講座

生物科学における分光学

第6講 ピコ秒領域時間分割吸収・蛍光測定

七田 芳則・吉澤 透

京都大学理学部生物物理学教室 京都市左京区北白川追分町 (〒606)

(1987年11月13日受理)

Spectroscopy in Biological Sciences

(VI) Picosecond Time-Resolved Absorption and Fluorescence Spectroscopy

Yoshinori SHICHIDA and Tôru YOSHIKAWA

Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606, Japan

(Received November 13, 1987)

1. はじめに

生体高分子あるいはその分子集合体は、種々の物理・化学的方法を用いて、その反応が追跡されている。そのうち、分光法を利用した反応追跡法は、他の手法と比べて、時間分解能あるいは空間分解能において、格段に秀でている。特に1970年代に発展したレーザー技術は、その測定技術の進歩とともに、分子及び細胞レベルの生物学の研究に一大転機をもたらした。

生物は、非常に多くの物質からなる高度に組織化された分子集合体である。すなわち、生体の中では、生きていくために必要な機能を担う種々の分子が、整然と配置され、細胞といわれる一つの単位を形成している。したがって、生物学では個々の機能分子の反応過程を追跡するだけではなく、細胞やその集合体(組織)を破壊することなしに、その中に存在する分子あるいは分子集合体の反応過程を追跡することが要求される。このような観点から、分光法を用いた時間分割測定法は、非常に有力な研究手段である。すなわち、個々の分子(物質)には、それぞれ特有の光吸収波長があるので、それを利用して、種々の分子の混在している細胞内で、ある特定の分子の状態

を選択的に変化させたり、またある分子だけの動的な挙動も観測したりすることができる。また、化学反応の追跡に必須であると考えられている極超短光パルス(フェムト秒、ピコ秒など)を用いると、生体高分子の光励起直後からの反応も追跡することができる。さらに、レーザー光は平行光線であるから、それをレンズなどで極限まで集光させることができるので、単一の細胞などのように非常に狭い領域でおこる反応過程も追跡できる。

本稿では、分光法を用いた時間分割測定のうち、吸収及び蛍光測定の生体の光受容色素への応用について概説する。

2. 時間分割測定

さて、光受容色素の反応過程を解析するには、まず対象となる試料を励起して遷移状態を作り、その変化の過程を測定する。その測定原理は非常に簡単で、図1のように書く事ができる。測定装置は大まかに三つの部分に分けられる。まず、試料を励起する光源部(Laser)、次に試料の吸収変化などをモニターするためのモニター光及び光学系(蛍光測定の場合にはモニター光は不用であるが、蛍光を検出部に導く光学系は必要)、最後に検出

図1 時間分割吸収測定の様式図 (Rodger⁷⁾ 改変).

Laser: 励起光源 (レーザー), M: ミラー, ML: 測定用光源, S: シャッター, F: フィルター, L: レンズ, A: アパーチャー, SM: 試料, Mono: モノクロメーター, D: 検出器 (ディテクター), TD: 記録系 (トランジェントディジタイザー).

部 (TD) である。

試料を励起する光源として、初期の頃には、低インダクタンスで高い光密度を持つフラッシュランプが使用されていた。このようなランプから発生する光パルスは、その幅が数マイクロ秒からそれよりも長い。時間分解能が余り要求されない実験では、取り扱いが難しくないので、現在でもよく使われている。また、高い光密度を必要としない単一光子計数法(後述)による蛍光の測定には、数ナノ秒のパルス幅を持つフラッシュランプも用いられている。しかし近年では、安定性のよいレーザーが作製されているので、それがフラッシュランプにとってかわるようになってきている。最近では、極限に近い速さの化学反応を追跡するのにフェムト秒パルスが用いられ始めている。これ以外に目的に応じて非常に高い光密度をもつパルス、また平行性のよいパルス、さらに、非常に繰り返しのよい(数10 MHz、従来の光源では50 kHzが限度)パルスを発生するレーザーが用いられている。また、レーザー光は従来単一(或は数種の)波長の光パルスしか放出しないといわれてきたが、その欠点は、色素レーザー技術の発展によって解消された。しかしレーザー光源はフラッシュランプに比べて、装置が大型であること、取り扱いに少々熟練が必要なこと、また高価であること等が難点である。

一方、変化過程を追跡する測定システムも、エレクトロニクス技術や集積回路などの半導体製造技術の進歩に支えられて、長足の進歩をとげてきた。最近では、サブナノ秒の時間追従を持つオシロスコープやトランジェン

トディジタイザー、ピコ秒の時間追従を持つストリークカメラ、また、高感度で時間追従の良いマルチチャンネルプレート光電子増倍管、さらに二次元検出器であるオプティカルマルチチャンネルディテクターなど種々の測定システムが市販されるようになり、その種類は数え上げればきりが無い。以下には、最近の技術を利用した生体物質の高速測定のうち、ピコ秒領域での吸収・蛍光測定装置について概説する。

2.1 ピコ秒時間分割吸収光測定

2.1.1 時間分割吸収測定

ナノ秒領域で時間分割吸収測定をするには、図1のような光学系を組み、励起光源としてナノ秒(あるいはピコ秒)レーザーを用い、検出器としてトランジェントディジタイザー等を用いればよい。しかし、ピコ秒領域での時間分割吸収測定とナノ秒領域でのそれとの間には、一つのギャップが存在する。それは、現在の最高性能のオシロスコープやトランジェントディジタイザーでも、それらの時間分解能が充分でなく、ピコ秒領域では用いられないことである。したがって、ピコ秒領域の時間追従には特殊な装置あるいは光学系が用いられている。その装置としては、すでにふれたように、ストリークカメラがある。現在市販されているものは、0.5ピコ秒の時間分解能をもっているが、測定装置のダイナミックレンジや、吸収をモニターする光源をいかにして得るか等の問題があり、現在のところ、吸収測定にはあまり用いられていない。しかし、後述するように、蛍光測定には有力な装置として活用されている。ここでは、光学遅延を利用したピコ秒時間分割吸収測定について詳述する¹²⁾。

1ピコ秒は、光が真空中を0.3mm進む時間であり、1ナノ秒は30cm進む時間である。このことから、ピコ秒領域で時間分割吸収測定を行うには、試料を励起する光パルスと吸収変化を測定する光パルスとの光路差を数cmずらせば、励起後数10ピコ秒での吸収変化を観測することができる。図2には我々の用いている装置のブロック図が示されている。

試料を励起したり、または励起後の吸収変化を測定したりする光パルスを発生させる光源として、我々は、モード同期YAGレーザー(Nd:YAG Laser)を用いている。レーザーオシレータからは、数ナノ秒の間隔をおいて数本のピコ秒パルスからなるパルス列が発生する。それぞれのパルスは波長が1064nm、パルス幅は25ピコ秒である。試料の励起には、単一光パルスを用いたほうがよいので、単一パルスセクター (SPS) でこのパルス列から、一番強度の高いパルスを選択して取り出す。単一パルスセクターは二つの偏光子と一つのポッケル

M: ミラー, DC: モード同期用色素セル, SPS: 単一パルスセレクター, AMP: 増幅器, SHG: 第二高調波発生器, BS: ビームスプリッター, SPM: 白色光発生素子 (自己位相同期素子), L: レンズ, D: ディフューザー, A: アパーチャー, F: フィルター, HF: ハーフミラー, P: プリズム, SM: 試料, PC: ポリカルロメーター, V: ビジコンディテクター, OMA 2: オブカルマルチチャンネルアナライザー, MS: モニタースコープ, R: レコーダー, PD: フォトダイオード, Osc: オシロスコープ.

