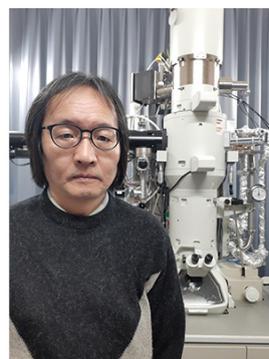


緑色光合成細菌の光捕集アンテナを模倣したクロロフィル自己集積体のナノ構造観察

北海道大学大学院工学研究院 庄司 淳
立命館大学大学院生命科学研究科 民秋 均 教授
京都大学微細構造解析プラットフォーム 小川 哲也



(左から) 北海道大学 庄司 淳, 立命館大学 民秋 均, 京都大学 小川 哲也

1. はじめに

光合成を行う生物は、地球上に降り注ぐ太陽光を利用して化学エネルギーを生産している。光合成の初期過程は、光エネルギー吸収・励起エネルギー伝達・電子移動である(図 1a)。光合成生物において、これらの機能を担う器官は光捕集アンテナと反応中心と呼ばれる装置である。光捕集アンテナは太陽光を吸収すると、電子移動(酸化還元)を担う反応中心にその励起エネルギーを伝達するという重要な働きをする器官である。自然界には多種

多様な光合成生物が存在し、様々な構造の光捕集アンテナが確認されている [1]。天然の光捕集アンテナにおける主要な光吸収・エネルギー伝達色素はクロロフィル (Chl) 分子(葉緑素)である [2]。本研究では、緑色光合成細菌の光捕集アンテナであるクロロソーム(図 1b)での構成 Chl 色素分子による超分子ナノ構造に着目した。

クロロソーム器官は長軸が約 100 ~ 200nm, 中軸が約 30 ~ 50nm, 短軸が 15 ~ 25nm の袋状の構造体である。その表面はタンパク質を含む脂質一分子膜で構成されており、内部は約 1 ~ 2mol L⁻¹ にも及ぶ高濃度の Chl 色素が含まれている [3]。クロロソームでの主要な色素はバク

