



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	閃光分光法と差スペクトル
Author(s)	伊藤, 繁
Description	4章 分光測定 2. 分光測定法 c
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, 465-471
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39180
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-065.pdf



2. 分光測定法

c. 閃光分光法と差スペクトル

伊藤 繁¹⁾

光合成に使われる閃光分光法による差スペクトル測定の原理，実験装置の説明をした．実験例として植物，アカリオクロリス(シアノバクテリア)，ヘリオバクテリア，クロロビウムのI型反応中心質複合体と光センサー蛋白質 AnPixJ の吸収時間変化と時間分解差スペクトル測定を紹介した．

Flash photolysis of photosynthetic systems

Shigeru Itoh

Principals and apparatus of flash-photolysis measurement systems are reviewed. Measurements of flash-induced absorption changes of chlorophylls in type-I reaction centers of plant, *Acaryochloris marina*, *Helio bacterium*, *Chlorobium* and of a color sensor protein in cyanobacteria are interpreted.

2.c はじめに

アンテナ色素に吸収された光は，反応中心タンパク質中のクロフィルに渡され，電荷分離がおこる．ほとんどの電子伝達成分は非アミノ酸で，酸化還元反応に伴い特徴的な吸収スペクトルの変化を示す．閃光分光法は，光反応をキセノンフラッシュランプあるいはレーザー閃光照射で開始し，各成分特有の吸収スペクトル変化（差スペクトル）を検出するので光合成研究に最適の方法である．試料を透過した測定光量の変化を高感度，高速に測定することで，反応や速度を直接決定できる．

2.c.1 測定原理と差スペクトル

分光法では，試料に測定光 I_0 を照射し，透過光強度 I を測り試料中の物質量を計測する．試料が吸収する光量は Lambert-Beer の法則に従い試料中の光吸収分子の対象波長での分子吸光係数 ϵ と光路長 (L)，分子濃度 C に比例する．吸光度 A は常用対数を使うと

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon CL \quad (1)$$

(ϵ は分子吸光係数で分子固有の値， C はモル濃度， L は光路長)であり， ϵ 既知の物質の濃度を簡単に決定できる．図1は，閃光分光法の原理を示す．ある分子種が酸化（あるいは還元）され吸光係数が変化する時，その差分分子吸光係数 ($\Delta\epsilon$) が既知ならば，濃度変化 ΔC は吸光度変化 ΔA と

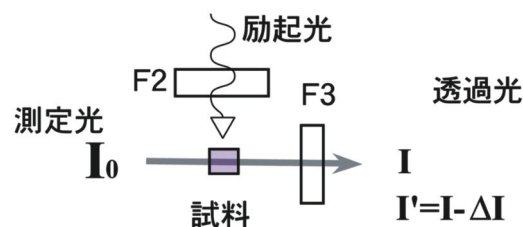
$$\Delta A = \Delta\epsilon \Delta CL \quad (2)$$

の関係となり，閃光照射前後での（明→暗）吸光度変化 ΔA_{L-D} を測定すれば濃度変化がわかる．これには，閃光照射前後の透過光量 I と I' を測定すれば良い．

$$\Delta A_{L-D} = \log(I_0/I') - \log(I_0/I) = \Delta\epsilon \Delta CL \quad (3)$$

従って混在する他の物質やその濃度を測定しなくとも（知らなくとも），光応答する対象分子の反応量や反応速度を実測できる． $\Delta\epsilon$ 未知物質についても差スペクトルや時間経過は測定できるので，反応過程を容易に非破壊的に追う事が出来る．他手段で分子数を推定できれば， $\Delta\epsilon$ も決定できる．閃光光源，レーザー，計算機，検出器である光電子増倍管などの発達をもたらした閃光分光法の発展により光合成研究は大きく進んだ．

測定上の注意点は，特定波長の光について I , I' を正確



$$\begin{aligned} \Delta A_{L-D} &= \log(I_0/I') - \log(I_0/I) = \log(I/I') \\ &= \log(I/(I - \Delta I)) = \Delta\epsilon \cdot \Delta C \cdot L \end{aligned}$$

図1：閃光分光法の原理と吸光度変化の計算。
F2, F3 は光学フィルター

1) 名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻物理

に測定することにつぎる。例えば、励起用の閃光が受光部にもれたり、試料の光散乱が変わったり（濁ったり）すると、I と I' の比を正しく測定できない。これを避けるために、測定領域の光は通すが、閃光は通さないような光学フィルターや、分光器を受光器の前におく。