次に、試料励起用の光パルスを発生させるために、増幅した光パルスを KDP という非線型結晶 (SHG) に角度マッチングさせて入射させる。すると、光パルスの波長は 1064 nm であるが、そのうち数 % が波長 532 nm の光パルスに変換される。ビームスプリッター (BS) を

その後、ハーフミラー（HM）を用いてモニター光

を二つに分け、一つを試料の吸収変化を測定するための試料光パルスとして、他を光パルスの強度あるいはビームの空間分布を補正する参照光パルスとして利用する。ピコ秒白色光パルスをモニター光として利用する場合、上記のように測定系をダブルビームスペクトロメーター方式にすることが必須である。その理由は、ピコ秒白色光パルスの発生原理がレーザー光の非線形効果を利用しているため、発生させる元の 1064 nm の光パルスの強度の変動や媒質の状態(温度など)によって、ピコ秒白色光パルスの強度や、波長分布が非常に変わるからである。

すでに述べたように、光励起後、ピコ秒領域で試料の吸収変化を測定するには、励起光が試料に到達するまでの距離を、モニター光が到達するまでの距離より数 cm 短くしなければならない。そのために、我々の測定系では励起光パルスの光路に移動プリズム(P)をいれ、励起光の試料までの到達距離を変化させている。

さて、試料を通過したモニター光(試料光)と参照光は、ポリクロメーター(PC)でスペクトルに変換されたあと、2次元に光検出素子が配列しているビジコンディテクター(V)によって測定される。ビジコンディテクターは、スペクトルグラフのフィルムに相当するものと考えればよい⁴⁾。すなわち、ビジコンディテクターの一方の光検出素子の配列軸に試料光と参照光を分離させて入射し、他の軸にそれぞれの光の波長分散(スペクトル)を測定できるようにセットすれば、このディテクターにより、試料および参照光のスペクトルを同時に測定することができる。実際の測定では、試料に励起光を照射した場合としない場合のそれぞれのモニター光のスペクトル及びその強度を測定し、コンピューター処理をすることにより(OMA2)、ピコ秒領域での光照射前後の差吸収スペクトルを算定している。

図3に測定の一例を示す¹⁾。試料は高度好塩菌(*Halobacterium halobium*)の細胞膜に存在するバクテリオロドプシン(後述)で、それをピコ秒レーザー(532 nm)で励起すると、長波長側に吸収極大をもつ中間体が生成するが、このことは照射前後の差の吸収スペクトルを測定することによって示されている。

このように上記の測定装置では、試料励起後、ピコ秒領域のある特定の時間(図3では、0ピコ秒、100ピコ秒など)に生成している中間体の吸収スペクトルを測定することができる。

では、試料を励起した後ピコ秒領域で起こる時間変化は、どのようにして測定すればよいであろうか。勿論上記の測定システムで、移動プリズムを動かすことにより、

図3 バクテリオロドプシンのピコ秒時間分割吸収測定(七田ら¹⁾)。

好塩菌ハロバクテリウムハロビウムの光受容色素バクテリオロドプシンを、ピコ秒レーザー(波長 532 nm, パルス幅 25 ピコ秒)で励起後、図中の時間で測定した中間体のスペクトル(バクテリオロドプシンとの差スペクトル)。上図のスペクトル1とスペクトル2~4が違うことから、ピコ秒領域で2つの中間体(JとK)の存在すること、また、下図のスペクトル1と2の差スペクトルと、2と3の差スペクトルが違うことから、ピコ秒領域からナノ秒領域にかけて、二つの中間体(KとKL)の存在することがわかった(本文参照)。

励起光とモニター光との光路差を少しずつ変え、測定を繰り返しても求められるが、短い時間間隔(例えば、約 10 ピコ秒おき)でデータを得ようとする、多量の試料と労力がある。そこで、時間変化の測定には、通常エシェロンリフレクター(図4)という特別の光学素子が用いられている⁵⁾。これは、階段状のミラーで、モニター光パルスを反射させることにより、それぞれの段のミラーの間の光路差に応じて、きまった時間間隔のパルス列を作る素子である。我々は図2の光学系の、白色光を発

図4 エシェロンリフレクターの模式図。

エシェロンリフレクターは階段状のミラーであり、図中のMと書いた平面がミラー部分である。図のように一つの光パルスがエシェロンリフレクターに入射すると、それぞれの段の光路差に対応して時間のずれた光パルス列(1, 2, 3, 4)に変換される。

図5 エシェロンリフレクターを用いた、ロドプシンのピコ秒時間分割吸収測定(神取ら⁶⁾)。

ウシのロドプシンをピコ秒レーザー(波長532 nm, パルス幅25ピコ秒)で励起した後、ピコ秒領域で波長578 nmの吸収変化を測定した。上図ではロドプシンを20 $\mu\text{J}/1.8\text{ mm}\phi$ のレーザーパルスで、また下図では約200 $\mu\text{J}/1.8\text{ mm}\phi$ のレーザーパルスで励起した(本文参照)。

生させた直後のミラーの位置にこれを入れることにより、ロドプシンの光励起後の578 nmの吸収変化を測定している⁶⁾(図5)。

さて、我々の測定装置のうち、特に生物試料のピコ秒分光という観点から、特に注意を払った部品について述べよう。

第1は試料セル及び試料セルホルダーである。我々の研究試料である動物のロドプシンは、光を吸収すると不可逆的に退色(分解)する。したがって、一度でも励起光パルスで励起されると、その試料は再び使えないので、

それを交換しなければならない。そのため、試料を節約する意味で、非常に少ない量で測定が行えるよう、マイクロセル(2 mm×2 mm)を使用する。このセルを使うと、1回の測定に用いる試料の量は8 μl (2 mm×2 mm×2 mm)ですむ。これは、簡単な事であるが、生物試料の測定には非常に重要である。いま簡単に測定に要する時間を考えると、我々の研究室では、上記のピコ秒領域時間分割吸収測定システムを組み上げて調整するのに約1週間かかり、一つの試料の測定には約1ヶ月かかる。一方、最も簡単に調製できるウシロドプシンでも測定用試料3 mlを網膜から調製するのに約1週間かかる。さらに、レチナールアナログを発色団とするロドプシンアナログの調製には、2週間～1ヶ月かかる。したがって、実験に必要な日数のうち、約半分が試料の調製に費やされる。以上のことから、少ない試料で実験を行えるシステムを組みあげることがいかに重要であるか、おわかりいただけると思う。

第2点は、モニター光に使う白色光パルスについてである。我々は白色光パルスの生成にガラスを用いているが、これ以外に、水、重水、リン酸(ポリリン酸)などが媒質として使われている。ガラスを使う長所は、生成する白色光パルスのスペクトル分布が非常にブロードであり、スペクトルの特定の波長領域にきわだったピークのないことである。他の媒質では、それぞれの媒質に特徴的なラマン線が非常に強く現れるため、白色光パルスのスペクトルには強いラマン線のピークが含まれる。さらに、白色光を発生させる元となるレーザー光の強度が少し変動すると、ピークの強度が大きく変動するので、測定した試料のスペクトルにラマン線のピークが重なりやすい。もちろん、得られたスペクトルを数多く積算すれば、この人工的なピークを除くことができるが、試料の調製がむづかしい場合は、決定的な短所となる。一方、ガラスを使う短所としては、白色光パルスが発生する部位でガラスの光学破壊がおこるため、ガラスのレーザー光を集光させる部位を実験のたびごとに換えねばならないことである。したがって、ガラスを移動させたときに光軸がずれないように、あらかじめ光学系を組み上げておかねばならない。ガラス以外に上にあげた媒質はすべて液体なので、このような操作は必要がない。

2.2 時間分割蛍光測定

2.2.1 ストリークカメラを用いた測定

近年ピコ秒領域での時間追従を持つ検出器として、ストリークカメラが用いられている。ストリークカメラは波形を直接観測できる高速光検出器で、現在最高の時間分解能(0.5ピコ秒)を持っており、試料から発する蛍光

の減衰曲線をピコ秒領域で直接観測することができる。

図6にストリークカメラの本体であるストリーク管の模式図⁷⁾を、また、図7に我々の研究室で用いている測定

図6 ストリーク管(浜松ホトニクス)の模式図(Rodger⁷⁾ 改変)。

PC: 光電面(フォトカソード), G: グリッド, A: アノード, DP: 掃引電圧用電極, MCP: マルチチャンネルプレート, PS: 蛍光スクリーン。

系のブロック図⁸⁾を示す。

ストリーク管のカソード(PC: 光電面)に光パルスがあたると、光パルスは電子パルスに変換される。電子パルスはグリッド(G)を通り高電圧のかかったアノード(A)により加速された後、掃引電極の間を通過する。掃引電極の間には、ピコ秒からナノ秒の時間で低い電圧から高い電圧へと変化する電圧パルス(掃引電圧)がかけられるようになっており、これによって電子パルスのうち、先に掃引電極板に到着した電子は、マルチチャンネルプレート(MCP)の上の部分に、また後に到着した電子は下の部分にあたる。これにより、光パルスの時間波形がMCP上の空間波形に変換されて検出されるのである。

さて、我々の装置では試料励起光パルスとして、1.1で述べた波長532 nmの光パルスを用いている。図7で532 nmのパルスの光路を非常に長くとしているのは、ストリークカメラをトリガーする光パルスと励起パルス

