HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 共鳴ラマン分光法 |
| Author(s) | 野口, 巧 |
| Description | 4章 分光測定 2. 分光測定法 f |
| 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, 491-496 |
| Issue Date | 2009-03-31 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/39183 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 67-068.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 2．分光測定法
## f．共鳴ラマン分光法

野口　　巧[1)]

共鳴ラマン分光法は，光合成試料中におけるクロロフィルやカロテノイドなどの色素の構造や相互作用を調べるのに極めて有効な手法である．本稿では共鳴ラマンスペクトルの測定法と解析法について解説する．

## Resonance Raman spectroscopy

Takumi Noguchi

Resonance Raman spectroscopy is a very useful method to study the structures and interactions of pigments such as chlorophylls and carotenoids in photosynthetic proteins.　In this article, the methods of measurements and analysis of resonance Raman spectra are explained.

### 2.f.1　はじめに

分子の振動スペクトルを測定する主な手法としては，赤外分光法の他に，ラマン分光法がある．共鳴ラマン法を用いることにより，多成分からなる光合成試料において，クロロフィルやカロテノイドなど，特定の色素のラマンスペクトルを選択的に測定することができる．したがって，蛋白質中の色素の構造や相互作用を，蛋白質や水のバンドに妨害されることなく調べることが可能となる．赤外分光法と同様に，共鳴ラマン法が与える構造情報は，水素結合構造など，X線結晶解析によって得られる情報と相補的なものを含んでおり，また微小な構造の違いに敏感である．ラマン散乱の原理，及び測定法については成書に詳しく述べられている[1)]．ここでは，光合成試料の共鳴ラマンスペクトルの一般的な測定法について述べる．共鳴ラマン法の光合成系への応用については，過去に多くの総説が出されているので，それらも参照されたい[2−7)]．

### 2.f.2　共鳴ラマン散乱

ラマン分光法では，物質に単色レーザー光を入射したときの散乱光を観測する．その散乱光の中には，レーザー光と同じ振動数を持つレイリー散乱の他に，分子振動の振動数分だけシフトしたラマン散乱光が存在している．ラマン散乱の原理は，定性的には，入射光によって誘起される双極子モーメントの強制振動に，分子振動が重なることによる「うなり」の現象として理解することができる．入射光よりも小さい振動数の散乱光をストークス散乱，逆に大きい振動数の散乱光をアンチストークス散乱と呼ぶ．常温では，分子はほとんど振動基底状態にあるため，振動準位が一つ上に遷移するストークス散乱の方が，アンチストークス散乱に比べて遥かに強い強度を持つ．そのため，通常は入射レーザー光よりも長波長側でラマン散乱を観測し，入射光の振動数からのシフト値（ラマンシフト）を横軸にとってスペクトルを表示する．

ある分子の電子吸収帯と一致する波長の光を入射すると，共鳴効果により，その電子遷移に共役する振動のラマン散乱光が著しく増大する．これを共鳴ラマン散乱と呼ぶ（図1）．共鳴ラマン法を用いると，蛋白質，脂質，水など複合的な成分を持つ試料中において，特定の分子の振動スペクトルを，励起波長を変えることにより，選択的に測定することができる．光合成試料におけるラマンスペクトル測定の対象は，ほとんどの場合，カロテノイドとクロロフィル・フェオフィチン類である．これらの$\pi$電子共役系を持つ色素では，共役系に含まれる構造部分の振動モードだけがスペクトル上に現れる．

電子吸収帯に一致した励起光による真正共鳴ラマン散乱に対し，それよりもやや長波長側の励起光によるラマン散乱を前期共鳴ラマン散乱と呼ぶ（図1）．この前期共鳴条件でもある程度の共鳴効果が得られ，ラマン散乱光の強度増大が見られる．よってスペクトルは，非共鳴ラマン散乱とは異なり，やはり近くの電子遷移の性質を反映したものとなる．

