

「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、高分解能原子間力顕微鏡装置 (AFM) の性能最適化を実施した。最適なカンチレバーの網羅的探索を行い、現状での最適性能を追求した。その結果、マイカ基板上に固定した一枚の人工光合成膜の高分解能 AFM 画像の取得に成功した。今後、AFM 装置と顕微分光計測装置とを融合し、一枚の人工光合成膜に由来する分光データの取得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、LH2 アンテナ色素蛋白複合体に結合したカロテノイド色素の縮退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。LH2 複合体に結合したカロテノイドがバクテリオクロロフィルへ高効率エネルギー移動を達成している様相が、分子振動をも時間分解できる程度の超高速な時間スケールで解釈できるようになった。時間分解顕微分光計測装置の開発を開始し、空間分解能 2 μm 、時間分解能 100 fs の性能を持つプロトタイプ装置を試作した。今後、一枚の光合成膜の時間分解分光データの取得が行えるように、装置性能の改良を行っていく予定である。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は、名古屋工業大学との良好な共同研究を展開し、パターニングを施した金属およびガラス基板上に LH2 複合体を自在配列させた試料調製に成功した。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を推進した。レーザー装置を改良し、広い波長範囲での測定が可能となった。Pump-Dump-Probe 等のマルチパルス励起により、アンテナ色素蛋白複合体に結合したカロテノイドの励起エネルギー移動過程に関する実験データが蓄積できた。

§ 2. 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

(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

(2)「東北大学」グループ

①研究分担グループ長:吉澤 雅幸(東北大学大学院、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

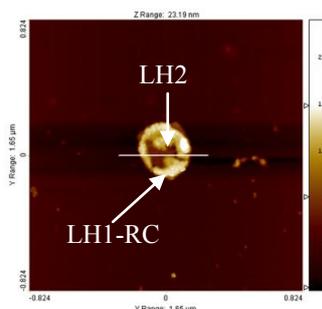
§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(橋本グループ関連)

1. 高分解能原子間力顕微鏡を用いた色素タンパク複合体配列の局所構造の観察

紅色光合成細菌 *Blc. viridis* から LH1-RC コア複合体を, *Rps. acidophila* から LH2 複合体を単離し, これら色素タンパク複合体を脂質二重層膜に任意の割合で組み込んだ人工光合成膜を構築した。人工光合成膜中の色素タンパク複合体の配列を原子間力顕微鏡を用いて観察した。ノンコンタクトモード, 大気中観察において, 右図のような AFM 画像の取得ができた。高さ情報から, 周りを LH1-RC コア複合体が取り囲み, 内側に LH2 が存在していることがわかった。また, LH1-RC, LH2 はそれぞれ混じらず, 色素タンパク複合体ごとに集まって存在している様子が観察された。今後, 先端半径 5 nm 以下のスーパーシャープカンチレバーを使用することで, さらに詳細な色素タンパク複合体の配列構造が観察できると考えている。

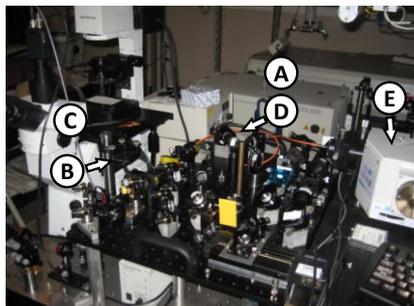


2. コヒーレント分光法を用いたカロテノイドの超高速光学応答

光合成初期過程において重要な役割を担っているカロテノイドの光学応答を理解するためには, 電子と分子振動の動的過程を総合的に理解する必要がある。そのため, 代表的カロテノイドであるβ-カロテンの過渡回折信号測定を, 広いスペクトル領域で行った。測定した結果を, **Brownian oscillator** モデルを用いて解析を行った。波長依存性を再現するために, パルス形状を取り入れ厳密な計算を行った結果, 実験結果を良く再現することができた。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³⁾。また, 溶媒依存性を測定した結果, 誘電環境の変化を低周波モードによりモデル化できることを示した⁴⁾。以上の結果は, 電子と分子振動の情報を取得する上で, コヒーレント分光法が非常に有用であることを示すものである。

3. 光合成色素の超高速光学応答に周辺蛋白質が及ぼす影響の理解

光合成色素と周辺蛋白質の相互作用の大きさにより, 励起エネルギー失活過程が大きく異なることが予想される。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。コヒーレント分子振動の減衰時間は, 溶媒中のそれに比べ, 色素蛋白複合体では約3割速くなることを見出した。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り, 電子状態と振動状態について総合的な理解をすることができた。



