

# クロロフィル分子集合体の 超分子構造形成と機能発現

「形とはたらき」領域 民秋 均

## 要 旨

緑色嫌気性光合成細菌の膜外アンテナ部における特異な色素自己集合体の超分子構造と光エネルギー収穫／伝達／移動機構の分子レベルでの解明を、合成モデル研究によって行った。

### 1. 研究のねらい

光合成における膜内集光アンテナは色素蛋白複合体によって構成されているが、緑色嫌気性光合成細菌の膜外アンテナ部（以下クロロゾームと呼ぶ）では色素のみが自己集合している。このような膜外アンテナはクロロフィル色素がらせん状に自己集合体を形成して、円筒状構造を取っているものと推定されている。そこで、アンテナ色素分子の合成モデル化合物を用いて、色素自己集合体を調製し、その超分子構造の解明と機能発現を目指すことを本研究の目的とする。あわせて、本モデル系と生体系とを比較することにより、生体系での膜外アンテナの超分子構造並びにエネルギー移動過程の解明も行う。さらに、本研究によって判明した分子集合体の構築原理をもとにして、新規な高次構造体を構築し、その機能化も目指した。

モデル色素分子は有機化合物であるため微細な修飾が可能であり、系統的な合成と分光学的検討によって自己集合体の超分子構造と機能相関を分子レベルで解明できるものと確信している。

### 2. 研究の方法と成果

天然クロロゾーム系から発せられている現象で未解明な種々の疑問点を、「形とはたらき」に留意しつつ、合成モデル系構築しながら解決していった。これまでに解明できた幾つかの成果を以下に記す。

#### 2-1 自己集積のためにはクロロフィルにどんな分子構造が必要か？

蛋白と結合することによってアンテナを構成しているクロロフィル類と、自己集積によっ

てアンテナを構成しているクロロフィル類 (図1左) との分子構造の差は、3<sup>1</sup>位に結合性の水酸基を有していないかいるかの違いである。そこで、様々な位置 (3<sup>1</sup>/3<sup>2</sup>/3<sup>3</sup>/7<sup>1</sup>/8<sup>1</sup>位) に水酸基を有するクロロフィル型分子を合成し、その自己会合能を低極性有機溶媒中で検討して、13<sup>1</sup>-オキソクロリン錯体では、天然型と同じ3<sup>1</sup>位に水酸基を有していることが (図1中)、十分に安定な会合体形成のためには必要であることが判明した。また、Q<sub>y</sub>軸 (N21-N23軸) 上に水酸基とカルボニル基を有している亜鉛クロリン錯体 (図1右) であれば、同様の自己集積することが判ったので、必ずしも天然と同じ3-ヒドロキシ-13<sup>1</sup>-オキソ型の分子構造が自己会合に必要でないことも明らかにできた。すなわち、Q<sub>y</sub>軸上に沿って分子が自己集積することが、クロロゾーム型の色素会合体にとって必要不可欠であることが判明した。

なお、本研究におけるモデル分子としては、天然アンテナ色素分子であるクロロゾームクロロフィルにおけるマグネシウム錯体の代わりに、より安定で取り扱いやすい亜鉛を中心金属とする錯体を用いた。いずれもアキシャル位に対する強い配位活性があり、五配位錯体を取りやすいことが確認されている。

