HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	分光測定の基礎
Author(s)	小池, 裕幸
Description	4章 分光測定 1
Relation	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
Citation	低温科学, 67, 431-447
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39177
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-062.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

1．分光測定の基礎

小池　裕幸[1)]

分光測定は，今や生化学，分子生物学では欠かすことのできない基本測定法である．さらに，光合成の分野では光誘起の微少スペクトル変化の測定も，分光光度計を使ってなされる．本項ではこの分光測定の基礎と，その装置の仕組みを解説する．

Principles of spectrophotometry and measurement of action spectra and quantum yield

Hiroyuki Koike

Principles of spectrophotometry are described. Spectrophotometer is basically composed of three parts; light-source, a monochrometer and a detector. Properties of the three parts are described in detail. Techniques to measure spectra of turbid samples and the samples at 77K are also described. Principles and techniques to determine action spectra and quantum yields are described.

1.a　装置と基本原理

光合成にはたらく物質は紫外・可視から近赤外に吸収を持つものがほとんどで，この領域の吸収スペクトルを測定できる市販の分光光度計が，標準の測定装置になる．一方，光照射に伴う反応中心やシトクロム等の吸光度変化を測定する場合は，市販の分光光度計を改造したり，装置を自作したりすることが多い(4.2　分光測定法で詳述)．なお，測定試料はクロロフィルやカロチノイド等，可視部に吸収を持つものがほとんどであるが，光合成細菌の場合は1,000 nm付近まで吸収を持つ試料もある．また，透明なものばかりではなく，混濁試料の場合も多い．本項ではこれらの測定法も含めて，装置の原理および試料の測定法について解説する．

1.a.1　Lambert-Beerの法則

吸光度測定の原理は，単色光が試料を透過する間に吸収された光量を測定するものである．濃度 c (c mM) の試料を吸収セルに入れ，これに強度 I_0 の単色光が光路長 ℓ を透過したときに強度が I になったとする．単色光が試料中を dl 分だけ通過したときに吸収されて減少する光量を $-dI$ とすると，この量は微少区間 dl への入射光量 I に比例し，また通過距離 dl にも比例する．したがって，

$$-dI = k'Idl \tag{4.1}$$

と表すことができる．これを変形すると，

$$-\frac{dI}{I} = k'dl \tag{4.2}$$

となり，両辺をそれぞれ I_0 から I，0から ℓ まで積分すると，

$$-\int_0^I \frac{dI}{I} = k'\int_0^l dl \tag{4.3}$$

$$-(\ln I - \ln I_0) = k'l \tag{4.4}$$

$$-\ln\frac{I}{I_0} = k'l \tag{4.5}$$

これを常用対数に直すと，

$$-\log\frac{I}{I_0} = k_1 l \tag{4.6}$$

という式が得られる（底の変換の結果出現する定数を k' に掛けたものを新たに k_1 とした)．すなわち，透過光の強さは被測定試料の長さが増加すると指数関数的に減少する．

ここで，透過した単色光の中にある溶質分子 n は，試

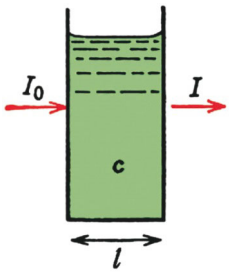


図4.1.1：光の吸収

1）中央大学理工学部生命科学科

料の長さ ℓ に比例するので，

$$-\log\frac{I}{I_0}=k_2 n \qquad (4.7)$$

とすることができる．この分子数 n は濃度 c に比例するので，

$$-\log\frac{I}{I_0}=k_3 c \qquad (4.8)$$

と書き換えることができる．したがって，透過光の強さは，溶液濃度が上がるに従い，やはり指数関数的に減少する．

以上のことから$-\log(I/I_0)$は光の通過距離にも，溶液の濃度にも比例することが分かる．したがって，$-\log(I/I_0)$は両者の積にも比例するため，

$$-\log\frac{I}{I_0}=\varepsilon cl \qquad (4.9)$$

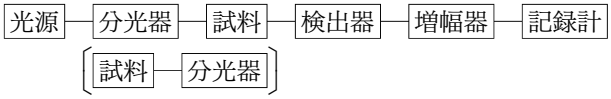
と書くことができる．ここで，ε は c をモル濃度で表したときの比例定数で，吸光係数（extinction coefficient）と呼ばれる．特に，c を mM で表したときの ε は mM 吸光係数（milimolar extinction coefficient）と呼ばれ，実際はこちらの方が多用される．また，I/I_0 を透過度（transmittance）といい，T で表す．これを％で表したときには透過率（percent transmittance）と呼び，T％と表現する．また，$-\log(I/I_0)$を吸光度（absorbance）といい，A で表す．したがって吸光度は，

$$A=-\log T=-\log\frac{I}{I_0}=\varepsilon cl \qquad (4.10)$$

と表すことができる．この法則は Lambert-Beer の法則と呼ばれ，分光測定の基本となる．この法則が成立するには，a）測定光は単色光で，b）溶液は透明，c）溶質の状態は濃度に依存しない（高濃度での分子同士の会合や，逆に低濃度での解離が起きたりして吸光係数が変化しない）という条件が必要である．

1.a.2　機器の構成

分光光度計には光源，分光器，検出器の 3 つが必須である．これは可視・紫外吸収スペクトル測定用の分光光度計だけでなく，蛍光光度計（蛍光を出す試料が光源に相当する）や，赤外分光光度計，放射光施設を用いた XENES 測定でも基本的に同じである．通常の紫外・可視分光光度計の場合は，光源として測定波長領域で発光があるもの，すなわち重水素放電管，タングステン・ハロゲンランプ，キセノンランプを用いる．光源からの光は分光器（モノクロメーター）で単色光にして試料に当てる．分光器は現在ほとんどの場合，回折格子が用いられているが，プリズムを組み合わせる場合もある．検出器としては光電子増倍管が普通用いられる．最近はフォトダイオードを使い，検出部をコンパクトにしたものもみられる．光電子増倍管は 900 nm より長波長では感度がほとんどなくなるので，光合成細菌のように 1,000 nm 付近まで測定する必要がある場合には PbS セルと併用している測定機を使う．検出された信号は増幅され，記録される．以前はレコーダー上に直接記録するものが主流であったが，最近は測定値はデジタル化されて分光光度計付属のディスプレイに表示されたり，コンピュータに転送されてグラフソフトで表示でき，データ処理が容易になった．



分光光度計の構成は上のようになっているが，分光器と試料の順序を入れ替えて，試料に白色光を照射し，分光器で分光した後，フォトダイオードアレイで検出して短時間の内にスペクトルを測定できる装置（ポリクロメーター）も売り出されている．HPLC 用には，単一波長をモニターする検出器のほかに，このタイプのものもよく使われる．

1.b　光源

上にも述べたように，測定波長域をカバーする連続光源が必要である．〝連続〟とは波長も，時間も切れ目のない（例えば輝線が非常に大きいとか，パルス的に光がでるようなものではない）光源という意味である．光照射で誘起される吸収変化を時間を変えて追跡するような場合に，光源からの単色光をシャッターを用いてミリ秒や秒単位で切り，その強度を測定する場合もあるが，ここでは割愛する．

1.b.1　重水素放電管

放電管中に数 Torr 程度の重水素を封入し，この中で放電を行うと 170～400 nm にわたって連続した発光スペクトルが得られる．発光部は放電電極を取り囲むように遮蔽ケースが置かれ，電極部に穴（ピンホール）が開いている．放電による発光はこの穴で起こる．このような重水素放電管を紫外部の吸収スペクトル測定用光源として用いる．生物試料用の紫外可視分光光度計では 190～370 nm の波長領域で用いられる．なお，可視部の 486.5 nm にも輝線があり，これは波長駆動部の波長校正などに使われる．

1.b.2　タングステンランプ（タングステンヨウ素ランプ）

可視光領域の吸収スペクトル測定に用いられる光源である．通常の測定波長領域は 370～900 nm だが，検出器

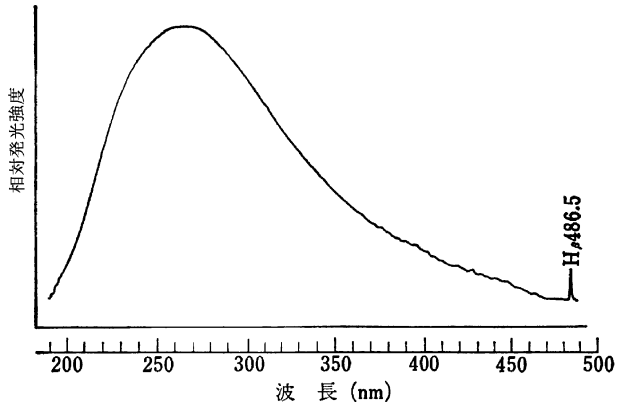


図 4.1.2：重水素ランプの発光スペクトル

を交換してさらに近赤外部までこの光源で測定出来る．タングステンランプは，平たく言うと普通の白熱電球で，以下のような特徴を持つ．①連続スペクトルを示す②赤～赤外部で強度が最大になる③輝度が高い④長時間安定に点灯できる．放射スペクトルは，ほぼ黒体放射の式に従う．すなわち，放射エネルギーの波長特性は発光体温度に依存する（図 4.1.3）．

ハロゲンランプ（ヨウ素ランプ）は，タングステンランプのフィラメントの寿命を延ばし，発光温度を高くできるようにしたものである．フィラメントに電流を通して発光させるとタングステンが気化する．気化したタングステンが，ランプの低温部でハロゲン（ヨウ素）と結合し，ハロゲン化タングステンが出来る．これがフィラメント付近の温度で分解して元に戻る．このため，フィラメントから気化したタングステンが絶えずフィラメントに供給されることでフィラメントの消耗が抑えられ，フィラメント温度を高くして発光ピークを短波長にすることができる．