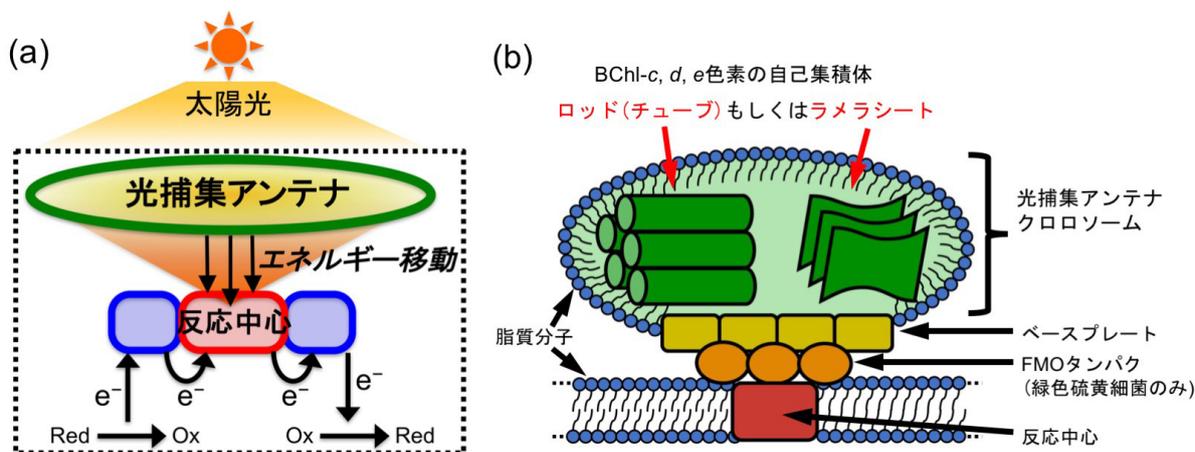


図 1 (a) 光合成初期過程と (b) 緑色光合成細菌の光合成器官の模式図。

テリオクロフィル (BChl)-*c*, *d*, *e* 分子である (図 2 左). BChl-*c* ~ *e* 分子は, 中心にマグネシウムイオンを配位し, 3¹ 位に水酸基と 13¹ 位にオキソ基を有するクロリン分子 (ポルフィリンの類縁体) である [4]. クロロソーム内ではこれらの色素分子が, 配位結合 (Mg...OH) と水素結合 (OH...O=C) と π - π スタッキングの分子間相互作用によって自己集積体を形成することで, 光捕集アンテナとして機能している [5]. ほとんどの光合成生物の光捕集アンテナでは, Chl 分子はタンパク質と結合して機能していることから [1], タンパク質と相互作用することなく Chl 分子の自己集積体から生じているクロロソームは, 構造的に特徴的でシンプルな光捕集アンテナ器官といえる. クロロソーム内における BChl-*c* ~ *e* 分子の自己集積体は, ロッド状, チューブ状, ラメラシート状のナノ構造体であると想定されている [6].

このような BChl-*c* ~ *e* 分子のモデル分子として, 亜鉛 Chl 誘導体 (図 2 中) が開発され [7], 天然産の Chl-*a* 分子 (図 2 右) を用いることで簡便かつ大量に合成することが可能である. 本研究では, 天然産 BChl 色素と合成 Chl 誘導体を用いて, 人工的に自己集積体をつくり, そのナノ構造を調べた.

紫外可視近赤外吸収 (UV-Vis-NIR)・円偏光二色性 (CD)・原子間力顕微鏡 (AFM) の測定に加え, 電子顕微鏡による構造観察を行うに当たり, 試料が有機物であり, 通常の電子顕微鏡では電子線による試料損傷のため高倍率での観察が不可能であると考えられたので, 極低温透過型電子顕微鏡 (cryo-TEM) による観察を思い立った. もともと京都大学に cryo-TEM が有ることは知っていたので,

京大ナノプラットフォームを通じて利用することとなった. この cryo-TEM は, 液体ヘリウムを用いて試料を極低温 (4.2K) で観察することができる. 試料を極低温に保つことで, 電子線による試料損傷を軽減することができ, 室温での観察に比べ桁以上強い電子線を照射することが可能となり高倍率での格子像等の観察ができた.



2. 天然産 BChl 色素が自己集積したナノ構造体

緑色光合成細菌の一種である *Chloroflexus aurantiacus* を培養し, BChl-*c* 色素 (図 3a) を抽出・精製した. この BChl-*c* 色素分子を少量のテトラヒドロフラン (THF) に溶かし, その色素分子をほとんど溶かすことのできないヘキサン中に分散させた. この 1%THF/ヘキサン溶液を暗所で 1 週間静置し, 得られた緑色の固体を超音波で分散すると, 懸濁液が得られた (図 3b). この懸濁液を石英基板上にキャストし, 分光測定を行った. UV-Vis-NIR スペクトルは, 743nm に Qy 帯と 462nm に Soret 帯の吸収極大を示した (図 3c, 赤線). また, CD スペクトルは Qy 帯領域で励起子カップリングによる逆 S 字型のコットン効果を示し (図 3d, 赤線), 自己集積体 (J 会合体) を形成していることが確認された. これらのスペクトルは, 水溶液中に分散した *Chloroflexus aurantiacus* の UV-Vis-NIR および CD スペクトル (図 3c, d, 青線) とよく一致し, 生体外 (*in vitro*) の試料が生体内 (*in vivo*) のように再構築されていることが確認された. このような *in*