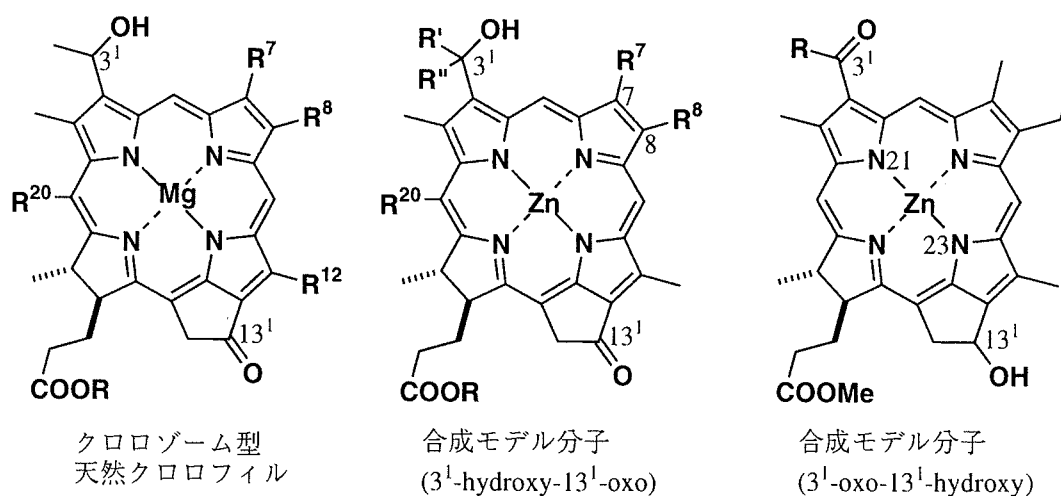


図1 天然/合成クロロゾームクロロフィル

## 2-2 クロロフィル同族体が存在している意味は？

単一の緑色細菌におけるクロロゾーム内には、様々な分子構造の異なるクロロフィルが存在していることが知られている。その意義を検討するために、*Chlorobium phaeobacteroides* の天然クロロゾームから、分子構造の異なる各バクテリオクロロフィル-e (図2左) を単離精製して、その自己会合体を低極性有機溶媒中で調製した。また、天然比と同

じ混合物の自己会合体も調製して、比較検討を行った。その結果、8位の立体的な嵩高さが大きくなるにつれて ( $R=R'=H \rightarrow R=Me, R'=H \rightarrow R=R'=Me$ )、蛍光発光波長が長波長シフトし (715  $\rightarrow$  720  $\rightarrow$  725 nm)、混合物になると、さらにシフトすることが判った ( $\rightarrow$  730 nm)。クロロゾーム内でのエネルギー受容体が795 nmに吸収を有するバクテリオクロロフィル-*a* (図2右: クロリン骨格の7-8位が単結合になったバクテリオクロリン骨格になっている点に注意) であることを考えれば、エネルギー供与体の自己会合体の発光波長の長波長シフトは、エネルギー移動効率の増大をもたらすので (フェルスター型のエネルギー移動機構に基づく)、天然はそのことをうまく利用していることが判った。

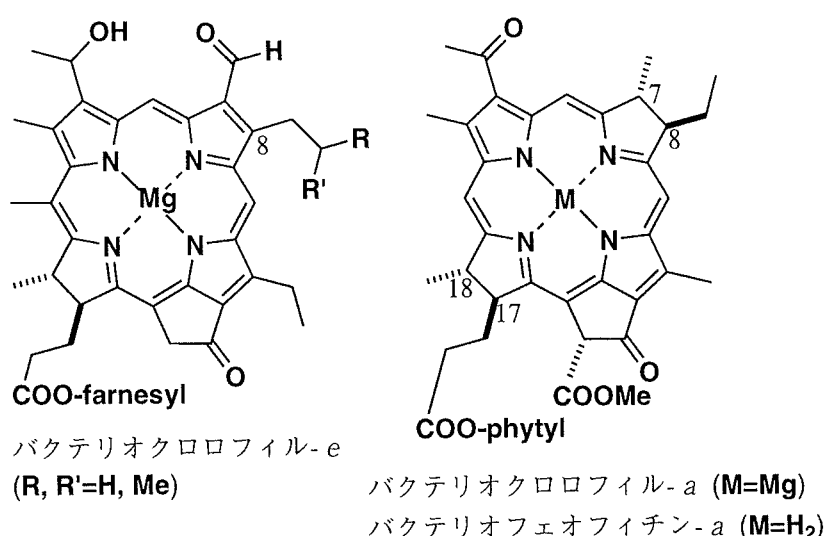


図2 *Chlorobium phaeobacteroides* のクロロゾーム内におけるクロロフィル

### 2-3 自己集積のために必要な環境は？

クロロフィルの自己会合体は、低極性有機溶媒中で形成されていることが、これまで知られていた。また、そのような溶媒を蒸発させたような薄膜においても、自己会合体が維持されていることも知られていた。一方、クロロゾームは、水中で脂質一分子膜に囲まれており、自己会合体がその疎水的環境に置かれていることも知られていた。そこで、両親媒性の界面活性剤を利用して、その自己集積体によるミセル様のカプセルを形成させて、その内部にクロロフィルの自己会合体を形成させることを試みた。界面活性剤として、様々なものを検討したが、天然クロロゾームでみられる糖脂質以外には、二本鎖型のリン脂質 (レシチンなど) と非イオン性の一本鎖界面活性剤 (トリトン X-100など) が有効であることが判った。