顕微分光システムの全体写真。A: 光源レーザー, B: ペリスコープ, C: 顕微鏡, D: 光ファイバー, E: 分光器。

4. 時間分解顕微分光計測装置の開発

超高速顕微分光を行うために, 顕微鏡用の過渡吸収分光システムを試作した。このシステムは, 全て一台のコンピュータにより制御されており, その制御プログラムは **Lab view** により自作した。作製した装置の性能評価を行うために, 色ガラスフィルター (O56, 厚さ約 2mm) の過渡透過率変化を測定し, 良好なシグナルを得ることができた。空間

分解能は約 2 μm を達成した。

5. 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(スペシャルペアー, P)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確認してきた。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 にアップロードした[PDB コード: 3I4D]。

昨年度、定常光照射前後の X 線結晶構造解析を行なったが、光照射前後における構造変化を見出せず、ただ X 線照射による分解が観測されるだけであった。本年度は方針を変換し、直方体状の薄い結晶の顕微分光を行い、光照射前後における P の吸収測定を行なった。その結果、今までの結晶化及び X 線測定用サンプリングでは、光酸化されて P の吸収帯(870nm)がほぼ無くなっている状態であることが分かった。その結晶を常温まで徐々に温度を上げてから暗闇で放置する「ダークアダプト」を行なうことにより、P の吸収帯はわずかに回復するが、同様の「ダークアダプト」により、結晶性が破壊され、X 線回折点が無くなっていく事をも突き止めた。現在、作成した結晶を「ダークアダプト」後に凍結処理をする手法を検討している。

6. 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

海洋性光合成生物に独特のアンテナ複合体であるフコキサンチンクロロフィル蛋白質 (FCP) については、微細藻類についての研究は近年行なわれてきたが、大型藻類についてはその取り扱いの困難さよりあまり報告例がない。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り、これは微細藻類の方法論が適応できるため、大型藻類の光合成器官の研究に最適である。我々は(株)サウスプロダクト伊波氏が培養法を開発した盤状体より FCP を調製することに成功した。非破壊電気泳動(Native-PAGE)、SDS-PAGE、及びこれらの二次元電気泳動、またゲルろ過 HPLC の結果、褐藻類であるオキナワモズクの FCP(以後、モズク FCP と呼ぶ)は、17.5kD、18.2kD の2種類のサブユニットのヘテロ 3 量体であるとの推測ができる結果が得られた。このようにして生化学的に純度の高い FCP の調製方法を確立した。

本年度は、生化学的に純度の高い FCP の光学特性を測定した。生育時の光合成環境を変えたモズク盤状体から調製した FCP の光学特性を評価することにより、最適生育環境との関連を科学的に議論するために、簡便に行なえる分光法(吸収、CD、蛍光)を測定し、それぞれの解析手法を確立する予定である。FCP には、クロロフィル(Chl) *a* という脂溶性の色素の他に、フコキサンチンという比較的親水性の高い色素と、海洋性光合成生物に特有の Chl *c* という色素が結合していると考えられている。特に、Chl *c* としては Chl *c*₂ のみが結合していると考えられてきた。しかしながら、Chl *c* は、有機酸であり、特に Chl *c*₁ と Chl *c*₂ を分離することは困難であった。我々は、Inertsil ODS-P カラムを用いることにより、Chl *c*₁/*c*₂、Chl *a* 及びカロテノイド含む全分析を行なうことに初めて成功した。また、これらの色素の組成比(化学量論比)を算出するためにはモル分子吸光係数を用いなければ成らないが、これらの値は文献によるばらつきが非常に大きく、またマグネシウム錯体であるクロロフィル類は乾燥重量を測定することが非常に困難であるため、原理的にも精度が悪い。この問題を解決するために、FCP 抽出物の ¹H-NMR を測定し、色素に存在する共役系のプロトンのみが観測される指紋領域(5.0-11.0ppm)に現れるシグナルを完全に帰属し、これらのプロトンの積分値より色素の存在比を決定することに成功した(論文準備中)。