1.b.3　キセノンランプ

キセノンランプを吸収スペクトル測定用の光源として

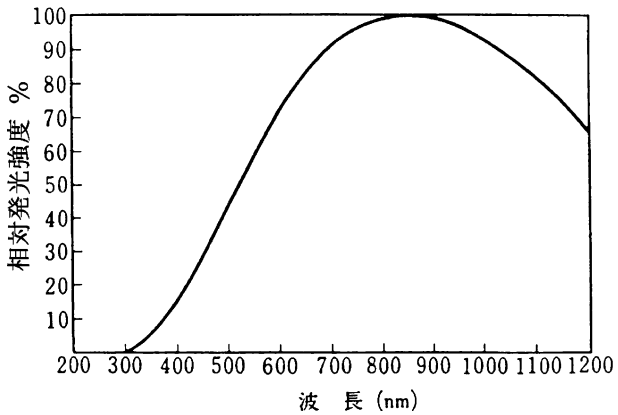


図 4.1.3：タングステンランプの発光スペクトル

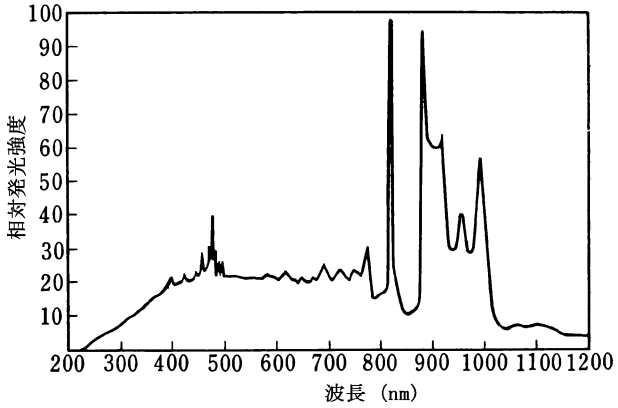


図 4.1.4：キセノンランプの発光スペクトル

使う例はあまりない．しかし，発光スペクトル(図 4.1.4)に示すように，近赤外部に輝線があるものの，400～750 nm にかけてほぼフラットな発光強度が得られるので，酸素発生型光合成生物から調製された試料の測定に有利である．ただ，一般的に発光強度が強く，長時間の照射は試料を損傷したり，測定光が励起光になって試料中の電子伝達成分が酸化や還元される．そのため，測定光用には，ニュートラルデンシティフィルター（減光フィルター）で減光したり，シャッターを用いて試料励起の前後のみにあてるといった工夫がいる．キセノンランプは発光管内部に 10 気圧程度のキセノンを封入し，電極間の放電で発光するので（図 4.1.5），発光面の揺らぎで光強度が微妙に揺らぎ，微少な吸光度変化の測定にはあまり適さない．数ミリ秒から数十ミリ秒程度の短時間なら発光面の変化は小さいので，フラッシュ励起後の短時間内の測定で，強い測定光を必要とする測定には用いられる．

1.c.1　分光器

連続スペクトルを示す光源から分光光度計に必要な単色光を取り出すための装置が分光器である．現在使われている主な分光器は反射型回折格子とプリズムである．それぞれ一長一短があるが，回折格子の方が分光光度計の波長駆動装置を単純化できるので，現在はこれが主流である．

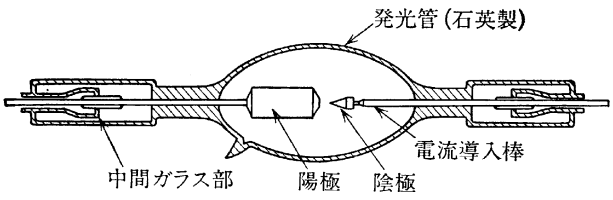


図 4.1.5：キセノンランプの構造

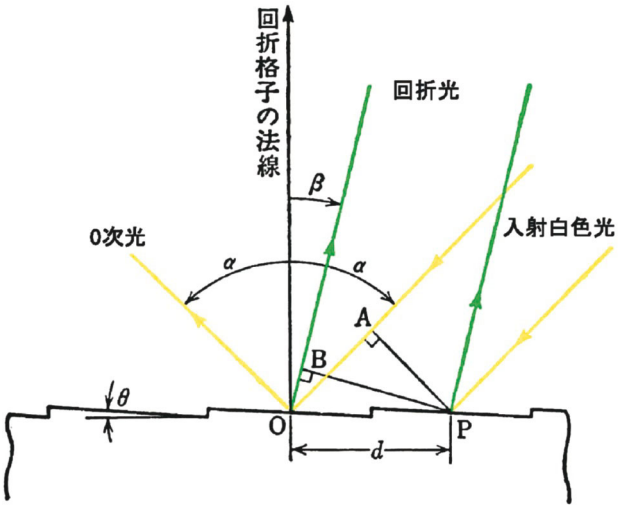


図 4.1.6：回折格子と回折光の反射

1.c.1　回折格子

回折格子は，図 4.1.6 に示すように，反射面に階段状の溝が一定幅で精密に刻まれた鏡である．回折格子に入射した白色光はそれぞれの溝で回折され，色々な方向に出ていく．回折光はそれぞれ互いに干渉し合い，位相が合わない大部分の波長光は弱めあい，特定波長の光が特定角度で回折された場合のみ強めあい，その波長の光が出る．この強め合う干渉波長は角度により連続的に変わるので，白色光がいわゆる虹色に分光される．

いま，回折格子に入射角 α で白色の平行光線が入ってきたとする．この時格子面で回折された光が回折角 β で反射して出ていくとする．この時互いに強め合う干渉が起こるためには，光の位相がＰ点とＢ点で揃っていなければならない．そのためには，線分 AO＋線分 OB が波長 λ の整数倍にならなければならない．

$$\overline{AO} = d\sin\alpha,\quad \overline{OB} = d\sin\beta \qquad (4.11)$$

であるから，光が強め合う回折条件は，

$$d(\sin\alpha + \sin\beta) = n\lambda \qquad (4.12)$$

と表せる．ここで，λ は波長，n は整数で，干渉次数と呼ばれる．

いま回折角 β が $\beta = -\alpha$，すなわち普通の鏡と同じように反射する場合，左辺が 0 なので，右辺は $n=0$ となる．この条件下では，波長 λ の値に依存せず上の式が成立する．これは 0 次光と呼ばれ，白色光が反射して出て行くことになる．次に $n \neq 0$ の時は，波長 λ が変わると回折条件（干渉を強める条件）を満たす回折角 β が変化する．このため，回折格子の角度を変えることで白色光を波長ごとに分離できる．

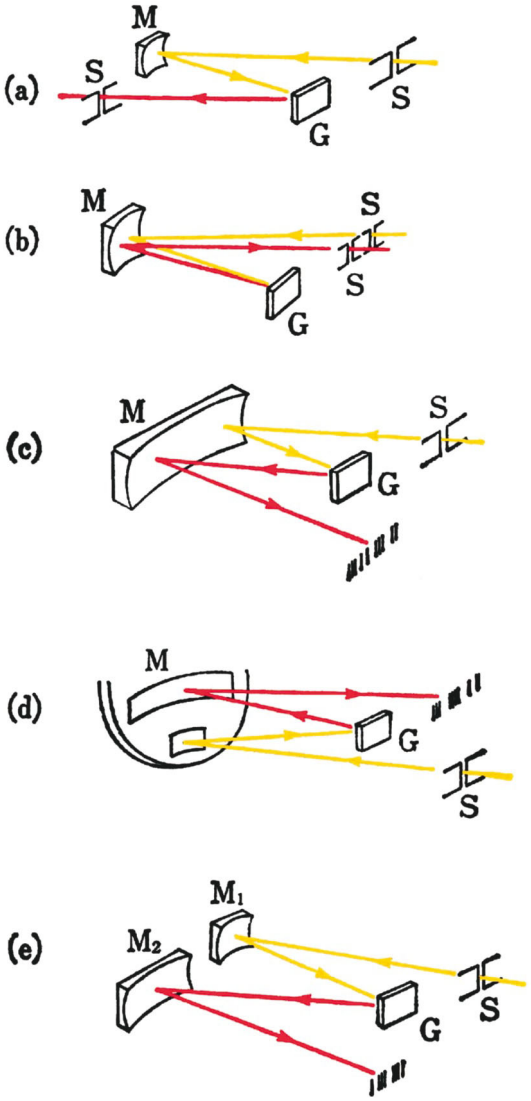


図 4.1.7：回折格子を使った光学系．文献(1)を改変

実際の回折格子を使った分光器では，図 4.1.7 に示すように 5 つの代表的な光学系が使われている[1]．上の 2 つは出射側にもスリットがつけられているので，単色光が取り出せ，モノクロメーターとして使われる．また，下の 3 つはモノクロメーターとしても使えるし，虹色に広がった複数波長の光を取り出すポリクロメーターとしても使うことができる．

上の式で示した回折条件は，$n=1$ の時だけではなく，$n=2, 3, \cdots\cdots$ の場合も成立し，これらの波長の光を高次光と呼ぶ．高次光の回折効率は非常に低いが，試料が λ の波長域の光を強く吸収するような場合には，吸収を受けない高次光が測定され誤った測定結果が得られる場合がある．この点については 4.2.2.b で解説する．

1.c.2　プリズム

小学校の理科の授業でも出てくるプリズムである．ガ

ラスの三角柱（石英でも透明アクリルでもよい）に光を通すと，屈折率が波長によって異なるのを利用して光を分離できる．

図 4.1.8(b)にプリズムを通る光線の光路を示す．いまプリズム面の法線に対して角度 α で白色光が入射し，屈折されて角 β でプリズム内を進み，反対側の面に角 β'で到達し，再び屈折されて角 α' で分光された光が出るとする．また，入射光と出射光のなす角を θ，プリズムの頂角を A とする．この時，

$$\sin\alpha = n\sin\beta \qquad (4.13)$$

$$\sin\alpha' = n\sin\beta' \qquad (4.14)$$

$$\alpha + \alpha' = A + \theta \qquad (4.15)$$

$$\beta + \beta' = A \qquad (4.16)$$

が成立する．ここで，n はプリズムの屈折率である．この式において，$\alpha = \alpha'$，$\beta = \beta'$のとき θ は最小になり，これを最小偏角という．普通プリズムは最小偏角か，それに近い条件で使用される．

プリズム分光器は回折格子と違って，原理的に高次光が混入しないのできれいな単色光を取り出せるという利点がある．ただし，光の分解能は波数（波長 λ の逆数）に比例するので，紫外部の分解能は高く赤外域の分解能は下がる．しかし，通常の紫外・可視分光光度計ではスペクトルは等間隔に目盛った波長に対してプロットされるので，これを機械的に補正しようとすると，プリズムの駆動系は回折格子の場合より複雑になる．

1.d　検出器

紫外・可視分光測定に用いられる検出器の主流は光電子増倍管である．これは光の光電効果を利用したものであり，光電子を増幅して検出するものである．もう一つは近赤外光領域で用いられるフォトセルである．これは，高抵抗の半導体に，入射する光の強度が増加すると電気抵抗が下がるという性質を利用している．フォトダイオード，CCD といった光起電力効果を利用する検出器も最近増加している．

1.d.1　光電子増倍管

光電子増倍管は，真空中で金属に負電圧をかけておき，これに光を当てると電子が放出される光電効果を利用したものである（図 4.1.9）．光電効果で光の粒子性を証明したことでアインシュタインはノーベル賞を受賞した．

