

「新機能創成に向けた光・光量子科学技術」
平成 19 年度採択研究代表者

橋本 秀樹

大阪市立大学大学院理学研究科・教授

光合成初期反応のナノ空間光機能制御

1. 研究実施の概要

構造を改変した光合成色素蛋白超分子複合体を、ナノ空間において自在に配列させた、人工光合成膜試料を作成し、超高速時間分解コヒーレント分光および時間分解顕微分光を用いた励起エネルギー移動の実時間計測と広い周波数領域でのフォノン物性の測定を行い、統括的な励起エネルギー移動メカニズムの解明及びデバイスとしての利用指針を確定することで、21世紀をリードするバイオナノテクノロジーの基盤技術形成を促進することを目的として研究を推進した。今年度は、昨年度導入した高分解能原子間力顕微鏡装置の本格稼働を開始し、光合成アンテナ系色素蛋白複合体を再構築した人工光合成膜の画像取得を行った。今後、高分解能画像の取得に向けて、名古屋工業大学グループと協力しつつ装置性能の最適化を行って行く予定である。超高速コヒーレント分光計測に関しては、有機溶媒中での光合成色素(バクテリオクロロフィルおよびカロテノイド)に加え、アンテナ系色素蛋白複合体に関して、縮退4光波混合信号の測定と実験結果を解釈するための数値シミュレーションを行った。今後、単離した色素蛋白複合体に関する研究成果を学術論文にまとめつつ、次年度はいよいよ、人工光合成膜試料に関する測定に取りかかる予定である。また、時間分解顕微分光装置の開発を開始する予定である。金属基板上への光合成色素蛋白の組織化と光電流特性の評価に関しても、名古屋工業大学との良好な共同研究を展開し、有意な研究成果の輩出に成功している。天然及び再構成アンテナ系色素蛋白複合体のフェムト秒吸収・ラマン分光に関しては、東北大学グループとの共同研究が実体化した。測定装置の改良を行い、広い波長範囲での測定が可能となりつつある他、実際に共同研究の成果を学術論文にまとめられるレベルまでデータの蓄積が行えるようになった。今後益々、共同研究による成果を上げて行く予定である。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

大阪市立大学グループが 1～22 の項目を、名古屋工業大学グループが 23～25 の項目を、東北大学グループが 26～29 の項目を実施した。

1. 光合成色素β-カロテンのコヒーレント分光計測

光合成系における超高速・高効率エネルギー伝達とコヒーレンスとの関係を解明するために、過渡回折格子(TG)信号測定を行った。代表的カロテノイドであるβ-カロテンのTG信号に、強い励起波長依存性があることを見出した¹⁾。ブラウニアンモデルをもとに三次分極率の計算を行ったところ、実験結果をよく再現することが分かった²⁾。このことは、最低一光子許容励起状態 S_2 と一光子禁制励起状態 S_1 の間に、中間状態が存在することを強く示唆するものである。

2. 光合成アンテナ系色素蛋白複合体のコヒーレント分光計測

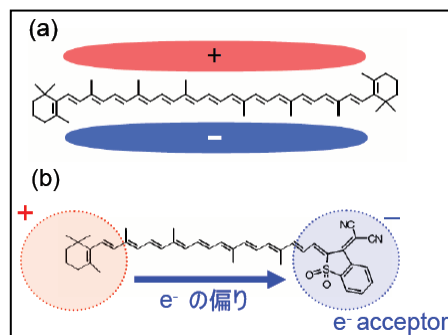
光合成による励起エネルギー伝達過程において、伝達に関与する光合成色素と周辺蛋白の相互作用を正しく理解することにより、その失活過程が明らかになる。そのため紅色光合成細菌 *Rba. sphaeroides* 2.4.1 光合成膜, LH2 アンテナ色素蛋白複合体, および主成分カロテノイドである spheroidene のTG信号測定を行った。興味深い点として、コヒーレント分子振動の減衰時間が、これら3つの試料でほとんど変わらないことを見出した³⁾。このことは、光合成アンテナの励起エネルギー伝達過程において、非常に高効率であることを支持するものである。また、理論モデル計算を行ったところ、実験結果をよく再現することも分かった。

3. 時間分解顕微分光計測装置の開発

次年度に向けて、超高速顕微分光を行うために、顕微鏡用のカーゲートシステムを試作した。現在、光学部品の最適化を行っている。

4. 光合成色素カロテノイドのπ電子共役鎖の非線形光学応答に関する研究

光合成色素であるカロテノイドの非線形光学応答を理解するために、β-カロテンの共役鎖長が異なる一連の誘導体を有機化学合成法により調製し、非線形光学応答のπ電子共役鎖長依存性を調べた。実験方法としては第三次高調波発生分光法を用い、時間摂動密度行列法による数値シミュレーションから理論的にも研究を行った。その結果、カロテノイドの非線形性が、最低一光子禁制状態への二光子共鳴ではなく、最低一光子許容励起状態への三光子共鳴によって引き起こされる事を明らかにした(図(a))。これは極性置換基による非線形性発現メカニズム(図(b))とはまったく異なるもので、新たな非線形性発現・増大の手段を提供するものである。また、これまでに我々が行ってきた超高速縮退四光波混合時間分解分光の結果と良い一致を示すものであった^{4,6)}。



5. 光合成色素カロテノイドの非線形光学応答と分子構造ひずみに関する研究

β-カロテンのπ電子共役鎖の両端に位置するβ-イオン環は、共役差に構造ひずみを及ぼす事が知られている。このような共役差の構造ひずみは、光合成蛋白中におけるカロテノイドにも存在すると考えられ、Smart Matrixとしての蛋白の影響を反映していると考えられる。構造ひずみが分子振動モードの位相緩和にどのように影響するかを調べるために、β-イオン環を末端に持たないリコペンの縮退四光波混合測定を行い、β-カロテンの結果と比較した。これら二つのカロテノイドは、共役鎖の長さが同じであるので、含まれるπ電子数も同じであり、構造ひずみが光に対するカロテノイドの電子応答にどのような影響を与えるかを知るためのよい例であると考えられる。結果として、構造ひずみがある場合、二重結合中心対称伸縮モードの位相緩和寿命が顕著に減少する事が明らかとなった⁸⁾。