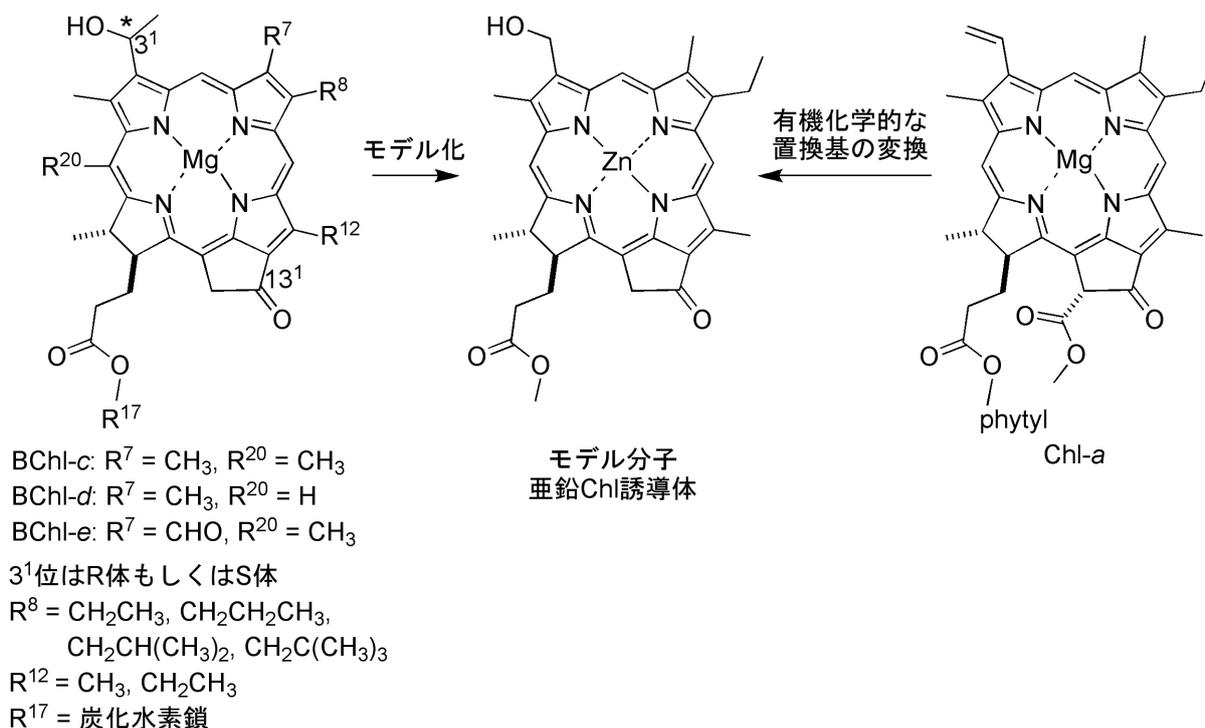


図 2 BChl-*c*, *d*, *e* (左), 合成モデル (中), Chl-*a* (右) の分子構造.