フッ素化溶媒は、ヘキサンと同様の低極性溶媒であるが、通常クロロフィル類を溶解す

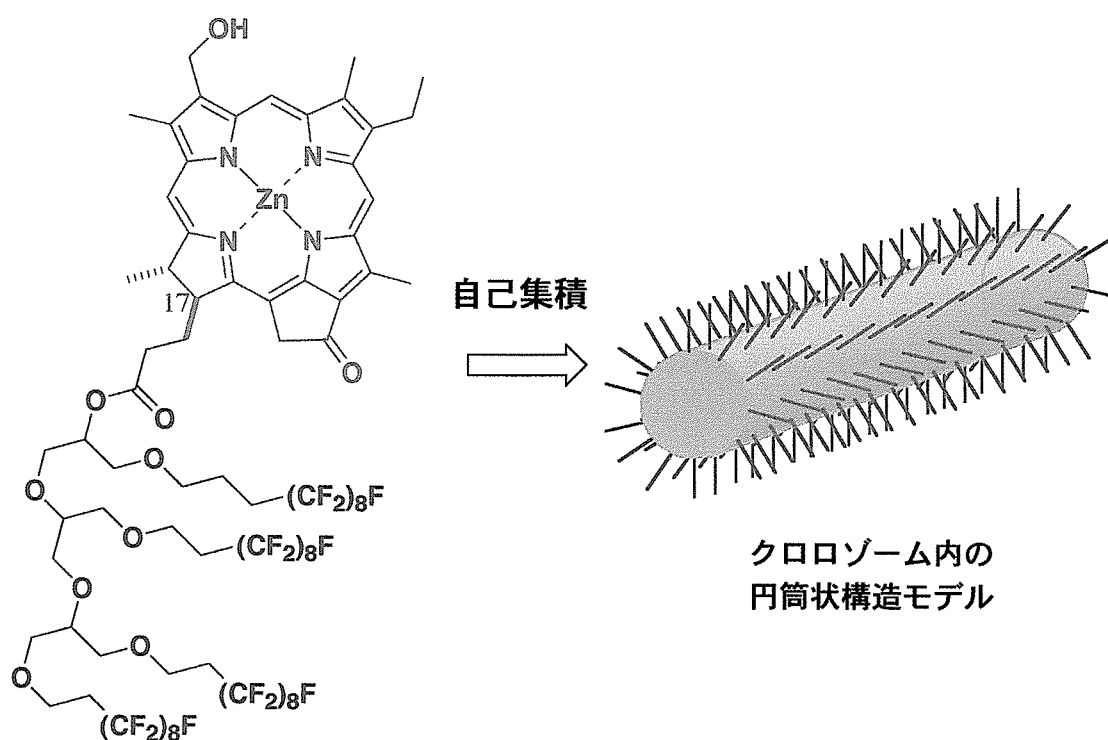


図3 フルオロ化モデル化合物の自己集積

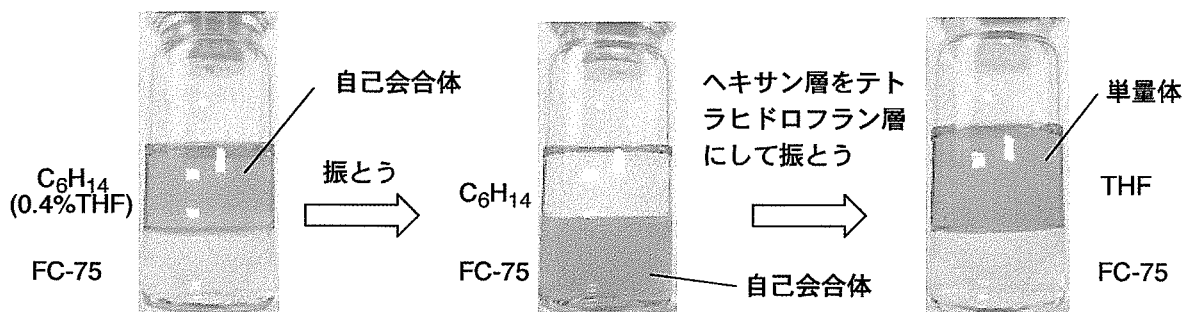


図4 フルオロ化モデル化合物のフッ素化溶媒による抽出

ることは出来ない。そこで、17位のプロピオネートのエステル基にパーフルオロオクチル基を多数導入することで、フッ素化溶媒への溶解度を高めることを試みた。パーフルオロオクチル基を4本導入したモデル化合物（図3左）でも、分子中でのフッ素化率がさほど高くなく（重量比で約50%）、単量体ではフッ素化溶媒に溶解することはなかった。しかし、その自己会合体（多量体）は、選択的にフッ素化溶媒（パーフルオロ-2-ブチルテトラヒドロフラン：FC-75/パーフルオロオクタン/パーフルオロ-トリ-n-ブチルアミンなど）に溶解して、ヘキサン中と同様の自己会合体を形成することが判った。一例として、図4にフッ素