1）筑波大学　大学院数理物質科学研究科　物性・分子工学専攻

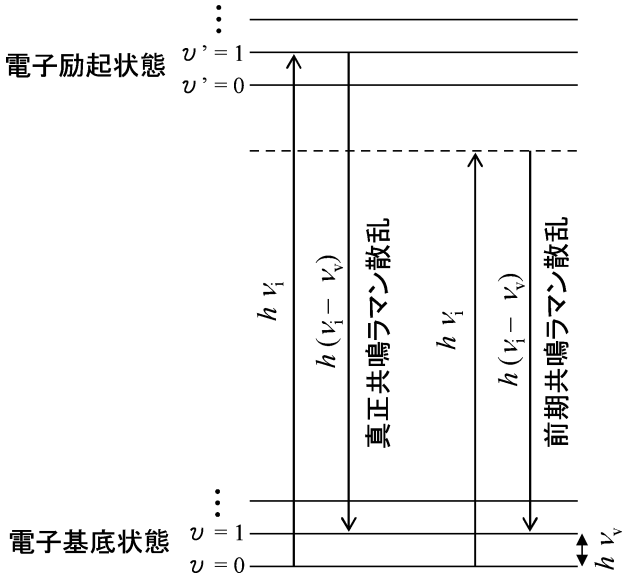


図 1：真正共鳴ラマン散乱と前期共鳴ラマン散乱．

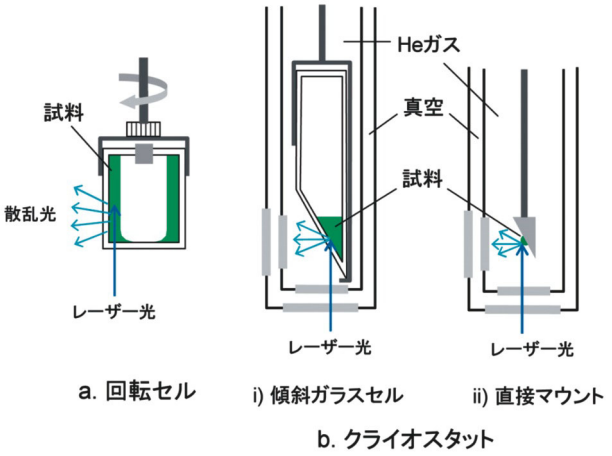


図 2：光合成試料に適したラマン散乱測定の試料部．(a) 液体試料用回転セル．(b) クライオスタットによる試料凍結；(i) 傾斜石英ガラスセル，(ii) 直接マウント試料．

## 2.f.3　測定法

ラマンスペクトルの測定系は，レーザー光源，試料部，分光器，検出器よりなる．光合成試料の共鳴ラマンスペクトルの測定は，紫外から近赤外にわたる広い波長領域で行われる．通常は分散型分光器を用いて測定を行うが，近赤外領域の測定においては，フーリエ変換 (FT) 赤外分光計を用いた FT ラマン法を用いることができる．これは異なる原理の測定法であるため，他とは区別して述べることとする．

### 2.f.3.1　レーザー光源

励起光として，$Ar^+$ レーザー，$Kr^+$ レーザー，He-Cd レーザーなどの各発振線，及び波長可変の Ti: sapphire レーザーや色素レーザーからの光を用いることができる．目的とする色素の吸収帯に合わせて励起光を選択する．

カロテノイドの共鳴ラマンスペクトルの測定には，$Ar^+$ レーザーの 514.5 または 488.0 nm の発振線が最もよく用いられる．これらの波長領域にはクロロフィルの吸収帯が存在しないため，その共鳴ラマン散乱の混入を防ぐことができる．