6. β-カロテン同族体のサブ20フェムト秒過渡回折分光

光合成系における超高速・高効率エネルギー伝達とコヒーレンスとの関係を解明するために、

β -カロテンの共役鎖長が異なる一連の同族体を合成し、非線形光学応答のポリエン型 π 電子共役鎖長依存性を調べた。分光方法としてはサブ 20 フェムト秒過渡回折法を用いた。基底状態に結合する分子振動の位相緩和が、熱浴からの摂動によって主に引き起こされる事を明らかにし、各分子振動モードの位相緩和寿命を決定した。共役鎖長の短いカロテノイド分子では、C=C 二重結合伸縮振動が主なエネルギー散逸のチャンネルとなっているのに対し、共役鎖長の長いカロテノイド分子では、C-C 単結合伸縮や C-Me 変角振動などの他の振動モードもエネルギー散逸チャンネルとして寄与していることを明らかにした^{5,7)}。

7. 時間分解 X 線構造解析・分光法によるカロテノイドの光保護分子メカニズムの解明

紅色光合成細菌の光反応中心に結合した 15 シスカロテノイドは、電荷分離を起こすバクテリオクロロフィル二量体の三重項状態をクエンチする光保護作用を担う。その効率の良いエネルギー散逸過程に異性化様の構造変化が関与する可能性が、時間分解 ESR・時間分解ラマン分光などにより示唆されてきた。これを X 線構造解析からも解明することを目指し、大きな蛋白質に結合した一分子のカロテノイドの結合長の変化と言う微細な構造変化を議論するために必要とされる分解能の結晶を大量調製する技術をこれまでの 2 年間で確立してきた。その結果、2.0 Å を切る世界トップクラスの分解能を出すことに成功し、その結果を PDB にアップロードする準備をしている。本年度は、最終的にピコ秒パルス光を当て続けることにより、時間分解 X 線結晶回折に取り掛かる計画で、現在結晶を調製中である。(2009 年 1 月から 3 月の間に X 線実験を行なう予定である。)

8. オキナワモズク盤状体由来の特殊なアンテナ色素タンパク複合体結晶化とその機能の解明

光合成初期過程を担うアンテナ色素タンパク複合体の構造については、X 線結晶構造解析により構造のはっきりしたものが多く、研究が進んできているが、海洋性光合成生物にのみ見られる特殊なアンテナ複合体についての報告例は際立って少ない。この理由としては、培養が困難なため、試料を大量に入手することが困難であること、また大量の脂質のために光合成膜の抽出が困難であることが挙げられる。沖縄原種であるオキナワモズクは、藻体の「種」である盤状体での大量培養が可能であるため、これらの困難を乗り越えることができる。我々は(株)サウスプロダクト伊波氏より盤状体の提供を受け、そこから膜蛋白質であるフコキサンチンクロロフィル a/c 蛋白質 (FCP) を調製することに成功した。珪藻類では FCPa、FCPb という二種類の表面電荷の異なる FCP が存在し、また 18kD と 19kD の二種類のサブユニットがそれぞれ 3 量体と 9 量を形成していると報告されている。現段階では、褐藻類であるオキナワモズクには、1種類の FCP のみが見られ、SDS-PAGE の結果 17.5kD、18.2kD の 2種類のサブユニットが存在することはわかった。また、結晶化に向けた精製過程の検討を行なったところ、イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った後にゲルろ過を行なうという過程が必須であることがわかった。BlueNative PAGE という非破壊電気泳動を行なった結果、これらのサブユニットは 3 量体を形成していると考えられる。褐藻類の FCP については、ジャイアントケルプの 1種について遺伝子クローニングによるアミノ酸配列の報告が 1例あるだけである。今後、結晶化にむけた蛋白質の大量精製、界面活性剤耐性や温度耐性などの基礎データの取得、アミノ酸一次配列の決定、色素構造の決定などを平行して進めていく予定である。

9. LH1-RC コア複合体の Egg PC 脂質二重層膜への再構成

プログラマブル恒温槽を導入することにより、今まで手動で行なっていた脂質二重層膜を調製するための温度サイクルをより管理した温度体制で行うことに成功した。

10. Cys-Tag LH2 sphaeroides の培養と LH2 の単離

Cys-Tag を N 末端に組み込んだ LH2 をコードする遺伝子とカナマイシン耐性を同時に組み込んだ sphaeroides の変異株を培養した。各社のカナマイシン製薬の価格と品質にかなりのばらつきがあったため、最も安価なカナマイシンを用いて培地への添加量を決定した。野生株との比較実験を行なったところ、カナマイシンが入っていれば野生株は全く増殖しないことを確認した。決定

した条件を用いて大量培養を行った。そこから定法を用いて LH2 を調製した。今後、LH2 が S-S 結合などで Cys-Tag の箇所では会合していないかどうかを確認しつつ、金電極に乗せて単層に並ぶかどうかを検証していく予定である。

11. HSCCC(High pressure counter current chromatography)の導入

向流クロマトグラフィーは、液体-液体の分配クロマトグラフィーで固定相も液体のため、レジンへの吸脱着を含む精製方法では分解してしまう可能性の高い光合成色素を分離するには理想的な手法であるが、日本人が開発したにもかかわらず日本ではあまり普及していない。このほど、日本の会社が初めてこの装置(カラム)を市販したため、これを導入して光合成色素の単離精製の過程を画期的に改善し、大量調製を可能にすることを目的として試験研究を行った。トマトピューレからリコペンを大量に精製する手法を開発した。現在、量産体制を確立することにより、リコペンの単結晶精製の試みに着手した。また光合成細菌からの抽出・精製にも利用すべく、光合成細菌や褐藻類などからの色素の抽出条件検索にも着手する予定である。