化溶媒による抽出実験を示す。低極性有機溶媒のヘキサン中におけるパーフルオロ化モデル化合物の自己会合体（緑色）が、完全にフッ素化溶媒であるFC-75層に抽出されていること／極性有機溶媒分子であるテトラヒドロフランの中心亜鉛への配位作用によって単量体（青色）になると、フッ素化溶媒層から完全にテトラヒドロフラン層に抽出されることが見てとれる。

以上の結果から、クロロゾームにおいて17位のプロピオネートの長鎖炭化水素基が自己会合体の外に向けて円筒状構造（図3右）をとっていることの傍証ともなった。

## 2-4 機能モデルの構築は？

様々な手法（核磁気共鳴法や可視吸収／円二色／赤外吸収／蛍光／共鳴ラマン分光法や電子線散乱法）によって、合成クロロフィルの自己会合体が、天然のクロロゾームの自己会合体のよい構造モデルであることは、明らかになってきた。そこで、光エネルギーを収穫／伝達できる機能モデルとして優れているか否かを検討した。

水中のトリトンX-100によるミセル中で、合成クロロフィル自己会合体とエネルギー受容体を共存させて、エネルギー移動過程を蛍光分光法を用いて検討した。バクテリオクロリン骨格を有するバクテリオフェオフィチン-*a*を数モル%混入させると、合成クロロフィル自己会合体の蛍光が消光され、バクテリオフェオフィチン-*a*由来の蛍光発光が見られ、前者