吸光度変化量は、受光器の出力電圧変化から計算する。たとえば 700 nm で、L=1 cm、I と I' が 1 V と 1.01 V（透過率 1 % 増）の出力変化を生んだと測定されれば $\Delta A_{L-D} = -\log(I'/I) = -\log(1.11/1) = -\log(1.11) = -0.00432$ の吸光度減少となり、700 nm での $\Delta \epsilon$ が $64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の分子（例えば P 700）の反応なら式 (3) より $\Delta C = -0.00432/64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}/1 \text{ cm} = 0.000068 \text{ mM} = 0.068 \mu\text{M}$ の変化となる。波長ごとの測定から、差スペクトルを得て反応分子を同定したり、その量、変化、加えた試料の量や反応条件との関係を調べる。

2.c.2 多様な電子伝達成分

表 1 に植物型光合成に働く主な電子伝達成分の名称、分光特性と酸化還元電位、反応速度（反応全般は文献³⁾ 参照）を示す。電子伝達成分近傍のクロロフィルや、カロテノイドなども局所的な電場変化や、膜内外液相間での膜電位に応じてスペクトル変化を示す。これらの詳細については光合成関連の教科書などを参照されたい。

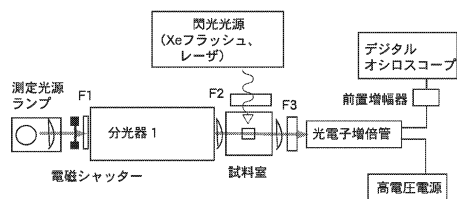
2.c.3 測定装置

実際に使われているいくつかの閃光分光装置を図 2 に示し、その特性を以下に示す。

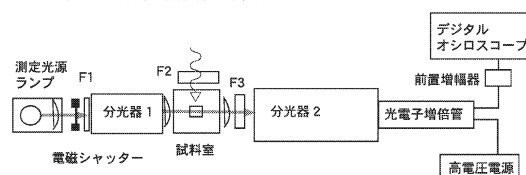
表 1：植物光合成初期反応に関わる成分の分光的特徴
吸収帯の red ox は還元と酸化型での吸収ピークを示す。（ ）内は差分子吸光係数

反応部位	分子名	吸収波長 nm (吸光係数 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	酸化還元電位 (V)	反応速度	参考になる 文献
PSI 電子供与体 Chl <i>a</i>	P700	700 red (64) 430 red (44) 810 ox (8)	0.43-0.46	光酸化 3-10 ps 暗還元 0.1, 1, 30 ms	1, 7
PSI 電子受容体 Chl <i>a</i>	A0	686 red	~-1.0	光還元 3-10 ps 暗酸化 30 ps	13
PSI 電子受容体キノン	A1：フィロキノン QK	390 red	~-0.8	光還元 30 ps, Fx による酸化 ns, P700 と 0, 2 ms	3, 13
PSI 電子受容体鉄硫黄 センター	A2=Fx	430 red (11)	~-0.7	光還元 25-200 ns P700 による酸化 1 ms	1, 3
PSI 電子受容体鉄硫黄 センター	P430 (=FB, FA)	430 red (11) 460 ox	~-0.48	光還元 ~200 ns P700 による酸化 30 ms	1, 6-8
P700 への電子供与体	プラストシアニン	460, 597 ox (4.9), 770 ox	+0.37	光酸化 0.01~0.2 ms	9, 10
PSII 電子供与体 Chl <i>a</i>	P680	680 red 410, 825 ox (7)	~+1.0	光酸化 ~ ps 暗還元 1-200 μs	4, 10
PSII 電子受容体	フェオフィチン <i>a</i>	410, 680 546 red	~-0.4	光還元 ~ ps 暗酸化 200 ns	
PSII 電子受容体	Q _A (プラストキノン)	270 ox, 320 red (13)	~0	光還元 200 ns	5, 6, 12
PSII 電子受容体	Q _B (プラストキノン)		~0.1	光還元 200 μs	5, 6, 12
PSII	シトクロム <i>b</i> 559	429, 539, 559 red 415 ox	0.35	~20-30 ms	1, 6
<i>b</i> 6/ <i>f</i> 複合体中	シトクロム <i>b</i> 6	434, 536, 563 red (A 563-600=21) 413, ox	-0.08		1, 5, 6
<i>b</i> 6/ <i>f</i> 複合体中	シトクロム <i>f</i>	421, 522, 553, 6 (28) red, 410 ox	+0.365 (pH 7.8)		1, 5, 6
<i>b</i> 6/ <i>f</i> 複合体中	Rieske-FeS	ESR で測定	0.29		5, 6
膜電位感受性	515nm カロテノイド 変化	518+, 480-でチラコ イド膜内側正の膜電位 変化		光での立ち上がり < 20 ns	11