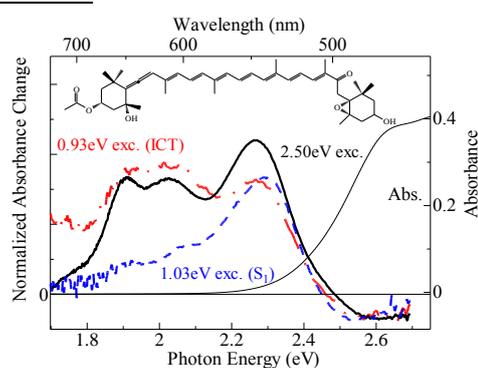
7. フェムト秒分光を用いた光合成色素の超高速励起状態ダイナミクスの研究

光合成のアンテナ系は、カロテノイドと(バクテリオ)クロロフィルの2種類の色素分子が重要な役割

を果たす。昨年度構築した、高感度検出分光装置を用いて、紅色光合成細菌におけるアンテナ色素蛋白複合体の励起状態ダイナミクスを詳細にわたり調べた。特に、異なる種における紅色光合成細菌のアンテナ色素蛋白複合体を調べることで、それぞれの種において、エネルギー伝達効率及びエネルギー伝達経路が異なることを明らかにした。また、カロテノイドとバクテリオクロロフィル間で、特異的な一重項及び三重項間エネルギー移動経路があることが明らかになった。

8. カルボニルカロテノイドにおける分子内電荷移動ダイナミクス

ポリエン骨格内にカルボニル基 (C=O) を持つカルボニルカロテノイドは、海洋性光合成生物の超高速エネルギー伝達過程において重要な役割を果たす。また、カルボニル基は極性溶媒中で電荷供給体となるため、分子内電荷移動状態 (ICT) を示すことで知られる。本年度は、カルボニルカロテノイド一種である、フコキサンチン (図の化学構造式) の励起状態ダイナミクスを1光子及び2光子励起分光法により調べた。その結果、極性溶媒条件下において共存する (図の実線)、 S_1 励起状態 (図の破線) と ICT 状態 (図の一点鎖線) を選択的に生成することに成功し、各励起状態のダイナミクスが明らかになった。



9. 包括的な励起エネルギー移動理論の基礎付け

光合成を司る色素蛋白質では太陽光から得たエネルギーを反応中心へ伝達するため、色素の間を励起エネルギーが移動する。この励起エネルギー移動の描像にはコヒーレントおよびインコヒーレント極限がある。従来の励起エネルギー移動の理論では、適用範囲がこれらの極限の場合だけに制限されていたため、コヒーレンスの取り扱いが不十分であった。我々はこれまでの研究で、この制限を撤廃し、従来の理論における2つの極限を連続的につなげる方法を考案した。しかし、この方法は、量子力学的に状態の記述する基底を現象論的に選択するもので、その基礎付けはなされていなかった。我々は、この方法をマスター方程式の摂動展開の側面から基礎付けをし、摂動展開を正当化するような基底を選択すると、自然にこの基底選択が得られることを明らかにした。

10. β -カロテンにおける振動モードのカップリングに関する理論的研究

β -カロテンに対する四光波混合分光の実験で興味深い結果が得られた。そこでは、 β -カロテンが電子的励起状態にいる時間間隔(いわゆるコヒーレント時間) τ を大きくするにつれ、分子振動の和周波や差周波の振動が、 τ が0の場合に比べて非常に強く観測された。この結果は従来の理論モデルでは再現できなかった。従って、実験を理論的に再現するためには従来のモデルを改良する必要がある。我々は、光許容の励起状態 S_2 と光禁制の励起状態 S_x との間で起こる、無輻射相互作用によるコヒーレントな混ざり合いと、 S_x とフォノンとの相互作用として曲率の変化およびモードの回転を考慮に入れたモデルを提案し、実験で観測されたカップリングモードを再現することに成功した。

11. LH1 複合体中のスピロ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 複合体及び天然の LH1 複合体の電場変調吸収 (EA) 分光測定を行った。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。2種類の LH1 複合体をこれらのパラメータについて比較した結果、良く一致することがわかった。

12. 紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* の単離 core と core-only 再構成膜の電場変調吸収分光測定

光合成膜中でのアンテナ系組織の配列の違いに伴う相互作用を議論する目的で、紅色光合成細菌 *Blastochloris(Blc.) viridis* の単離 core (LH1-RC)と脂質二重層膜に core を配列させた core-only 再構成膜の電場変調吸収分光測定を行い、それぞれの非線形光学パラメータを測定した。その結果、遷移における永久双極子モーメントの変化量に有意な差があることがわかった。今後は LH2 も含めた再構成膜の電場変調吸収分光測定もを行い、議論を深める。