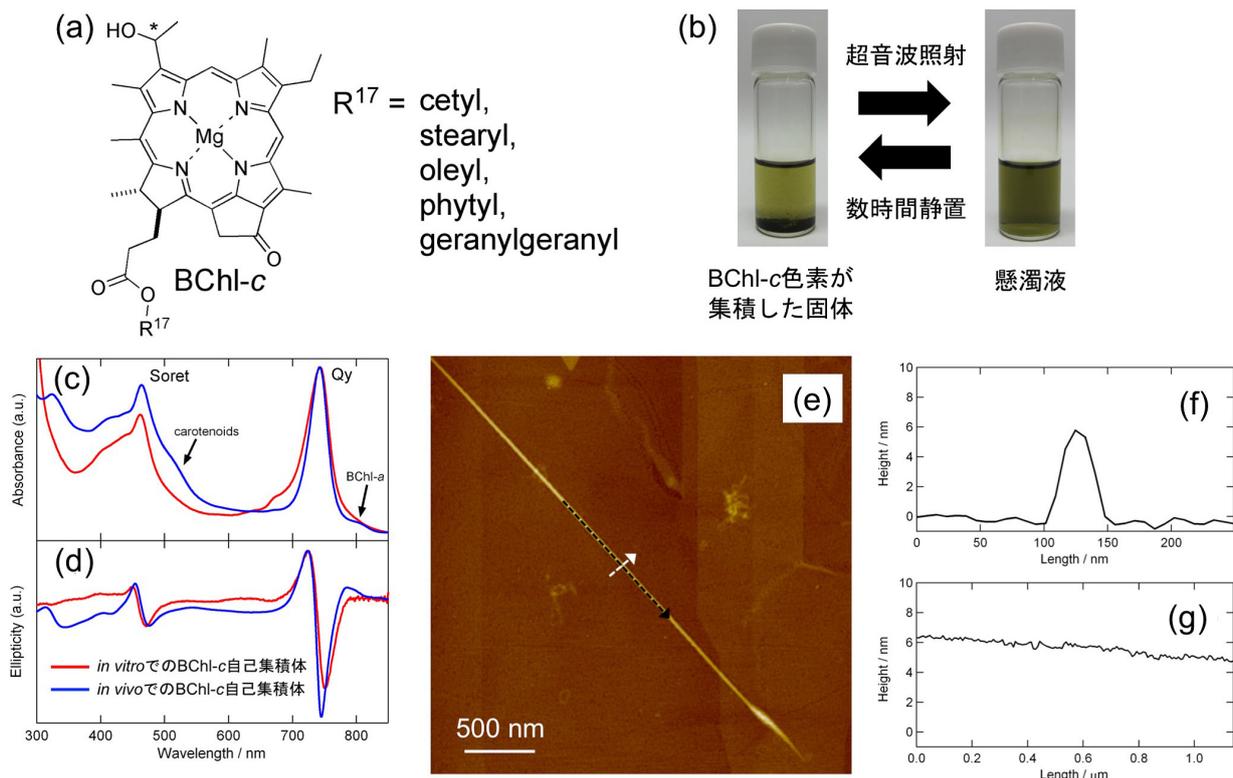


図3 (a) *Chloroflexus aurantiacus* 由来の BChl-c の分子構造, (b) 試料の写真, (c) UV-Vis-NIR スペクトル, (d) CD スペクトル, ならびに (e) AFM 像と (f), (g) その断面解析.

in vitro の BChl-c 自己集積体のナノ構造を観察するために、懸濁液を疎水性の HOPG 基板にキャストし、AFM でナノ構造を観察した。AFM 観察から、高さが約 5nm のロッド状のナノ構造体を形成していることがわかった (図 3e, f)。 *Chloroflexus aurantiacus* のクロロソームに含まれる BChl-c 自己集積体は、直径 5nm のロッド状ナノ構造体であると想定されていたので [8], *in vitro* と *in vivo* の BChl-c 自己集積体のナノ構造が一致することを初めて見出した [9][10]。



3. 合成 Chl 色素によるナノチューブ

モデル分子として、17 位プロピオネート残基上に種々の長鎖アルキル基を有する亜鉛 Chl 誘導体を合成した。ここでは、ドデシル基を有するモデル分子 (Zn-1, 図 4a) の自己集積体について述べる。前項と同様の方法で、緑色固体の Zn-1 自己集積体を調製した (図 4b)。石英基板上の Zn-1 自己集積体は、741nm と 450nm にそれぞれ Qy 帯および Soret 帯の吸収極大を示した (図 4c, 赤線)。また、Qy 帯領域に逆 S 字型の CD シグナルを示し (図 4d, 赤線)、自己集積体 (J 会合体) を形成していることがわかった。これらのスペクトルは、BChl-d 色素を多く含む天然産のクロロソームを水溶液中に分散した試料のもの (図 4c, d, 青線) とよく一致した。モデル分