一方，クロロフィル・フェオフィチン類の測定には，通常，Soret 帯を励起するレーザー光を用いる．クロロフィルの種類によって Soret 帯の位置はそれぞれ異なるので，用いる励起光もそれに合うものを用いる．クロロフィル *a* の場合には，He-Cd レーザーの 441.6 nm の発振線，フェオフィチン *a* には $Kr^+$ レーザーの 406.7 または 413.1 nm の発振線などが用いられる．これらの青色レーザー光ではカロテノイドも同時に励起してしまうが，クロロフィルやフェオフィチンの構造情報を示すマーカーバンド（4.参照）はカロテノイドのバンドとほとんど重ならないため特に問題にはならない (図 2)．バクテリオクロロフィル *a* の場合には，紫外域にある Soret バンドを励起するため，$Ar^+$ レーザーの 363.8 nm の発振線を用いる．

クロロフィル類の Qy 帯への真正共鳴ラマン散乱は，強い蛍光によって妨害されるため，一般的には観測が困難である．しかし，光合成細菌の反応中心蛋白質などでは，励起波長の選択とスペシャルペアの酸化状態により，各コファクターの共鳴ラマンスペクトルを選択的に測定することが可能である[8–10]．また，SERDS（Shifted-excitation Raman difference spectroscopy）法によって，数 $cm^{-1}$ だけ異なる励起光を用いてラマン散乱を測定し，その差を計算して蛍光によるバックグラウンドを除去するという手法もしばしば用いられる[11,12]．これらの測定には，750–900 nm に存在するバクテリオフェオフィチン及びバクテリオクロロフィルの Qy 帯に合わせて，連続波長可変の Ti：sapphire レーザーや色素レーザーが用いられる．

### 2.f.3.2　分光器

ラマン散乱を測定する際に最も注意を要することは，強いレイリー散乱光を除去して迷光を除くことである．そのために，以前は，ダブルモノクロメータやトリプルモノクロメータを用いるのが一般的であったが，スループットが低くなるという欠点があった．現在では，ノッチフィルターなどによってレイリー光を選択的に除去し，シングルモノクロメータで測定するという手法がよく使われる．それぞれの励起光に対して基本的に別の

フィルターを用意しなければならないが，フィルターを傾けることにより，若干カットオフ波長をシフトさせることができる．

#### 2.f.3.3　検出器

検出器として光電子増倍管を用いる場合には，モノクロメータをスキャンしてラマンスペクトルを測定する．近年では，分光器をポリクロメータとして用いて，高感度 CCD 検出器（charge coupled device）によって広い波数領域を一度に測定するのが一般的である．

#### 2.f.3.4　試料部

光合成試料などで共鳴ラマンスペクトルを測定する際の注意は，レーザー光照射による色素および蛋白質試料の破壊，不活性化をなるべく防ぐことである．液体試料で測定する際には，回転セル（図 2 a）を用いて試料を回転させることにより，同じ試料に励起光が当たるのを避けるようにする．光吸収による試料温度の上昇を防ぐためには，冷 $N_2$ ガスなどを回転セルに吹き付けて，試料を冷やすとよい．

また，クライオスタットを用いて試料を凍結させることにより，試料を動かさなくとも，励起光による温度上昇と試料の破壊を抑えることができる（図 2 b）．図 2 b（ii）の様に，金属ホルダーに直接試料溶液を載せて凍結すれば，10 $\mu$L くらいの少量の試料で測定が可能である．また，レーザー光を直接試料に照射できるので，ガラスセルからのラマン散乱の混入を避けることができる．

#### 2.f.3.5　波数較正

ラマンスペクトルの横軸は励起光からのラマンシフトで表わされるため，波数較正が必要となる．特に，CCD 検出器を用いる際には，生データの横軸は素子のチャンネル数であるため，標準物質のラマン散乱を用いてスペクトルの較正を行う．標準物質としては，一般的なラマン測定ではインデンが用いられる場合が多いが，クロロフィル類のマーカーバンドが現れる 1600–1750 $cm^{-1}$ の領域にバンドを持たないため，光合成試料に対する標準としてはあまり有用とは言えない．アセトンや酢酸エチルなど，この波数領域に C＝O 伸縮振動バンドを持つ溶媒が有用である．標準溶媒のラマンスペクトルは成書[1]の付録に纏められているので利用するとよい．