光電子増倍管のガラス容器（バルブ）内の真空中に，光電面と 2 次電子放出電極とが納められている．光電面に入射した光は，光電効果で運動エネルギーを持つ電子を光電面から放出させる．これが光電子増倍管への印加電圧で光電面に対して正極になっている増倍電極（ダイノード）に衝突し，2 次電子を放出させる．光電面から 1 光子当たり 1 電子放出された電子は，さらに増倍電極から数倍の 2 次電子を出す．何段もの増倍電極で，衝突のたび毎に電子が増幅され最後に陽極（アノード）に達する(図 4.1.10)．ダイノード 1 段当たりの電子放出比が 4 で 10 段のダイノードで増倍すれば，$4^{10} \fallingdotseq 10^6$ 倍の電子増幅率となる．

光電子増倍管には，真空ガラス容器（バルブ）の側面から光が入るサイドオン型と頭端部から入るヘッドオン型がある(図 4.1.11)．サイドオン型では光が当たると内部金属電極上の光電面から光電子放出が起こる．一方ヘッドオン型では入射ガラス窓内面の光電面から光電子が放出される．大部分の市販分光光度計はサイドオン型を採用している．ヘッドオン型は，本体を試料に近づけ散乱された測定光も有効に捕捉できるので，混濁試料も測定できる分光光度計や，微弱光測定用の検出器として使われている．

光電子増倍管の感度は，使用する光電面により異なる[2]．紫外部にのみ感度があるものや，逆に近赤外の方が

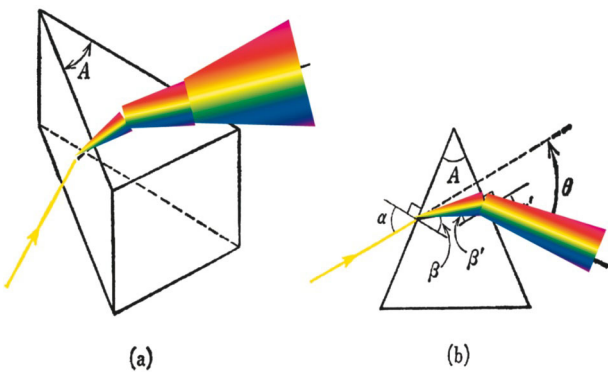


図 4.1.8：プリズムの形状（a）と光路の説明（b）

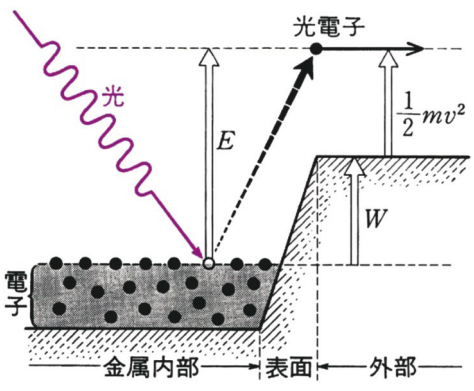


図 4.1.9：光電効果

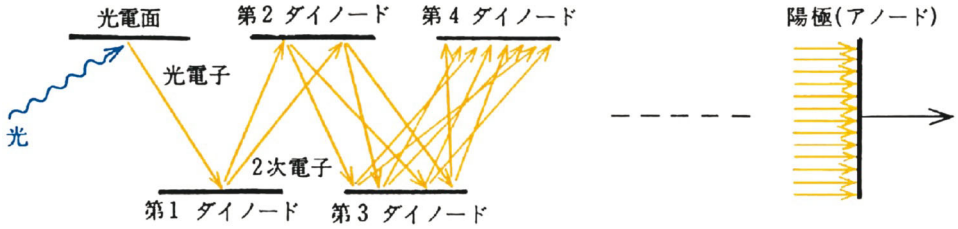


図 4.1.10：光電子増倍管の原理

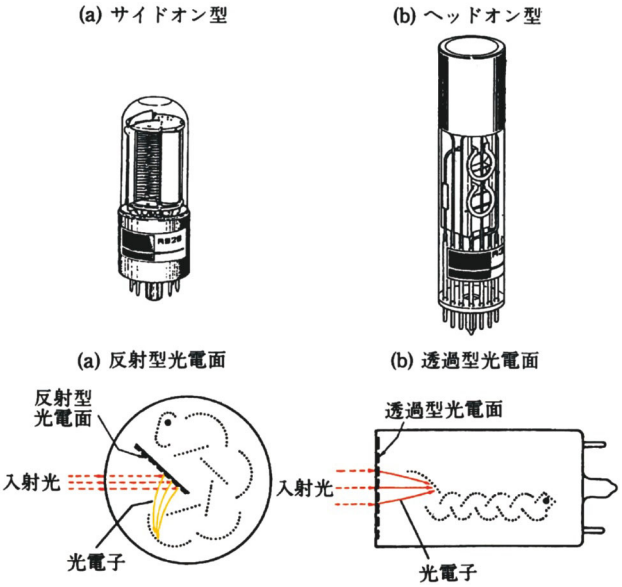


図 4.1.11：サイドオン型とヘッドオン型光電子増倍管の構造

感度が高いものがあり，用途に応じて（蛍光測定等）使い分ける(図 4.1.12)．

1.d.2　PbS セル

PbS セルは半導体光検出器の一種で，900 nm 以上の波長範囲のスペクトル測定に用いられる．高純度の半導体または不純物をドープした半導体が，光を吸収したときに電気伝導度が変化することを利用して光の検出を行うものである．光電子増倍管の感度は 900 nm 以上では急速に落ちるため(図 4.1.12)，近赤外部のスペクトル測定にはこの PbS セルが使われる．PbS セルは常温では 2,500 nm まで感度があるので，光合成細菌の吸収スペクトル測定には十分な感度を持つ．

1.d.3　CCD 検出器

CCD とは Charge Coupled Device の略で，電荷結合素子と訳される．CCD は半導体の基板表面にシリコン酸化膜のような絶縁膜を薄く貼り付け，その上にさらに多数の電極を配した構造をしている．フォトダイオードを小さくして（必然的に受光面積は小さくなる）多数配列させたというイメージである．各チャンネル（素子）に入力した光は電気量に変換されて蓄積される．この後，各電極間の適当な電位操作により，蓄積電荷を転送して読み出して，各チャンネルの電気量（入射光量）を測定する．CCD を使うと，回折格子（ポリクロメーター）で分離され虹色に広がった回折光全部を一挙に測定できるので，短時間でスペクトルを測定できる．この利点を生かして，時間ごとに次々と変化する試料の吸収スペクトルをほとんどオンタイムで測定でき，HPLC のモニターとしてよく使われている．また，回折格子を回転させないので，分光光度計の駆動部分が不要で，故障が減る．広い波長範囲をカバーするために，通常のイメージセンサより波長領域の広い 200〜700 nm に感度を持つものが使われる．

1.e　分光光度計

これまで分光光度計で心臓部をなす各部品について解説してきた．分光光度計の構成は，基本的にこれら 3 つの装置に，増幅器と記録計を繋げたものである．したがって，原理を理解すればこれらを組み合わせて分光光度計を自作する（組み立てる）ことも可能である．本節では分光光度計での測光法と光学系について例を示して解説する．

原理のところで述べたたように，ある溶液の吸光度を測定するためには，試料入射前の光強度 (I_0) と，試料透過後の光強度 (I) を測定する必要がある．通常の吸収スペクトルの測定では，試料を透過した光 (I) と，対照を透過した光 (I_0) の強度比を取り，吸光度を計算する．これには二つの方法がある．①まず測定光に対照試料をおいて I_0 を測定する．次に試料をおいて I を測定する．この比の対数を取り，吸光度とする．これはいわゆるシングルビームによる測定である．②もう一つは，測定光を二つに分け，一つは対照試料の入ったセルを通った光の強度を測定し(I_0 に当たる)，もう一つは測定試料の入ったセルを通った光の強度を測定して (I に当たる)，これを一つあるいは二つの検知器で検出して吸光度を求めるものである[3]．これはダブルビーム方式と呼ばれ，自記分光光度計はこの方式が採用されている．検出器は一つの

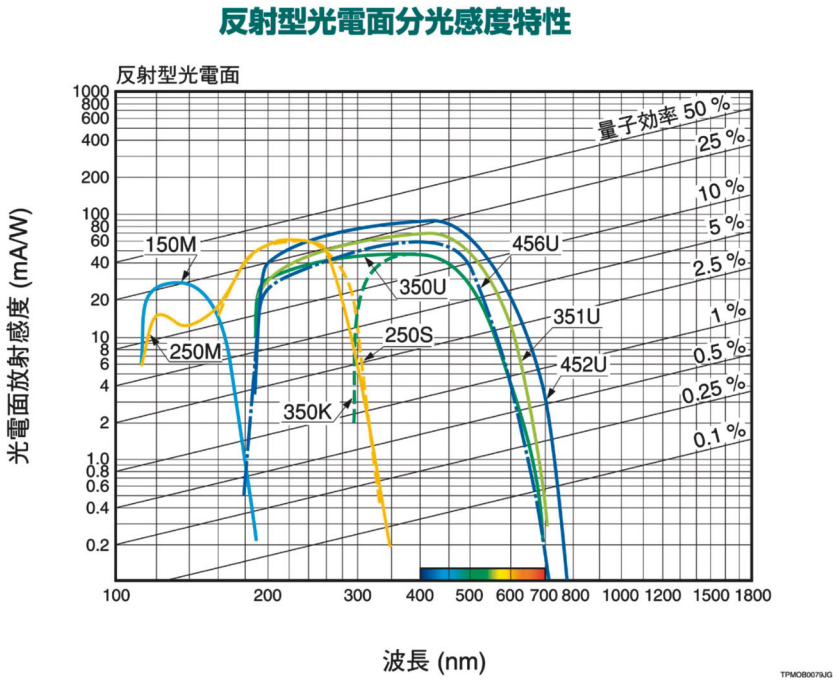


図 4.1.12：光電子増倍管の感度曲線　出典：浜松ホトニクス株式会社(文献（2))

ものが主流である．検出器が一つの場合，試料を透過した光強度に対する信号と，対照を透過した光強度に対する信号を別々に検出しなければならない．これには，モノクロメーターから取り出した単色光のビームを二つに分け，試料と対照とを交互に（時間的に分割して）入射させ，検出器からの信号を試料側と対照側の信号とに分離増幅し，吸光度に変換する方式がとられる．光束の分割は，回転する半円鏡（セクター）とその後ろの固定鏡によって行う(図 4.1.13 a, b, c, d)か，振動鏡(図 4.1.13