子 Zn-1 の自己集積体を HOPG 基板にキャストし、そのナノ構造を AFM で観察した。AFM 観察の結果、モデル分子 Zn-1 の自己集積体は高さが約 5nm のロッド状ナノ構造体を形成していることが明らかとなった (図 4e ~ g)。また、長いもので 16.4 μ m 以上のもが観察され、そのアスペクト比は、3,000 以上にも及んだ。このような試料をカーボンコートされた銅グリッド上にキャストし、cryo-TEM を用いて、そのナノ観察を行った。Cryo-TEM 観察の結果、AFM 像ではロッド状に見えていた構造は、その内部が空洞となったナノチューブ状の構造であることが判明した (図 4h, i)。内径が約 3nm、外径が約 5nm の構造体であることもわかった (図 4j)。天然産 BChl 色素は中心に Mg を配位しているが、よりも重い元素である Zn を配位したモデル分子 Zn-1 を用いたことと、極低温 (4.2K) で観察を行ったことで、より詳細なナノ構造が明らかとなった。モデル分子で人工的にナノチューブを構築することに成功し (図 4k)、クロロソームに含まれるロッド状 BChl 自己集積体もチューブ状であることが示唆される結果となった [11][12]。



4. 合成 Chl 色素によるナノシート

様々なモデル分子を有機化学的に合成し、その自己集積化挙動を調べていた際に、水素結合性の置換基である

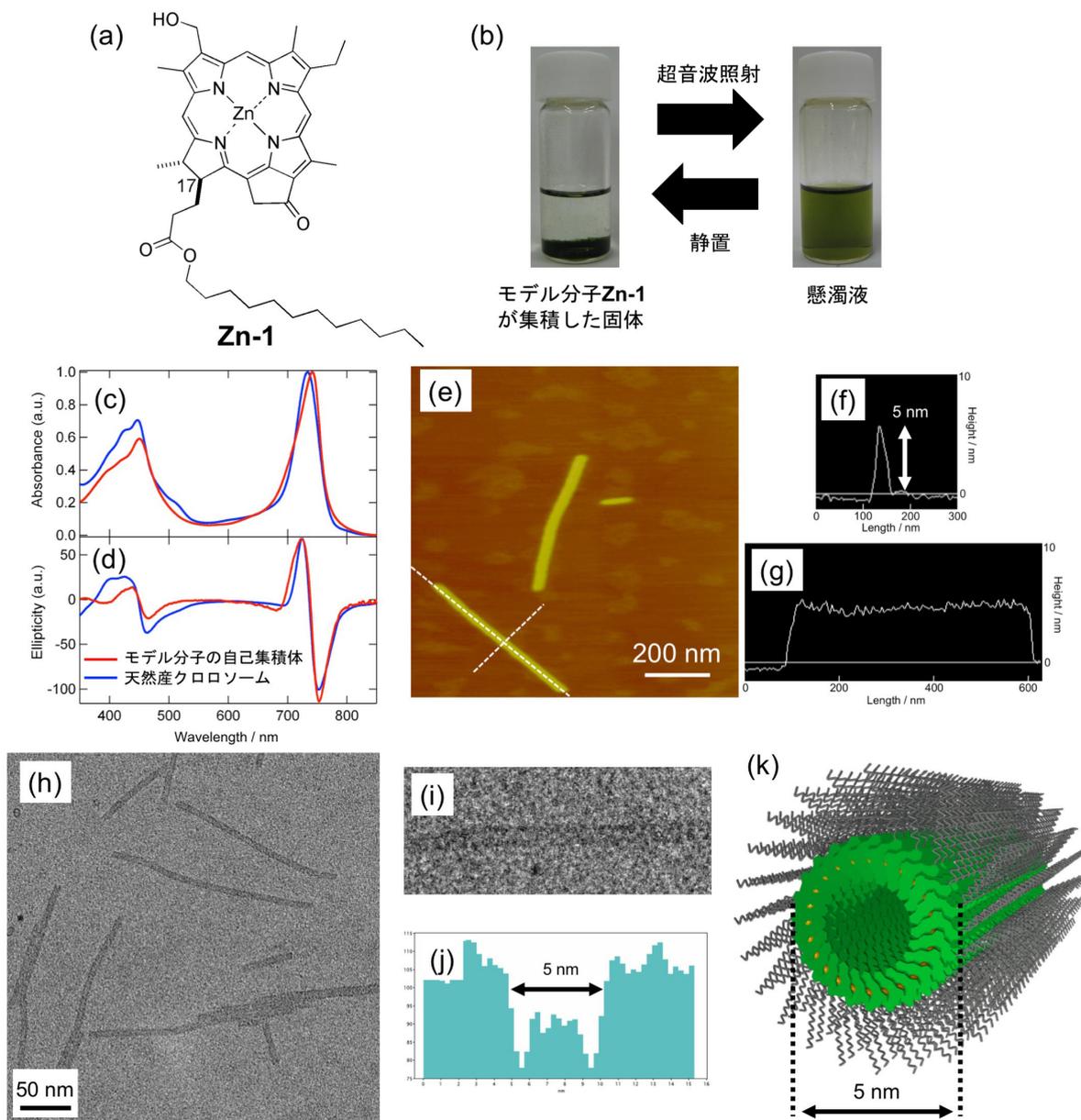


図4 (a) モデル分子 **Zn-1** の分子構造, (b) 試料の写真, (c) UV-Vis-NIR スペクトル, (d) CD スペクトル, (e) AFM 像と (f, g) その断面解析, (h, i) cryo-TEM 像と (j) その断面解析, ならびに (k) ナノチューブ構造の模式図.