図7 ピコ秒時間分割蛍光測定装置のブロック図。

図中で使用しているピコ秒レーザー装置は図2のものと同じである。第二高調波発生器(SHG)により波長532 nmに変換されたレーザーパルスは、ビームスプリッターにより基本波(1064 nm)と分離され、試料に照射される。532 nmの光パルスの光路を長くしているのは、ストリークカメラをトリガーするタイミングと試料を照射するタイミングをとるためである。

M: ミラー, DC: モード同期用色素セル, SPS: 単一パルスセレクター, AMP: 増幅器, SHG: 第二高調波発生器, BS: ビームスプリッター, A: アパーチャー, F: フィルター, P: プリズム, SM: 試料, PD: フォトダイオード, Osc: オシロスコープ, DU: 遅延回路。

図8 5員環ロドプシンのピコ秒時間分割蛍光測定（神取ら⁹⁾）。

5員環ロドプシンをピコ秒レーザー（波長 532 nm, パルス幅 25 ピコ秒）で励起し、ストリークカメラを用いてピコ秒領域での蛍光の減衰曲線を測定した。図中の点は実験値であり、実線は、最小 2 乗法を用いて実験値をシミュレート ($\tau=60$ ピコ秒) した曲線（本文参照）。挿入図は、励起光の強度（光密度）に対する蛍光の強度をプロットしたもの。

の同期をとるためである。

図8に最近我々が行った実験例を示す⁹⁾。試料は5員環レチナール¹⁰⁾を発色団とするロドプシン類縁体（5員環ロドプシン）である。後述するように、ロドプシンは発色団として 11-シスチナールを持っており、光を吸収すると発色団のシストランス異性化が非常に高速（サブピコ秒）で起こる。5員環レチナールは 11-シスレチナールの10と13の位置の炭素をメチレン基で結合させ、異性化が起こらないようにしたレチナール類縁体である（図11参照）。5員環ロドプシンは励起状態で発色団の構造変化が起こらないので、励起状態からの蛍光が観測されるようになる。詳しい説明は他の文献を参照していただきたい。

2.2.2 単一光子計数法

生物試料を光励起した後に、試料から出る蛍光を測定する有力な手法として、単一光子計数法がある。この方法は、他の方法と比べて測定に時間がかかるという難点はあるが、データの s/n 比が非常に高いので、種々の状態にある光合成アンテナ色素タンパク質の励起エネルギー移動の解析（後述）の手段として非常に有力であると言われている。以下簡単にこの方法について述べる。

単一光子計数法は、その名のように光励起した色素分子から出てくる蛍光の光子を一つずつ数える方法である。実際には、ピコ秒、あるいはナノ秒の非常に弱い光

パルスを試料にあて、ディテクター（光電子増倍管など）に到達する蛍光の強度を十分に弱くする。すなわち、1回の光パルス照射につき、せいぜい1個の光子しか検出されないようにする。そのように組み立てた光学系を用いて試料を励起し、蛍光の光子が検出されるまでの時間を記録する。試料からでてくる蛍光の頻度は、励起直後が一番高く、時間とともに減衰する。したがって、上記の操作を何百万回とくり返して、横軸に蛍光光子が検出されるまでの時間を取り、縦軸に検出された回数をプロットすると、蛍光の減衰曲線が描ける。図9には、山崎ら¹²⁾によって報告されている装置のブロック図が示されている。すでに述べたように、この方法の欠点の一つは、蛍光光子を検出する操作を何回もくり返さねばならないので、測定に時間がかかるということである。この欠点を補うには、励起光パルスの単位時間あたりのくり返しを多くすればよい。山崎らは、光源としてモード同期アルゴンイオンレーザーとそれに同期させた色素レーザーを用いて、くり返し 800 kHz のピコ秒パルスを得ている。また、検出器として、マルチチャンネル光電子増倍管を用いて、70ピコ秒の分解能（デコンボリューション操作により10ピコ秒以下）を得ている。彼らは、この装置を用いて、光合成の光集光システム（light-harvesting antenna system）の蛍光を単一波長で測定し、その減衰曲線を10秒で、また、600 nm から 750 nm の蛍

光スペクトルを約1時間で測定している¹²⁾ (図10参照)。

3. 時間分割吸収蛍光測定による、生体光受容色素の研究—最近の動向

3.1 レチナール蛋白質

レチナール蛋白質とは、レチナール (ビタミンAのアルデヒド型) (図11参照) を補欠分子族 (発色団) として持つ蛋白質の総称である。よく研究の行われているのが、視覚の光受容色素であるロドプシンや好塩菌に存在するバクテリオロドプシンである。

3.1.1 ロドプシン

ロドプシンは動物の明暗視 (薄明視) を司る視細胞の外節と呼ばれる部分に存在し、11-シスレチナール (図11参照) を発色団とする膜蛋白質である。外節には、ディスク膜と呼ばれる円盤状の膜が数百枚積み重なった構造があり、ロドプシンはその膜構造のなかに埋め込まれている。ロドプシンの分子量は動物種によって異なるが、約4万~7万である。最近、遺伝子工学の導入により、現在6種のロドプシンの蛋白質の一次構造が決められている。そのうち、分光学的にもよく研究されているウシのロドプシンは、348個のアミノ酸残基からなる単一のペプチドである^{14,15,16)}。発色団はアミノ末端から296番目のリジン残基とシッフ塩基を介して結合している。また、ペプチドはディスク膜中で7本のヘリックス構造を作っていると推定されている¹⁷⁾。

さて、視覚の光情報伝達過程におけるロドプシンの役割は、外界からの光を効率よく捕獲し、その構造変化を

図9 ピコ秒単一光子計数法のブロック図 (山崎ら¹²⁾)。

PD: フォトダイオード, Discrim: ディスクリミネーター, Delay: 遅延回路, TAC: time-to-amplitude コンバーター, MCP-PMT: マルチチャンネルプレート光電子増倍管, MCPHA: マルチチャンネルパルス高検出器。

図10 光合成アンテナ色素のピコ秒時間分割蛍光測定 (単一光子計数法) (山崎ら¹²⁾)。

フィコビリゾーム (本文参照) をピコ秒レーザー (波長 610 nm, パルス幅 8 ピコ秒) で励起した後に発する蛍光の減衰曲線を図中に示した波長でモニターした。

図11 各種光受容色素の発色団の構造。

通じて光の情報をロドプシンに共役している後続増幅系に正確に伝えることである。ロドプシンの蛋白質の構造及び視覚の光情報伝達過程については、すぐれた総説が発表されているのでそれらを参照して頂きたい¹⁸⁻²¹⁾。ここでは、ロドプシンの光反応の解析に時間分割測定が、どのように利用されているかを述べる。

脊椎動物のロドプシンは光を吸収すると、可視部(500 nm 付近)にあった吸収が近紫外部(380 nm)に移る。これを、光退色変化という。この過程で、ロドプシンは種々の中間体に変化する。この過程の研究は、1950年代から精力的に続けられ、現在では7つの中間体あるいはサイドプロダクトの生成が知られている(図12²⁰⁾)。これら中間体の大部分は、時間分割測定法よりは、試料を低温にして光化学反応を遅らせ中間体を同定する、低温吸収スペクトル法によって発見されている。実際、図12に書かれた中間体のうち時間分割測定法により最初に報告されたものは、フォトロドプシン一つだけである。

1950年代には、Wald のグループ^{22,23)}による低温吸収スペクトル法によってルミロドプシン、メタロドプシンが発見された。さらに1958年には、吉澤、鬼頭²⁴⁾により、パソロドプシンの存在が示された。時間分割測定法は、1960年代には Grellmann ら²⁵⁾によって行われた研究をあげることができる。彼らは、 -20°C ～ -70°C に冷やしたロドプシン試料にフラッシュ光を照

図12 ウシロドプシンの光退色過程。

かつこ内は、吸収スペクトルの極大波長を示している。矢印の右の温度は、低温スペクトル法によって求められた、中間体の遷移温度である。また、左の時間は、室温でのレーザーフォトリシス、あるいは、フラッシュフォトリシスにより求められた時定数である。

表 1 ウシロドプシンとその中間体の、ロドプシンに対する相対的エンタルピーと相対的エントロピー及び各中間体間の活性化パラメーター^{26), 27), 28)}

	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol.deg)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol.deg)
ロドプシン	0	0			
バソロドプシン	35	43			
↓			10	10	-5
ルミロドプシン	26	37			
↓			19	60	160
メタロドプシン I	17	23			
↑↓			19	60	150
メタロドプシン II	27	60			
↓			21	19	-7
All-trans レチナール + オプシン	22	40			