#### 2.f.3.6　フーリエ変換ラマン法

近赤外励起のラマン散乱測定法として，FT ラマン法が普及している．励起光としては Nd：YAG レーザーの 1064 nm の発振線が主に用いられ，試料からの散乱光をフーリエ変換赤外分光計に導入し，そのスペクトルを観測する．検出器としては，近赤外領域に感度を持つ，In-GaAs 検出器や Ge 検出器などを用いる．この励起波長は，クロロフィル類に対しては前期共鳴条件となり，蛍光による妨害を回避してラマン散乱を測定することができる[13,14]．一方，カロテノイドのラジカルカチオンなどのように，1000 nm 付近に吸収帯をもつ分子種に対しては真正共鳴ラマン散乱の測定となる[15]．FT ラマン法は，光合成細菌の第一電子供与体バクテリオクロロフィルの水素結合状態の解析に有効に利用されている[16]．

### 2.f.4　スペクトル解析

共鳴ラマンスペクトルでは，共鳴条件にある特定の色素の振動のうち，励起電子遷移に共役するもののみが観測されるため，バンドの帰属は比較的容易である．励起波長を変えて測定すれば各色素への帰属も容易に判断でき，同位体置換が必要になることもあまりない．ただし，試料中に同じ吸収帯をもつ同種の色素が多数含まれている場合には，それらのラマンバンドが重なって現れる．よって，各コファクターを識別するためには，酸化還元電位を変えて活性種の割合を変化させ，その差スペクトルを測定するなどの工夫が必要となる．

各色素のラマンスペクトルは，抽出精製物として様々な溶媒中で測定されており，構造情報を導き出すためのマーカーバンドもほぼ確定している[2–7]．以下に，クロロフィル $a$ とカロテノイドについて，マーカーバンドとそれから得られる情報について簡単に述べる．

#### 2.f.4.1　クロロフィル $a$

1620–1510 $cm^{-1}$ の領域には，クロリン環の C＝C 伸縮振動が現れる．これらの振動の振動数は中心 Mg への配位数の違いによって変化するため，配位数を決めるマーカーとなる[17]．6 配位構造においては，中心 Mg は環平面上に位置するが，5 配位構造では第 5 配位子によって中心 Mg が環平面から引き出された構造を取る．よって，5 配位構造において環はより縮んだ状態となり，C＝C 伸縮振動の振動数は 6 配位の場合よりも高く現れる． 3 つの C＝C バンドが，それぞれ 1620–1590，1560–1540，1530–1510 $cm^{-1}$ の領域に現れ，そのうち，1600 $cm^{-1}$ 付近のバンドが最も明確に配位数依存性を示す．5 配位では 1620–1600 $cm^{-1}$，6 配位では 1600–1590 $cm^{-1}$ にバンドが現れる．

$13^1$ ケト C＝O はクロリン環の共役系に含まれているため，その伸縮振動は比較的強い強度を示す．1710–1640 $cm^{-1}$ の範囲にバンドが現れる[18,19]．水素結合相互作用がない場合には，1710–1680 $cm^{-1}$ に振動数を示す．その際，C＝O 基が存在する環境の誘電率が高いほど，低い振動数となる．水素結合を形成することにより，より低波数