アミド基とウレア基の2つを17位上にもつモデル分子 **Zn-2** (図5a) が興味深い自己集積化挙動を示すことを見出した [13]. 上述の方法で, このモデル分子の自己集積体を調製すると, 調製直後は青緑色であったのに対し, 1週間熟成すると濃い緑色に変化することがわかった (図5b). これらの試料のUV-Vis-NIR および CD スペクトルを測定した. 調製直後の試料では Qy 帯と Soret 帯の吸収極大はそれぞれ 667nm と 437nm を示し (図5c, 青線), 二量体程度の吸収帯に由来していた. 一方, 1週間後の試料は Qy 帯と Soret 帯の吸収極大はそれぞれ 728nm と 439nm へと長波長側にシフトした (図5c, 赤線). さらに, Qy 帯領域に大きな CD のシグナルも観測されたことから (図5d, 赤線), クロロソーム型の自己集積体 (J 会合体) に類似した構造を形成していることがわかった. それぞ

れの試料を HOPG 基板上にキャストし, そのナノ構造を AFM で観察した. AFM 観察の結果, 調製直後の試料は 1 ~ 25nm の高さを持つ粒子状のナノ構造 (図5e) であったのに対し, 1週間熟成後の試料は高さが 15 ~ 25nm で表面が平らなナノシート (図5f) を形成していることが明らかとなった. また, AFM 像からナノシートは高さ約 6nm のステップを有することもわかった (図5g): この 6nm の値は, モデル分子を2つ並べたものに相当している. ナノシートのより詳しい構造を調べるために, 試料をカーボンコートされた銅グリッド上にキャストし, cryo-TEM 観察を行った. Cryo-TEM 観察の結果から, ナノシートの内部は間隔が 2.9nm のラメラ状の構造が観察された (図5h, i). ナノシートの電子線回折像からは, ラメラの間隔である 2.9nm とその垂直方向にモデル分子