13. 極性カロテノイド誘導体のフェムト秒時間分解吸収分光の溶媒及び励起波長依存性

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、レチナールに 1,3-インダンジオンを結合させた、カルボニル基を二つ持つ極性カロテノイド誘導体を合成し、中間励起状態の溶媒及び励起波長を測定した。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、中間励起状態の寿命の溶媒及び励起波長依存性を決定した。これらの結果から、最も長寿命な中間励起状態は、極性溶媒中のカルボニル基を持つ極性カロテノイドにおいて観測されている分子内電荷移動状態(S_{ICT})とは逆の溶媒極性依存性を示していた。これは、 S_{ICT} の生成と分子構造との関係性に対して今までの報告に疑問を投げかける結果である。

14. アレン基改変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(S_{ICT})形成との関係を解明するため、ペリジニンの分子構造のアレン基部分を改変した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。さらに、分子起動計算による考察から、この測定において観測された状態は S_{2-ICT} 状態であり、また、ペリジニンのアレン基は s-trans 型ではなく、s-cis 型をしていることを明らかにした。

15. 共役鎖長改変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(S_{ICT})形成との関係を解明するため、ペリジニンの分子構造の共役鎖長の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、ペリジニンの共役鎖長より短いペリジニン誘導体では $|\Delta\mu|$ は共役鎖長が長くなるほど大きくなるのに対し、共役鎖長より長いペリジニン誘導体では $|\Delta\mu|$ はペリジニンとほぼ変わらないことがわかった。これは、ペリジニンの共役鎖長依存性がペリジニンの共役鎖長数のところで変化していることを示唆しており、このことからペリジニンの構造の特異性を議論することが可能であると考えられる。

16. デバイス動作と分光の融合技術の開発と有機半導体デバイスへの適用

カロテノイド分子を中心とした光合成化合物群を太陽光発電に応用するに際しては、デバイス動作時におけるキャリアの振る舞いを明らかにする必要がある。そのためには、デバイス動作と分光技術を融合させた手法が有効であることを着想し、実際に開発を行った。その手法の有効性を確かめるために、カロテノイドの類似物かつ半導体デバイスとしての利用が盛んな π 共役ポリマーのダイオードに対して、実際に手法を適用した。結果として、ダイオード動作で消費されるポリマー分子の電子構造並びに生成されるキャリアの電子状態を解明することに成功した。さらには過渡吸収実験と組み合わせることで、光励起及びダイオード動作で消費される電子状態の違いを明確にすることが出来た。この研究成果を *Phys. Rev. Lett.* 誌により公表した¹⁹⁾。

17. 有機高分子薄膜における超高速四波混合実験

カロテノイド分子を中心とした光合成化合物群の光励起ダイナミクスを解明するためには四波混合分光を主とした非線形分光手法が鍵となる。実際に開発した超高速時間領域の四波混合分光の有用性を確かめるために、薄膜生成が容易かつカロテノイドの類似物である π 共役ポリマー、ポリチオフェンに対して sub-20fs 領域での四波混合実験を行った。結果として、ポリチオフェンの光励起過渡状態の寿命が約 20fs であることを初めて明らかにしただけでなく、その光学非線形性が極めて高いことを初めて示した²⁰⁾。特に、掲載された論文が高く評価され、強い四波混合信号の様子を示した写真を中心にした図が雑誌の表紙に採用された。

(南後グループ関連)

18. 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)および(LH2)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 ならびに Cys 基をもつ LH2 の金及び透明 ITO 基板への自己組織化を行った。その組織化の確認は、UV-Vis, 蛍光, SPR, AFM 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、金および ITO 基板の化学修飾ならびに His-tag 基および LH2 の有無によって、RC-LH1 および LH2 の配向を制御できることが認められた。また、金基板系と同様に ITO 基板系でも His-tag 基をもつ RC-LH1 ならびに Cys 基をもつ LH2 を組織化できることがわかった。得られた成果の一部を学術論文にまとめた。

19. 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とカロテノイドの構造特異性

光合成膜から、LH1 α および LH1 β タンパク質とバクテリオクロフィル *a* (BChl *a*) および Zn-BChl *a* 誘導体ならびに諸種の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ならびに BChl *a* および Zn-BChl *a* 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。また、LH1 複合体の再構成ではカロテノイドの構造特異性が顕著に認められ、LH1 タンパク質のアミノ酸組成に大きく依存することが認められた。得られた成果の一部を学術論文にまとめた。