12. 光合成光反応中心複合体の FT-IR 分光測定

カロテノイドを含む RC とカロテノイドを含まない RC の FT-IR 差スペクトルを取得することで、X 線結晶構造解析では見えない、RC に結合しているカロテノイド分子の動的構造を簡便な方法で抽出・解析することを目的として研究を行った。RC を自然乾燥させた状態、結晶、PVA に分散させた状態の3つの状態を ATR 法にて測定した。得られた差スペクトルのピークをβ-カロテンに関する文献情報を用いて経験的に帰属した。PVA に分散させる状態が一番綺麗な差スペクトルを与えた。カロテノイド分子の構造のねじれを経験的に予測することができた。今後は基準振動解析を用いた理論解析を行う予定である。

13. 再構成 LH1 複合体中のスピロキサンチンの電場変調吸収分光の入射光の偏光角依存性

LH1 複合体に結合しているカロテノイドの構造に対する知見を得る目的で、LH1 由来のバクテリオクロフィル蛋白複合体及び対称性のあるカロテノイドを用いて、LH1 複合体を再構築した。この人工 LH1 複合体の電場変調吸収 (EA) 分光測定を行った⁹⁾。入射光の偏光角を変えて測定することにより、色素の構造や静電環境に由来するパラメータを決定した。独立して存在する場合に対称性を持つカロテノイドが、LH1 に結合している場合には対称性が破れていることが明らかとなり、LH2 同様に LH1 においてもカロテノイドがねじれ構造をとって結合しているという示唆を裏付ける結果が得られた。

14. 高分解能原子間力顕微鏡を用いた色素蛋白複合体配列の局所構造の同定

Blc. viridis から LH1-RC コア複合体を単離し、脂質二重層膜 Egg PC に組み込んだ、人工光合成膜を構築した。色素蛋白複合体の配列を観察するために、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。脂質二重層膜を観察するにあたり、原子間力顕微鏡の性能の最適条件を調べた。コンタクトモード、大気中観察において、大きさ~500 nm、高さ~20 nm の人工光合成膜を観察した。色素蛋白複合体の配列を同定するための高分解画像を得るために、よりソフトなカンチレバーの選定が必要であることが示唆された。今後も継続して最適条件の探索を行って行く予定である。

15. ペリジニン誘導体の電場変調吸収分光

カルボニル基を持つ極性カロテノイドにおける分子構造と分子内電荷移動状態 (ICT 状態) 形成との関係を解明するため、ペリジニンの分子構造の一部だけが異なるペリジニン誘導体に対して非線形光学応答の分子構造依存性を調べた。分光手段として、電場変調吸収分光法を用いた。その結果、ペリジニンのアレン構造がある場合とない場合の基底状態と励起状態間の永久双極子モーメントの差の大きさ ($|\Delta\mu|$) 及び $\Delta\mu$ と遷移双極子モーメントとの間の角度を決定し、アレン構造があると $|\Delta\mu|$ が大きくなり、遷移双極子モーメントとの角度もアレン構造の有無により大きく異なることを明らかにした。これにより、ペリジ

ニンにおける ICT 状態形成に、アレン構造が非常に重要であることを明らかにした。

16. 極性カロテノイド同族体のナノ秒時間分解吸収分光

極性カロテノイドにおけるカチオン状態形成過程を解明するため、1,3-インダンジオンを結合させた極性カロテノイドの共役鎖長が異なる一連の同族体を合成し、ジカチオン状態のポリエン型 π 電子共役鎖長依存性を測定した。分光手段として、アントラセン三重項増感励起ナノ秒時間分解吸収分光法を用いた。その結果、それぞれの極性カロテノイド同族体のジカチオン状態の寿命を決定し、極性カロテノイド同族体のジカチオン状態は共役鎖長が長いほど安定化されることを明らかにした。また、共役鎖長が短い極性カロテノイド同族体において、極性カロテノイド同族体のモノカチオン状態からの吸収と考えられる吸収帯を観測し、極性カロテノイド同族体のジカチオン状態の過渡吸収信号の帰属をより支持できることを明らかにした。

17. 極性カロテノイド同族体のフェムト秒時間分解吸収分光

極性カロテノイドにおける中間励起状態形成過程を解明するため、1,3-インダンジオンを結合させた極性カロテノイドの共役鎖長が異なる一連の同族体を合成し、中間励起状態のポリエン型 π 電子共役鎖長依存性を測定した。分光手段として、フェムト秒時間分解吸収分光法を用いた。その結果、それぞれの極性カロテノイド同族体の中間励起状態の寿命を決定した。これらの結果から、それぞれの試料の中間励起状態として、共役鎖長が短い極性カロテノイド同族体においては主に分子内電荷移動状態となっているが、共役鎖長が長い極性カロテノイド同族体においては主に S_1 状態となっていることを明らかにした。

18. 光合成系における励起エネルギー移動に関する理論研究

光合成アンテナ蛋白質においては、捕捉された太陽光エネルギーを伝達するために、色素の間で励起エネルギー移動が効率的に起こる。この励起移動では、色素間に広がる量子力学コヒーレンスが重要な役割を演じていることが示唆されている。この役割を明らかにするために、実験的だけでなく理論的研究の貢献が期待されている。特に、現状の励起移動理論には適用範囲に制限があるため、この制限をなくし、広範囲に適用可能な理論を構築する必要がある。我々は、コヒーレントおよびインコヒーレント極限における励起移動に関する従来の2つの理論を、連続的につなげる方法を考案した。この方法によって、コヒーレンスを考慮に入れつつ、励起移動のダイナミクスを正しく記述する理論的枠組みのひとつを提案した。

19. 光合成色素モデル化合物オリゴチオフェンの温度効果

光合成色素に及ぼす温度効果を考察する目的で、色素モデル化合物であるオリゴチオフェンの吸収及び発光スペクトルの温度変化を測定した。この物質では、格子振動との相互作用の程度を反映する Huang-Rhys 因子を用いたスペクトル解析が実験結果をよく説明し、色素分子と格子系の結合を探るためのモデル物質として適する。スペクトルの温度変化を考察することで、色素の共役広がりの程度を反映する有効共役長さが、温度上昇とともに減少し、室温では、元の分子長の 2/3 程度になることが明らかになった。すなわち室温では、長鎖色素分子の場合、もはや棒状の形状を完全には仮定できないことを意味する。また光励起状態が、有効共役長の減少に起因して分子内に生成したエネルギー勾配により、光励起後、数 100 ps の時間スケールで低エネルギー側に流れていくことを明らかにした^{11,12)}。