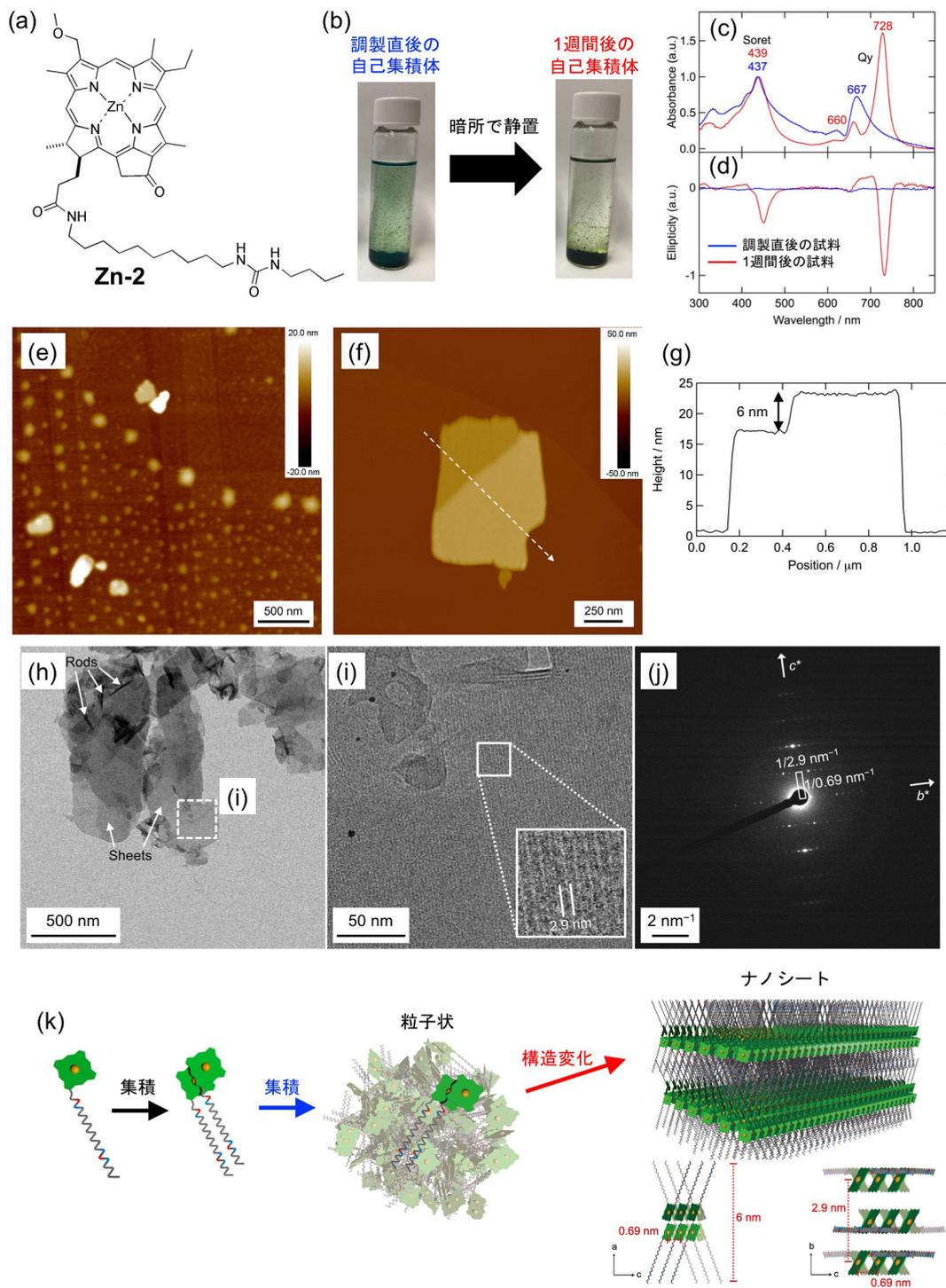


図5 (a) モデル分子 **Zn-2** の分子構造, (b) 試料の写真, (c) UV-Vis-NIR スペクトル, (d) CD スペクトル, (e) 調製直後の試料の AFM 像, (f) 1 週間後の試料の AFM 像と (g) その断面解析, (h, i) cryo-TEM 像, (j) 電子線回折像, ならびに (k) ナノシート形成のスキーム.

のスタッキングに基づく Zn 間の距離である 0.68nm のスポットが観測された (図 5j). 分光測定と顕微鏡観察の結果から, モデル分子 **Zn-2** は, 速度論的に形成した構造から熱力学的により安定な構造へと分子レベルで変化 (超分子構造が変化) したことによって, 粒子状からシート状のナノ構造へと変化したことがわかった (図 5k). 合成 Chl 分子 **Zn-2** が秩序正しく配列して, シート状のナノ構造体を形成していることが見出された [14].