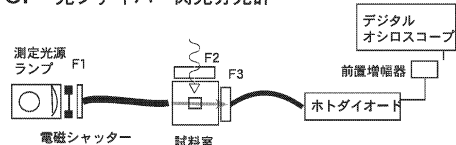
A. 閃光分光計



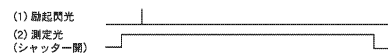
B. ダブル分光器閃光分光計



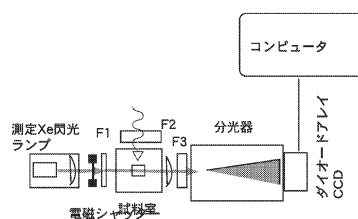
C. 光ファイバー閃光分光計



D. A-C 装置のタイミング



E. マルチチャンネル時間分解スペクトル測定機



F. E 装置のタイミング

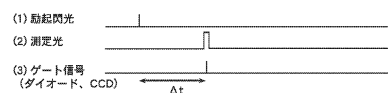


図2：各種閃光分光装置の概略 (F1, F2, F3は光学フィルター)

A. 閃光分光装置標準型 (濁った試料も測れるが、蛍光が強い試料は困難)

概略：直流点灯の光源ランプ (可視 — 近赤外光領域ではハロゲンランプ, 紫外部ではXe放電管など) から出た光を光学フィルターF1と分光器1で必要な波長光のみ取り出し, 試料にあて, パルスレーザ (またはXeフラッシュランプ) からの励起光で引き起こされる吸光度変化を光電子増倍管で検出される光電流の増減として測定する。電流はプリアンプで増幅し, デジタルオシロスコープで記録する。測定光はDに示すようなタイミング (コンピュータあるいは専用パルスジェネレータで制御) でレーザ照射に同期させて電磁シャッターを開閉することで, 閃光照射前に試料にあて, 測定終了後は消す。これにより, 試料に不必要な光反応が起こるのを防ぐ (電磁シャッターの振動が測定系に余分なノイズを与えないように注意する)。 (このような測定系は東京インスツルメンツ, 堀場製作所, などで得られるが, 注文生産)。

光学フィルター：F1は分光器の2次光カット用でF3があればなくともよい。F2は励起光を必要な波長のみに限定するガラス光学フィルターで, 波長精度が良いレーザ励起時には無くても可 (しかし, レーザ励起用のフラッシュ光などが漏れる事もあるので注意)。F3は励起光が光電子増倍管にはいるのを防ぐため, 重要。光合成では, 通常1%以下の吸光度変化 (存在する被測定分子の濃度と分子吸収係数から計算できる) しか期待で

きないので, 測定光より2-3桁強い励起光が0.1%もれても測定に大きく影響する。これを改善するために長波長や短波長光カット用の色ガラスフィルターや干渉フィルター, レーザ波長だけを通さないノッチフィルターなどを使用する。2枚以上を組み合わせてもよい。励起光で生じるクロロフィル蛍光なども測定を阻害する。ただし, 励起光や蛍光の影響は, 励起時間だけのものです。長時間の測定ではあまり問題にならない。また, 増幅系の時定数を遅くして測定すると, その時定数に合わせて励起光によるノイズが観測される。反応を引き起こさない範囲で測定光強度をあげ, 繰り返し測定を行い, 信号を積算することで, S/N比を上げる。フィルターが強い蛍光を発する場合もあるので注意する。(色ガラス, 干渉フィルターともメーカー多数あり, 価格は数千円-20万円/1枚)

検出器：光電子増倍管は多種あり, それぞれ紫外, 青, 赤, 近赤外などの感度の特徴がある。測定波長で感度が高い事を確認する。励起波長域で感度が低く, 測定波長域で高い検出器が良い。たとえば, シトクロムなどを測定する時は赤感度のない管を使用し, 赤色部のクロロフィル吸収帯を励起する事で, 蛍光や励起光によるノイズの少ない測定ができる。一方, P700のようなクロロフィルの吸収変化を測定する時には赤感度の高い管が必要となる。化学物質の光反応では赤や近赤外には感度が低い検出器を使用することが多い。電圧を印可したまま