20. 高感度フェムト秒 Pump-Probe 分光装置の構築

高速読み取り可能なマルチチャンネル・フォトダイオードアレイをフェムト秒レーザーのパルス繰り返し(1kHz)に同期させることで、リアルタイムでデータを取得し、ノイズの原因となるレーザーの

強度揺らぎの影響を軽減した。この検出システムを用いることにより、従来の測定方法に比べ、測定時間は3分の1程度に縮小され、かつノイズレベルは2桁小さくなるという画期的な結果が得られた。この方法を用いて光合成細菌 *Rps. viridis* の励起状態ダイナミクスを調べたところ、従来の10分の1程度の励起強度でも十分質のよいデータが取得できることを確認した。今後は、この系と極低温システムを組み合わせることで、極限微弱励起光による光合成細菌における励起状態ダイナミクスの観測を試みる。

21. イオウ骨格ポリピリジン錯体

硫黄を骨格として含むポリピリジン錯体は、金属イオンの特別な酸化状態を安定化する。この性質を用い、大環状の Py3S3 銅錯体を合成し、カロテノイドとの独特の親和性を見出した。この状態はカロテノイドの性質として、焦点になっているカロテノイドラジカルカチオンを電子的に再現したもとなっている。また tptm 銅錯体は銅(II,III)イオンとしては極めて珍しい、アルキル錯体を形成している。その二つの電子状態間はきわめて可逆性が高く、この性質を用いると、Ru(II,III)に特有のプロトン協奏電子移動反応を実現可能となる。この反応性を用いて、小さな光合成類似過程として、キノン/ヒドロキノン変換を実現した¹⁵⁾。このような水素イオン協奏形反応の一般化を目指し、現在新規配位子系を合成し、資源の豊かな金属イオンを用いた人工光合成システムの構築を目指している。

22. 糖修飾カルベン配位子をもつ金属錯体

水溶性金属錯体触媒の開発を目指し、糖ユニットをN-ヘテロ環カルベン(NHC)を配位子に導入し金属錯体の合成を行った。ニッケル錯体について、結晶構造解析を行い、固体中では NHC 配位子の D-グルコースユニットが syn 配置をとっていることを明らかにした。この錯体の溶液での¹H NMR スペクトルの温度変化測定により、高温と低温で2種類のダイナミクスが存在することがわかった。分子軌道計算を用いて、高温側および低温側のダイナミクスが、それぞれ syn と anti 間の平衡、NHC 配位子の傾きと D-グルコース部位の光学活性に起因する2つのジアステレオマーの間の平衡によるものであると結論づけた。また、新たに側鎖にピリジル基を持つ α および β -D-グルコース修飾 NHC 配位子前駆体を合成し、これを用いてイリジウム錯体の合成を行い、 α 体と β 体の違いによって、金属中心の不斉が反転することを明らかにした^{13,14)}。

23. 光合成反応中心(RC)およびアンテナ系タンパク質色素複合体(RC-LH1)の電極上への配向を制御した人工的な組織化とその機能解析

光合成細菌から単離精製した RC-LH1 および RC ならびに分子生物学的手法を用いて発現させた His-tag 基をもつ RC-LH1 の金基板への自己組織化を行った。その組織化の確認は、UV-Vis, SPR および FT-IR RAS などの分光学的手法ならびに CAFM および光電流特性を用いた検討から行った。その結果、金基板の化学修飾ならびに His-tag 基の有無によって、RC-LH1 の配向を制御できることが認められた²⁴⁾。

24. カロテノイドを含むLH1アンテナタンパク質色素複合体の再構築

光合成膜から、LH1- α および LH1- β タンパク質と BChl *a* 誘導体 (Zn-BChl *a*) ならびにカロテノイドを別々に単離精製し、LH1 複合体を再構成した。この LH1 複合体の吸収スペクトルは、天然の LH1 複合体のそれとよく類似し、この再構成法を用いてもカロテノイドを含むLH1アンテナタンパク質色素複合体を再構築できることがわかった。また、LH1- α タンパク質だけを用いた再構成では、カロテノイドが LH1 複合体を形成しないことが認められ、このことにより、LH1- β タンパク質はカロテノイドの結合に大きく関与していることがわかった。さらに、LH1 タンパク質のアミノ酸配列をモデルとした「LH1 モデルタンパク質」を遺伝子工学的的手法により発現して LH1 複合体を再構成した。その結果、発現した LH1 モデルタンパク質はカロテノイドの結合部位を探索するのに非常に有用であることがわかった^{31,32)}。

25. 基板上への LH1 モデルタンパク質の組織化と光電流特性

光合成アンテナ系膜タンパク質を模倣したモデルペプチド類を合成ならびに遺伝子工学的手法を用いて調製し、諸種のポルフィリン分子との複合体を金属電極上に自己組織化した。電極基板上でのポルフィリン分子の光電流特性を測定した結果、いずれのポルフィリン分子からも電極に電流注入が起こることを見出した。その効率は、モデルペプチド分子とポルフィリン分子の分子配向ならびにそれらの構造に大きく依存することがわかった³³⁾。

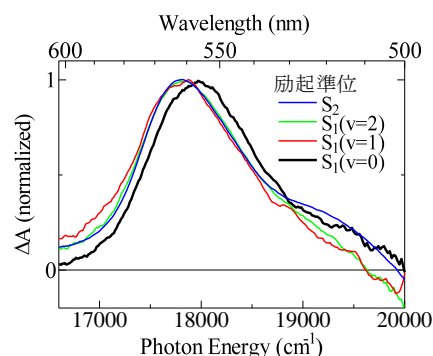
26. フェムト秒吸収・ラマン分光

色素蛋白複合体の系統的測定を可能とするために、フェムト秒吸収・ラマン分光装置の改良を進めた。波長可変励起光として赤外光パラメトリック増幅器の出力、および、その第二高調波と和周波を使用可能とした。波長可変域は 400nm から 2 μ m であり、光合成初期過程における過渡的状態の振動準位を選択的に励起する。振動の実時間観測を行うために、パルス圧縮による超短パルス光発生を行った。励起光の中心波長は 530nm であり、観測波長域 450-1600nm を 30 フェムト秒の時間分解能で観測可能である。

