSII膜配向効果の観測も行った。X線構造解析データとの比較

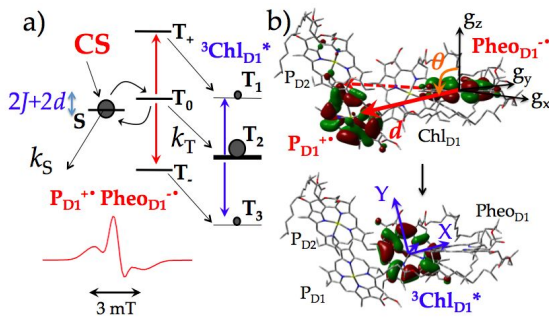


図 3 . a) PSII キノン還元体の初期電荷分離状態 $P^+Pheo_{D1}^-$ および電荷再結合で生成した励起三重項状態の電子スピン量子コヒーレンスモデル b) モデル解析から明らかになった電荷分離状態および再結合三重項状態の立体配置

から、電荷分離状態と電荷再結合状態の分子配向の詳細を明らかにした(図 3b)。得られた電荷分離構造から、スペシャルペアに生じる正孔は図 2 の紅色細菌で明らかになった不對電子分布とは異なり、 P_{D1} 部位に局在化していることが示された。これは、PSII が水を酸化分解するのに必要な高い酸化電位を獲得するために、局在化した正孔軌道分布を生じていることを直接的に示している。このような局在化した軌道分布が電荷分離状態における静電引力を生じさせ、安定化された状態として計測されたものと考えられる。さらに、電荷分離状態の交換相互作用の値は、図 2 の紅色細菌で得られたものよりも小さいことが明らかとなった。これは、PSII では $P^+Pheo_{D1}^-$ の正電荷がより局在化しているにも関わらず(図 3b)、電荷分離状態における電子軌道の重なりが制限されることによって電荷再結合によるエネルギー損失過程が紅色細菌の P^+H よりも大きく抑制されることを示しており、極めて興味深い。PSII のフェオフィチンは末端部位にビニル基を有しているのに対してバクテリアフェオフィチンでは、アセチル基を持っている。植物進化の過程において生じた末端置換基の変化により、初期電荷分離状態 $P^+Pheo_{D1}^-$ における電子軌道の重なりが減少し、電荷再結合の抑制が起こったことが示唆される。

以上のように、本研究は高等植物における初期光電荷分離状態の立体構造と電子的相互作用の決定により、光合成初期過程に関わる電子伝達機構の詳細を世界で初めて明らかにしたものであり、次世代の超高効率エネルギー変換系の構築に向けて極めて有用な知見を与える成果である。

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 9 件)

1. 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).

2. 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).
3. T. Tachikawa*, T. Ochi, Y. Kobori: Crystal-Face-Dependent Charge Dynamics on a $BiVO_4$ Photocatalyst Revealed by Single-Particle Spectroelectrochemistry *ACS Catal.* 6, 2250-2256 (2016).
4. T. Higashino, T. Yamada, M. Yamamoto, A. Furube, N. V. Tkachenko*, T. Miura, Y. Kobori*, R. Jono, K. Yamashita*, H. Imahori*: Remarkable Dependence of Final Charge Separation Efficiency on Donor-Acceptor Interaction in Photoinduced Electron Transfer *Angew. Chem.-Int. Edit.* 55, 629–633 (2016).
5. T. Tachikawa*, I. Karimata, Y. Kobori: Surface Charge Trapping in Organolead Halide Perovskites Explored by Single-Particle Photoluminescence Imaging *J. Phys. Chem. Lett.* 6, 3195–3201 (2015).
6. Y. Kobori*, N. Ponomarenko, J. R. Norris*: Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance Study on Cofactor Geometries and Electronic Couplings after Primary Charge Separations in the Photosynthetic Reaction Center, *J. Phys. Chem. C* 119, 8078–8088 (2015).
7. Y. Kobori*, T. Miura: Overcoming Coulombic Traps: Geometry and Electronic Characterizations of Light-Induced Separated Spins at the Bulk Heterojunction Interface *J. Phys. Chem. Lett.* 6, 113–123 (2015). 【Perspective】
8. Y. Kobori*, T. Miura: Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance Study on Long-Range Interfacial Electronic Coupling in Organic Photovoltaic Interface *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* 35, 621-626 (2014).
9. T. Miura, M. Aikawa, Y. Kobori*: Time-Resolved EPR Study of Electron-Hole Dissociations Influenced by Alkyl Side Chains at the Photovoltaic Polyalkylthiophene:PCBM Interface *J. Phys. Chem. Lett.* 5, 30–35 (2014).

[学会発表](計 14 件)

1. Yasuhiro Kobori “Initial Molecular Photocurrent: Nanostructure and Motion of Weakly Bound Charge-Separated State in Organic Photovoltaic Interface” Spin Chemistry Meeting 2013 オーストラリア バッドホーフ

ガスタイン 2013/4/25.