射したあと、その吸収の時間変化を測定し、バソロドプシンからルミロドプシンへの変化過程が三つの速度定数をもつ成分に分けられること、また、それぞれの成分の活性化エネルギーは実験誤差内で一致し、 10 ± 2 kcal/mol と求められた。その後、Hubbard ら²⁶⁾、Cooper²⁷⁾、垣谷²⁸⁾によりバソロドプシン以降の中間体の生成の熱力学的パラメーターが求められている(表 1)。最近、Parkes ら²⁹⁾によって、メタロドプシン I と II との変化過程が詳しく検討された。この反応過程で特徴的なことは、両者の間に互変平衡が成り立つことであるが、彼らはメタロドプシン I のエンタルピー (ΔH) とエントロピー (ΔS) が、II に比べてともに小さいことを明らかにした。したがって、この平衡は、メタロドプシン I の ΔH が小さいことによりメタロドプシン I に傾き、 ΔS が小さいことによりメタロドプシン II に傾くのである。

さて、ロドプシンの研究に時間分割測定法が強力な測定手段となったのは、何といってもピコ秒レーザー閃光分解法が応用されてからである。1972年に Rentzepis のグループ⁶⁾が、生理的温度でバソロドプシンの生成を確認したと報告してから、ロドプシン発色団の非常に速い光異性を直接解析する道が開けた。

Rentzepis ら⁶⁾は、モード同期 Nd³⁺: ガラスレーザーシステムから発生する 530 nm のピコ秒パルスを用いて、ウシロドプシンを光励起し、ピコ秒領域で生じる光産物の生成と崩壊を検討した。その結果、光励起直後から、ロドプシンより長波長側に吸収をもつ光産物(彼らはバソロドプシンと考えた)が生成し、この光産物は、ピコ秒領域(0 ピコ秒から 300 ピコ秒)で安定に存在すると報告した。一方、Alfano らのグループは³⁰⁾、同様のレー

ザーシステムを用いて、ロドプシンと、9-シスレチナールを発色団とする人工産物であるアイソロドプシン(イソロドプシンともいう)とのピコ秒領域での光変化を調べ、両者から同じ光産物の生成することを報告した。彼らはこの光産物をバソロドプシンと考え、両者から同じ様に生成することから、バソロドプシンがトランス型のレチナールを発色団として持つと考え、ロドプシンの初期光化学反応は吉澤、Wald³¹⁾によって提唱されたように発色団のシス-トランス異性化であると報告した。

その後、上記の研究に用いられたレーザー光の強度(光密度)がロドプシンの“真”の光化学反応(一光子反応)を観測するには余りにも強く、ロドプシンの二光子吸収あるいはロドプシンに 1 個の光子が吸収されて生成した励起状態、あるいは中間体に更にもう 1 個の光子が吸収されて起こる、いわゆる二光子反応を観測していたことが指摘された³²⁾。実際、ロドプシンを非常に弱いレーザー光(光密度が、Rentzepis らのグループの約 1/200、また Alfano らのグループの約 1/10)で励起すると、励起直後に生成する中間体(フォトロドプシン)は、約 45 ピコ秒の時定数で別の中間体(バソロドプシン)に変化することが示された。一方、光密度の非常に高いレーザー光で励起すると、励起直後から長波長に吸収を持つ産物が生成し、この産物はピコ秒領域では変化しなかった⁶⁾(図 5 参照)。この結果は、以前に発表された結果と一致する。現在、励起直後に生成する中間体はフォトロドプシン、また次の中間体はバソロドプシンであると考えられている(図 12 参照)。

図 12 には、ヒソロドプシンという中間体がかかれていいる。ヒソロドプシンは、最初ロドプシンを液体ヘリ

ウム温度 (4K) で光照射したときに生成する中間体として発見された³³⁾。ヒブソロドプシンは、フォトロドプシンやバソロドプシンとは異なり、もとのロドプシンより短波長側に吸収極大をもつ。生理的温度でのヒブソロドプシンの生成は、最初イカロドプシンを 347 nm のピコ秒パルスで光励起することにより確認された³⁴⁾。しかし、この実験では、ロドプシンの吸収スペクトルの β -バンドを励起した後の光反応を観測した。一方、生理的条件下でロドプシンが吸収する光 (可視光) はロドプシンの α -バンドで吸収される。そこで、ロドプシンを可視光 (530 nm 付近) で光励起した場合に、ヒブソロドプシンが生成するかどうかを検討された結果、生成を確認したというグループと確認出来ないとするグループに分かれた。その後、生成に関する励起光強度の影響が検討された結果、ヒブソロドプシンはロドプシンの一光子反応では生成せず、二光子が必要で、おそらくロドプシンの一光子反応で生成したフォトロドプシンにさらに光が吸収されることにより生成すると考えられている³⁵⁾。したがって、ヒブソロドプシンはロドプシンの生理的な中間体ではないという考えが一般に受け入れられている。

さて、従来ロドプシンの励起状態からの蛍光は非常に弱く、観測できないと考えられていた。しかし、最近 Alfano らのグループ³⁶⁾は、ピコ秒レーザーとストリークカメラを組み合わせることにより、蛍光を観測することに成功した。彼らは、蛍光の量子収率を $1.2 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ と見積った。ロドプシンの吸収スペクトルから求められる蛍光の自然寿命は約 5 ナノ秒である。そこで、彼らは蛍光を発するロドプシンの励起状態の寿命を約 0.1~0.5 ピコ秒を求め、ロドプシンの励起状態での発色団の構造変化 (シス-トランス異性化) は、サブピコ秒のオーダーで起こると考えている。励起状態からの緩和過程は、一般に無輻射遷移過程、蛍光過程、項間交差過程、光化学過程の四つに分けられる。ロドプシンでは、励起一重項状態から三重項状態への項間交差は観測されない。また、上記のように、観測される蛍光の寿命は、自然寿命に比べて非常に速い。したがって、ロドプシンの励起状態からの緩和過程は、光化学過程 (発色団のシス-トランス異性化) と無輻射遷移過程の拮抗過程と考えられる。

3.2 バクテリオロドプシン

1972年、古細菌の一種である高度好塩菌に、レチナール蛋白質の存在することが見出され³⁷⁾、この蛋白質はバクテリオロドプシン (bR) と名づけられた。bR は、この菌の細胞膜のところどころある紫色の PATCH 状の膜の中に存在する。その生理的機能は、吸収した光エネルギーを用いて、菌の膜内外のプロトンの濃度勾配をつく

る働き、いわゆる光プロトンポンプ機能である³⁸⁾。bR は、発見後わずか15年にもかかわらず、その生理的機能の重要性に加えて、安定な蛋白質であること、また、容易に分離精製のできることから、研究が急速に進み、今では、膜蛋白質のうち、最も研究の進んでいるものの一つとなっている。bR には、オールトランス型のレチナール (図11参照) を発色団として持つ明順応型と、13-シス型とオールトランス型を 1:1 の比で発色団として持つ暗順応型とがある。このうち光プロトンポンプ機能をもつ bR は、オールトランス型の発色団を持つものである。ここではこの bR についての研究のみを述べる。

さて、bR の光化学反応過程 (図13) は、ロドプシンのそれとは違って、まず、時間分割吸収測定により調べられた。1975年に、Stoeckenius のグループ³⁹⁾により、光励起後ナノ秒からミリ秒領域までに生成する中間体の同定が行われた。その後、Rentzepis のグループ^{40,41)}により、ピコ秒領域で光化学過程が調べられた。

その後、ナノ秒レーザー閃光分解法の分解能で最も速く生成する中間体として発見された K 中間体³⁹⁾と、ピコ秒領域で発見された中間体とが吸収スペクトル的に違うことが確認され¹⁾、新たに、ピコ秒領域で発見された中間体を K 中間体、ナノ秒領域で発見された中間体を K_L 中間体と呼ばれるようになった (図4参照)。また、

図13 バクテリオロドプシンの光反応サイクル。

かっこ内は、吸収スペクトルの極大波長を示している。矢印の右の温度は、低温スペクトル法によって求められた、中間体の遷移温度である。また、左の時間は、室温でのレーザーフォトリシス、あるいは、フラッシュフォトリシスにより求められた時定数である。

