



Title	蛍光
Author(s)	秋本, 誠志
Citation	低温科学, 67, 449-452 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/39178">http://hdl.handle.net/2115/39178</a>
Type	bulletin (article)
Note	4章 分光測定 2. 分光測定法 a
File Information	67-063.pdf



[Instructions for use](#)

## 2. 分光測定法

## a. 蛍光

秋本 誠志<sup>1)</sup>

吸収とは異なり蛍光は電子励起状態にある物質のみから得られるため、蛍光分光法は光合成系における励起エネルギー移動など電子励起状態が関与する現象の観測に適している。本章では、蛍光分光法についての概略を述べる。

## Fluorescence spectroscopy

Seiji Akimoto

Fluorescence spectroscopy is one of the most important techniques to detect excitation relaxations within a pigment molecule and excitation energy transfer among pigment molecules. In this chapter, fluorescence emission and excitation spectra, fluorescence anisotropy, and time-resolved fluorescence are described.

## 2.a.1 蛍光発光スペクトル

発光は、電子励起された物質が光を発しながら電子基底状態に緩和する過程である(図1)。比較的寿命が短く一重項間の遷移で発せられるものを蛍光と呼び、比較的寿命が長く三重項—一重項間の遷移で発せられる磷光とは区別される。ある固定された波長で物質を励起し、そこから発せられる蛍光の強度を観測波長の関数として表したものを蛍光発光スペクトルと呼ぶ。単に蛍光スペクトルと略される場合が多い。

蛍光は、振動緩和、内部転換、項間交差などの緩和過程と競合して起こる。最低電子励起状態の寿命が振動エネルギーの緩和時間よりも十分に長い色素分子(クロロフィルやフィコビルンなど)では、蛍光は最低電子励起状態の振動基底状態から発せられるもの(図1、赤矢印)が主成分となり、定常蛍光スペクトルの形状は励起波長依存性を示さない。カロテノイド系分子<sup>1)</sup>やポルフィリン系分子<sup>2)</sup>などでは、高電子励起状態からの蛍光スペクトルも観測される。

液体窒素や極低温クライオスタットなどを用いて低温にすると蛍光スペクトルのバンド幅は鋭くなり、色素分子の電子遷移エネルギーや分子間相互作用に関する詳細な検討が可能となる。例えば、室温で植物やシアノバクテリア中のクロロフィル *a* 蛍光を観測すると(図2)、光化学系 I の蛍光は弱く、680 nm 近辺に極大を持つ光化学系 II の集光性クロロフィル *a* からの蛍光が主に観測さ

れる。一方、液体窒素温度(−196°C、絶対温度 77 K)まで冷却すると、光化学系 II のクロロフィル *a* からの蛍光バンドが 685 nm 近辺と 695 nm 近辺に、光化学系 I のクロロフィル *a* からの蛍光バンドが 715–735 nm に観測される<sup>3)</sup>。685 nm と 695 nm の2つのバンドは、光化学系 II コアアンテナ CP43, CP47 サブユニットに存在する低エネルギーのクロロフィル *a* からの蛍光、また、715–735 nm のバンドは、光化学系 I 複合体や隣接する光化学系 I アンテナ色素タンパク質複合体(LHC I)に存在する相互作用の強いクロロフィル *a* からの蛍光に帰属されている(これらのクロロフィル *a* は吸収帯についても長波長にシフトする)。光化学系 I 蛍光は光合成生物ごとに

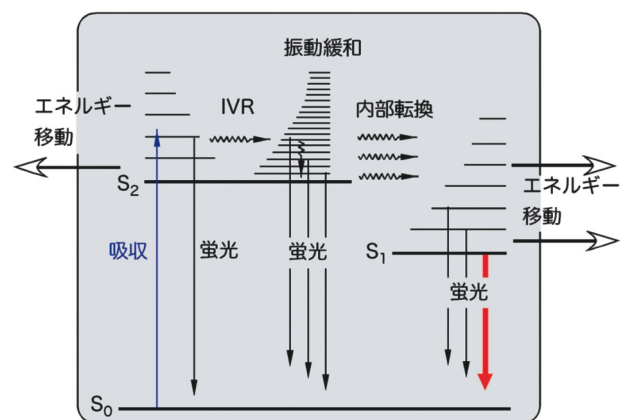


図1：光励起後の緩和過程の概略

分子が光を吸収した後、分子内振動エネルギー再分配(IVR)、振動緩和、内部転換、励起エネルギー移動過程などが起こる(この他にも、三重項状態が関与する項間交差などがある)。ここでは、第2電子励起状態( $S_2$ )への励起を例にしている。実際には、最低電子励起状態( $S_1$ )においても、IVR、振動緩和、電子基底状態( $S_0$ )への内部転換が起こる。