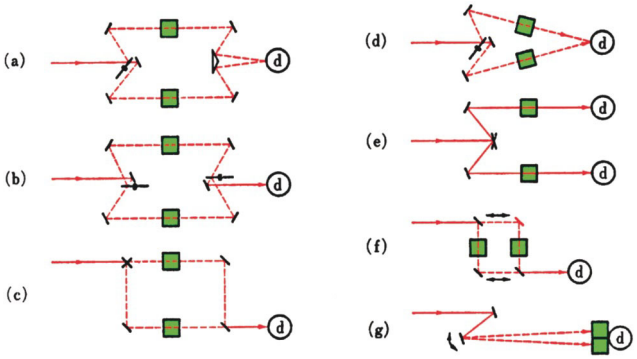


図 4.1.13：ダブルビームの作り方　文献（3）を改変

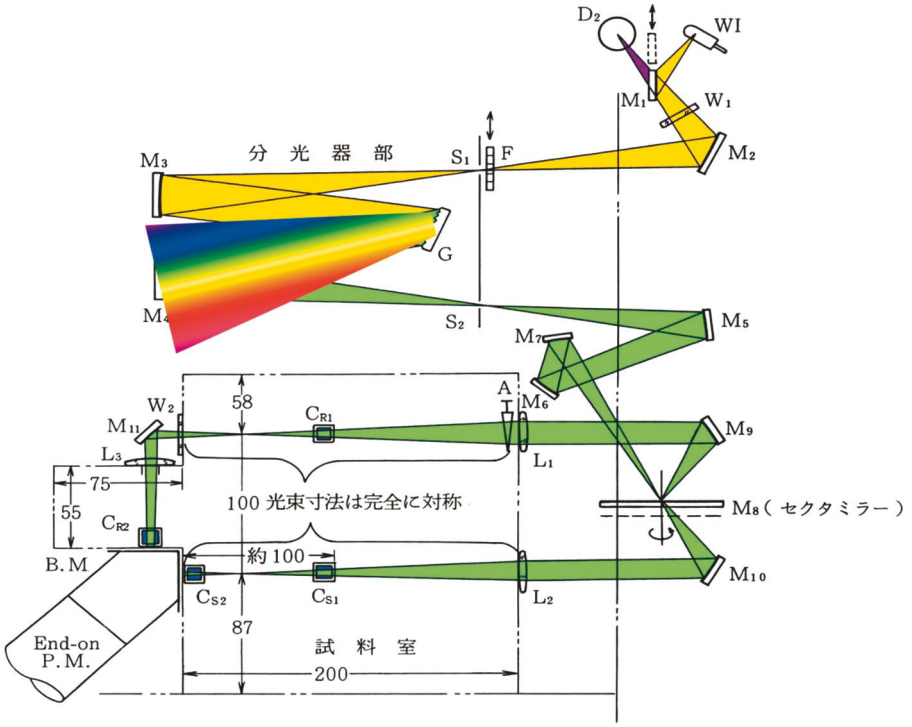


図 4.1.14：島津 MPS-2000 の光学系　文献（4）を改変

g）によって行う．測定光を分割する装置をビームスプリッターと呼ぶ．試料透過後の光はミラーあるいはハーフミラーで光束を揃え，検出器の同じ位置に入射させる．

1.e.1　分光光度計の光学系

光電子増倍管を検出器として用いた分光光度計の光学系の一例として島津 MPS-2000 の光学系を図 4.1.14 に示す[4]．測定光源である，重水素ランプ（D_2）またはタングステンヨウ素ランプ（WI）からの光は，測定波長範囲にあわせて，ミラーの挿入によって選択される．その後分光器の入射スリットを通って凹面鏡（コンケイブミラー）で平行光にされた後，グレーティング（G）で分光される．この光がもう一つの凹面鏡で出射スリットに集光され，単色光として取り出される．この光はセクターミラーで分割されて試料または対照光として別のキュベットを透過し，一つのヘッドオン型光電子増倍管で測定される．

フォトダイオードアレイ検出器を用いた分光光度計の光学系の原理を図 4.1.15 に示す．これは HPLC や，カラムクロマトグラフィーのモニター用として使われる分光光度計の例である．従来は，分光器で単色光にしてフローセルに通していたため，単一波長での溶出曲線しか取れず，分離された全ての成分を感度よく捉えるための波長を選択するのはほとんど不可能だった．しかしフォトダイオードアレイ検出器を使ったものでは，白色光がフローセルを通った後に分光するので，フローセルを通過する成分の吸収スペクトルを逐次測定していくことができる．そのため，単一波長のモニターでは見逃すような，予想外の波長にピークを持つ成分の検出も可能になった．モニターしたスペクトルを時間に対してプロットしていって，三次元表示を行うことも広く行われている．これはコンピュータの性能が飛躍的に向上したためで，フォトダイオードアレイ型検出器が広く使われるようになった要因の一つである．

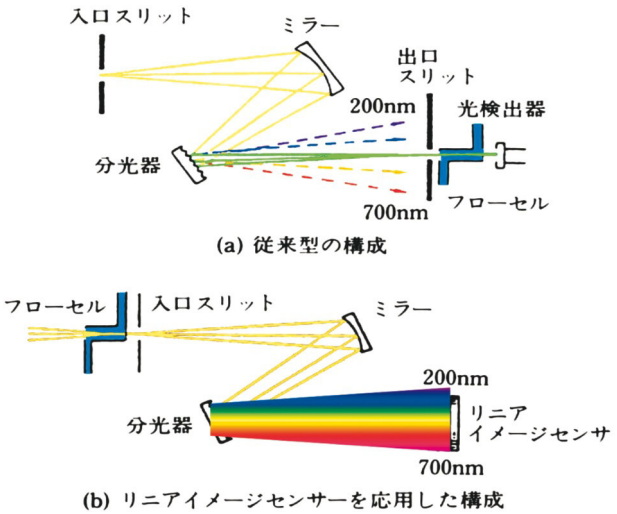


図 4.1.15：クロマトグラフィーモニターに使われる光学系

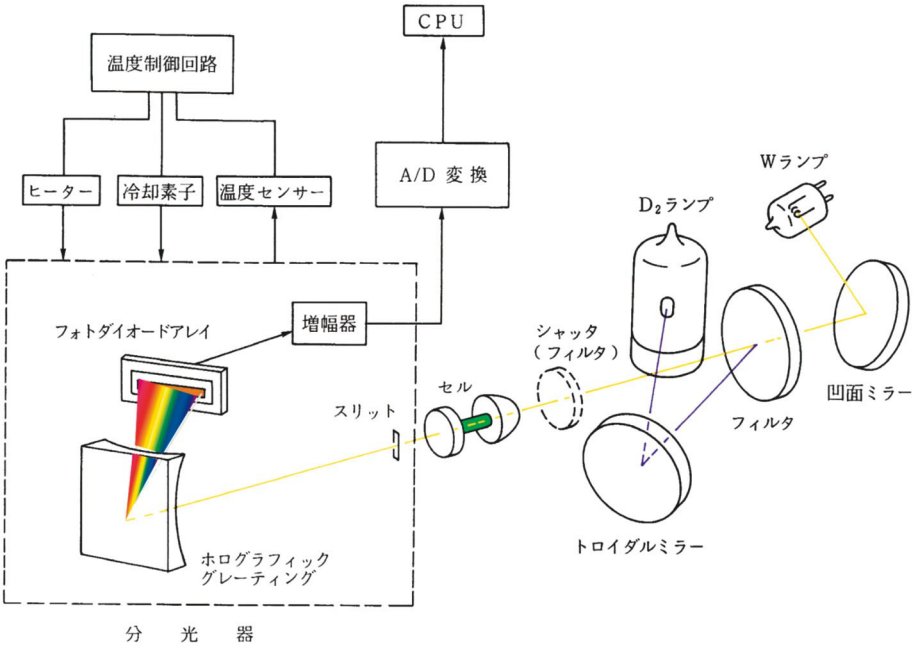


図 4.1.16：フォトダイオードアレイ型モニターの光学系　文献（5）を改変

フォトダイオードアレイ型検出器を使った，実際のモニターの光学系の例を図 4.1.16 に示す[5]．測定光源であるタングステンランプからの光と重水素ランプからの光は，フィルターを兼ねたハーフミラーによって完全に同一の光軸上に載せられ，紫外から可視までの光を含む白色光としてフローセルを通過する．この後，グレーティングにより分光され，512 素子のフォトダイオードアレイに結像させて吸収スペクトルを測定する．

1.f　吸収スペクトルの測定

吸収スペクトルを測定する場合，まず試料側，対照側ともに同一試料（通常は水あるいは緩衝液）を入れて，吸光度を波長に対して記録させる．これをベースラインと呼び，原理的には吸光度ゼロの直線が引かれるが，使用しているセルのマッチングが悪かったり，セルの微少な汚れやキズ，ビームが完全に対照になっていないための微妙な光強度，光の純度の違い，検知器への測定光の入射のしかたが同じでない，等で凹凸を示す．大半の市販自記分光光度計はこのベースラインをまず測定器本体のコンピュータに記憶させて，吸光度 0 の値として補正する．次に試料側に測定したい試料を入れて波長をスキャンし，対照試料に対する吸収曲線（ベースライン）から引いて，試料の吸収スペクトルとする．

1.f.1　測定誤差

最近の分光光度計は，吸光度表示は全てデジタル表示になっている．表示範囲も 0 ～ 2 または 4 というものもあり，吸光度の値を読み取るのは非常に簡単になっている．分光光度計の検出器からの直接出力は対照および試料を透過した光の強度に比例した電流値である．この時，通常は対照からの透過光の出力（電流値）を 100%T にしておくので，試料からの透過光の出力は透過率に相当する値になる（図 4.1.17 参照）．もし試料を透過率（T%）で測定するのなら，測定誤差は測定値全範囲で一定になる．しかし，吸光度の計算法（$A=-\log T=-\log(I/I_0)$）から，吸光度の値は濃度 c に比例するので，T の誤差は一定でも，$-\log T$ の誤差は一定にはならないので，吸光度値は全ての範囲で測定誤差は同じにはならない．

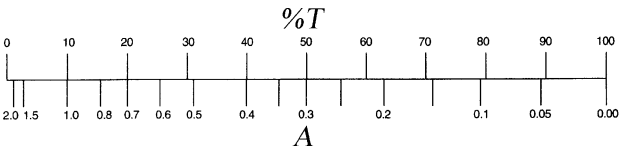


図 4.1.17：透過率と吸光度の関係

いま濃度の相対誤差 $\Delta c/c$ と ΔT との関係は，

$$A=-\ln T=\varepsilon' cl \quad -\frac{\Delta T}{T}=\varepsilon'\Delta cl \qquad (4.17)$$