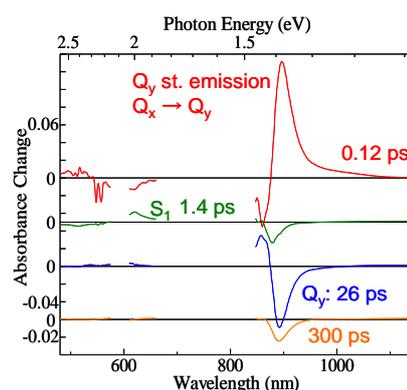
20. LH1 モデルタンパク質色素複合体の電極および脂質二分子膜で修飾した電極への組織化と光電流特性

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ならびに透明 ITO 電極および脂質二分子膜で化学修飾したそれらの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、それらの構造、ポルフィリン分子と電極基板との距離および脂質の構造に大きく依存することがわかった。また、脂質二分子膜中ではモデルペプチド分子とのポルフィリン分子複合体は安定に存在し、光電変換能の向上が認められた。得られた成果の一部を学術論文にまとめた。

(吉澤グループ関連)

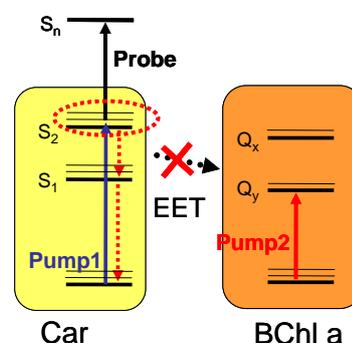
21. 波長可変励起光によるエネルギー移動効率の定量評価

カロテノイドを変えた再会合色素蛋白複合体の系統的測定を可能とするために、赤外光パラメトリック増幅器の出力を非線形光学効果により波長変換し、400 nm から 3 μ m までほぼ連続的に波長可変励起光を発生可能とした。右図は *Rhodospirillum rubrum S1* から抽出した LH1 複合体 (カロテノイドは Spirilloxanthin) のバクテリオクロロフィル Q_x 準位を光励起し、過渡吸収変化を Global Fitting により解析したものである。バクテリオクロロフィルの Q_x , Q_y 準位の信号以外にカロテノイドの S_1 準位の信号が観測されており、 Q_x から S_1 へのエネルギー移動が起きていることがわかる。カロテノイドの S_2 を光励起した結果と比較して光捕集作用の効率を求めると、従来の報告では効率を過大に評価していることが明らかとなった。



22. マルチ励起光による再会合 LH1 複合体の光合成初期過程の制御と評価

時間分解分光による光合成初期過程の研究は、複合体中と溶液中のカロテノイドの緩和過程を比較することで行われてきた。そこで、右図に示すようにエネルギー移動 (EET) のアクセプターであるバクテリオクロロフィルを Pump2 で励起状態とすることで、複合体中のエネルギー移動を制御して評価を行うことを試みた。カロテノイドとして Spheroidene を再会合した LH1 複合体を用いて測定を行ったところ、バクテリオクロロフィルの励起によりカロテノイド S_2 信号の 80fs 減衰成分が減少し、300fs 減衰成分が増加した。この結果、80fs 成分がバクテリオクロロフィルへのエネルギー移動、300fs 成分がカロテノイドの内部転換であることが明らかとなった。この手法の開発により、溶液との比較をすることなく初期過程のダイナミクスを評価することが可能となった。



23. フェムト秒ラマン分光用波長可変光源の開発

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、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 (OPA) の製作を行った。回折格子とスリットを用いてゼロ分散の周波数フィルターを製作し、フェムト秒白色光を狭帯域化して OPA のシード光とし、さらに増幅された出力光を再びフィルターに通すことで増幅によるスペクトル広がりを除去した。これにより、550nm から 650nm の範囲でスペクトル幅 20cm^{-1} 以下のラマン分光用励起光を得た。

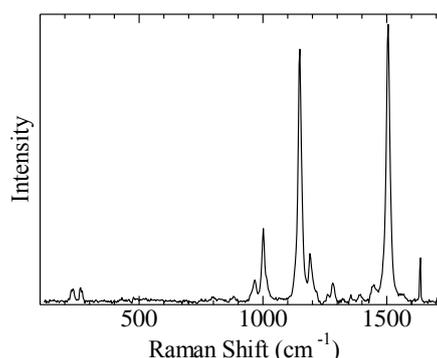
24. マルチ励起光および波形整形励起光によるコヒーレント振動生成

光合成初期過程における振動の役割を解明するために、任意の励起状態にコヒーレント振動を生成可能なマルチ励起光の開発を行った。励起状態を生成する第一の励起光には、波長可変励起光 (パルス幅約 100fs) を用いる。コヒーレント振動を生成する第二の励起光として、非同軸光パラメトリック増幅器 (NOPA) により発生した 20fs 光パルスを波形整形生成して振動周期に整合したパルス列を得た。色素分子 (Nile Blue) を用いた予備実験により、励起状態に周期約 56fs のコヒーレント振動を効率よく生成することに成功した。