Lozierらの発見したM中間体の次に生成するN中間体³⁹⁾は、追試のきかないことから疑問視されている。また、M中間体には、2成分あり、速い崩壊時定数を持つものをMf中間体、遅い崩壊時定数を持つものをMs中間体と呼ばれている⁴²⁾。bRには、このほかに、bRとは吸収スペクトルがほとんど変わらないP中間体があると報告されている⁴³⁾。この中間体はbRに比べて蛍光の量子収率が非常に大きいこと、また、P中間体は数ミリ秒の時定数でbRへ戻ることが報告されている。最近、Drachevら⁴⁴⁾は、P中間体がM中間体とbRとの間に位置する中間体であることを報告している。したがって、P中間体とLozierらが報告しているN中間体は、吸収スペクトルの極大が違うが同じ中間体である可能性もある。

さて、K中間体より前に、さらに中間体が存在するのであろうか。1977年にIppenら⁴⁵⁾は、bRを0.5ピコ秒のパルス幅をもつサブピコ秒パルスで光励起した後、その吸収変化を測定し、bRより長波長側に吸収極大をもつ中間体が、彼らの測定装置の分解能以下で生成すると報告した。彼らは、この中間体をK中間体と報告したが、その後の研究で、彼らの測定に用いた波長が、K中間体とその前の中間体(J中間体と名づけられた)との等吸収点の波長に近く、二つの中間体を区別できなかったことがわかった。

Nussら⁴⁶⁾は、波長620nm、パルス巾0.16ピコ秒の光パルスでbRを励起することにより、J中間体が 0.43 ± 0.05 ピコ秒の時定数で生成し、J中間体は、約3ピコ秒の時定数で、K中間体に変化することを見出した。また、Sharkovら⁴⁷⁾は、サブピコ秒領域で生成する中間体の吸収スペクトル及び時定数を測定し、Nussらと同様の結果を得ている。さらにSarkovら⁴⁷⁾、Pollandら⁴⁸⁾は、J中間体の前に生成するbRの励起状態(彼らはI状態と呼んでいる)の吸収スペクトルを測定することにも成功している。

さて、bRはオールトランス型のレチナールを発色団として持つ光受容色素であり、光を吸収すると発色団は13-シス型になる。一方ロドプシンは11-シス型のレチナールを発色団として持ち、光を吸収すると、発色団はオールトランス型になる。両者の発色団の光化学反応過程は、それらの異性化の方向は逆であるが、どちらも光異性化反応を起こすことは同じである。いま、両者の光化学反応過程を比較すると、興味深いことに、対応する中間体の変化の時定数がbRの中間体の場合の方がロドプシンのそれに比べてひとケタ短くなっている。これらの時定数の違いはどのように考えればよいのだろうか。

いま、光異性化に伴う発色団の変化を考えると、bRでは異性化に伴って発色団のC₁₄からシッフ塩基までの炭素原子が、一方ロドプシンではC₁₂からシッフ塩基までの炭素原子が180°近く回転する。したがって、両者の初期光化学反応における時定数の違いは、発色団の回転に要する容積の大きさによるのかも知れない。さらに、発色団が異性化する容積が大きいほど、それと相互作用するアミノ酸残基の数も増えるので、より大きな蛋白質部分の高次構造の変化が要求される。このことが、bRの中間体とロドプシンのそれらとの時定数の差として表れていると考えられる。

3.3 光合成色素

生物に起因するすべてのエネルギーは太陽のエネルギーに由来している。植物は光合成の働きで太陽エネルギーを化学エネルギー(物質)に変え、それがいろいろな生物の生存の基礎となっていることはよく知られている。高等植物の光合成器官は、葉緑体(chloroplast)とよばれる5~10μmの直径をもつ小器官で、その中には、よく発達した膜系が存在している。この膜をチラコイド膜という。チラコイド膜にはほとんどころで何層にも重なった構造を作っており、この部分をグラナという。また、チラコイド膜以外の不均質な連続体をストロマと呼んでいる⁴⁹⁾。光合成の光受容色素は、チラコイド膜の中あるいはその膜上に存在している。

さて、高等植物や藍藻では光合成の光受容色素系として、光システムI(PSI)およびII(PSII)と呼ばれる膜に結合した複合体がある⁵⁰⁾。これらの生物では、これら二つのシステムが連動し、光のエネルギーを使って、二酸化炭素と水から、炭水化合物と酸素を作り出している。チラコイド膜が重なっている部分(グラナ)にはPSIIが比較的多く、チラコイド膜がストロマに露出している部分にはPSIが多く含まれている。

一方バクテリアでは、高等植物のPSIとPSIIのどちらかによく似た光システムをもっている。例えば、紅色細菌(Chromatiaceae, Rhodospirillaceaeなど)では、PSIIとよく似た光システムをもち、一方緑色細菌(Chlorobiaceae, など)では、両者のどちらかに似た光システムをもっている⁵⁰⁾。

これらの光システムは、その機能からさらに、二つの分けられる。一つは、いわゆる反応中心と呼ばれる部分で、光合成機能の中心をなしている。他の一つは、光集光器官(light-harvesting-antenna system)と呼ばれており、光エネルギーを吸収し、それを反応中心に渡す役目を担っている。

それぞれの分子は P と Fe を中心に 2 回回転軸を構成しているにもかかわらず、電子はその移動に片方の分子配列しか利用しないことである。Parson ら⁶⁵⁾は低温で二つの BPh の吸収スペクトルが十分分離することを見だし、レーザーで照射した後の、それぞれの BPh の吸収スペクトルの変化を測定した。その結果、長波長(505 nm)に吸収極大を持つ BPh の吸収スペクトルのみが変化し、他方は変化しないことを発見した。さらに Zinth ら⁶⁶⁾は、反応中心の結晶の偏光吸収測定から、長波長に吸収極大を持つ BPh は、図14の右側の BPh であることを確かめた。したがって、電子移動は図14の右側の経路のみを使って起こることがわかった。二つの電子移動の経路の違いは、それぞれの分子が結合している蛋白質の微環境の違いに帰せられると考えられているが、どの様な違いなのかは今後の研究に待たれる。さらに反応中心に存在する二つの BChl 分子の役割についても今後の研究が期待される。

3.3.1.2 光システム I の反応中心複合体

光システム I (PSI) は、光を吸収して酸化されると 700 nm の吸収が変化する特別なクロロフィルダイマー (P_{700}) を持っている^{67,68)}。PSII の場合と同様に、PSI でも光エネルギーが、一連の発色団分子間の電荷分離という形で化学エネルギーに変換されるが、これに関与する発色団分子が違っている。光を吸収して電荷分離した P_{700} から最初に電子を受け取る分子 (A_0) は、反応中心に特別に結合したクロロフィル a 分子と考えられている^{69,70)}。次に電子受容体となる分子 (A_1) は、キノン (phylloquinone) である⁷⁰⁾。キノン分子から電子を受け取る分子は、順に X, B A と名付けられている鉄-硫黄クラスターをもつ蛋白質である。それぞれの分子は、鉄原子 4 個と硫黄原子 4 個をもつフェレドキシン類と考えられているが⁷¹⁾、X については、現在のところ特別の状態をもつ分子であると考えられている。また、B と A は分光学的に分離されている状態であり、それぞれが、別の蛋白質であるかどうかはわかっていない。

時間分割吸収蛍光測定から求められたそれぞれの反応過程は、下記の様を書くことができる⁵⁰⁾。

現在、X以降の電子移動が、B, A, と順次進むのかどうかは明らかになっていないが、そのような過程が、それぞれの酸化還元電位の測定から示唆されている。

3.3.2 光合成アンテナ色素 (集光性色素)

すでに述べたように、光合成には光を吸収して励起状態に移り、そこで、分子間の励起エネルギー移動を行い、反応中心に光エネルギーを送り込む役割を持つ色素が存在する。高等植物のチラコイド膜や光合成細菌の細胞膜系で、蛋白質と複合体を作っているクロロフィルは、ほとんどが集光性クロロフィル (light-harvesting antenna chlorophyll) である。また、生物群によっては、これらの膜に接した粒子状の構造体のなかに集光性色素が存在することもある。フィコビリゾーム (紅藻, 藍藻) やクロソーム (緑色細菌) などがその例である。