となる．ここで，ε'は，常用対数ではなく，自然対数で表したことによる係数を含んでいる．上式の両辺を $\varepsilon' cl$ で割ると，

$$\frac{\Delta c}{c}=-\frac{\Delta T}{T\cdot\varepsilon' cl}=\frac{\Delta T}{T\cdot\ln T} \qquad (4.18)$$

$$\frac{\Delta c/c}{\Delta T}=\frac{1}{T\cdot\ln T}\equiv F \qquad (4.19)$$

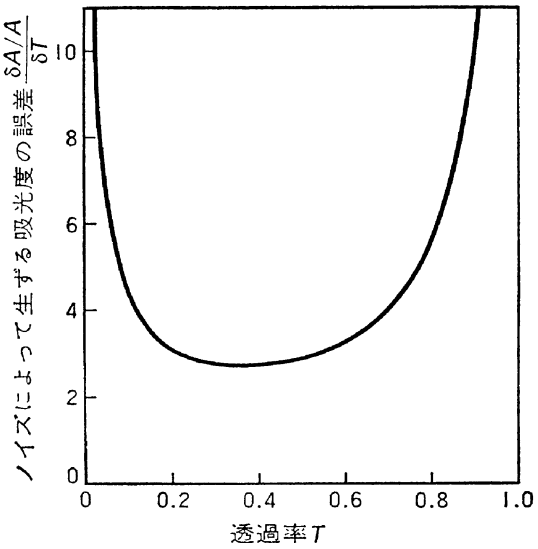


図 4.1.18：測定値の相対誤差

となる．この F を誤差関数といい，透過率の誤差(ΔT)を 1 %としたときの F と T の関係は，図 4.1.18 のようになる．この時の極小値は，

$$\frac{d(T\ln T)}{dT}=\ln T+\frac{T}{T}=\ln T+1=0 \qquad (4.20)$$

$$-\ln T=1,\ \ln T=-1,\ T=e^{-1},\ T=0.368 \qquad (4.21)$$

つまり，36.8%T（A=0.434）のところで誤差が最小となる．このグラフから，吸光度測定を行うときは，誤差の小さい 10〜80%T（A=0.1〜1.0）の範囲に試料濃度を調整した方がよいことになる．

ただ，最近の分光光度計は透過率の測定誤差がもっと低く抑えられているので，より高濃度部分での測定値もかなり信用できる．

しかし，常に心がけておかねばならないのは，表示される吸光度の値はゼロ付近と高い吸光度の所では測定誤差が大きいことである．デジタルで表示された値をそのまま信用してはならない．

1.f.2　迷光の影響[6)]

単色光には，モノクロメーターの構造と，入射および出射スリットの幅に依存した，ある波長幅を持った光が含まれている．また，モノクロメーター内部で乱反射した光が単色光と同じ光軸で出てくることもある．さらに，グレーティングを使って単色光を作る場合，除去しきれない高次光が混ざっている．これら単色光に含まれる，目的としない光を迷光と呼んでいる．測定したスペクトルに迷光の影響が現れやすいのは，紫外部と近赤外部である．それは，グレーティングの回折効率がこれらの領域で悪くなり目的とする単色光の強度が落ちることと，光電子増倍管の感度が下がることによる．また，試料の

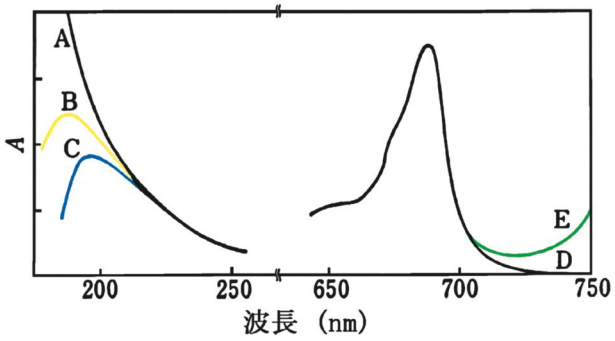


図 4.1.19：吸収スペクトルに対する迷光の影響　文献 (6) を改変

吸収が強い波長でも迷光の影響が出やすい．

紫外部の場合，正しくは図 4.1.19 の曲線 A のような吸収スペクトルを示すものが，長波長の迷光で曲線 B や C のように，あたかも吸収ピークを持つようなスペクトルを示すことがある．また，本来吸収がない 750 nm 付近（曲線 D）で，長波長になるに従って吸収があがるスペクトルになることがある．これは，混入している短波長の迷光を試料が吸収するためである．

また，検量線を作成する場合，ある吸光度以上で検量線が直線から下にずれることがある．これも迷光の影響であることが多い．

迷光の影響を減らすには，迷光の少ないモノクロメーターを使う，測定波長範囲で十分な感度を持つ光電子増倍管を使う，モノクロメーターの入射側に適切なフィルターを入れて高次光を除く，等が対策となる．

1.f.3　混濁試料の測定

光合成生物由来の試料には不透明なものが多い．光合成細菌や藻類などの生細胞や単離したチラコイド膜はそのよい例である．通常の分光光度計は透明試料を測定す

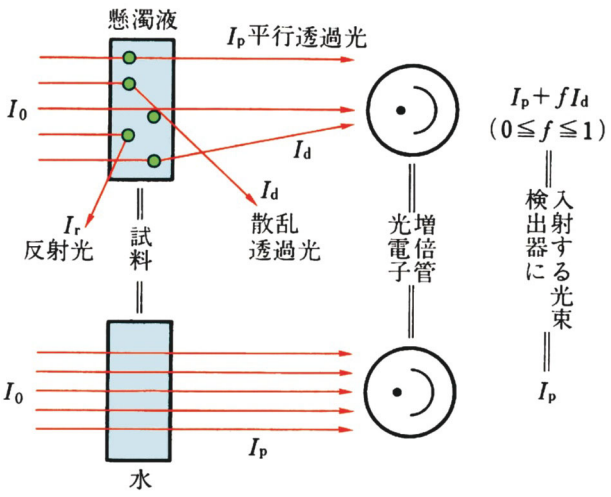


図 4.1.20：混濁試料を透過する測定光

るために作られている．そのため，試料と検出器（光電子増倍管）間の距離が比較的遠い．また，使われている光電子増倍管はサイドオン型なので，受光面積が狭く受光範囲が散乱に影響される．

混濁試料は，母液中に微小な粒子が浮遊している状態と考えることができる．いま，混濁試料に平行な測定光が入射された場合を考える．この時測定光 I について，①試料中の粒子に一度も当たらずに素通りする（I_p），②粒子に当たって吸収が起こり，吸収され残った光が前方に散乱される（I_d），③吸収され残った光が後方に散乱される（I_r）の 3 つの場合が考えられる．実際には，I_r は無視できるので，試料からの透過光の強さは I_p と I_d の和と考えて差し支えない．ここで，I_p はそのまま透過してきた光なので，平行光として検出器に入射される．一方 I_d は散乱光なので，円錐状に後方に散乱されていくことになる．通常の分光光度計は，試料と検出器の間が離れているので，I_p は全量を検出できる（そのように設計されている）が，I_d はその一部分のみが検出されるだけである．散乱光強度 I_d にかかる係数 f は，分光光度計の検出器（光電子増倍管）が捉える散乱光の割合で，試料と検出器間の距離が長くなると f は距離の自乗に反比例して急激に小さくなる．普通の分光光度計の場合，この値は数百分の 1 のオーダーになるため実質的に fI_d はゼロで，吸光度 A は試料に吸収されたかどうかということとは無関係に，I_0/I_p で決定されることになる．さらに，I_0/I_p は波長にほとんど依存しないので，波長による変化がほとんど見られないスペクトルとなってしまう．

懸濁試料の吸収スペクトルが正しく測定できないのは，試料によって測定光

$$A=-\log\frac{I}{I_0}=\log\frac{I_0}{I}=\log\frac{I_0}{I_p+fI_d} \qquad (4.22)$$

ここで，$I=I_p+fI_d$，$0\leq f\leq 1$ である．

が散乱されるためである．その解決策としては，①対照試料の測定光も同じように散乱させる（I_0 も同じような散乱効果を与える）か，②検知器を試料に密着させる（f の値を 1 に近づける）．①には，積分球を使う方法と，オパールグラスを使う方法がある．②には，このために設計された特殊な分光光度計が必要となる．

① オパールグラス法[7]

オパールグラス法は，通常の分光光度計を使って比較的簡便に吸収スペクトルを測定する方法である（図 4.1.21）．オパールグラスは不透明に近い散乱板で，平行光（対照試料からの測定光）も，散乱光（混濁試料からの測定光）も区別なく一様に散乱させるので，試料，対照とも同じ程度に混濁した試料が入った状態で測定することとほぼ同じになる．したがって，検出器では対照側，試料側ともに入射光の一部のみが測定され，その結果試料の吸収スペクトルにほぼ忠実な測定光の信号が得られ，懸濁試料の吸収スペクトルが測定できる．図 4.1.22 の曲線Ａは，通常の測定法でクロレラの懸濁液を測定した場合で，特徴的な吸収スペクトルが得られない．オパールグラスを対照，試料両側に挿入して測定すると曲線Ｂのスペクトルが得られる．これはクロレラ懸濁液から有機溶媒で色素を抽出した，透明な溶液の吸収スペクトル（曲線Ｃ）とよく似ている．普通の分光光度計を使って混濁試料の吸収スペクトルを測定する際には，オパールグラスを使うのが有効であることが分かる．

問題点としては，オパールグラスによって対照光も散乱されるため，光電子増倍管に入射する光量がかなり低下する点である．対照光が絞られると，感度を上げるために光電子増倍管への印加電圧が高まり，それに伴うノイズが多くなる．特に光電子増倍管の感度が低下する短

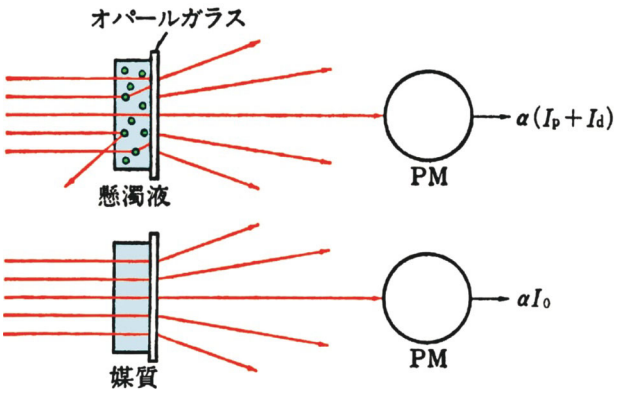


図 4.1.21：オパールグラス法の原理

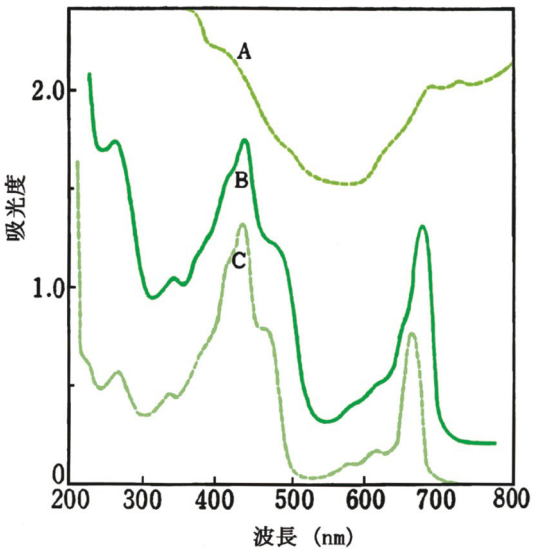


図 4.1.22：オパールグラス法による測定例　文献 (7) を改変

波長側でその傾向が目立つようになる．

② 検出器密着法[8)]