光電子増倍管に強光を照射すると損傷するので注意する。300-1000 V の安定化電源が必要。(浜松ホトニクスのカatalogなど参照)。

ブリアンプ：光電子増倍管の出力は直接オシロスコープにつなぐ事も可能だが、電流が少ないので、簡単な電流増幅用のブリアンプで増幅したあとさらにもう一段オフセット電圧を加える増幅器を使用する(市販の100 MHz 程度の高速汎用安価なオペアンプによる自作も容易。電源ノイズや発振などに注意する。スイッチング電源はGHz 程度の早いノイズがあるので、100 μ s 以下の測定では使用しない)。ごく小さな変化量(1%以下)を拡大して増幅記録するためにオフセット電圧を引加し、信号変化範囲を0 V 付近に限定することでデジタル分解能を最大限利用してS/Nよく記録できる。たとえば10ビット分解能のデジタルオシロに入力すると、 $1/1024=0.1\%$ 以下の信号差は全く記録できないはずであるが、実際にはオフセット電圧の利用や多数回の信号積分により分解能があがり、必要精度を得られる。(岩通、テクトロ、など色々 数十万円)

光源と分光器と回折格子；目的の波長精度にあわせて選定する。通常1 nm 程度の精度がえられれば十分に15-50 cm の分光器が一般的。既存のスペクトロメータから取り出してもよいが、一番重要なのは明るさ。波長精度と光量がいる。分光器はニコン、島津、日本分光、など多数あり、使用波長範囲で明るいものを選ぶ。閃光分光での最重要点は明るさであり、ランプとの組み合わせが重要。光源は高安定化直流電源で点灯し、分光器の細いスリットに焦点を合わせるので、100 W 程度の小さく高輝度(青部分で重要)のフィラメントのハロゲンランプが良い。やや低い電圧で新しいものを使用して変動を減らす。ランプの冷却ファンはノイズをだすので止める。Xe ランプは高輝度だが、直流点灯でも発光量、発光部位の変動が大きく紫外部(レンズ系を石英にする必要あり)以外ではメリット少ない。

試料室；試料は通常の1 x 1 x 4 cm のガラスセル中にいれるのが便利。試料ホルダーは水循環などで温度制御したりマグネットスターラーなどで攪拌できると便利である。試料室中、あるいは外にガラスフィルターを取り付ける。我々はやや大きめの25 cm 角の試料室を使用しているが、手をいれることが出来るので、低温測定用のクライオスタット(Oxford など)もいれられ、使い勝手はよい。既成の分光器の一部を取り外しても良い。我々は、鉄板上に、マグネットで、分光器、試料室、検出器を固定してA、B兼用型として使用している。装置A-Dでは防振台などは特に必要ない。

閃光光源；キセノン閃光光源(発光時間1-50 ミクロ秒程度)、やパルスレーザ(発光時間10-20 ナノ秒)を使用する。前者は簡便で幅広い発光スペクトルで、ガラス分光フィルターや干渉フィルターと組み合わせ、様々な波長での励起が可能である。発光時間が長く、発光スペクトルが広いことが便利だが同時に迷光をうみ、検出を妨げる。例えば波長範囲400-700 nm でのクロロフィル吸収変化の測定では、600 nm 以上の測定にはフィルターを閃光光源につけ500 nm 以下のSoret 帯のみを励起する、600 nm 以下の測定には650 nm 以上のみを励起するような工夫が必要で、しかも(光強度と吸収帯とでできる)励起効率も異なる。最も普及しているNd-YAG レーザの2倍波(20 ns, 532 nm)で励起するなら、検出器側に532 nm $\pm$ 20 nm 程度を通さないノッチフィルターをいれると、これ以外のほぼ全波長で測定可能となる。しかも、短い閃光時間により高速過程の測定が出来る。さらに、色素レーザ(色素により、500-700 nm)、チタンサファイヤレーザ(700-900 nm 可変)などを加え、異なった波長域を励起できれば更に便利だが、費用がかかる。