過渡的状態の誘導ラマン信号は共鳴効果を利用することで選択的に観測できる。このために数 cm^{-1} の狭いスペクトル幅をもつ波長可変ラマン励起光をフェムト秒光パルスから発生する新しい光パラメトリック増幅器の製作を進めている。複合体の過渡吸収分光の成果から赤外ラマン励起光も有効であると判断し、赤外・可視のラマン励起光を発生する装置の製作を開始した。狭帯域の赤外シード光をパルス幅を広げた 800nm の励起光で光パラメトリック増幅することで、赤外ラマン励起光 (1100-1300nm) を発生する。可視ラマン励起光は赤外ラマン励起光の第2高調波 (550-650nm) を利用する。既に、狭帯域シード光の発生と励起光パルス幅の伸張を達成している。

27. β -カロテン S_1 状態の振動選択2光子励起

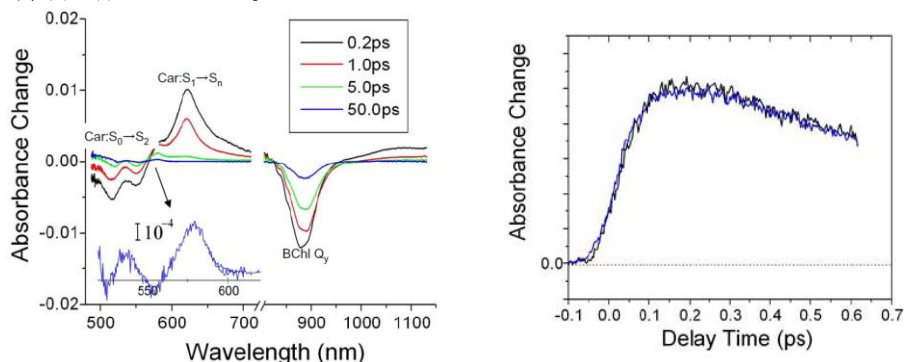
β -カロテンの S_1 励起状態は、振動準位が長い寿命をもつことで注目されている。しかし、光学禁制であるため通常は光学許容な S_2 状態からの内部転換で生成される。このため S_1 の振動状態を制御することはできなかった。赤外励起光を用いた2光子励起では、直接 S_1 を励起できるため、振動準位の選択ができる。右図は、 β -カロテン (シクロヘキサン溶液) の過渡吸収スペクトルを示している。 S_1 の振動準位 ($v=0 \sim 2$, 2光子励起) と S_2 (1光子励起) を生成後 5.0ps の過渡吸収スペクトルである。17700 cm^{-1} (560nm) 付近の吸収は、 S_1 から高い励起状態 (S_m) への遷移によるものである。 $S_1(v=0)$ を励起した場合の吸収は、他に比べ明らかに高エネルギー側にピークをもつ。これは $v=1$ 以上の振動準位を励起した場合には $v=0$ までの振動緩和が起きていないためであり、 β -カロテンにおける振動励起状態の重要性を示している³⁵⁾。



28. 再構成された LH1 複合体の光反応初期過程

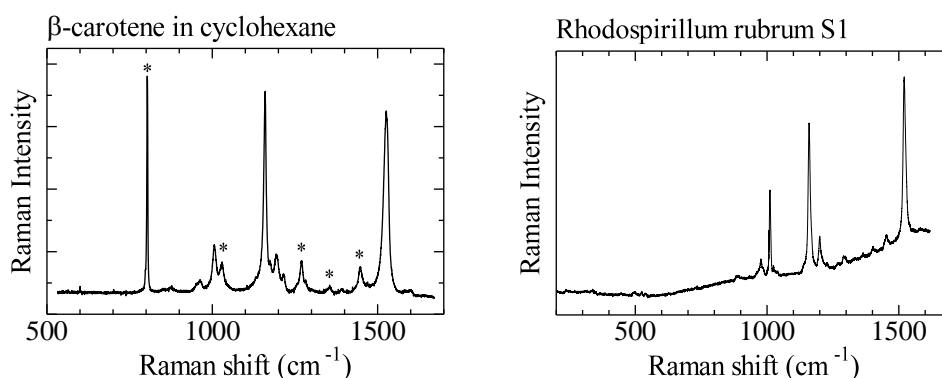
紅色光合成細菌 *Rs. Rubrum* S1 から単離した LH1 複合体 (天然 LH1) とスピロキサンチンを再構成した LH1 複合体 (再構成 LH1) においては、吸収スペクトル・蛍光励起スペクトル・Stark スペクトルの比較から再構成の品質が議論されてきた。エネルギー移動を伴う超高速現象における再構成の影響を調べるために、天然 LH1 と再構成 LH1 のフェムト秒吸収分光を行った。下図左は天然 LH1 (PVA フィルム) のスピロキサンチン (Car) を光励起 (20fs, 530nm) した後の過渡吸収スペクトルであり、Car からバクテリオクロフィル (Bchl) へのエネルギー移動が観測されている。下図右は天然 LH1 (黒) と再構成 LH1 (青) の比較であり、過渡吸収信号は同じ遅延時間依存性をもっている。このことから、再構成による動的過程への影響はないことがわかった³⁴⁾。さらに、複体内

でのエネルギー移動過程を正確に定量するために、マルチパルス励起を用いる新しい方法を考案し測定を開始している。この方法では、先行する予備励起光により複合体の状態を制御しておき、主励起光による生じるエネルギー移動を調べる。予備実験では、LH1 複合体におけるエネルギー移動の抑制に成功している。