もう一つの解決法として，散乱光も捉えて吸収スペクトルを測定する方法である．このために光電子増倍管を試料セルに密着させて，散乱光をほとんど全て捉える方法が工夫されている．これには，受光面が広く，かつ平面になっているヘッドオン型光電子増倍管が使われる．この場合，対照は通常透明な溶液を使うので，対照光は光電面の一部だけに強く入射するので，その場所だけが激しく劣化する危険性がある．また，なるべく広く光電面を使う方が場所による感度差が少なくなるので，石英板をスリにして（磨りガラスと同じだがガラスは紫外線を透過しないので石英ガラスを使う），セルの後ろまたは光電子増倍管の前に置いて測定光を散乱させて測定するのが普通であるが，これでも問題は完全には解決されない．これらの問題をある程度解決する方法として，光散乱させる磨り石英板と光電子増倍管の間をある程度離して測定するという工夫がなされている（図 4.1.23）．このような光学系の例を，図 4.1.14 に示した．

1.f.4 低温吸収スペクトル

紫外・可視領域における吸収スペクトルは，測定分子の，基底状態から励起状態への電子状態の遷移を測定するもので，電子スペクトルに相当する．

ところで，分子が持つ内部エネルギーには，回転，振動，電子の三種類がある．紫外―可視吸収スペクトルの測定はそのうちの電子エネルギーの遷移を測定するものだが，それぞれの電子状態はその準位内に振動と回転準位を含む．振動準位間の遷移は室温程度の熱エネルギーで容易に励起されるので，基底状態にある分子の電子状態中にも，広い振動準位の分布がある．これを低温（たとえば 77 K）に冷却すると，電子の多くは振動準位の基底状態または第 1 励起状態に落ちる．光の吸収による電子状態の遷移も，室温では様々な振動準位から遷移するため，吸収スペクトルの半値幅は広く，吸収ピークは低くなる（図 4.1.24 左）．一方低温では，低い振動準位に多くの電子が存在している状態から，光の吸収で励起状態に遷移するので，半値幅が狭く，ピークは高くなる．また，低い振動準位から励起状態に上げるために，室温より多少高いエネルギーが必要になり，吸収ピークは室温より短波長側にシフトする（図 4.1.24 右）．したがって，低温で吸収スペクトルを測定すると吸収型（吸収フォーム）の違いが室温より明瞭になる．

実際に葉緑体の吸収スペクトルの測定例を図 4.1.25 に示す[9)]．室温では 680 nm 付近に一つのなだらかなピークを示すだけだが，液体窒素温度 77 K ではピークが鋭くなり，いくつかの肩が見られるようになり，同じクロロフィル a でもタンパク質に結合した状態ではその吸収ピークがいくつかの型（クロロフィルフォーム）に分かれるのが見て取れる．

低温といっても，数 K から 273 K（0°C）まで広いが，液体窒素温度（77 K）またはドライアイス ── メタノー

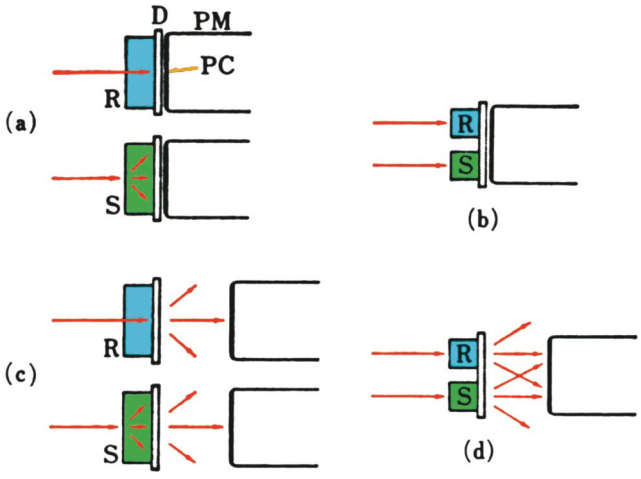


図 4.1.23：検出器密着法　文献（8）を改変

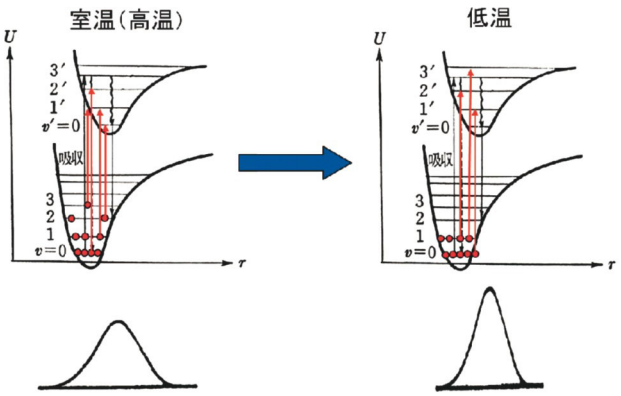


図 4.1.24：室温と低温における分子のエネルギー準位と遷移および吸収スペクトル

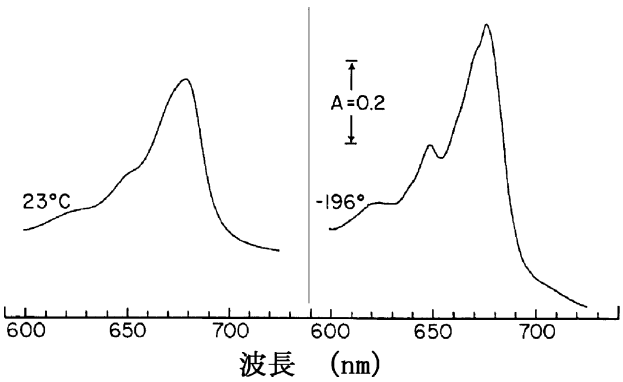


図 4.1.25：葉緑体の室温と液体窒素温度での吸収スペクトル　文献（9）を改変

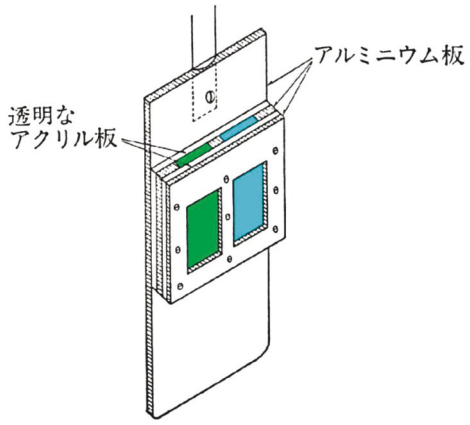


図 4.1.26：低温スペクトル用サンプルホルダー（1）

ル温度（−79℃）での測定が簡便なためよく用いられる．本項では，液体窒素温度での吸収スペクトル測定に必要な付属装置について述べる．液体ヘリウム温度または寒剤のみでは到達できない温度での測定には通常クライオスタットが用いられる．この装置はやや高価で，複雑である．生体試料の低温スペクトル測定の詳しい解説は他の成書[10]を参照していただきたい．

液体窒素温度での測定には専用のデュワー瓶（魔法瓶）を使用する．普通のデュワー瓶は保温性を上げるためにメッキが施されているが，吸収スペクトル測定用では測定光の通路部だけ窓状，または帯状にメッキしていないものが用いられる．

サンプルホルダーは，図 4.1.26 に示したようなものが一般的である．図 4.1.27 はサンプルホルダー全体を横から見た図である[11]．これは，アルミ板に四角く窓を開けたものに，サンプル保持用のアルミ枠をアクリル板で挟んだ構造になっている．サンプルはこのアクリル板の間の隙間に注入して凍らせる．試料を凍らせるには，液体窒素を入れた別のデュワー瓶にサンプルホルダーを静かに入れるだけでよい．最初は液体窒素が沸騰するが，全体が低温になるとおさまるので，測定用のデュワー瓶に移して測定を開始する．低温スペクトル測定装置の光学系の一例を図 4.1.28 に示す[11]．

測定用のデュワー瓶にも液体窒素を入れておき，サンプルホルダーのアルミ板がそれに浸るようにする．通常は窓の下あたりまで液体窒素を入れる．試料を全部液体窒素に漬けると，気化した窒素の泡が上がり吸光度が安定しない．

試料はグリセロールやショ糖を含む場合がある．このような試料を急速に凍らせると透明なまま凍るが，大きなひび割れができる．これをそのまま測定に用いると，測定中にさらにひび割れができてベースラインが途中で

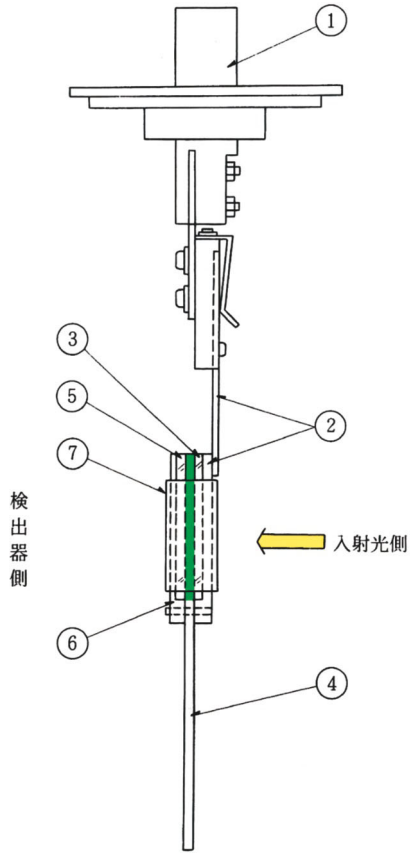


図 4.1.27：低温スペクトル用サンプルホルダー（2）文献（11）を改変

飛んだり，吸収スペクトルが異常になったりする．これを避けるために，試料を−50℃ぐらいまでいったん暖める．すると突然白濁し，氷の微結晶ができて試料がオパールグラス状になり，安定した状態になる．この状態から再び冷却して測定する．また，この微結晶のために測定光の多重吸収が起こり，吸光度が増加する利点もある．（クライオスタット中や熱伝導などで，55%以上のグリセロール存在下でゆっくり凍らせると透明な氷ができる）．スペクトル測定後はサンプルホルダーを水道水の中に入れて融かす．その後洗瓶でよく洗い，細く切った濾紙でセルに残った水を除き，次の測定に用いる．