B. ダブル分光器型閃光分光装置(透明試料や、蛍光を出す試料に適している)。

上記A装置とは逆に試料の後に主分光器(2)をとりつけば試料の蛍光を取り除ける。クロロフィル蛍光と重なる波長域の測定(例えばP700)の測定にはこの配置がよい。試料にあてる測定光量をへらし、波長精度をあげるために、副分光器(1)も使うが、これは明るく小さなもので良い。この代わりに特定波長光を透過するバンドパスフィルターや干渉フィルターなどを使用してもよい。試料に当たる測定光が強すぎないようにする(光応答信号量を測定光量を変えてはかり、減らない事を確認する)。光が試料を透過後に主分光器2に入れるので、試料が透明でないと、光電子増倍管に到達する光量が減少してしまい、ノイズが増え測定困難となる。濁った試料(例えば植物葉緑体チラコイド膜、細菌細胞、葉、など)には散乱に強いA型が、表面活性剤処理で分離精製した透明な光化学系I、II標品やアンテナ蛋白質、バクテリア反応中心などや、蛍光の強い試料にはB型が適している。

C. 光ファイバー型分光装置。

A, B, 型での分光器の役割を干渉フィルターで置き換え、光路を光ファイバーに置き換え、検出器をダイオードにすることで、簡便で安定、必要なら移動可能な装置を作る事ができる。F1を小型分光器にしても良い。差ス

ペクトルが明らかな特定の成分（例えば P 700 やカロテノイドシフト）の時間変化だけを測りたい場合に良い。市販品もある。（例えば PAM 蛍光測定装置の付属品）。励起光も光ファイバーを通して与える事が可能である。試料に検出器側の光ファイバーを近づけることで、濁った試料（たとえば葉など）でも測定ができる。この際には、励起光や散乱光の影響を除くために、フィルターや測定時間などに注意する。

D. A-C 装置の測定時系列例。

励起閃光照射の直前に光路中の電磁シャッターをあけ、信号を測定する。測定後はシャッターを閉じておくことで、試料の暗回復をはかり、より強い測定光でも問題なく測定できるようにする。デジタルオシロスコープでの記録はシャッター解放と閃光照射時からシャッター閉鎖直前までにおこなう。タイミングの調製には、専用のパルス発生機（我々は 50 ps で設定可能なスタンフォードリサーチ社製 DG535 を使用）を用いて、シャッターの解放、測定の開始、レーザーの照射、シャッター閉鎖のシーケンスを制御する。これを 1-1000 回程度繰り返し、信号積算することで、S/N 比の高い測定ができる。測定時間や、繰り返し時間は目的信号の特性と試料の暗所回復時間などの条件毎に検討して、信号強度が最大になるように設定する。

E. マルチチャンネル時間分解スペクトル測定装置

A-C では、特定波長での透過光強度を測定し、その変化量を波長を変えて測定することで、変化成分の差吸収スペクトルを得る。これと反対に、レーザー閃光後の特定時間での吸収スペクトル（時間分解スペクトル）を直接得る。タイミングを変化させて沢山の時間分解スペクトルを得た後、時間変化を判定する。本装置では、閃光照射後の特定時間に、測定光を白色閃光として与え、透過光を分光器にいれ、分光後の光量をダイオードアレイ検出機や CCD 検出器で波長全域での時間分解スペクトルとして一度に検出する。このタイミングを変えることで、励起レーザー閃光照射前後の広範囲の時間での時間分解スペクトルを得る。暗所でも出る熱ノイズを減らすため、 -20 から -80°C 程度の冷却器付きのダイオードアレイや CCD を用いる。パルスレーザーで励起し、測定光は Xe 閃光から得る。後者の発光時間（1 ミクロ秒程度）に応じた時間分解を行う場合と、さらに CCD やダイオードアレイの前に取り付けたいメージインテンシファイヤーをゲート電気信号で制御して 10 ナノ秒程度の分解能での時間分解スペクトルを取る方法がある。多波長を同時に

測定して時間分解スペクトルを直接得られるのが特徴であるが、その分検出器が小さいので光量がへり、S/N は落ちる。B と同様に濁った試料の測定には向かない。同じ装置で測定光をつけなければ蛍光スペクトルもとれる利点があり、透明である程度大きな信号が期待される精製反応中心試料などの測定に向いている。一方信号の小さい（差吸収係数の小さな）分子の反応などにはあまり向かない。ランプの時間による揺れなどでベースラインのずれも起こりやすい。