25. 光アンテナ複合体の高周波数分解ラマン分光

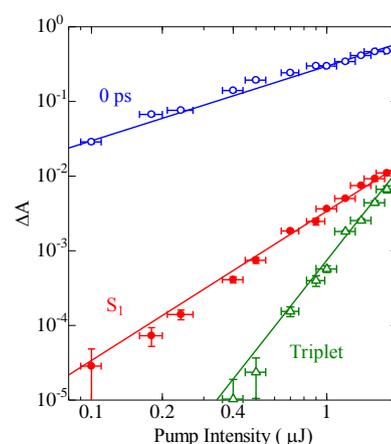
色素蛋白複合体の構造について議論するために、高い周波数分解能をもつラマン分光を行った。下図は、*Rhodospirillum rubrum S1* から抽出した LH1 複合体にカロテノイドとして Spheroidene を

再会合した薄膜試料の自発ラマンスペクトルである。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 1001, 1149, 1505 cm^{-1} にはっきりと現われている。他のラマン信号は、主としてバクテリオクロフィルによるものである。天然の複合体や異なるカロテノイドを再会合した複合体と比較することで、再会合の影響が構造や振動にどのように表れているかの検証を進めている。



26. 多光子励起によるカロテノイド緩和過程の研究

カロテノイドは多くの励起状態をもっており、光合成初期過程における役割を明らかにするためには、それぞれのダイナミクスを調べる必要がある。しかし、通常の1光子励起では生成できる励起状態が限られている。そこで、赤外励起光を用いた多光子励起を行うことで1光子励起とは異なる初期状態を生成し、そこからの緩和過程を調べた。右図は過渡吸収変化の励起光強度依存性である。0ps 信号は励起光強度に比例しており、コヒーレントな非線形光学効果によるものであることがわかる。 S_1 は2光子励起により生成されており、励起光波長依存性から S_1 の振動準位が数 ps 以上の寿命を持つことが示された。3重項状態 (Triplet) の信号は励起光強度の4乗に比例しており、4光子過程により作られた高い励起状態からの生成過程の観測に成功した¹⁴⁾。



27. β -カロテン同族体の緩和過程

光合成系における超高速・高効率エネルギー伝達とカロテノイドの主鎖構造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についてフェムト秒吸収・発光分光により緩和過程を調べた。その結果、 S_2 から S_1 状態への緩和は主鎖の共役2重結合数 n が 9 の場合に最も速くなることが明らかとなり、 n が 9 以上にカロテノイドでは S_2 と S_1 の間の中間状態が緩和に寄与していることが示された¹⁵⁾。さらに、主鎖中央部のメチル側鎖基の有無による違いを調べ、側鎖基が励起状態の振動緩和に影響を与えていることを明らかにした。メチル基をもつ $m9$ では、 $m9'$ よりも S_1 の振動緩和および S_1 から S_0 への内部転換が遅くなっていた。ラマン分光の結果からは、 $C=C$ 伸縮振動モードには差がないが、 $C-C$ 伸縮振動および $C-H$ 変角振動のモードに差が見られた。この振動状態の差が、 S_1 の緩和過程に影響を与えていると考えられる。

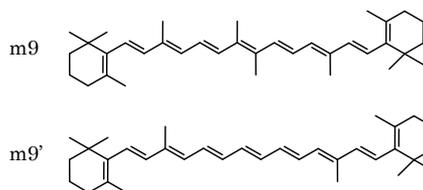


図 5

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、有意な研究成果を排出し続けている。そのことを定量化するために、上述した27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次ページに記す。また、主な研究項目の達成度・進捗度を%単位で記す。

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50%) 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50%) 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20%) 			5,6,8,11,13, 14,15,16,17, 19 1			
<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100%) 人工光合成膜のコヒーレント分光 (達成度0%, 進捗度20%) 人工光合成膜の時間分解顕微分光 (達成度100%, 進捗度20%) 			2,3,7,9,10 12 4			
<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70%) 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20%) 			18 20			
<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70%) エネルギー移動機構の解明 (達成度100%, 進捗度40%) 新たな機能発現およびエネルギー移動の制御 (達成度100%, 進捗度0%) 			23,25 21,22,26, 27 24			