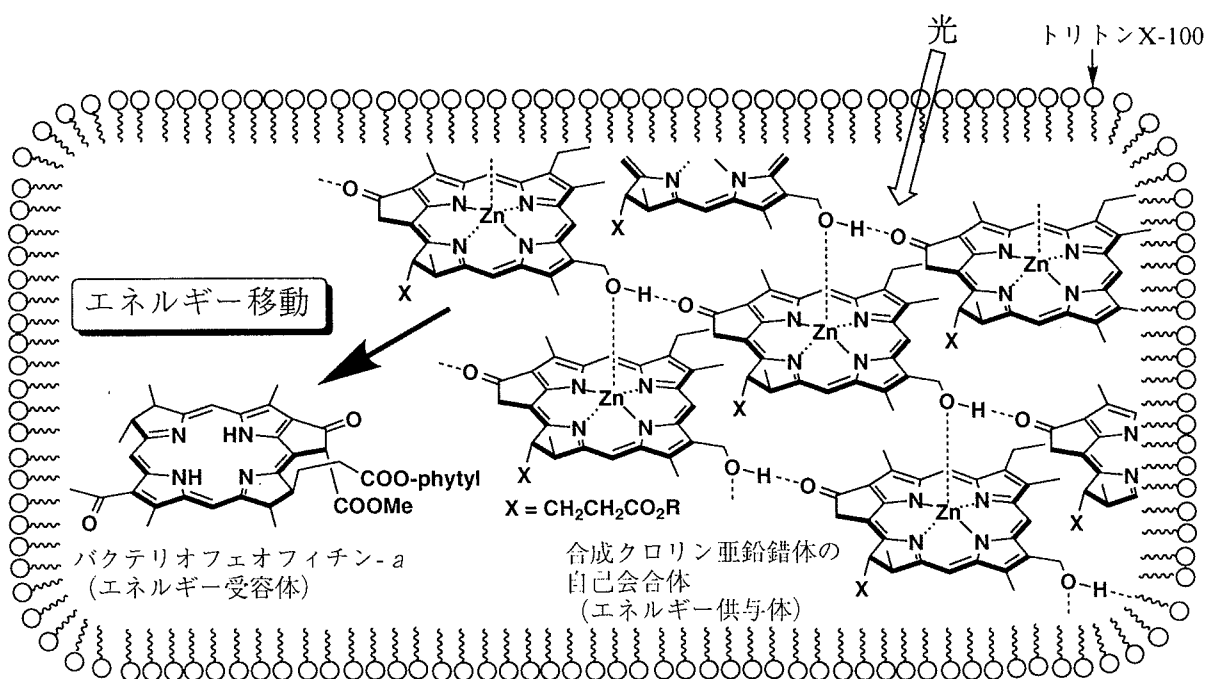


図5 人工クロロゾーム機能モデル

から後者へのエネルギー移動が観測された。つまり、人工クロロゾーム機能モデルの構築に成功したことが判った (図5)。天然クロロゾームでは、バクテリオフェオフィチン-*a* のマグネシウム錯体が蛋白に結合した単量体状態でエネルギー受容体として機能していることを考えれば、蛋白の存在していない本モデル系では、自己会合能のより低いバクテリオフェオフィチン-*a* が、エネルギー受容体として機能している点は興味深い。

また、エネルギー受容体型クロロフィル自己会合体モデルとして、新たにポルフィリン亜鉛錯体 (従来のクロリン錯体の17-18結合が二重結合になっている : 図6 左上) の自己会合体 (発光極大=660 nm) を調製し、そのエネルギー移動能を検討したところ、この系でもクロロゾーム型機能モデルとなることが判明した。エネルギー受容体として、バクテリオクロリン骨格のメチルバクテリオピロフェオフォルバイド-*a* (図6 中下 : 吸収極大=755 nm) ばかりではなく、クロリン骨格のメチルピロフェオフォルバイド-*d* (図6 中上 : 吸収極大=705 nm) も利用できる点は、より低波長 (高エネルギー) 側の光を利用できる点で、エネ