この測定では励起レーザー光と、測定用閃光、ゲート制御信号のタイミングがきわめて重要となる。G に示すようにレーザー光と、測定閃光間の時間を設定し、積算を行い、時間分解スペクトルを得る。時間を変えて行くことで反応を追う。

F. ピコ秒時間分解スペクトル測定装置

ナノ秒以下の分光測定では、電気的な方法での時間制御は困難であり、光速と距離の関数として時間を決める方法をとる。光源として、数ピコ秒～数十フェムト秒のレーザー閃光を用いる。この閃光を偏光ビームスプリッターで 2 つに分け、一方は励起光として試料にあて、もう一方は、 CS_2 溶液や D_2O などに当てて白色光を作り出し、これを測定光として使う。測定光の光路長を移動ステージ上のミラー対により変化させて、試料への到達時間を励起光とはずらしていく。光検出器としては D と同様に分光器とダイオードアレイや CCD の組み合わせを用い、励起光と測定光の時間差を変えつつ時間分解スペクトルを得る。レーザー閃光の幅で時間分解能がきまる。時間分解能が高い（測定光照射時間が短い）と得られる光量が減るので、多数回の積算が必要となる。このため励起レーザーの繰り返しも早くなるので、試料損傷も起こりやすくなる。これを防ぐために、フローセルによる試料の循環、冷却などを行う。数ナノ秒以下の時間範囲ではアンテナクロロフィルの励起状態生成による吸収変化や、レーザー光照射による蛍光誘導放出などが起こるのでこれらの影響も考慮して時間分解スペクトルを解釈する必要がある。測定試料溶液の酸化還元電位の制御なども行い、電子移動に伴う吸収変化と励起状態による吸収変化（こちらは酸化還元状態に依存しない）を分けることも行い、目的対象のスペクトル変化を得る。F に示す時間系列と同様だが、受光器のゲート信号による感度制御は不要となる。

2.C.4 測定例 1：閃光で誘起される吸光度変化の時間変化と差スペクトル

装置 B による、クロロフィル *d* を主要色素として持つシアノバクテリア、アカリオクロリスより単離したチラコイド膜上の光化学系 I 反応中心クロロフィル P 740 の光酸化と暗回復の測定 (図 3)。文献¹⁴⁾ 参照。

試料、アカリオクロリスをビーズビーターで破碎し、超遠心分離機により分画したチラコイド膜。反応液：50 mM Tris 緩衝液 pH 7.5, 20 mM NaCl, さらにアスコルビン酸 10 mM, DCIP 0.1 mM を添加して P 740 を前もって還元しておく。室温。励起光は NdYAG レーザ 2 倍波 532 nm, 10 ns パルス幅, 0.25 Hz 繰り返し, 吸収変化が 90% 飽和するレーザ強度に設定。32-256 回積算。

閃光照射で引き起こされる各波長での吸収の時間変化を測定した (図 3)。P 740 の時間変化は遅いので ms 領域のみを表示。1 ms 以内では 725 nm に一部見られるように PSII の反応中心クロロフィル (2009 年時点ではクロロフィル *d* か *a* か論争中) の半減期 200 μ s の変化が重なる。波長ごとに変化の大きさ、方向が変化する。このうち遅い部分 (2 ms での変化量) の大きさを波長に対して示すと図 4 下の P 740 (還元-光酸化) の差スペクトルが得られる。この差スペクトルは 460 nm と 740 nm に吸収減少の極大を示し、430 nm と 700 nm に正の極大を示す P 700 (ホウレンソウなどのようにクロロフィル *a* をもつ通常の植物やシアノバクテリアの光化学 I の反応中心クロロフィル *a* 2 量体) とはことになっていた。この差スペクトルからアカリオクロリスの光化学系 I でクロロフィル *d* の 2 量体が反応していることがわかり、酸素発生型の光合成でもクロロフィル *a* 以外のクロロフィルが電子供与体として働くことが初めて示された。反応時間の違い、試料の酸化還元状態の制御で吸収変化を与える成分の特定や反応が検討できる。