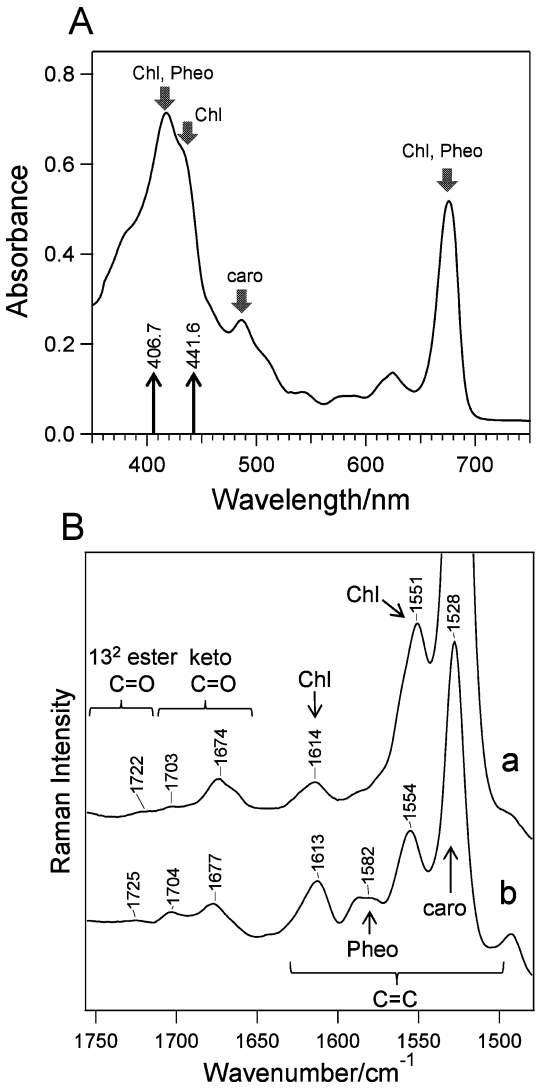


**図 3**：光化学系 II 反応中心蛋白質の電子吸収スペクトル（A）と共鳴ラマンスペクトル（B）．共鳴ラマンスペクトル（B）は，441.6 nm（a）及び 406.7 nm（b）励起によるもの．ラマン散乱測定の試料温度は 85 K．

側にシフトし，通常は，1680–1660 $cm^{-1}$ にバンドを示す．クロロフィル会合体において，ケト C＝O が別のクロロフィルの中心 Mg に直接配位すると，その伸縮振動は，1660–1650 $cm^{-1}$ に現れる．また，水との会合体において，C＝O‥HO(H)‥Mg のような架橋構造によって著しく強い水素結合が形成されると，1650–1640 $cm^{-1}$ まで振動数がシフトする．

$13^2$ エステル C＝O は，共役環の近傍に存在しているため，弱いラマンバンドを示すことがある．ケト C＝O よりも高い 1750–1710 $cm^{-1}$ の振動数領域にバンドを示すため，ケト C＝O との区別は容易である．水素結合の形成により，また，極性環境下おいて，より低波数側に振動数を持つことはケト C＝O と同じである．

他のクロロフィル類に関しても，多少の振動数の違いはあるものの，同様のマーカーバンドを用いてスペクトルを解釈することができる．

#### 2.f.4.2　カロテノイド

カロテノイドの共鳴ラマンスペクトルにおける顕著なバンドは，1600–1500 $cm^{-1}$ の C＝C 伸縮振動，1300–1100 $cm^{-1}$ に現れる CC（C＝C または C–C）伸縮/CH 面内変角振動，1000 $cm^{-1}$ 付近の Me 横揺れ振動，960 $cm^{-1}$ 付近に現れる C–H 面外変角振動のバンドである[20]．

共役二重結合の長さが長いカロテノイド程，C＝C 結合は低い振動数を持つ[21]．これにより，ラマンスペクトルからカロテノイドのポリエン鎖長をある程度推定することができる．しかし，溶媒や蛋白質環境の違いによっても C＝C 振動数が変化するので注意が必要である[22]．一般に，電子吸収バンドの波長と C＝C 伸縮振動数とは負の相関があることが知られている．

1200–1100 $cm^{-1}$ の CC 伸縮/CH 変角領域には複数のバンドが見られ，そのバンドパターンからシス/トランス異性体を区別することが可能である[6,23]．紅色光合成細菌の反応中心蛋白質に結合するカロテノイドが 15 シス型を持つことは，この CC/CH マーカーによって明らかとなり[24]，後に X 線結晶解析により確認された[25]．