29. 高周波数分解ラマン分光

色素蛋白複合体の構造について議論するためには、高い周波数分解能をもつ振動分光が重要である。しかし、色素蛋白複合体は励起光による損傷を受けやすいため、弱い励起光により短時間で測定する必要がある。このために周波数分解能が 0.4cm^{-1} のラマン分光装置の改良を行った。下図左は、テスト試料として β -カロテン(シクロヘキサン溶液)を室温で測定したものである(*は溶媒のラマン信号)。検出器として液体窒素冷却 CCD を用いることで、 2mW の励起光(532nm)であっても約 5 分の測定で高精度の信号が得られている。改良した装置を用いて色素蛋白複合体の測定を行った。ラマン信号をシャープに観測するために、測定はクライオスタットを用いて 80K で行った。下図右は *Rhodospirillum rubrum S1* から抽出した LH2 複合体の測定結果である。カロテノイドに共鳴した励起光 (532nm) を用いているため、カロテノイドのラマン信号が強く現われている。ブロードな信号はカロテノイドの発光である。バクテリオクロロフィルに近共鳴となる赤色励起光 (680nm) による測定も進めている。



以上記したとおり、本プロジェクトは当初計画通りに順調に進展しており、有意な研究成果を輩出し続けている。そのことを定量化するために、上述した29の実施項目が、研究計画書に記した主な研究スケジュールのチャート上で、どの部分に対応しているのかを以下に記す。また、主な研究項目の達成度・進捗度を%単位で記す。

(研究の主なスケジュールと達成度・進捗度)

項目	H19年度 (6ヶ月)	H20年度	H21年度	H22年度	H23年度	H24年度 (12ヶ月)
<p>1. 人工光合成色素蛋白複合体の創成と配列制御 (橋本グループ)</p> <ul style="list-style-type: none"> 人工光合成色素蛋白超分子複合体の調製と二次元配列 (達成度100%, 進捗度30%) 高分解能原子間力顕微鏡を用いた局所構造の同定 (達成度100%, 進捗度30%) 金属基板上への光合成色素蛋白複合体の組織化 (達成度100%, 進捗度0%) 		7,8,9,11,12, 13,24 14 10,21,22				
<p>2. フェムト秒コヒーレント分光計測および時間分解顕微分光計測 (橋本グループ)</p> <ul style="list-style-type: none"> 光合成色素蛋白複合体のコヒーレント分光 (達成度100%, 進捗度80%) 人工光合成膜のコヒーレント分光 (達成度0%, 進捗度0%) 人工光合成膜の時間分解顕微分光 (達成度100%, 進捗度0%) 		1,4,5,6,15, 16,17,18, 19,20, 3	2			
<p>3. 光電変換機能を持つ光合成蛋白質/色素ナノ構造の構築とその機能解析 (南後グループ)</p> <ul style="list-style-type: none"> 光合成細菌の反応中心およびアンテナ系タンパク質色素複合体 (LH-RC) の電極上での組織化と機能解析 (達成度100%, 進捗度50%) モデルポリペプチドを用いた光合成色素複合体の電極基板上での組織化と機能解析 (達成度100%, 進捗度0%) 		23 25				
<p>4. 光合成色素蛋白ナノ組織体の構造およびフォノンがエネルギー移動に果たす役割の解明 (吉澤グループ)</p> <ul style="list-style-type: none"> 振動分光装置の開発 (達成度100%, 進捗度50%) エネルギー移動機構の解明 (達成度100%, 進捗度20%) 新たな機能発現およびエネルギー移動の制御 (達成度0%, 進捗度0%) 		26,27,29 28				

3. 研究実施体制

(1)「大阪市立大学」グループ

①研究分担グループ長： 橋本 秀樹(大阪市立大学大学院、教授)

②研究項目

光合成初期反応の動作機構の解明と制御
コヒーレント分光計測及び時間分解顕微分光計測
光合成色素蛋白複合体試料の創成
光合成膜のその場観察
時間分解顕微分光計測
金属電極の修飾
光合成色素アナログの合成
コヒーレント分光計測
非線形分光計測
原子間力顕微鏡を用いた複合体配列の決定

(2)「名古屋工業大学」グループ

①研究分担グループ長： 南後 守(名古屋工業大学大学院、教授)

②研究項目

光合成細菌の反応中心およびアンテナ系タンパク質色素複合体の基板上での 組織化
と機能解析
光合成色素蛋白複合体の組織化
モデル蛋白の合成
金属電極のパターン作成
アミノ酸改変光合成色素蛋白の発現
モデル蛋白の合成
光合成色素蛋白複合体の再構成

(3)「東北大学」グループ

①研究分担グループ長： 吉澤 雅幸(東北大学、准教授)

②研究項目

光合成色素蛋白ナノ組織体の構造およびフォノンがエネルギー移動に果たす役割の解明
振動状態を測定するための現有フェムト秒ラマン分光装置の改良による高精度化
波長可変ラマン励起光を発生させる光パラメトリック増幅器の設計
カロテノイドの超高速緩和過程およびエネルギー移動過程の研究