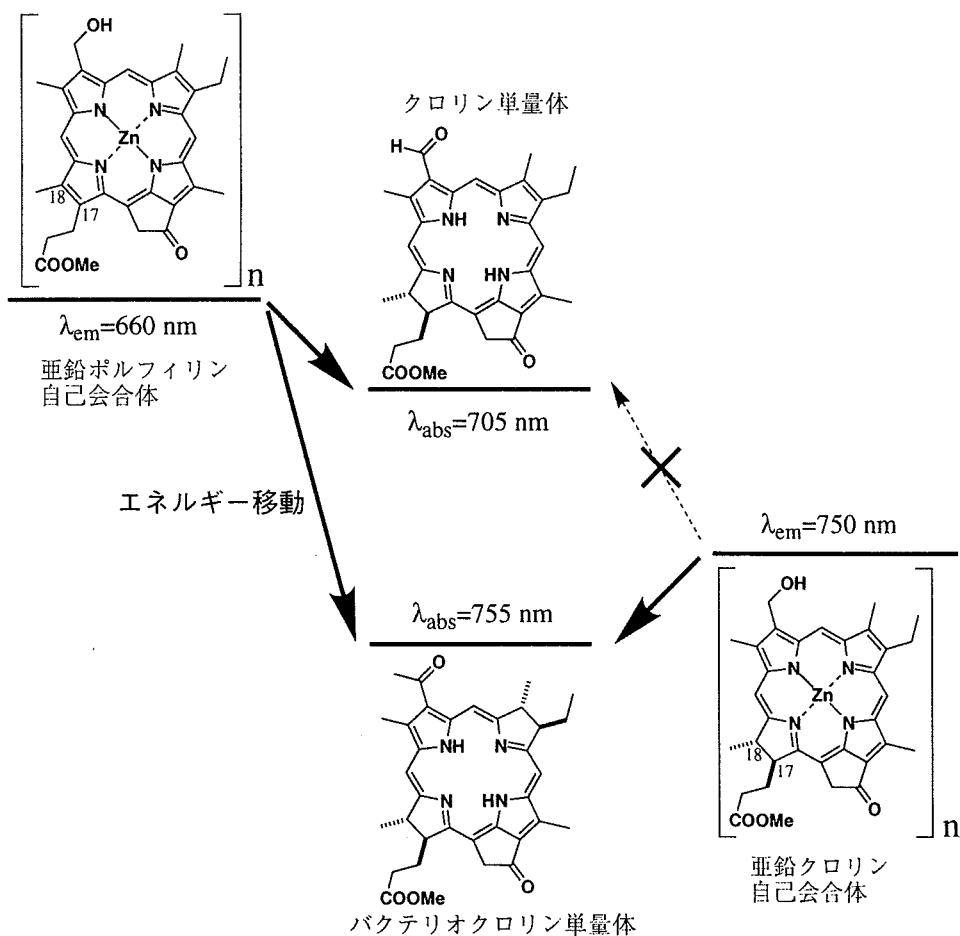


図6 モデル系での励起一重項エネルギー移動

ルギー変換分子素子の観点からも興味深い。

## 2-5 単一のクロロゾームではどうなっているの？

これまでのクロロゾームに関する研究は、多数のクロロゾームを対象とした分光法のみであり、単一の器官を対象にした分光学的研究はなかった。2-2で述べたように、クロロゾームには様々な分子構造を持った会合性のクロロフィルが存在しているので、その存在様式を明確にするには、単一のクロロゾームを対象にする必要があった。そこで、単一のクロロゾームの蛍光分光を行うことにした。

石英板上にクロロゾームを固定化し、個々のクロロゾームが単独で存在していることを原子間力顕微鏡で確認しつつ、全反射型近接場型光学顕微鏡によって単一クロロゾームからの蛍光発光スペクトルを測定した。非硫黄型緑色細菌の *Chloroflexus aurantiacus* では、どのクロロゾームからもほとんど同じスペクトル（発光極大=747±2 nm）が得られ、バクテリオクロロフィル-*c* が 3<sup>1</sup>R/S が 2 : 1 で存在しているにも関わらず（図7）、不均一性は見られなかった。各異性体のみからなる自己会合体は、異なる蛍光スペクトルを与えることから、各異性体は混合して単一のクロロゾームに存在している可能性が高い。一方、硫黄型緑色細菌の *Chlorobium tepidum* では、比較的大きな不均一性が見られた（発光極大=750~770 nm）。構成バクテリオクロロフィル-*c* が多様な同族体からなるので（図7で R<sup>8</sup> と R<sup>12</sup> が様々なアルキル基をとっている）、個々のクロロゾームにおいて、同族体組成（もしくは 3<sup>1</sup>異性体組成）が異なっている可能性が示唆され、非硫黄型のクロロゾームと際立った差異が見られた。硫黄型では一つずつのクロロゾームの色素組成を早急に解明する必要がある。

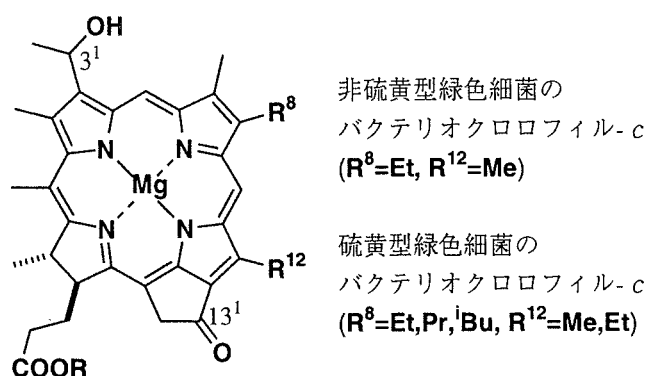


図7 バクテリオクロロフィル-*c*

### 3. 今後の展望

本研究によって、クロロゾームの構造／機能モデルの構築に成功し、その超分子構造と機能はかなり解明できた。しかし、まだ完全ではないので、さらに一層の解明が必要であり、分子レベルでのクロロゾーム全体の超分子構造と強相関係でのエネルギー伝達／移動機構の解明を目指したい。