1) 神戸大学自然科学系先端融合研究環分子フォトサイエンス研究センター

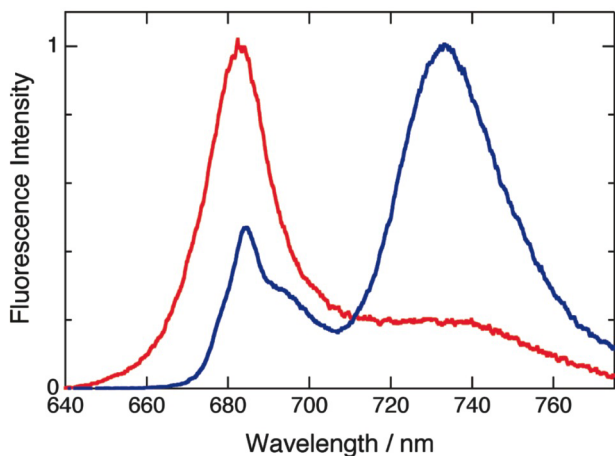


図2：シロイヌナズナチラコイド膜の蛍光スペクトル  
赤は室温、青は77 Kでのスペクトルを示す。77 Kでは室温と比較してスペクトルが鋭くなっており、光化学系IIクロロフィル *a* からの蛍光バンドが684 nmと695 nm近辺に、光化学系Iクロロフィル *a* からの蛍光バンドが733 nmに観測されている。

少しずつ異なり、明確なピークを示さない生物や、もっと長波長の760 nm付近にバンドが確認されるシアノバクテリア(スピルリナ)<sup>4)</sup>なども報告されている。LHC Iを持たないシアノバクテリアでは光化学系I複合体は3量体を形成するが、3量体形成に伴い、長波長蛍光を発するクロロフィル数が変化したり、単量体にはみられない波長領域にバンドが観測されたりする<sup>4)</sup>。光化学系I複合体、光化学系IIコアアンテナ、および、アンテナ色素タンパク質複合体に存在する集光性クロロフィル *a* や *b* は、長波長領域に蛍光を出すクロロフィル *a* に励起エネルギーを効率よく移動させるので、大量に存在するにもかかわらず77 Kでの定常光測定では弱い蛍光しか観測されない。光化学系I、II蛍光バンドの強度比をはかることで、光化学系I、IIの量比や、相互間でのエネルギー移動が推定できる。蛍光強度や収率の変化を測定することで光化学系間のエネルギー移動の変化(ステート遷移)や、光化学反応も研究されている(4.3 a, b項参照)。

### 2.a.2 蛍光励起スペクトル

蛍光を観測する波長を固定し、蛍光強度を励起波長の関数として表したものを蛍光励起スペクトルと呼ぶ。一種類の色素分子を含む希薄溶液では、蛍光励起スペクトルは吸収スペクトルと同じものとなる。一方、複数種の色素分子が存在する時は、蛍光励起スペクトルは吸収スペクトルとは一致しないが、特定の色素分子の吸収スペ

クトルを反映したものとなる。また、光合成色素タンパク質複合体など複数の色素分子が近接して存在する場合には、色素分子間の励起エネルギー移動効率に依存したスペクトルが得られる。エネルギーアクセプターの蛍光を観測しながら蛍光励起スペクトルを測定すると、エネルギー移動効率が高い場合にはエネルギードナーとエネルギーアクセプターの吸収スペクトルを足し合わせたスペクトルが得られ、エネルギー移動効率が低い場合にはエネルギードナーの寄与の小さいスペクトルが得られる。

実際の測定では、励起光源や分光器の特性を反映して励起光強度が波長に依存し変動するため、あらかじめ励起光の分光特性を調べ装置の較正を行う必要がある<sup>5)</sup>。特に、励起光源の経年変化に注意を要する。