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

①橋本グループ

1. M. Sugisaki, M. Fujiwara, S.V. Nair, H.E. Ruda, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Excitation energy dependence of transient grating spectroscopy in β -carotene", submitted to *Phys. Rev. B*.
2. M. Sugisaki, K. Yanagi, and H. Hashimoto, "Transient Grating Signals from beta-carotene: Excitation energy Dependence", *Carotenoid Science* **13** (2008) 53-58.
3. M. Sugisaki, M. Fujiwara, S.V. Nair, H.E. Ruda, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Spectrally-resolved transient grating signals from β -carotene in benzene solution", *Phys. Stat. Solidi (c)*, in press.
4. M. Sugisaki, M. Fujiwara, R. Fujii, K. Nakagawa, M. Nango, R.J. Cogdelland, and H. Hashimoto, "Transient grating spectroscopy in photosynthetic purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1", *J. Lumin.*, in press.
5. N. Charterjee, D.M. Niedzwiedzki, K. Aoki, T. Kajikawa, S. Katsumura, H. Hashimoto, and H.A. Frank, "Effect of structural modifications on the spectroscopic properties and dynamics of the excited states of peridinin", *Arch. Biochem. Biophys.* **483** (2009) 146-155.
6. M. Fujiwara, K. Yamauchi, M. Sugisaki, K. Yanagi, A. Gall, B. Robert, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Large Third-Order Optical Nonlinearity Realized in Symmetric Nonpolar Carotenoids", *Phys. Rev. B* **78**, 161101(R) (2008).
7. M. Fujiwara, K. Yamauchi, M. Sugisaki, A. Gall, B. Robert, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Energy dissipation in the ground-state vibrational manifolds of β -carotene homologues: A sub-20-fs time-resolved transient grating spectroscopic study", *Phys. Rev. B* **77**, 205118 (2008).
8. M. Fujiwara, K. Yamauchi, M. Sugisaki, K. Yanagi, A. Gall, B. Robert, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Third-order optical nonlinearity of β -carotene homologues", *Phys. Stat. Solidi (c)*, in press.
9. M. Fujiwara, K. Yamauchi, M. Sugisaki, A. Gall, B. Robert, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Specific Channel of Energy Dissipation in Carotenoids: Coherent Spectroscopic Study", in *Ultrafast Phenomena XVI, Springer Series in Chemical Physics, vol. 92*, edited by P. Corkum, S. De Silvestri, K. A. Nelson, E. Riedle and R. W. Schoenlein, in press.
10. M. Fujiwara, M. Sugisaki, A. Gall, B. Robert, R. J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Ultrafast optical responses of β -carotene and lycopene probed by sub-20 fs time-resolved coherent spectroscopy", *J. Lumin.*, to be published.
11. K. Nakagawa, S. Suzuki, R. Fujii, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Nango, H. Hashimoto, "Probing the Effect of the Binding Site on the Electrostatic Behavior of a Series of Carotenoids Reconstituted into the Light-Harvesting 1 Complex from Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* Detected by Stark Spectroscopy", *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) 9467-9475.
12. I. Akai, M. Higuchi, K. Kanemoto, T. Karasawa, H. Hashimoto, M. Kimura,, "Energy transfer dynamics in wire-type dendrimers having oligophenylene peripheries." *J. Lumin.*, **128** (2008) 948-951.
13. K. Kanemoto, I. Akai, H. Hashimoto, T. Karasawa, N. Negishi, Y. Aso, "Temperature dependence of intrachain photoluminescence of a long oligothiophene", *Physica Status Solidi (c)* **6** (2009) 193-196.
14. K. Kanemoto, M. Sugisaki, M. Fujiwara, T. Karasawa, H. Hashimoto, "Ultrafast coherent vibronic oscillations in regioregular poly(3-alkylthiophene)" *Physica Status Solidi (c)* in press.
15. Y. Yoshida, R. Miyamoto, T. Nishioka, H. Hashimoto, and I. Kinoshita "Compressed' Ice-Like Structures Between the Molecular Films Comparable with Ice Phase III" *Chem. Lett.* **38** (2008) 366-367.
16. I. Kinoshita, H. Hashimoto, T. Nishioka, R. Miyamotom, N. Kuwamura, and Y. Yoshida, "Mimicking the photosynthetic system with strong hydrogen bonds to promote proton electron concerted reactions", *Photosynth. Res.*, **95**, 363-371, **2008**.

17. M. Obata, A. Kitamura, A. Mori, C. Kameyama, J.A. Czaplewska, R. Tanaka, I. Kinoshita, T. Kusumoto, H. Hashimoto, M. Harada, Y. Mikata, T. Funabiki and S. Yano, "Syntheses, structural characterization and photophysical properties of 4-(2-pyridyl)-1,2,3-triazole rhenium(I) complexes", *Dalton trans.*, 3292-3300, **2008**.
18. K. Nakagawa, S. Suzuki, R. Fujii, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Nango, and H. Hashimoto, "Electrostatic effect of surfactant molecules on bacteriochlorophyll *a* and carotenoid binding sites in the LH1 complex isolated from *Rhodospirillum rubrum* S1 proved by Stark spectroscopy" *Photosynth. Res.* **95**, 345-351 (2008).
19. K. Nakagawa, S. Suzuki, R. Fujii, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Nango, and H. Hashimoto, "Probing binding site of bacteriochlorophyll *a* and carotenoid in the reconstituted LH1 complex from *Rhodospirillum rubrum* S1 by Stark spectroscopy" *Photosynth. Res.* **95**, 339-344 (2008).