960 $cm^{-1}$ 付近の対称 C-H 面外変角振動バンドの相対強度により，ポリエン鎖の捻じれ構造を知ることができる（図 4）[26,27]．ポリエン鎖が平面構造を取っている際には，この振動モードはほとんど強度を示さないが，二重結合に対して捻じれて対称性が崩れることにより，強いラマン強度を示すようになる．蛋白質に結合したときのカロテノイドの捻じれ構造は，光合成細菌の光捕集系におけるカロテノイドからバクテリオクロロフィルへの一重項励起エネルギー移動効率[27]や，植物の LHCII の非光化学消光[28]と関連付けて議論されている．

### 2.f.5　測定例：光化学系 II 反応中心蛋白質の共鳴ラマンスペクトル

光化学系 II の反応中心蛋白質には，コファクターとして 6 分子のクロロフィル *a* と 2 分子のフェオフィチン *a*，2 分子の *β*-カロテン，1 分子のチトクロム *b* 559 が含まれている．406.7 nm と 441.6 nm の励起光を用いて，クロロフィル及びフェオフィチンの Soret 帯を励起し，それらの共鳴ラマンスペクトルを測定する．

励起光として，He-Cd レーザー（Kimmon IK5651R-G）の 441.6 nm，及び $Kr^+$ レーザー（Innova 90-K）の 406.7 nm の発振線を用いる．

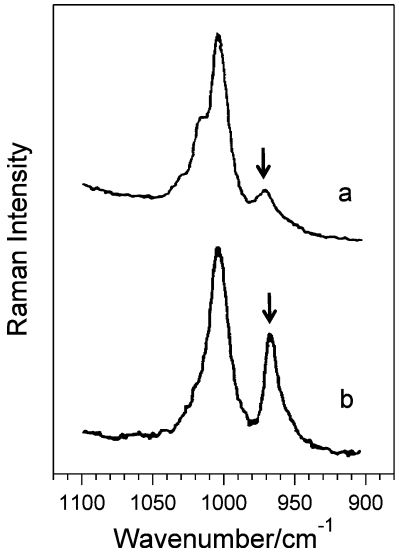


**図4**：紅色光合成細菌のクロマトフォアにおけるカロテノイドの共鳴ラマンスペクトル（CH面外変角振動領域）．(a) *Rhodobacter sphaeroides* (b) *Chromatium vinosum*．CH面外変角振動バンドを矢印で示す．*Rb. sphaeroides* の弱いCH面外変角振動バンド，及び *Ch. vinosum* の強いCH面外変角振動バンドは，それぞれ，ポリエン鎖の平面，及び捩れ構造を表す．

Hepes緩衝液（50 mM Hepes-NaOH，0.1% dodecyl maltoside pH 7.5）に懸濁した反応中心蛋白質（0.2 mg Chl/mL）を石英ガラスセル（図2b(i)）に入れ，クライオスタット（Oxford DN1704）中で温度を85 Kにする．試料部において15 mWの強度のレーザー光をやや焦点をぼかして照射し(局所的な温度上昇を防ぐため)，レーザー光に対して直角方向の散乱光を集光する．ノッチフィルター（Kaiser Optical Systems, Inc.）でレイリー散乱を除去した後，シングル分光器に入射し，分光されたラマン散乱光をCCD検出器（Princeton Instruments, Inc., LN/CCD-1100PBUVAR）を用いて検出する．

図3のスペクトルが得られる[29]．クロロフィル *a* のSoret帯と一致する441.6 nmによる励起では，クロロフィルと *β*-カロテンのバンドが，またフェオフィチン *a* のSoret帯に近い406.7 nmの励起では，これらに加えて，フェオフィチンのバンドが観測される．

## 参考文献


1）濱口宏夫，平川暁子編，「ラマン分光法」，学会出版センター，1988．

2）M. Lutz, Advances in Infrared and Raman Spectroscopy, eds. R. J. H. Clark & R. E. Hester, John Wiley & Sons, New York, 1984, vol. 11, p.211.