### 2.a.3 時間分解蛍光分光法

サンプルを十分に短いパルス幅を持った光源で励起し、その後の蛍光強度の変化、蛍光スペクトルの形状の変化、蛍光異方性の変化などを時間の関数として観測する方法である。従来は、サブピコ秒から数10ピコ秒( $10^{-13}$ ~ $10^{-11}$ s)のパルス幅を持った色素レーザーが光源として用いられていたが、最近では、フェムト秒領域( $\leq 10^{-13}$ s)のパルス幅を持ったチタンサファイアレーザーが用いられることが多い。

数ピコ秒から数100ナノ秒領域( $10^{-12}$ ~ $10^{-7}$ s)で起こる現象の観測には、時間相関単一光子計数法<sup>6,7)</sup>やストリークカメラ法<sup>8)</sup>が用いられる。前者は、感度が高くダイナミックレンジが広いこと遅延蛍光などの微弱蛍光成分の検出に適しているが、基本的に観測は単一波長について行われる。それに対して後者は、時間一波長の2次元測光が可能であるため照射により劣化がみられる試料の測定に適しているが、ダイナミックレンジが狭い。したがって、観測する現象や試料に応じて測定法を選ぶか、併用することが望ましい。ピコ秒より短い時間領域の測定には、蛍光アップコンバージョン法<sup>9,10)</sup>や光カーゲート法<sup>11,12)</sup>などが用いられる。

時間分解測定では、高電子励起状態、振動励起状態からの蛍光が得られ、内部転換や振動緩和などを詳細に検討することができる。また、光合成色素タンパク質複合体ではエネルギードナーとなる色素分子からの蛍光を捉えることができ、構成色素分子が発する蛍光スペクトルの時間変化を観測することにより、色素分子間での励起エネルギー移動を実時間で追跡することができる<sup>13)</sup>。異なる波長領域に蛍光を発する色素分子間での励起エネルギー

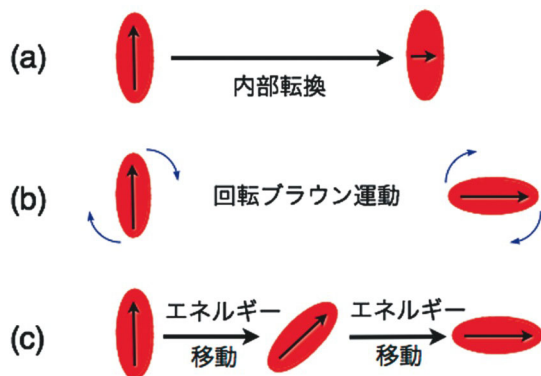


図3：偏光が解消される過程  
(a) 内部転換，(b) 回転ブラウン運動，(c) 励起エネルギー移動。赤い楕円は色素分子を，その中にある黒矢印は遷移双極子モーメントの向きを示す。

ギー移動の観測に適している。

#### 2.a.4 蛍光異方性

レーザー光など電場の振動方向が一定方向に揃った光源（直線偏光）を用いて物質を励起すると，電場の振動方向と遷移双極子モーメントの方向が平行に近い分子が選択的に励起される（平行の時で最大，直交する時は0）。したがって，タンパク質中で光合成色素がランダムな向きに分散している場合でも，直線偏光を用いて励起を行うと，励起直後は色素分子から発せられる蛍光もまた偏光性を示す。蛍光の偏光性は，(a) 内部転換，(b) 色素分子の向きの変化，(c) 励起エネルギー移動，などにより失われる（偏光解消，図3）。(a)は，励起された電子状態と蛍光を発する電子状態の遷移双極子モーメントの向きが異なる場合である。(b)は，励起状態にある間に色素分子の向きが変わることによって，励起時点での遷移双極子モーメントの向きと発光時点での遷移双極子モーメントの向きが異なる場合である。溶液中における回転ブラウン運動がその例である。(c)は分子間過程であり，遷移双極子モーメントの向きが異なる色素分子へと励起エネルギー移動が起こり，励起された色素分子と発光する色素分子が異なる場合である。

励起光源の偏光方向と平行な蛍光偏光成分を  $I_{\parallel}(t)$ ，垂直な蛍光偏光成分を  $I_{\perp}(t)$  とする（図4）と，蛍光異方性  $r$  は，

$$r = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (1)$$

と定義される。この時，等方的な蛍光強度は  $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$  で与えられる。励起子相互作用などがある場合を除き，等方的なサンプルから観測される  $r$  の値は， $0.4 \geq r \geq -0.2$  となる。時間分解蛍光分光法により， $I_{\parallel}$  および  $I_{\perp}$  の時間