さて、現在 PSI と PSII の両方の反応中心を持つ生物種の PSII に共役しているアンテナシステムの状態が興味をもって研究されている⁷²⁾。本講では詳しくふれなかったが、光合成が効率よく働くためには、PSI と PSII が化学量論的に 1:1 で光を吸収する必要がある (Z スキーム⁷³⁾)。どちらか一方がたくさん光を吸収しても、他方がそれにみあうだけ光を吸収しなければ、光合成系における電子移動はとまってしまう。光合成系中の PSI と PSII の反応中心の量比は、生物種によって違いますが、1 ではない。例えば、藍藻では一般に RCII/RCI は 0.3 ~ 0.8 であり、高等植物では 1.4 ~ 1.9⁵⁰⁾である。従って、それぞれの反応中心がうまく 1:1 で光を吸収するように、また吸収できる光を効率よく二つの反応中心に振り分けられるよう、アンテナシステムが発達しているとも言える。アンテナシステムの状態の変化は光励起後にシステムから発する蛍光の寿命およびそのスペクトルから解析されている⁷²⁾。

さて、実験的に得られる PSII からの蛍光の収率と寿命は、PSII の反応中心の状態に依存する。反応中心中の電子受容体 Q が酸化状態 (F_0) であると、蛍光の収率は小さく、逆に還元状態 ($F_{\max}$) であると、蛍光の収率は最大となる。 $F_{\max}$ と F_0 の比は、生物種によって 3 から 5 の範囲にある。

現在のところ、 F_0 の状態から発する蛍光は少なくとも三つの速度定数を持つ成分に分けられることがわかっていて⁷²⁾。それぞれの時定数は、80 ~ 130 ピコ秒 (fast component), 300 ~ 600 ピコ秒 (middle component), 1.2 ~ 3.2 ナノ秒 (long-lived component) である。このうち一番遅い成分は、全蛍光の強度に対する強度比も数%と弱く、“死んだ”クロロフィル分子、あるいは試料に少し残っている $F_{\max}$ 状態から発せられる蛍光であろう。

と与えられている。一方最近のピコ秒領域時間分割蛍光スペクトルの測定から、fast component は PSII から発せられるものと、PSI から発生するものとが混在していることが示されている^{74,75)}。

次に F_{max} 状態から発する蛍光は、 F_0 状態とはかなり違っている。それらの特徴的な違いは、long-lived component の蛍光強度が 60 倍以上に増大することである。このことによって、全蛍光強度が F_0 状態に比べて、約 4 倍強くなる。一方 fast component の蛍光強度は減少する。しかし middle component の蛍光強度は、生物種あるいは F_{max} 状態の作り方（光照射によって作る場合と化学物質（DCMU やヒドロキシルアミン）によって直接 Q を還元状態にする）によって F_0 状態と同じか少し強くなる。以上の実験結果を Holzworth ら⁷²⁾は、次のように解釈している。すなわち、 F_0 状態では PSII から発する蛍光は、2 成分 (fast component・middle component) であり、 F_{max} 状態では、 F_0 状態の fast component が middle component に、また、middle component が long-lived component に変化するのである。また、 F_0 状態の fast component の一部と、 F_{max} 状態の fast component の全部は、PSI から発する蛍光である。以上の解釈に従うと、PSII には二つの

成分があり、それぞれが違った寿命の蛍光を発し、さらに PSII の反応中心の状態の変化 (F_0 状態から F_{max} 状態の変化) に伴って、それぞれの寿命が長くなると考えられる。一方 PSI は一つの成分であり、PSII の反応中心の状態の変化によっては、その蛍光の寿命は変化しない。

さて、PSI と PSII との間には、エネルギーの再配分という興味深い現象がある。これを light state transition という⁷⁶⁾。この現象は最初二つの光システムを含む試料を室温であらかじめ光照射した場合と、しない場合で、液体窒素温度で測定した PSII と PSI から発する蛍光の強度が変わることから発見された⁷⁷⁾。PSI に十分光が吸収されている状態を state I と呼び、PSII に十分光が吸収されている状態を state II という。state I, state II は、PSI, PSII 両方の光システムが関与した状態のわけかたであり、先に述べた F_0 , F_{max} は、PSII の反応中心の状態によるわけかたである。

すでに述べたように、光集光システムには、それぞれの光システムの反応中心に強く結合しているコアシステムと反応中心とは独立して粒子状構造をもつ光集光アンテナシステム (light-harvesting antenna system, LHCP) とがある。最近 LHCP は、磷酸化されている状

図15 反応中心とアンテナシステム (LHCP) との結合様式 (Holzworth⁷²⁾ から転写)。

態と、されていない状態のあることが発見された⁷⁸⁾。さらに、PSII が光を十分に吸収していない状態では、LHCP は磷酸化されておらず、その状態で PSII と結合している。一方 PSII が十分光を吸収すると、LHCP が磷酸化され、磷酸化された LHCP は PSI と結合できるようになる。

以上の事から、Holzworth ら⁷²⁾は、state I と、state II での PSII の LHCP の配置を図15のようにまとめている。すでに述べたように、蛍光の寿命から PSII には二つの状態がある。これらを PSII α , PSII β とかく。PSII α はチラコイド膜が重なっている部分 (appressed membrane region, グラナ) にあり、そこには PSI はほとんど存在していない。一方 PSII β はストロマに露出しているチラコイド膜の部分 (stroma-exposed membrane region) にあり、PSI と共存している。state I では LHCP は磷酸化されていない状態で PSII と結合している。PSII に十分光が吸収され、state II になると LHCP の一部は磷酸化され、膜内を移動して PSI と結合するようになる。そのため PSI の光の吸収効率が上がるのである。現在の所 LHCP の磷酸化だけでは PSI の光吸収効率の増大が説明できず、光環境による2価のカチオンの影響も考えられている⁷⁹⁾。そこで図15には磷酸化されていない LHCP にも、膜構造の変化などにより、PSI が結合する可能性や、光吸収した LHCP の PSII への結合状態の変化なども考えられている。

3.4 フィトクロム

フィトクロム (phytochrome) は、植物の光形態形成に関与する光受容色素の一つである。1952年に Borthwick ら⁸⁰⁾は、暗所で吸水させたレタスの種子の発芽が、赤色光照射により促進され、近赤外光照射により抑制されること、さらに光照射の発芽に対する効果は、最後に照射した光の波長によりきまることが観測した。彼らはこの実験事実から、赤色光と近赤外光で光可逆的な反応を起こす光受容色素が存在することを示唆した。その後、Butler ら⁸¹⁾によって、トウモロコシの芽生えの黄化組織を試料とした分光学的測定により、この色素の存在が確認され、後にフィトクロムと名付けられた。フィトクロムの関与している植物の光形態形成反応は非常に多く、詳しいことは他の総説を参照していただきたい^{82,83)}。

フィトクロムの抽出は最初 Butler らによって行われたが、1970年代になって、それが蛋白質分解酵素に非常に弱いことがわかり、native なフィトクロムが分離精製されたのは、1982年になってからである⁸⁴⁾。時代とともに抽出されるフィトクロムの分子量 (SDS-PAGE で決定された見かけの分子量) は60K⁸⁵⁾、114~118K^{86,87)}と

なり、最終的な native フィトクロムとして124K という値が報告されている^{84,88)}。

分光学的手法を用いたフィトクロムの光反応過程の研究は60Kの分子量を持つフィトクロムを用いて行われ始めた。しかしここでは、最近行われている124Kの分子量を持つフィトクロムについての実験を中心に述べる。現在60K、114~118K、124Kの分子量をもつフィトクロム分子をそれぞれ small フィトクロム, large フィトクロム (degraded フィトクロム), native フィトクロムと呼んでいる。

すでに述べたようにフィトクロムには生理的条件下で二つの状態が存在する。一つは吸収極大が665 nm にある状態で、Pr と名付けられており、他は吸収極大が730 nm にある状態で、Pfr と名付けられている。両者の間には光可逆的な反応がある。すなわち、

である。Pr は生理的に不活性な状態であり、Pfr は活性な状態である。フィトクロムの発色団は開環したテトラピロールの一種 (フィトクロモビリン, 図11参照) である^{85,89)}。

さて Pr から Pfr への変換過程が時間分割吸収蛍光測定により調べられている。それによると、この光変換過程には少なくとも二つの中間体が存在することが確認されており⁹⁰⁾ (図16)、それぞれ I_{700} , I_{b1} と名付けられている。低温吸収スペクトル法による研究も行われており、上記二つの中間体の生成が確認されている⁹¹⁾ (I_{700} を lumi-R, I_{b1} を meta-R と呼んでいる)。さらに I_{b1} はスペクトル的に分離できない三つの成分からなり、それぞれの成分が異なった速度定数をもって Pfr へ変化することが示されている⁹²⁾。また最近では Ruzsicska ら⁹⁰⁾により、 I_{700} にも少なくとも二つの成分があり、それぞれ数10ナノ秒、数100ナノ秒の寿命で I_{b1} に変化することが報告されている (それぞれの活性化エネルギーは、54 kJ/mol, 58 kJ/mol と報告されている)。しかし I_{700}