3）B. Robert, *Biochim. Biophys. Acta* **1017** (1990) p.99.

4）M. Lutz & W. Mäntele, Chlorophylls, ed. H. Scheer, CRC Press, Boca Roton, 1991, p.855.

5）B. Robert, Biophysical Techniques in Photosynthesis, eds. J. Amesz & A. J. Hoff, Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, Netherlands, 1996, p.161.

6）Y. Koyama & R. Fujii, The Photochemistry of Carotenoids, eds. H. A. Frank, A. J. Young & R. J. Cogdell, Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, Netherlands, 1999, p.161.

7）B. Robert, The Photochemistry of Carotenoids, eds. H. A. Frank, A. J. Young & R. J. Cogdell, Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, Netherlands, 1999, p.189.

8）V. Palaniappan, C. C. Schenck & D. F. Bocian, *J. Phys. Chem*. **99** (1995) p.17049.

9）D. D. Eads, C. Moser, M. E. Blackwood, C. Y. Lin, L. Dutton & T. G. Spiro, *Biopolymers* **57** (2000) p.64.

10）D. Frolov, A. Gall, M. Lutz & B. Robert, *J. Phys. Chem. A* **106** (2002) p.3605.

11）A. P. Shreve, N. J. Cherepy, S. Franzen, S. G. Boxer & R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **88** (1991) p. 11207.

12）K. Czarnecki, V. Chynwat, J. P. Erickson, H. A. Frank & D. F. Bocian, *J. Am. Chem. Soc*. **119** (1997) p.2594.

13）T. Noguchi, Y. Furukawa & M. Tasumi, *Spectrochim. Acta A* **47** (1991) p.1431.

14）T. A. Mattioli, A. Hoffmann, B. Robert, B. Schrader & M. Lutz, *Biochemistry* **30** (1991) p.4648.

15）J. S. Vrettos, D. H. Stewart, J. C. de Paula & G. W. Brudvig, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) p.6403.

16）A. Ivancich, K. Artz, J. C. Williams, J. P. Allen & T. A. Mattioli, *Biochemistry* **37** (1998) p.11812.

17）M. Fujiwara & M. Tasumi, *J. Phys. Chem*. **90** (1986) p. 250.

18）S. Krawczyk, *Biochim. Biophys. Acta* **976** (1989) p.140.

19）Y. Koyama, Y. Umemoto & A. Akamatsu, *J. Mol. Struct*. **146** (1986) p.273.

20）S. Saito & M. Tasumi, *J. Raman Spectrosc*. **14** (1983) p. 310.

21）L. Rimai, M. E. Heyde & D. Gill, *J. Am. Chem. Soc*. **95** (1973) p.4493.

22）R. J. H. Clark, N. R. D'Urso & P. F. Zagalsky, *J. Am. Chem. Soc*. **102** (1980) p.6693.

23）Y. Koyama, I. Takatsuka, M. Nakata & M. Tasumi, *J. Raman Spectrosc*. **19** (1988) p.37.

24）M. Lutz, I. Agalidis, G. Hervo, R. J. Cogdell & F. Reiss-Husson, *Biochim. Biophys. Acta* **503** (1978) p.287.

25）B. Arnoux, A. Ducruix, F. Reiss-Husson, M. Lutz, J. Norris, M. Schiffer, & C.-H. Chang, *FEBS Lett*. **258** (1989) p.47.

26）K. Iwata, H. Hayashi & M. Tasumi, *Biochim. Biophys. Acta* **810** (1985) p.269.

27) T. Noguchi, H. Hayashi & M. Tasumi, *Biochim. Biophys. Acta* **1017** (1990) p.280.
28) B. Robert, P. Horton, A. A. Pascal & A. V. Ruban, *Trends Plant Sci*. 9 (2004) p.385.
29) T. Noguchi, T. Tomo & Y. Inoue, *Biochemistry* **37** (1998) p.13614.