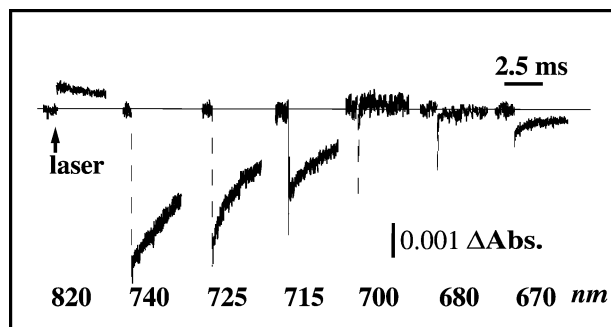


図 3：アカリオクロリスチラコイド膜閃光照射時の吸収変化¹⁴⁾

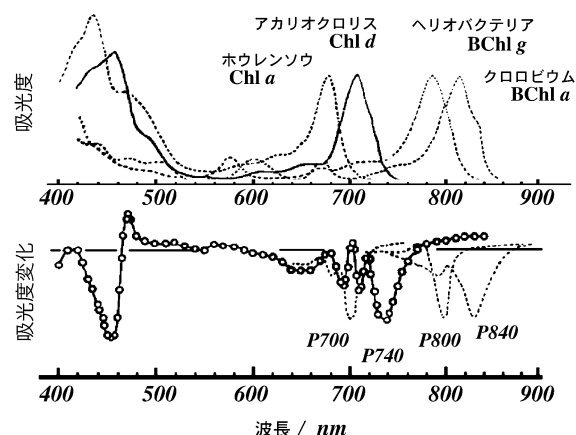


図 4：ホウレンソウとアカリオクロリスの光化学系 I，ヘリオバクテリア，クロロビウムの反応中心質複合体の吸収スペクトル (上) とレーザ誘起された各電子供与体の差スペクトル (下)。P 740 差スペクトルは図 3 の結果から作成¹⁴⁾

図 4 に、絶対嫌気性細菌と植物、アカリオクロリス各々から精製された I 型反応中心複合体の吸収スペクトルと反応中心クロロフィルの光誘起差スペクトルを示した。クロロフィル *a* をもつホウレンソウの光化学系 I は P 700, クロロフィル *d* をもつアカリオクロリスの光化学系 I は P 740, バクテリオクロロフィル *g* をもつヘリオバクテリアの反応中心は P 800, バクテリオクロロフィル *a* をもつクロロビウムの反応中心は P 840 とよばれ、それぞれ異なったクロロフィルの 2 量体が電子供与体として働く。各反応中心複合体は 100-50 分子のアンテナクロロフィルと 1 分子の電子供与体 (クロロフィル 2 量体) を持ち、特徴的なスペクトルを与える。反応中心クロロフィルはアンテナクロロフィルの長波長側に吸収帯を持ち励起エネルギーを集め光反応を行う。多数のアンテナクロロフィル中でも、光酸化をする各電子供与体の異なる差スペクトルだけが閃光分光法では測定できる。また差スペクトルは近傍クロロフィルのシフトによる吸収変化もふくみ、時間範囲を変えると違う成分の反応も見えてくる。

2.C.5 測定例 2：時間分解差スペクトルの実測

ゲート CCD 分光システム (図 2 E) によるシアノバクテリア光センサータンパク質 AnPixJ の時間分解スペクトルの測定 (図 5)。

試料 大腸菌で発現精製した、シアノバクテリア光センサータンパク質 AnPixJ。図 5 上に示すように、この蛋白質は赤と緑に吸収帯を持つ Pr と Pg の 2 状態を示す。光照射で状態間の遷移が起こり、シアノバクテリアの走