図16 フィトクロムの光反応過程。

図中の時間は、室温でのレーザーフォトリシス、あるいは、フラッシュフォトリシスにより求められた時定数である。

の2成分と I_{bl} の3成分との関係は明らかになっていない。

Pfr から Pr への光変換過程も同様な方法で解析され、現在のところ二つの中間体の存在が報告されている。しかし Pfr のみを含む試料がえられないこともあって、この過程に関する研究は遅れている。

さて、Pr から Pfr への光変換の初期過程はどのようなものであろうか。Rudiger ら⁸⁹⁾は、Pr と Pfr の蛋白質を分解酵素で処理することにより、発色団を含むペプチドを分離し、それぞれの発色団の構造を分光学的に解析した。その結果、Pr の発色団は15Zの構造であるのに対し、Pfr の発色団は15Eの構造であることを見いだした。そこで彼らは、光変換過程で発色団の Z-E 異性化が起こっていると推測している。一方 Song ら^{93,94)}は Pr から発する蛍光の収率が試料を重水に懸濁すると大きくなることから、光変換過程でプロトン移動反応に関与していると示唆した。しかし最近の Pr のピコ秒領域での蛍光寿命の測定によると⁹⁵⁾、Pr の励起状態からの蛍光の寿命は重水素効果を示さなかった。従って、Pr の初期光反応過程にプロトン移動反応は関与しておらず、もし関与しているとしても、生成した中間体の変化過程に関与していると考えられている。

すでに述べたように、フィトクロムが蛋白質分解酵素の作用を受けやすいことから、分子量の違う3つの試料がえられている。それらは全て発色団部分は同じであるので、光変換過程に対する蛋白質部分の影響を調べるためには好材料である。すなわち、native フィトクロムから large フィトクロムの間には約6Kのペプチドが、また large フィトクロムから small フィトクロムの間には約60Kのペプチドが失われているので、これらのペプチドが失われたことにより、フィトクロムの光反応過程がどのように変化するかを調べれば、光反応に伴う蛋白質の高次構造変化に関する知見が得られると期待される。

さて Pr の吸収スペクトルの吸収極大は、これら三者のフィトクロムによってほとんど変わらない。一方 Pfr のそれは small フィトクロムと large フィトクロムではほとんど変わらないが、両者と native フィトクロムの間には約5~7nmの違いがある。さらに small フィトクロムと large フィトクロムでは Pfr から Pr への暗変換が観測されるが、native フィトクロムでは観測されない。したがって、上記の6Kのペプチドが Pfr の安定性や吸収スペクトルの性質に重要な役割を果たしている様である。一方最近の時間分割吸収蛍光測定による、Pr の初期光反応中間体の生成および崩壊の時間定数は、small フィトクロムと native フィトクロムで殆ど変わらないこ

とが示されている⁹⁵⁾。

4. おわりに

本稿では、分光学を用いた時間分割測定のうち、最近のバルスレーザー技術を応用した吸収蛍光測定について概説した。いうまでもなく、時間分割測定は、反応解析のための基本操作であり、吸収蛍光測定に限らず、いろいろな物理・化学量の測定がある。本講座でもすでにラマン分光⁹⁶⁾、EXAFS⁹⁷⁾、SOR 光を用いた時間分割測定⁹⁸⁾が解説されている。

紙面の関係で生体光受容色素の構造や、その生理的役割、さらに細胞内での存在状態などには、ほとんどふれることができなかった。また本稿に例として取りあげた光受容色素のそれぞれが、非常に複雑な色素であるため、個々の実験例を詳細に解説することができなかった。また多数の研究例の内の一部をトピック的にとりあげたので、読みづらい箇所も多々あったと思う。興味のある読者は、それぞれの項にあげた文献を参照していただきたい。

最近のレーザー技術の進歩は、化学反応追跡のための究極的な短さである、フェムト秒光パルスの発生も可能にした。この技術を利用することにより、光励起直後からの緩和過程の解析が今後展開されていくであろう。しかし、生体の分子、あるいは、生体そのものを試料として研究を行う場合、実験の約半分の時間が試料の調製にかかる事も無視できない現実である。分光学者と生物学者あるいは生化学者の有機的な協力が、今後ますます重要になるであろう。

[謝辞] 本稿執筆にあたって、基礎生物学研究所の山本興太郎博士からフィトクロムに関する多くの文献を御教示いただいた。厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Y. Shichida, S. Matuoka, Y. Hidaka and T. Yoshizawa: *Biochim. Biophys. Acta.* **723**, 240 (1983).
- 2) 吉澤 透, 神取秀樹: *エラン* **6**, 12 (1986).
- 3) R. R. Alfano and S. L. Shapiro: *Phys. Rev. Lett.* **24**, 593 (1970).
- 4) 解説書として、中原勝儼, 朽津耕三, 幸田清一郎編: 反応追跡のための分光測定 (日本分光学会 測定法シリーズ 6), 学会出版センター (1984).
- 5) G. E. Busch, M. L. Applebury, A. Lamola and P. M. Rentzepis: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2802 (1972).
- 6) H. Kandori, S. Matuoka, Y. Shichida and T. Yoshizawa: *Photochem. Photobiol.* submitted