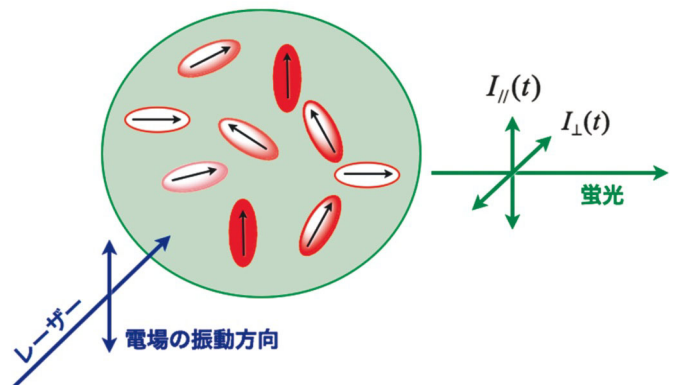


図4：直線偏光を用いた蛍光偏光の測定  
励起光（図ではレーザー光）の電場の振動方向と遷移双極子モーメントの方向が平行に近い分子が選択的に励起される（赤色の濃い分子）。励起光源の偏光方向と平行な蛍光偏光成分  $I_{\parallel}$  および垂直な蛍光偏光成分  $I_{\perp}$  の観測を行う。

変化（それぞれ， $I_{\parallel}(t)$ ， $I_{\perp}(t)$ ）の測定を行えば， $r$  の時間変化  $r(t)$  が

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (2)$$

と求められる。等方的な蛍光強度の時間変化，すなわち，蛍光減衰曲線は  $I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)$  として得られる。偏光解消過程を反映して時間と共に  $r(t)$  が変化し，例えば，同じ波長領域に蛍光を発する色素分子間での励起エネルギー移動を実時間で観測することができる<sup>7,14)</sup>。

実際の測定では，検出系（回折格子，光電子増倍管，など）の感度が偏光の方向に対して一様でない場合があり，その補正を考慮する必要がある。鉛直方向および水平方向に偏光した光に対する検出系の感度の比（ $G$  因子）を観測波長の関数として求める方法や，簡単には，偏光解消板を蛍光観測用の分光器の前に設置する方法がある<sup>5,7)</sup>。

#### 参考文献

- 1) T. Gillbro & R. J. Cogdell, Chem. Phys. Lett., **158** (1989) P.9.
- 2) M. Gouterman, The Porphyrins, ed. D. Dolphin Ed., Vol. III, New York, Academic Press, 1978, p.1.
- 3) M. Nakayama, T. Yamaoka, & S. Katoh, Plant Cell Physiol., **20** (1979) P.1565.
- 4) N. V. Karapetyan, D. Dorra, G. Schweitzer, I. N. Bezmertnaya & A. R. Holzwarth, Biochem., **36** (1997) P. 13830.
- 5) 木下一彦，御橋廣真編，「蛍光測定」，学会出版センター，1983.
- 6) 山崎巖，藤田昌久，内田勝雄，進藤善雄，馬場宏明，応

- 用電気研究所報告, **26** (1974) P.124.
- 7) D. V. O'Connor & D. Phillips, Time-correlated single photon counting. London, Academic Press, 1984.
- 8) P. P. Ho, A. Katz, R. R. Alfano, & N. H. Schiller, Opt. Commun., **54** (1985) P.57.
- 9) J. Shah, IEEE J. Quantum Electric., **24** (1988) P.276.
- 10) 秋本誠志, 木場隆之, 横野牧生, 三室守, 山崎巖, 分光研究, **54** (2005) P.18.
- 11) M. A. Duguay & J. W. Hansen, Appl. Phys. Lett. **15** (1969) P.192.
- 12) 永原哲彦, 兼松泰男, 木下修一, 岡田正, 分光研究, **49** (2000) P.186.
- 13) I. Yamazaki, M. Mimuro, T. Murao, T. Yamazaki, K. Yoshihara, & Y. Fujita, Photochem. Photobiolo., **39** (1984) P.233.
- 14) S. Akimoto & M. Mimuro, Photochem. Photobiolo., **83** (2007) P.163.