一方、モデル系では、エネルギーを有効に取り出して、それを利用できるところまでには至っていない。例えば、電荷移動系と連結して、光合成初期過程を複合的に構築しようとする企ては今のところまだ成功していない。今後は、超分子間でのコミュニケーションという問題点を中心に据えて研究を進めて、人工光合成の構築という大きな問題にも取り組んでいきたいと考えている。

さらに、アンテナ系には単純な光収穫／エネルギー伝達のための機能だけではなく、それ以外の機能も果たす可能性を秘めている。例えば、アンテナモデルとして有効な色素の集合体を光励起することで、電子ドナーとして機能することが確認されており、電子移動媒体としても機能しそうである。今後は、アンテナモデル系をこのような天然にはない機能を有する光応答性デバイスとしても展開していきたい。

### 4. 発表リスト

#### (1) 論文

1. H. Tamiaki, M. Omoda & M. Kubo, "A Novel Approach toward Bacteriochlorophylls-*e* and *f*," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1631-1632 (1999).
2. S. Yagai, T. Miyatake & H. Tamiaki, "Self-Assembly of Synthetic 8<sup>1</sup>-Hydroxy-Chlorophyll Analogues," *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **52**, 74-85 (1999).
3. S. Yagai, T. Miyatake, Y. Shimono & H. Tamiaki, "Supramolecular Structure of Self-Assembled Synthetic Zinc-13<sup>1</sup>-Oxo-Chlorins Possessing Primary, Secondary or Tertiary Alcoholic 3<sup>1</sup>-Hydroxyl Group: Visible Spectroscopic and Molecular Modeling Studies," *Photochem. Photobiol.*, **73**, 153-163 (2001).
4. Y. Saga, K. Matsuura & H. Tamiaki, "Spectroscopic Studies on Self-aggregation of Bacteriochlorophyll-*e* in Non-polar Organic Solvents: Effects of Stereoisomeric Configuration at the 3<sup>1</sup>-Position and Alkyl Substituents at the 8<sup>1</sup>-Position," *Photochem. Photobiol.*, **74**, 72-80 (2001).



## (2) 口頭発表

### 国際会議発表（依頼講演分）

1. H. Tamiaki, "Synthetic Models for Chlorosomal Photosynthetic Antennae," The Second SANKEN International Symposium: Chemical and Physical Perspective for Molecular Devices, SL11 (吹田, 1999年1月).
2. S. Yagai, T. Miyatake & H. Tamiaki, "Regio- and Stereoisomeric Control of the Aggregation of Zinc-Chlorophylls Possessing Inverted Interacted Hydroxyl and Carbonyl Groups," 11th International Symposium on Supramolecular Chemistry, S-20 (福岡, 2000年8月).
3. H. Tamiaki, H. Kitamoto & T. Miyatake, "A Photosynthetic Antenna Model: Energy Transfer from Porphyrin Aggregates to a Chlorin in an Aqueous Micelle," Physical Aspects of Photobiological Processes: Photobiology and Energy Conversion, S5 (名古屋, 2001年7月).
4. H. Tamiaki, Y. Saga, T. Wazawa, T. Nakada, T. Mizoguchi, Y. Ishii & T. Yanagida, "Spectroscopy of Single Chlorosome from Green Bacteria," Light-Harvesting 2001, I3 (オーストラリア・ゴールドコースト, 2001年8月).

### 国内会議発表（依頼講演分）

1. 民秋 均、「光合成アンテナを模した合成クロロフィル類の自己集積体」、第12回配位化合物の光化学討論会、O-2-02 (埼玉, 1999年8月).
2. 民秋 均、「人工亜鉛クロリンによる光合成アンテナモデルの構築」、日本化学会第77秋季年会、4A2 05 (札幌, 1999年9月).
3. 民秋 均、「自己集積型クロロフィル系色素の会合体による光エネルギー移動」、日本化学会第79春季年会、1S2 09 (神戸, 2001年3月).

外部発表（論文4件、口頭発表：国際会議19件、国内会議26件）