- to Photochem. Photobiol..
- 7) M.A.J. Rodgers: In Primary Photo-process in Biology and Medicine (ed. R.V. Bensasson et al.) pp.1-23 Plenum Press New York (1985).
 - 8) H. Kandori, S. Matuoka, Y. Shichida and T. Yoshizawa: ICER Satellite Symp. Photoreception in Visual cells 15 (1986).
 - 9) H. Kandori, S. Matuoka, Y. Shichida and T. Yoshizawa: submitted to Photochem. Photobiol.
 - 10) M. Ito, A. Kodama, K. Tsukida, Y. Fukada, Y. Shichida and T. Yoshizawa: Chem. Pharm. Bull. 30, 1913 (1982).
 - 11) 解説書として, 木下一彦, 御橋廣真編: 螢光測定, 生物科学への応用 (日本分光学会 測定法シリーズ 3), 学会出版センター (1983).
 - 12) I. Yamazaki, M. Mimuro, T. Muraio, T. Yamazaki, K. Yoshihara and Y. Fujita: Photochem. Photobiol. 39, 233 (1984).
 - 13) 徳永史生, 岩佐達郎: 生体の科学 38, 252 (1987).
 - 14) Y.A. Ovchinnikov: FEBS Lett. 148, 179 (1982).
 - 15) P.A. Hargrave, J.H. McDowell, D.R. Curtis, K.J. Wang, E. Juszak, S. Fong, J.K.M. Rao and P. Argos: Biophys. Struct. Mech. 9, 235 (1983).
 - 16) J. Nathans and D.S. Hogness: Cell 34, 807 (1983).
 - 17) E. Dratz and P.A. Hargrave: Trends Biochem. Sci. 8, 128 (1983).
 - 18) ロドプシンの光情報伝達過程の特集号として,
a) Photobiochem. Photobiophys. 13 (1986).
b) 生体の科学 38, No. 4 (1987).
 - 19) 吉澤 透, 篠沢隆雄: 蛋白質核酸酵素 29, 1161 (1984).
 - 20) 七田芳則: 蛋白質核酸酵素 別冊 28, 64 (1985).
 - 21) T. Tsuda: Photochem. Photobiol. 45, 915 (1987).
 - 22) G. Wald, J. Durell and R.C.C. St. George: Science 111, 179 (1950).
 - 23) R. Hubberd and A. Kropf: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 134 (1958).
 - 24) T. Yoshizawa and Y. Kito: Ann. Rep. Scient. Works. Fac. Sci. Osaka Univ. 6, 27 (1958).
 - 25) K.-H. Grellmann, R. Livingston and D. Pratt: Nature 193 (1962).
 - 26) R. Hubbard, D. Bownds and T. Yoshizawa: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 30, 301 (1965).
 - 27) A. Cooper: FEBS Lett. 123, 324 (1981).
 - 28) 垣谷俊昭: 蛋白質核酸酵素 別冊 28, 47 (1985).
 - 29) J.H. Parkes and P.A. Liebman: Biochemistry 23, 5054 (1984).
 - 30) B.H. Green, T.G. Monger, R.R. Alfano, B. Aton and R.H. Callender: Nature 269, 179 (1977).
 - 31) T. Yoshizawa and G. Wald: Nature 197, 1279 (1963).
 - 32) Y. Shichida, S. Matuoka and T. Yoshizawa: Photobiochem. Photobiophys. 7, 221 (1984).
 - 33) T. Yoshizawa: In Handbook of Sensory Physiology (ed. H.J.A. Dartnall) VII/1, pp.146-179, Springer-Verlag, Heidelberg (1972).
 - 34) Y. Shichida, T. Kabayashi, H. Ohtani, T. Yoshizawa and S. Nagakura: Photochem. Photobiol. 27, 335 (1979).
 - 35) S. Matuoka, Y. Shichida and T. Yoshizawa: Biochim. Biophys. Acta 765, 38 (1984).
 - 36) A.G. Doukas, M.R. Junnarker, R.R. Alfano, R.H. Callender, T. Kakitani and B. Honig: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4790 (1984).
 - 37) D. Oesterheld and W. Stoerkenius: Nature New Biol. 233, 149 (1971).
 - 38) D. Oesterheld and W. Stoerkenius: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2853 (1973).
 - 39) R.H. Lozier, R.A. Bogomolni and W. Stoerkenius: Biophys. J. 15, 955 (1975).
 - 40) K.J. Kaufmann, P.M. Rentzepis and W. Stoerkenius: Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 1109 (1976).
 - 41) M. L. Applebury, K. S. Peters and P. M. Rentzepis: Biophys. J. 23, 375 (1978).
 - 42) M.A. Slifkin and S.R. Caplan: Nature 253, 56 (1975).
 - 43) A. Kriebel, T. Gillbro and U.P. Wild: Biochim. Biophys. Acta 546, 106 (1979).
 - 44) L.A. Drachev, A.D. Kaulen, V.P. Skulachev and V.V. Zorina: FEBS Lett. 209, 316 (1986).
 - 45) E.P. Ippen, C.V. Shank, A. Lewis and M.A. Marcus: Science, 200, 1279 (1978).
 - 46) M.C. Nuss, W. Zinth, W. Kaizer, E. Kolling and D. Oesterheld: Chem. Phys. Lett. 117, 1 (1985).
 - 47) A.V. Sharkov, A.V. Pakulev, S.V. Chekalin and Y.A. Matreetz: Biochim. Biophys. Acta 808, 94 (1985).
 - 48) H.-J. Polland, M.A. Franz, W. Zinth, W. Kaizer, E. Kolling and D. Oesterheld: Biophys. J. 49, (1986).
 - 49) J. Coombs and A.D. Greenwood: In The Intact Chloroplast 8ed. J. Barber) pp.1-51, Elsevier Amsterdam, New York (1976).
 - 50) A.N. Glazer and A. Melis: Ann. Rev. Plant Physiol. 38, 11 (1987).
 - 51) G. Doring, G. Renger, J. Vater and H.T. Witt: Z. Naturforsch. Teil B. 24, 1139 (1969).
 - 52) V.V. Klimov, A.V. Klevanik and V.A. Shuvalov: FEBS Lett. 82, 183 (1977).
 - 53) V.V. Klimov, E. Dolan, E.R. Shaw and B. Ke: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7227 (1980).
 - 54) H.J. van Gorkom: Biochim. Biophys. Acta 347, 439 (1974).
 - 55) R.J. Cogdell: Ann. Rev. Plant. Physiol. 34, 21 (1983).
 - 56) W.W. Parson and B. Ke: In Photosynthesis (ed. Govindjee) 1, pp.331-85, Academic Press

- New York (1982).
- 57) H.-W. Trissl, U. Kunze and W. Junge: *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 364 (1982).
- 58) A.R. Crofts and C. Wraight: *Biochim. Biophys. Acta* **726**, 149 (1983).
- 59) W. Haehnel: *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **35**, 659 (1984).
- 60) J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel: *J. Mol. Biol.* **180**, 385 (1984).
- 61) K. J. Kaufmann, P. L. Dutton, T. L. Netzel, J. S. Leigh and P. M. Rentzepis: *Science* **188**, 1301 (1975).
- 62) T. L. Netzel, P. M. Rentzepis and J. S. Leigh: *Science* **182**, 238 (1973).
- 63) W. W. Parson and R. J. Cogdell: *Biochim. Biophys. Acta* **416**, 105 (1975).
- 64) M. G. Rockley, M. W. Windsor, R. J. Cogdell and W. W. Parson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2251 (1975).
- 65) W. W. Parson, N. W. T. Woodbury, M. Backer, C. Kirmaier and D. Holten: In *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria: Structure, Interactions and Dynamics* (ed. M. E. Michel-Beyerle) **42**, pp. 279-85 Springer-Verlag Berlin (1985).
- 66) W. Zinth, W. Kaizer and H. Michel: *Biochim. Biophys. Acta* **723**, 128 (1983).
- 67) B. Kok: *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 527 (1961).
- 68) T. Watanabe, M. Kobayashi, A. Hongu, M. Nakazato, T. Hiyama and N. Murata: *FEBS Lett.* **191**, 252 (1985).
- 69) I. Ikegami and B. Ke: *Biochim. Biophys. Acta* **764**, 80 (1984).
- 70) V. A. Shuvalov, E. Dolan and B. Ke: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 770 (1979).
- 71) D. J. Lundell, A. N. Glazer, A. Melis and R. Malkin: *J. Biol. Chem.* **260**, 646 (1985).
- 72) A. R. Holzwarth: *Photochem. Photobiol.* **43**, 707 (1986).
- 73) R. Hill and F. Bendall: *Nature* **186**, 136 (1960).
- 74) A. R. Holzwarth, J. Wendler and W. Haehnel: *Biochim. Biophys. Acta* **807**, 155 (1985).
- 75) I. Yamazaki, M. Mimuro, N. Tamai, T. Yamazaki and Y. Fujita: *FEBS Lett.* **179**, 65 (1985).
- 76) D. C. Fork and K. Satoh: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**, 335 (1986).
- 77) N. Murata: *Biochim. Biophys. Acta* **172**, 242 (1963).
- 78) L. A. Staehelin and C. J. Arntzen: *J. Cell Biol.* **97**, 1327 (1983).
- 79) N. Murata: *Biochim. Biophys. Acta* **189**, 171 (1969).
- 80) H. A. Borthwick, S. B. Hendricks, M. W. Parker, E. H. Toole and V. K. Toole: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **38**, 662 (1952).
- 81) W. L. Butler, K. H. Norris, H. W. Siegelman and S. B. Hendricks: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**, 1703 (1959).
- 82) 古谷雅樹: *フォトクロム*, 岩波書店 (1976).
- 83) L. H. Pratt: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**, 557 (1982).
- 84) R. D. Vierstra and P. H. Quail: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5272 (1982).
- 85) F. E. Mumford and E. L. Jenner: *Biochemistry* **5**, 3657 (1966).
- 86) G. Gardner, C. S. Pike, H. V. Rice and W. R. Briggs: *Plant Physiol.* **48**, 688 (1971).
- 87) H. V. Rice and W. R. Briggs: *Plant Physiol.* **51**, 927 (1973).
- 88) R. D. Vierstra and P. H. Quail: *Biochemistry* **22**, 2498 (1983).
- 89) W. Rodiger, F. Thummler, E. Cmiel and S. Schneider: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6244 (1983).
- 90) B. P. Ruzsicska, S. E. Braslavsky and K. Schaffner: *Photochem. Photobiol.* **41**, 681 (1985).
- 91) P. Eilfeld and W. Rodiger: *Z. Naturforsch* **40c**, 109 (1984).
- 92) M. Furuya: *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B303**, 361 (1983).
- 93) H. K. Sarkav and P.-S. Song: *Biochemistry* **20**, 4315 (1981).
- 94) D.-K. Moon, G.-S. Jeon and P.-S. Song: *Photochem. Photobiol.* **42**, 633 (1985).
- 95) H. Brock, B. P. Ruzsicska, T. Arai, W. Schlammann, A. R. Holzwarth, S. E. Braslavsky and K. Schaffner: *Biochemistry* **26**, 1412 (1987).
- 96) 北川禎三, 小倉尚志: *分光研究* **36**, 147 (1987).
- 97) 飯塚哲太郎: *分光研究* **36**, 216 (1987).
- 98) 桧枝光太郎: *分光研究* **36**, 295 (1987).