窓剤として使うアクリル板は液体窒素に浸しても割れたりしないので都合がよい．しかし，紫外線を透過しないので紫外部の吸収スペクトルは測定できないことに注意する．分解可能なサンプルホルダーは，その日の測定が終了したら分解して乾燥させておく．

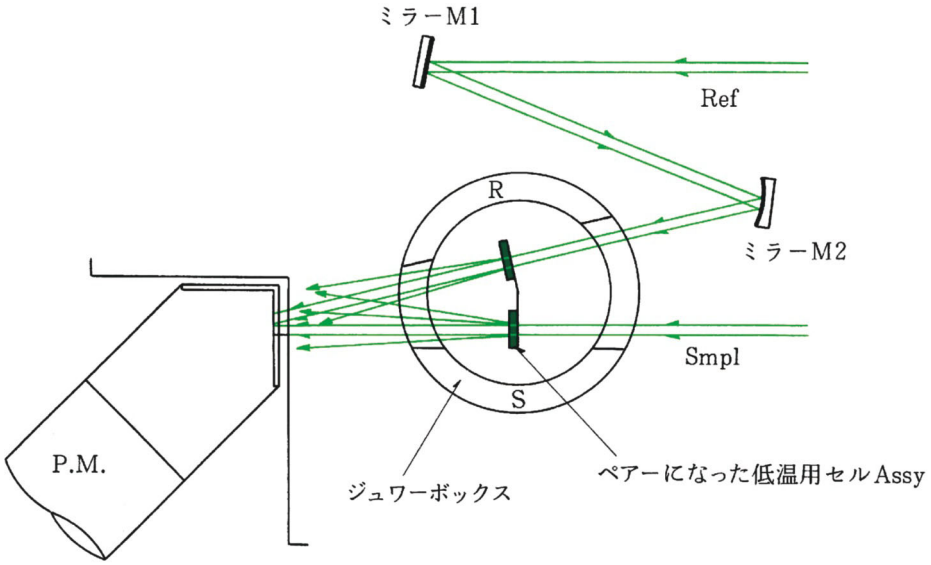


図 4.1.28：低温スペクトル測定装置の例　文献（11）を改変

1.g　作用スペクトルと量子収率

1.g.1　原理

光合成に限らず，光照射で何らかの反応が起こる場合，一定の光量（光量子またはエネルギー）で起こる反応量または反応速度を，照射光の波長に対してプロットしたものが作用スペクトルである．フィトクロームのように，生体中での光受容物質の量が極端に少なく，吸収スペクトルでは検出できない場合でも，作用スペクトルの測定で，その光受容物質の吸収スペクトルを推定することが可能である．また，光合成系のように，多数の色素（吸収フォーム）によって吸収された光が光化学反応を起こす場合，色素間のエネルギー移動や光化学系Ⅰ，Ⅱの関与を解析する手段としても有効な手法である．

ある反応系に，単色光の波長 λ の光量子を単位時間あたり N_0 個照射し，測定対象が N 個の光量子を吸収したとする．この照射を時間 t だけ行い，反応量 P_λ が得られたとする．このとき，波長 λ における反応は

$$P_\lambda/(N_0 t) \qquad (4.23)$$

で表され，作用スペクトル（action spectrum）はこれの，波長 λ を変えたときの関数として定義される．

作用スペクトルの測定は，光受容物質による光の吸収が反応全体を律速する条件で行わなければならない．つまり，反応は，与えた光強度と照射時間に比例する条件が必要である．したがって，試料はそのような条件を満たすような希釈されたものを用いる必要がある（ただし，逆に光が全て吸収されるように濃い試料を用い，照射した単色光の光強度（光量子）と反応量から作用スペクトルを測定する方法もある）．波長 λ の光を照射したとき，その反応量 P_λ と吸収された全光量子 $N\cdot t$ は比例関係にある．このときの比例定数を ϕ とすると，

$$P_\lambda = \phi \cdot N \cdot t \qquad (4.24)$$

と表すことができる．この比例定数 ϕ を量子収率（quantum yield）と呼ぶ．すると，作用スペクトル測定における波長 λ の反応は，

$$P_\lambda/(N_0 t) = \phi \cdot N \cdot t/(N_0 t) = \phi \cdot N/N_0 \qquad (4.25)$$

と表せる．したがって，作用スペクトルは量子収率 ϕ と吸収率 N/N_0 の積についての波長依存性と考えることができる．

ここで，量子収率 ϕ は光受容物質に吸収された光量子当たりの反応（分子）数であったので，一種類の光受容物質のみが反応する場合には ϕ の値はその光受容物質の吸収波長全域に渡って一定の値をとるということに注意する．つまり，ある一種類の色素が光を吸収して反応を起こす場合，標的色素が光を吸収して反応するのなら，どの波長の光であってもその効率は同じであるということである．したがって，試料濃度が高く，N/N_0 が 1 に近いようなところでは，量子収率が見かけ上波長に依存するような測定結果が得られてしまう（もちろん光合成系のように複数の色素が反応に関与していたり，色素間のエネルギー転移の効率が最終的な反応量に反映されるような場合は，量子収率は実際に照射波長に依存する）．

通常作用スペクトルは吸収スペクトルに関連させてプ

ロットされる．式 4.25 は，物質の吸収率 N/N_0 の関数となっていた．通常使う吸光度は透過率 T の常用対数をとったものである．透過率は，

$$T=1-N/N_0 \tag{4.26}$$

で表されるので，光受容物質の吸光度を A としたとき，

$$A=-\log T=-\log(1-N/N_0) \tag{4.27}$$
$$-A=\log(1-N/N_0) \tag{4.28}$$
$$-A=\ln(1-N/N_0)/\ln 10 \tag{4.29}$$
$$\exp(-A\cdot\ln 10)=1-N/N_0 \tag{4.30}$$
$$N/N_0=1-\exp(-2.303\,A) \tag{4.31}$$

となる．いま，N/N_0 と A が十分に小さければ，

$$N/N_0=2.303\,A \tag{4.32}$$

と表せる．したがって，

$$P_\lambda/(N_0\cdot t)=\phi N/N_0=2.303\phi\cdot A \tag{4.33}$$

となり，作用スペクトルを光受容物質の吸収スペクトルと対比できる．この関係式を満たす測定には，試料濃度を低く抑える必要がある．試料濃度が高いと作用スペクトルは吸光度ではなく，吸収率で表されるスペクトルに近づき，波長依存性は不明瞭になる．

1.g.2　作用スペクトルの測定

作用スペクトルの測定には，反応を測定するための装置に加え，光を照射するための光源，そこから単色光を取り出す器具，光量子または光のエネルギーを測定する装置が必要になる．

光源は，連続スペクトルを持つタングステンランプや，白熱球，またはキセノンランプがよい．

単色光を取り出す器具としては分光器が考えられるが，これは波長精度はよいものの，どうしても光強度が低くなる．また，適当なフィルターの組み合わせで高次光を除かなければならないという欠点がある．そのため，波長精度は落ちるが，干渉フィルターを用いて測定することが多い．干渉フィルターは 10 nm 程度の半値幅を持つものが一般的である．従来の干渉フィルターは，得られる強度は強いが，透過する波長の幅が広いという欠点があった．しかし最近は金属薄膜を多重蒸着させた，透過率が高く，かつ切れのよい干渉フィルターがあり，高い波長精度で単色光を取り出すことができる．

干渉フィルターはその性質上，照射光をフィルターに対して垂直に当てる必要がある．斜めに入射すると透過波長が変わるので，注意が必要である．また，干渉フィルターといっても高次光を通す「窓」が長波長側（近赤外から赤外）に出現するので，熱線カットフィルターや水の層を通して除去する．

そのほかに，最近では発光ダイオードで，安価，容易に単色光光源を作ることが可能になった．青色発光ダイオードも実用化され，青から赤まで，ほぼは全波長範囲に渡ってそろえることができる．青色部はまだ高輝度のものは得られていないが，2 ～ 3 個合わせて使えば問題はない．赤色部では超高輝度のものまで入手できる．680 nm 以上の波長範囲の発光ダイオードはあまり多くない．

LED 光源には，直流安定化電源が一つあれば十分である．これに抵抗を入れ，定格電圧で発光させればよい．平行光や収束光を作るにはそれなりのランプハウスとレンズがいるが，円錐形にした厚紙の内側にアルミホイルを貼ったものでも十分使用できる．

発光ダイオードは定格電圧以下でも発光が始まり，電圧を上げる輝度が上がり，発光ピークが 1～2 nm，場合によっては 5 nm ほどシフトすることがあるので注意が必要である．蛍光光度計の試料室に発光ダイオードを置き，励起光を遮断してスペクトル測定すれば発光スペクトルが得られるので，正確な発光波長を求めておくことを勧める．

さらに，分光器を使うにせよ，干渉フィルターを使うにせよ，装置の隅をまわって迷光が入り込むことがあるので，これを除くように注意しなければならない．

光量測定には，専用の熱電対が用いられてきた．これは，熱電対を何段にも重ね，受光部内部を黒くして光を全て熱に変換して測定するもので，専用の道具（サーモパイル）として購入できた．波長感度特性が波長によって変わらず，入射光が全て熱に変わるという前提で，温度上昇に比例した起電力が生ずるのでこれを記録すればよい．たいていは感度の校正値が付いてくるので，エネルギーに換算する．赤外線を十分に除き，照射波長の光だけをサーモパイルに導入する．得られる値はエネルギーなので，測定した波長ごとに光量子数に換算する必要がある．

最近は，照射光強度を直接光量子数として計測換算できる光量子センサーが市販されている．今のところ可視光領域でのみ測定できるが，センサーとしては，感度にあまり波長依存性のないフォトダイオードを使用している．

実際の測定に際しては，測定条件で反応が飽和しないことに注意する．特定波長（通常は反応が一番大きく出ると予想される波長）を選び，時間当たりの光強度 N_0 の光を一定時間照射して反応量（P）を測定する．このとき，