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. H. Hashimoto, Daisuke Kosumi, M. Sugisaki, M. Fujiwara, R. Fujii, R.J. Cogdell, "The Possible Involvement of Multiple 'Dark' State in Carotenoid Photophysics", *Carotenoid Science*, **14** (2009) 6-13. (ISSN: 1880-5671)
2. N. Chatterjee, 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. DOI:10.1016/j.abb.2008.10.035
3. 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", *Phys. Rev.* **B80** (2009) 035118-1-10, DOI: 10.1103/PhysRevB.80.035118.
4. 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)* **6** (2009) S34-S37, DOI: 10.1002/pssc.200881344.
5. M. Sugisaki, M. Fujiwara, R. Fujii, K. Nakagawa, M. Nango, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Transient grating spectroscopy in photosynthetic purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1", *J. Lumin.* **129** (2009) 1908-1911, DOI:10.1016/j.jlumin.2009.01.027.
6. M. Sugisaki, M. Fujiwara, D. Kosumi, R. Fujii, M. Nango, and H. Hashimoto, "Transient grating signals from spheroidene in and out of pigment-protein complexes from *Rba. sphaeroides* 2.4.1", *Carotenoid Science*, **14** (2009) 70-76. (ISSN: 1880-5671)
7. M. Fujiwara, M. Sugisaki, A. Gall, B. Robert, R.J. Cogdell, and H. Hashimoto, "Ultrafast optical response of β -carotene and lycopene probed by sub-20-fs time-resolved coherent spectroscopy", *J. Lumin.* **129** (2009) 1808-1812.
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. Status Solidi (c)* **6** (2009) S31-S33.
9. K. Miyamoto, S. Ohno, M. Fujiwara, H. Minamide, H. Hashimoto and H. Ito, "Optimized terahertz-wave generation using BNA-DFG", *Optics Express*, **17** (2009) 14832-14838.
10. T. Kajikawa, K. Aoki, R.S. Singh, T. Iwashita, T. Kusumoto, H.A. Frank, H. Hashimoto, and S. Katsumura, "Syntheses of allene-modified derivatives of peridinin toward elucidation of the effective role of the allene function in high transfer efficiencies in photosynthesis", *Org. Biomol. Chem.*, **7** (2009) 3723. (doi: 10.1039/b907456b)
11. K. Iwaszczuk, D.G. Cooke, M. Fujiwara, H. Hashimoto, and P.U. Jepsen, "Simultaneous reference and differential waveform acquisition in time-resolved terahertz spectroscopy", *Optics Express* **17** (2009) 21969-21976.
12. T. Kajikawa, S. Hasegawa, T. Iwashita, T. Kusumoto, H. Hashimoto, D.M. Niedzwiedzki, H.A. Frank, and S. Katsumura, "Syntheses of C33-, C35-, and C39-Peridinin and Their Spectral Characteristics", *Org. Lett.* **11** (2009) 5006-5009. (doi: 10.1021/ol901940g)
13. D. Kosumi, T. Kusumoto, R. Fujii, M. Sugisaki, Y. Iinuma, N. Oka, Y. Takaesu, T. Taira, M. Iha, H.A. Frank, and H. Hashimoto, "One- and two-photon pump-probe spectroscopic measurements reveal the S_1 and intramolecular charge transfer states are distinct in fucoxanthin", *Chem. Phys. Lett.* **483** (2009) 95-100. (doi: 10.1016/j.cplett.2009.10.077)
14. D. Kosumi, M. Fujiwara, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, "Ultrafast Nonlinear Optical Responses Induced by Multiphoton Excitation in All-*trans*- β -carotene: Nonresonant Excitation to the Optically Allowed S_2 State", *J. Phys. Soc. Jpn.* **78** (2009) 104715. DOI: 10.1143/JPSJ.78.104715