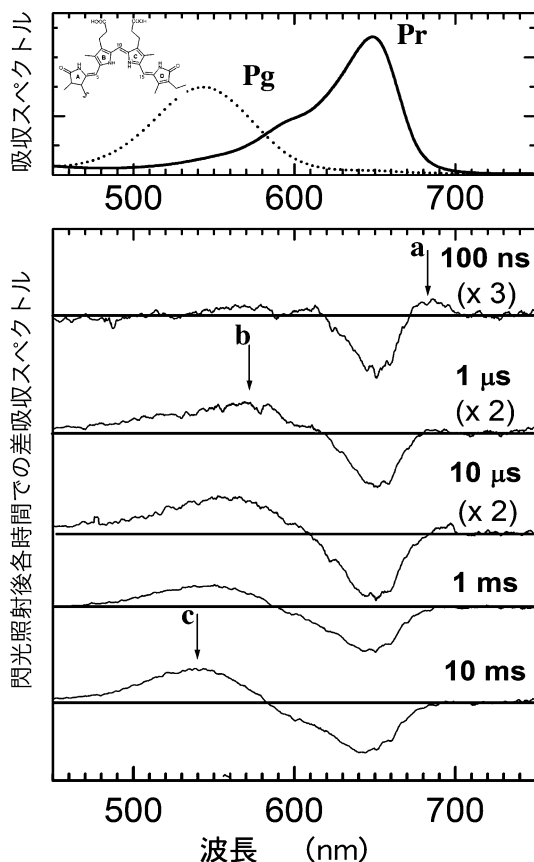


図5：シアノバクテリア光センサー蛋白質 AnPixJ の光反応に伴う差スペクトルの変化¹⁵⁾

光性を制御する光センサーとして機能する。

測定装置, Pr から Pg への遷移を, 反応開始用レーザー閃光として, 固体色素レーザー (Solar), 10 ナノ秒閃光, 650 nm を使用 (Nd-YAG レーザ 2 倍波 532 nm, 10 ns を変換). 測定光はキセノン閃光 1 ミクロ秒白色光. 受光器はオリエール社製ゲートイメージインテンシファイヤー付き冷却 CCD, 分光器はオリエール 30 cm 分光器.

励起用レーザー閃光照射に同期して, 図 G に示すように一定時間ずらしたキセノン閃光 (測定光) 1 ミクロ秒を照射し, そのピーク時間でイメージインテンシファイヤーを 10-50 ナノ秒ゲート信号で作動させ, I, I' を測定し, 差スペクトルを計算した. 繰り返し間隔 5 秒, 測定をしない 4 秒間は緑色 LED 照射で, 試料を Pr 状態に保持した. ゲート信号の時間を変えて得た時間分解スペクトルを示す.

レーザー閃光照射後 100 ns 以内に, 650 nm に負の吸収

変化, 同時にその超波長側に吸収増大が起こる. これは 650 nm の Pr 型の基底状態の吸収帯が消失し, 660-70 nm (a) に新吸収帯が出現 (長波長シフト) した事を示す. 次に 1 μ s の時点では逆に短波長側 570 nm (b) に吸収帯が移る (短波長シフト), 更に 10 ms 後には最終状態である Pg が 540 nm に新吸収帯をもたらす. この間 650 nm の Pr 型の基底状態の吸収帯は消えたままで, 最終的に Pr が光照射で a, b に極大を示すような中間状態を経て Pg 型に遷移したことがわかる. 更に多くの時間分解スペクトルを測定し, 各中間体個々のスペクトルをガウス曲線を使ったシミュレーションと時間変化を計算した.

文献

- 1) B. Ke, *Photosynthesis, Photobiochemistry and Photobiophysics*, Kluwer. Dordrecht. 2001.
- 2) D. R. Ort and F. Yocum eds., *Oxygenic photosynthesis: The light reactions* Kluwer. Dordrecht. 1996.
- 3) S. Itoh, M. Iwaki & I. Ikegami, *Biochim. Biophys. Acta* **1507** (2001) P.115.
- 4) H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta* **505** (1979) P.355.
- 5) A. Trebst and M. Avron, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology. Photosynthesis I*, Springer-Verlag, Berlin. 1977.
- 6) A. San Pietro, ed. *Methods in Enzymology*, **69**, Academic Press, New York. 1980.
- 7) T. Hiyama, and B. Ke, *Biochim. Biophys. Acta* **267** (1972) P.160.
- 8) K. Sauer, P., Mathis, S, Acker and J. van Best, *Biochim. Biophys. Acta*, **503** (1978) P.120.
- 9) S. Katoh, S. Shiratori and A. Takamiya, *J. Biochem.* **51** (1962) P.32.
- 10) G. Döring, G. Renger, J. Vater and H. T. Witt, *Z. Naturforsch.* **24b** (1969) P.1139
- 11) W. Junge and H. T. Witt, *Proc. Natl. Acad. Scie., USA* **63** (1968) P.963.
- 12) W. Haehnel, *Biochim. Biophys. Acta* **459** (1977) P.418-419.
- 13) S. Kumazaki, M. Iwaki, I. Ikegami, H. Kandori, K. Yoshihara and S. Itoh, *J. Phys. Chem.*, **98** (1994) P.11220.
- 14) S. Itoh, H. Mino, K. Itoh, T. Shigenaga, T. Uzumaki and M. Iwaki, *Biochemistry* **46** (2007) P.1247.
- 15) R. Narikawa, Y. Fukushima, T. Ishizuka, S. Itoh and M. Ikeuchi, *J. Mol. Biol.*, **380** (2008) P.844.