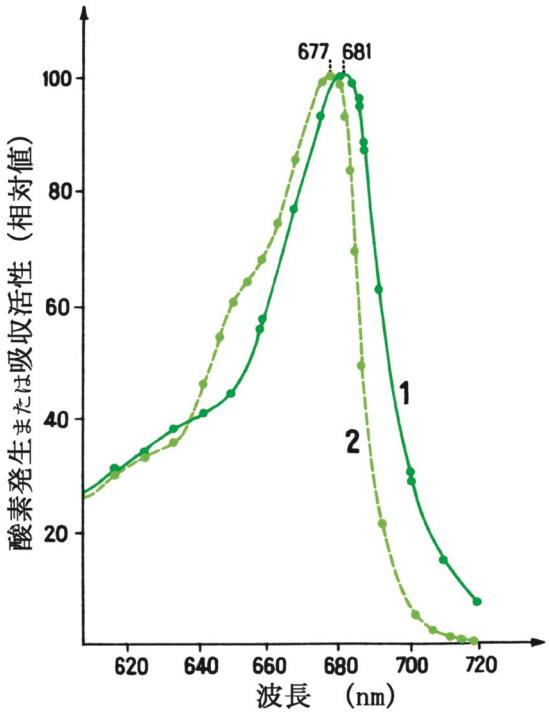


図 4.1.29：異なるバックグラウンド光を照射したときの，酸素発生または吸収に対する作用スペクトル　文献(12)を改変

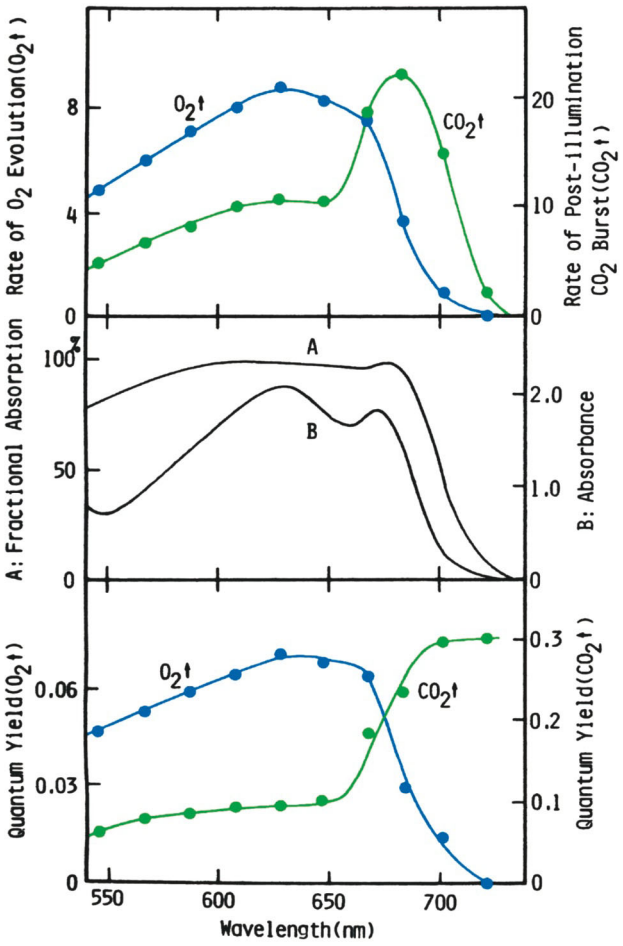


図 4.1.30：ラン藻細胞における酸素発生と重炭酸イオンの取り込み量に対する作用スペクトルと，それらの量子収率　文献（13）を改変

反応量が照射時間 t に比例していることを確認する．同時にいくつかの異なる光量を選んで測定し，反応が十分大きく，かつ比例関係にある光量を選んでおく．この条件が見つかれば，N_0 を一定にして t を変化させても，逆に t を一定にして N_0 を変化させても同じ結果が得られるはずである．このような比例関係が満たされていれば，波長 λ を変えて試料を一定時間照射し，得られた反応量 P_λ をプロットすれば作用スペクトルが得られる．厳密に作用スペクトルを求めるのなら，$P=\alpha\cdot N_0\cdot t$ の比例関係から α を波長に対してプロットする．

作用スペクトルの例を，図 4.1.29 に示す[12]．これは，ホウレンソウの葉緑体にバックグラウンド光を照射しておき，波長の異なる，90 Hz で変調した作用光を照射したときの活性の変化量を，波長に対してプロットしたものである．

曲線 1 は，系 II 光（650 nm）をバックグラウンド光として照射しながら，波長の異なる変調光を照射したときに観測される，メチルビオローゲンの還元活性（光化学系 I の活性）を，波長に対してプロットしたものである．活性のピークは 681 nm にあり，700 nm でも高い活性を示すことが分かる．一方曲線 2 は，720 nm のバックグラウンド光を照射しながら，波長の異なる変調光を照射したときに見られる酸素発生量（光化学系 II の活性）を，波長に対してプロットしたものである．この場合は，より短波長側の 677 nm にピークが見られ，700 nm では活性はほとんど見られない．また，650 nm に光化学系 II の集光性クロロフィルタンパク質の寄与による明瞭な肩が見られる．

両者の作用スペクトルの形は，分離された光化学系 I，II のそれぞれの吸収スペクトルとよく一致している．

作用スペクトルの測定は十分な光強度を持つ単色光を作り出すことが困難なため，あまり行われてこなかった．しかし，自然科学研究機構基礎生物学研究所にある共同利用機器，大型スペクトログラフは強力で照射面積の広い単色光を照射できる．作用スペクトルの測定設備を整える費用や手間がなければ，これを利用するのも一つの手である．

1.g.3　量子収率の測定

量子収率 ϕ は，反応量（速度）P_λ を，吸収された光量子数 N で割ることで求められる．N の測定は，反応系に照射した光の光量子数 N_0 と，反応液に吸収されずに透

過してきた光の光量子数（N_0-N）を測定すれば，求められる．しかし単色光を照射して測定する場合は，N_0 だけを測定し，N/N_0 は，分光光度計でスペクトル測定して求めても同じである．

作用スペクトルの場合は相対値として測定して問題はない．しかし，量子収率は絶対値の測定になるので，光強度の測定は精確に行う必要がある．

一例として，ラン藻を用いた量子収率の測定結果を示す．ラン藻は主な光合成色素としてクロロフィル a と，620 nm 付近にピークを持つ青色の可溶性タンパク質であるフィコシアニン類，および黄色～橙色の複数種のカロチノイドを持つ．このうち，クロロフィルは主に光化学系Ⅰに属し，フィコシアニンは光化学系Ⅱに属す．

ラン藻は炭酸固定のための無機炭素（CO_2，HCO_3^-）を，光のエネルギーを使って細胞内に取り込む．この反応の作用スペクトルとそれらの量子収率を測定したのが，図4.1.30 である[13]．なお，照射光は干渉フィルター（半値幅 10～15 nm）を用いて単色光化している．

上段の図は酸素発生で測定した炭酸固定反応と，光照射で細胞内に蓄積される無機炭素の量についての作用スペクトルである．酸素発生反応の作用スペクトルは 600～700 nm に広いピークを持ち，フィコシアニンの吸収スペクトルとよく一致している．これは，炭酸固定反応までを含む全体の光合成反応が光化学系Ⅱ（フィコシアニンが主要な集光色素）の反応で律速されていることを示している．一方無機炭素の取り込みは酸素発生のそれとは全く異なり，684 nm にピークを持つクロロフィルの吸収スペクトルの形とよく一致しており，この反応は専ら光化学系Ⅰによって進行することを示す．

中段の図は使用したラン藻細胞の吸収スペクトル（B）と吸収率（N/N_0）スペクトル（A）である．原理のところで述べたように，測定試料が希薄な場合は吸収スペクトルに係数を掛けた値で反応量を割れば量子収率が得られるが，図に示した試料は吸収率が 1 に近いため，吸光度ではなく，吸収率（中段曲線 A）で割って量子収率を求めている．

こうして得られた量子収率が下段の図である．酸素発生の量子収率は 630～670 nm でほぼ一定の最大値をとり，短波長側では緩やかに低下していく．この低下は作用スペクトルの低下よりも緩やかである．もし短波長側の吸収もフィコシアニンによる寄与が非常に大きければ高い値のままであるはずであるが，これらの波長域ではクロロフィルによる吸収の寄与が大きくなるので，その分だけ量子収率が低下することになる．また，長波長側はクロロフィルによる吸収が圧倒的に大きくなることで量子収率が急激に低下している．他方，無機炭素の蓄積に対する量子収率は，650 nm より短波長側では低い一定の値を示すが，それより長波長側では急激に上昇し，700 nm 以上で最大値を示す．これは，上で述べたように無機炭素の蓄積は専ら光化学系Ⅰによって進行し，光化学系Ⅰは主にクロロフィルが（フィコシアニンではなく）その集光色素系を構成しているためである．フィコシアニン類の吸収の寄与が全くない 700 nm 以上の波長領域ではクロロフィルのみが光を吸収するため，高い量子収率を示す．

ここで注意しなければならないのは，量子収率が高いからといって反応量が大きいとは限らないことである．中段の吸収・吸収率スペクトルが示すように，長波長側では試料に光を照射してもほとんど吸収されない．反応量は吸収された光量に比例するので，吸収率が低ければ当然反応量も小さい．したがって，長波長光を照射した場合，量子収率は高いが，実際の反応量は少ない．

参考文献

1）村山精一，「分光測定入門」，中原勝巖編，日本分光学会測定法シリーズ 13，学会出版センター，1987，P.74

2）浜松ホトニクス株式会社　光電子増倍管及び関連製品カタログ

3）柴田和雄，「微少スペクトル変化の測定　生体試料を中心にして」，井上頼直編，日本分光学会測定シリーズ 4，学会出版センター，1983，P.11

4）島津製作所　MPS-2000 取扱説明書

5）島津製作所　SPD-10A　取扱説明書

6）柴田和雄，「微少スペクトル変化の測定　生体試料を中心にして」，井上頼直編，日本分光学会測定シリーズ 4，学会出版センター，1983，P.13

7）K. Shibata, Methods of Biochemical Analysis, ed. D. Glick, Interscience Publ. Vol. **7**, 1959, P.77

8）柴田和雄，「微少スペクトル変化の測定　生体試料を中心にして」，井上頼直編，日本分光学会測定シリーズ 4，学会出版センター，1983，P.22

9）Butler, W. L. and Hopkins, D. W., Biochim. Biophys. Acta **12**, 1970 439

10）飯塚哲太郎「微少スペクトル変化の測定　生体試料を中心にして」，井上頼直編，日本分光学会測定シリーズ 4，学会出版センター，1983，P.99

11）島津製作所　MPS-2000 用低温スペクトル測定ユニット取扱説明書

12）Joliot, P. Methods Enzymol. ed. A. San Pietro, Academic Press, Vol. **24**, P.123

13）Ogawa, T. and Inoue, Y. Biochim. Biophys. Acta **724**, 1983, P.490