15. D. Kosumi, M. Fujiwara, R. Fujii, R.J. Cogdell, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, “The dependence of the ultrafast relaxation kinetics of the S₂ and S₁ states in β-carotene homologs and lycopene on conjugation length studied by femtosecond time-resolved absorption and Kerr-gate fluorescence spectroscopies”, *J. Chem. Phys.* **130** (2009) 214506. DOI: 10.1063/1.3147008
16. D. Kosumi, K. Abe, H. Karasawa, M. Fujiwara, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, “Highly Sensitive Femtosecond Dispersive Spectroscopy: Application to the Ultrafast Relaxation Kinetics in All-*trans*-β-carotene”, *Carotenoid Science* **14** (2009) 37-42. (ISSN: 1880-5671)
17. T. Horibe, K. Nakagawa, T. Kusumoto, R. Fujii, R. J. Cogdell, M. Nango, and H. Hashimoto, “Polarization-Angle Dependence of Stark Absorption Spectra of Spirilloxanthin Bound to Reconstituted LH1 Complexes using LH1-Subunits Isolated from the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*”, *Carotenoid Science* **14** (2009) 66-69. (ISSN: 1880-5671)
18. T. Kusumoto, T. Horibe, T. Kajikawa, S. Hasegawa, K. Aoki, S. R. Shanker, T. Iwashita, S. Katsumura and H. Hashimoto, “Electroabsorption spectroscopy of peridinin and allene-modified peridinin analogues” *Carotenoid Science*, **14** (2009) 77-79. (ISSN: 1880-5671)
19. K. Kanemoto, M. Yasui, D. Kosumi, A. Ogata, M. Sugisaki, T. Karasawa, I. Akai, and H. Hashimoto, “Morphology dependent carrier and exciton generations in regioregular poly(3-hexylthiophene) polymer diodes as revealed by bleaching spectroscopy” *Phys. Rev. Lett.*, **103** (2009) 187402. DOI: 10.1103/PhysRevLett.103.187402
20. K. Kanemoto, M. Sugisaki, M. Fujiwara, T. Karasawa, and H. Hashimoto “Ultrafast coherent vibronic oscillations in regioregular poly(3-alkylthiophene)” *Physica Status Solidi (c)* **6** (2009) S46-S49. DOI: 10.1002/pssc.200881304
21. K. Kanemoto, I. Akai, M. Sugisaki, H. Hashimoto, T. Karasawa, N. Negishi, and Y. Aso , “Temperature effects on quasi-isolated conjugated polymers as revealed by temperature-dependent optical spectra of 16-mer oligothiophene diluted in a solid matrix”, *J. Chem. Phys.* **130** (2009) 234909. DOI: 10.1063/1.3152447
22. K. Kanemoto, M. Sugisaki, H. Hashimoto, I. Akai, T. Karasawa, N. Negishi, and Y. Aso, “Intrachain Photoluminescence Dynamics of a Long Oligothiophene at Room Temperature”, *J. Lumin.* **129** (2009) 1845-1848. DOI: 10.1016/j.jlumin.2009.04.045
23. K. Nakagawa, T. Nakano, N. Fukui, A. Nakashima, S. Sakai, T. Mizuno, T. Dewa, K. Iida, A.T. Gardiner, R.J. Cogdell, R. Fujii, H. Hashimoto and M. Nango, “Reconstitution of the Light-harvesting 1 (LH1) Complex Using LH1-α and LH1-β Polypeptides, Separately Isolated from the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*, Together with Bacteriochlorophyll *a* and All-*trans* Carotenoids”, *Carotenoid Science* **14** (2009) 54-57. (ISSN: 1880-5671)
24. K. Nakagawa, N. Fukui, T. Nakano, A. Mizuno, A. Nakashima, S. Sakai, T. Mizuno, T. Dewa, K. Iida, A.T. Gardiner, R.J. Cogdell, R. Fujii, H. Hashimoto and M. Nango, “Carotenoid Specificity During Reconstitution of the Light-harvesting 1 (LH1) Complexes Using LH1-polypeptides Isolated from the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides* Together with Bacteriochlorophyll *a* and Carotenoids”, *Carotenoid Science* **14** (2009) 58-61. (ISSN: 1880-5671)
25. K. Nakagawa, T. Nakano, N. Fukui, A. Nakashima, S. Sakai, T. Mizuno, T. Dewa, K. Iida, A.T. Gardiner, R.J. Cogdell, R. Fujii, H. Hashimoto and M. Nango, “Reconstitution of the Light-harvesting (LH1) Complex Using Zinc-substituted Bacteriochlorophyll *a* and LH1-Polypeptides Isolated from the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* Together with all-*trans* Carotenoids”, *Carotenoid Science* **14** (2009) 62-65. (ISSN: 1880-5671)
26. J. Nakamura, R. Oura, S. Isigure, S. Iwasaki, Y. Hirose, and M. Nango, “Effect of polymer on peroxide decoloration of azo dye catalyzed by manganese porphyrin derivatives”, *Porphyrins* **18** (2009) 23-29.

(4-2) 知財出願

① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)