2. 小堀康博・山下幸美・近藤徹・三野広幸 「時間分解 EPR 法による光合成光化学系 II 反応中心の初期電荷分離構造」2013 年光化学討論会 愛媛大学(愛媛県) 2013/9/11.

3. 小堀康博・James R. Norris Jr. 「有機分子による光エネルギー変換機能：光合成反応中心と有機薄膜太陽電池」招待講演 第 17 回 ESR フォーラム研究会 九州大学医学部百年講堂(福岡県) 2013/7/19.

4. Yasuhiro Kobori, Time-resolved EPR study on cofactor geometries and electronic couplings after primary charge-separations in the photosynthetic reaction center, SCM 2015 - 14th International Symposium on Spin and Magnetic Field Effects in Chemistry and Related Phenomena, "Kolkata, India", 2015,03, 国際, 口頭発表 (招待・特別)

5. Yasuhiro Kobori; Nina Ponomarenko; James R. Norris Jr., Time-Resolved EPR study on cofactor geometries and electronic couplings of primary charge-separated state in the photosynthetic reaction center, 2nd Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications, 淡路国際会議場(兵庫県), 2014,06, 国際, 口頭発表 (招待・特別)

6. Yasuhiro Kobori, Electron-hole dissociations and electronic coupling influenced by alkyl side chains in the photovoltaic Polyalkylthiophene:PCBM interface, アジア太平洋 EPR/ESR 学会 - 国際 EPR(ESR)学会 - 第 53 回電子スピンサイエンス学会年会合同国際会議 (APES-IES-SEST2014), 東大寺総合文化センター(奈良県), 2014,11, 国際, 口頭発表 (招待・特別)

7. Yasuhiro Kobori, Electron-hole dissociations influenced by alkyl side chains in the photovoltaic Polyalkylthiophene:PCBM interface, 32nd National Physics Congress of the Samahang Pisika ng Pilipinas, "National Institute of Physics University of the Philippines, Quezon City, Philippines", 2014,10, 国際, 口頭発表 (基調)

8. Yasuhiro Kobori, Electron-hole dissociations influenced by alkyl side chains in the photovoltaic Polyalkylthiophene:PCBM interface, Grand Renewable Energy International Conference, 東京ビックサイト(東京都), 2014,08, 国際, 口頭発表 (招待・特別)

9. 小堀康博; Nina Ponomarenko; James R. Norris Jr., 光合成反応中心の初期電荷分離過程に伴う立体構造変化: 時間分解 EPR 法による解析, 第 8 回分子科学討論会, 広島大学 東広島キャンパス(広島県) 2014,09, 国内, 口頭発表 (一般)

10. 小堀康博; Nina Ponomarenko; James R. Norris Jr., 時間分解 EPR 法による光合成反応中心の初期電荷分離構造と電子的相互作用の解析, 2014 光化学討論会, 北海道大学 札幌

キャンパス(北海道) 2014,11, 国内, 口頭発表 (一般)

11. Yasuhiro Kobori, Primary Charge-Separation Mechanism in the Photosynthetic Reaction Center, International Workshop for Green Photonics, 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県), 2015,09, 国際, 口頭発表 (招待・特別)

12. Yasuhiro Kobori; Nina Ponomarenko; James R. Norris Jr., Time-resolved EPR on primary charge separation and recombination in the photosynthetic reaction center: Impact of electronic couplings, AWEST2015, 淡路国際会議場(兵庫県), 2015,06, 国際, 口頭発表 (招待・特別)

13. 小堀康博, 有機薄膜太陽電池の光電流生成初期過程: 界面電子-正孔対の立体構造と電子状態, 異分野融合ワークショップ「有機太陽電池開発の現状と展望」, 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県) 2015,11, 国内, 口頭発表 (招待・特別)

14. 小堀康博; 長谷川将司; 立川貴士; 近藤徹; 長島宏樹; 酒井貴弘; 三野広幸, 時間分解 EPR 法によるホウレン草の光合成光化学系 II 反応中心における初期電荷分離構造, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学角間キャンパス(石川県) 2015,09, 国内, 口頭発表 (一般)

【図書】(計 3 件)

1. 「分子光化学の原理」山内清語・小堀康博(2.22 から 2.40 節) 小堀康博(3.12 から 3.27 節) 丸善出版 2013 年 7 月 30 日出版【翻訳】

2. 小堀康博、三浦拓 「有機薄膜太陽電池の電子伝達機構: 光合成反応中心との比較」株式会社エヌ・ティー・エス社 光合成研究と産業応用最前線 東京, 2014 年 pp. 371-379

3. 小堀康博 「電子スピン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」シーエムシー出版 「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-」 2016 年 pp.148-155.

【産業財産権】

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

【その他】

ホームページ等

プレスリリース

1. 「有機薄膜太陽電池で電流を効率よく生成させる仕組みを実験的に解明」JST・神戸大 <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131225/index.html> 2013 年 12 月 25 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小堀 康博 (KOBORI YASUHIRO)

神戸大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 00282038

(2) 研究分担者

三野 広幸 (MINO HIROYUKI)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 70300902