②南後グループ

20. T. Ochiai, T. Asaoka, T. Kato, S. Osaka, T. Dewa, K. Yamashita, A.T. Gardiner, R. J. Cogdell, H. Hashimoto, and M. Nango, "Molecular Assembly of Zn Porphyrin Complexes Using Synthetic Light -harvesting Model Polypeptides" *Photosynth. Res.* **95**, 353-361(2008).
21. H. Oikawa, S. Fujiyoshi, T. Dewa, M. Nango and M. Matsushita "How Deep Is the Potential Well Confining a Protein in a Specific Conformation? A Single-Molecule Study on Temperature Dependence of Conformational Change between 5 and 18 K" *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4580 (2008).
22. Y. Suemori, M. Nagata, M. Kondo, S. Ishigure, T. Dewa, T. Ohtsuka, and M. Nango "Phospholipid-linked Quinones-mediated Electron Transfer on an Electrode Modified with Lipid Bilayers" *Colloid Surf. B*, **61**, 106-112 (2008).
23. M. Nagata, M. Kondo, Y. Suemori, T. Ochiai, T. Dewa, T. Ohtsuka, and M. Nango, "Electron Transfer of Quinone Self-Assembled Monolayers on a Gold Electrode" *Colloid Surf. B*, in press.
24. 落合剛, 石樽修一, 山田敦, 出羽毅久, 山下啓司, 南後守, "金電極上のMnメソポルフィリン単分子膜中へのアンテナ系ポリペプチドの導入による電子伝達の促進効果", *Porphyrins Vol. 17*, in press.
25. T. Mikayama, K. Iida, Y. Suemori, T. Dewa, T. Miyashita, M. Nango, A. T. Gardiner and R. J. Cogdell, "The Electronic behavior of a Photosynthetic Reaction Center Sandwiched between Chemically-modified Gold Substrates Monitored by Conductive Atomic Force Microscopy", *J. Nanosci. Nanotech.*, in press.
26. K. Nakagawa, A. Mizuno, S. Suzuki, R. Fujii, T. Dewa, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Nango, and H. Hashimoto "Characterization by Stark Spectroscopy of Reconstituted Light-Harvesting 1 Complex of Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* with the Polypeptides, Bacteriochlorophyll *a*, and Carotenoids" *Carotenoid Science*, **13** (2008) 38-45.
27. T. Asai, Y. Suzuki, S. Matsushita, S. Yonezawa, J. Yokota, Y. Katanasaka, T. Ishida, T. Dewa, H. Kiwada, M. Nango, and N.Oku, "Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**(2), 243-248, (2008).
28. J. Nakamura, R. Oura, and M. Nango "Peroxide Decoloration of Azo Dye Catalyzed by Manganese Porphyrin Derivatives in Nonaqueous Solvent" *Textile Res. J.* **78**, 1080-1086, (2008)
29. S. Ishigure, A. Okuda, K. Fujii, Y. Maki, *M. Nango, and Y. Amao, "Photoinduced Hydrogen Production with a Platinum Nanoparticle and Light-Harvesting Chlorophyll *a/b*-Protein Complex of Photosystem II (LHCII) from Spinach System", *B. Chem. Soc. Japan*, **82**, 93-95, (2009)
30. T. Mikayama, K. Iida, Y. Suemori, T. Dewa, T. Miyashita, M. Nango, A. T. Gardiner and R. J. Cogdell, "The Electronic behavior of a Photosynthetic Reaction Center Sandwiched

- between Chemically-modified Gold Substrates Monitored by Conductive Atomic Force Microscopy” *J. Nanosci. Nanotech.*, 9(1), 97-107, (2009)
31. J. Nakamura, and M. Nango, “Effect of polymer on peroxide decoloration of azo dye catalyzed by manganese porphyrin derivatives”, *Porphyrins*, (2009) in press
 32. K. Nakagawa, T. Nakano, N. Fukui, S. Sakai, A. Nakashima, E. Nishimura, A. Kashiwada, K. Iida, T. Dewa, K. Yamashita, H. Hashimoto, M. Nango “Reconstitution of light-harvesting 1 complex from purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* by using separately isolated two types of polypeptides, Zn-substituted bacteriochlorophyll *a*, and carotenoid”, to be published.
 33. K. Nakagawa, T. Nakano, N. Fukui, A. Hiro, S. Sakai, A. Nakashima, K. Iida, T. Dewa, K. Yamashita, H. Hashimoto, M. Nango. “Expression of light-harvesting 1 model-polypeptides bearing histidine-tag and immobilization onto an electrode of reconstituted their model-polypeptides / bacteriochlorophyll derivatives complexes”, to be published.
 34. T. Ochiai, M. Kondo, H. Katami, T. Asaoka, T. Kato, S. Osaka, K. Shimoyama, T. Dewa, K. Yamashita, H. Hashimoto, M. Nango, “Immobilization of Porphyrin Derivatives with a Defined Distance and Orientation onto a Gold Electrode Using Synthetic Light-Harvesting α -Helix Hydrophobic Polypeptides”, to be published.

③吉澤グループ

35. R. Nakamura, K. Nakagawa, T. Horibe, H. Hashimoto, M. Nango, and M. Yoshizawa, “Ultrafast spectroscopy of the reconstituted LH1 complex from *Rhodospirillum rubrum*”, to be submitted to *J. Phys. Chem. B*.
36. M. Yoshizawa, D. Kosumi, K. Abe, R. Nakamura, M. Fujiwara, and H. Hashimoto, “Time-resolved two-photon pump dispersive spectroscopy of the dark excited state (S_1) in β -Carotene”, to be submitted to *Chem. Phys. Lett.*
37. D. Kosumi, K. Abe, H. Karasawa, M. Fujiwara, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, “Ultrafast relaxation kinetics of all-*trans*- β -carotene explored by linear and nonlinear excitations”, to be submitted to *Chem. Phys.*
38. D. Kosumi, M. Fujiwara, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, “Ultrafast nonlinear optical responses in all-*trans*- β -carotene under the non-resonant excitation to the optically allowed S_2 state”, to be submitted to *J. Phys. Soc. Jpn.*
39. K. Abe, D. Kosumi, K. Yanagi, M. Miyata, H. Kataura, and M. Yoshizawa, “Ultrafast energy transfer between single-walled carbon nanotubes and encapsulated β -carotene”, submitted to *Carotenoid Science*.
40. D. Kosumi, M. Fujiwara, R. Fujii, R. J. Cogdell, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, “Conjugation length dependence of the ultrafast relaxation kinetics of the S_2 and S_1 states in β -carotene homologs and lycopene studied by femtosecond time-resolved absorption and Kerr-gate fluorescence spectroscopies”, submitted to *J. Chem. Phys.*
41. K. Abe, D. Kosumi, K. Yanagi, M. Miyata, H. Kataura, and M. Yoshizawa, “Ultrafast excited energy transfer from β -carotene inside single-walled carbon nanotubes”, *Carotenoid Science*, 13, 46 (2008).
42. D. Kosumi, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, “The S_1 relaxation kinetics of all-*trans*- β -carotene explored by two-photon excitation”, *Carotenoid Science*, 2008, 13, 49.
43. K. Abe, D. Kosumi, K. Yanagi, M. Miyata, H. Kataura, and M. Yoshizawa, “Light-harvesting function of β -carotene inside carbon nanotubes explored by femtosecond absorption spectroscopy”, *Phys. Rev. B* 77(16), 165436/1-6 (2008).
44. D. Kosumi, K. Abe, H. Karasawa, M. Fujiwara, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, “Excitation energy dependence of the S_1 relaxation kinetics in all-*trans*- β -carotene explored by two-photon excitation”, *Carotenoid Science*, 12, 34, 2008.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）