5. 今後の課題

天然のクロロソームでは, BChl-*c* ~ *e* 色素の自己集積体のナノ構造は, 脂質一分子膜内で大きさや形状が制御されている. 本研究によって, 合成 Chl 分子の自己集積体がカーボンナノチューブやグラフェンを彷彿とさせるようなナノ構造体を形成できることを見出した. しかし,

得られるナノ構造体の大きさや長さにはばらつきがあるので、ナノ構造の精密制御が今後の課題である。最近、「ケージドクロロフィル」と呼ばれる分子の光脱保護を利用して、モデル分子の集積化を制御できることを報告しており [15]、ナノ構造の精密制御が可能になりつつあるので、今後の展開を期待して頂きたい。



6. おわりに

光合成の分子や原子レベルでの構造と機能は、まだわかっていないことがたくさんある。本研究では、緑色光合成細菌に着目して、Chl 分子の自己集積体がどのようなナノ構造を形成するか検討した。今後、より詳細な構造や光機能を研究していくことで、天然光合成の機能を解明することが望まれる。人類の夢で実現が待たれている人工光合成の創製に繋がるよう目指していきたい。



7. 謝辞

本研究の一部は、科研費・新学術領域研究「革新的光物質変換」（課題番号 JP17H06436）と笹川科学研究助成の支援を受けて実施されました。本研究の一部は、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業（京都大学微細構造解析プラットフォーム）の支援もを受けて実施されました。京都大学化学研究所 倉田 博基 教授に感謝申し上げます。



参考文献

- Photosynthesis, 2nd Edition, Wiley (2014).
- [2] 垣谷俊昭, 三室 守, 民秋 均 (三室 守 編集), *クロロフィル - 構造・反応・機能 -*, 裳華房 (2011).
- [3] Y. Saga, Y. Shibata, H. Tamiaki, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **11**, 15-24 (2010).
- [4] H. Tamiaki, R. Shibata, T. Mizoguchi, *Photochem. Photobiol.*, **83**, 152-162 (2007).
- [5] H. Tamiaki, *Coord. Chem. Rev.*, **148**, 183-197 (1996).
- [6] G. S. Orf, R. E. Blankenship, *Photosynth. Res.*, **116**, 315-331 (2010).
- [7] H. Tamiaki, M. Amakawa, Y. Shimono, R. Tanikaga, A. R. Holzwarth, K. Schaffner, *Photochem. Photobiol.*, **63**, 92-99 (1996).
- [8] Y. Saga, H. Tamiaki, *J. Biosci. Biotech.*, **102**, 118-123 (2006).
- [9] S. Shoji, T. Mizoguchi, H. Tamiaki, *Chem. Phys. Lett.*, **578**, 102-105 (2013).
- [10] S. Shoji, T. Mizoguchi, H. Tamiaki, *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.*, **331**, 190-196 (2016).
- [11] S. Shoji, T. Hashishin, H. Tamiaki, *Chem. Eur. J.*, **18**, 13331-13341 (2012).
- [12] S. Shoji, T. Ogawa, T. Hashishin, S. Ogasawara, H. Watanabe, H. Usami, H. Tamiaki, *Nano Lett.*, **16**, 3650-3654 (2016).
- [13] S. Shoji, T. Ogawa, T. Hashishin, H. Tamiaki, *ChemPhysChem*, **19**, 913-920 (2018).
- [14] S. Shoji, T. Ogawa, S. Matsubara, H. Tamiaki, *Sci. Rep.*, **9**, 14006 (2019).
- [15] S. Matsubara, H. Tamiaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 1207-1211 (2019).

(北海道大学大学院工学研究院 庄司 淳)

[1] R. E. Blankenship, *Molecular Mechanisms of*



**Nanotechnology
Platform**
KYOTO UNIVERSITY

【お問い合わせ】

微細構造解析プラットフォーム
京都大学 最先端構造観察・計測共用拠点
☎ 0774-38-3051

E-mail nanoplat@eels.kuicr.kyoto-u.ac.jp

ホームページ

<http://tem.nanoplat.cpier.kyoto-u.ac.jp/>