

光合成反応中心における電子励起エネルギーと 電子の超高速移動過程

熊崎 茂一

北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 (〒923-1292 石川県能美郡辰口町旭台1-1)

Ultrafast Transfers of Electronic Excitation and Electron in Photosynthetic Reaction Centers

Shigeichi KUMAZAKI

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology,

1-1 Asahidai, Tatsunokuchi-cho, Nomi-gun, Ishikawa 923-1292

(Received September 2, 2002)

A brief review is given on how ultrafast laser spectroscopy has been recently applied to the research of photosynthetic reaction center, which achieves the most essential energy conversion from light to chemical (physiological) energy. Photosystem I reaction center (PSIRC) is one of the several types of photosynthetic reaction center, and it is working in plants and some photosynthetic bacteria. Light-illuminated PSIRC generates the highest reducing capability among all biological systems, which is necessary for the reduction of carbon dioxide, the most controversial greenhouse effect gas. The understanding on PSIRC has been relatively delayed due to its stoichiometric and spectroscopic complexity. Thanks to the advance of ultrafast laser spectroscopy and the finely determined crystal structure in 2001, very detailed picture is being rapidly constructed on the mechanism of the electronic excitation transfer and the primary charge separation processes among the constituent chlorophylls in PSIRC.

Key Words: Ultrafast laser spectroscopy, Photosynthesis, Electron transfer, Electronic excitation transfer, Chlorophyll

1. はじめに

地球上の全生物は植物や光合成細菌で行われる光合成に依存している。光合成反応の本質は、太陽光を吸収した色素分子が電子励起され、その電子励起エネルギーが電荷移動のエネルギーに変換されることである。この変換を行うのが光合成反応中心と呼ばれる色素とタンパク質の複合体である。このエネルギー変換の量子効率ほとんど100%であって、人工的光合成には未到達の高みにある。

植物の緑色(反射スペクトル)は主にクロロフィル分子(Chl, Fig. 1)の吸収スペクトルによって与えられている。

反応中心では、ある特別な状態におかれたChlの電子励起状態から電荷分離は開始される。Chlが有機溶媒中で孤立している時に示す最低励起一重項状態(S_1)の寿命は数ナノ秒であるのに対し、反応中心での電荷分離の時定数は数ピコ秒以下であり、かつ一旦電荷分離状態が生成すると、電荷再結合反応が巧妙に抑制されている。こうして高い量子収率が実現している。

超短パルスレーザーを使った時間分解分光は、電荷分

離反応の素過程をもっとも直接的な形で我々に見せてくれる。一部の反応中心については精密な結晶構造が得られており、分子配列と電荷移動素過程の関係を詳細に検討することができる。遺伝子操作によって、電子伝達Chlの近傍のアミノ酸置換も可能で、電子移動速度を制御できる¹⁾。光合成反応中心は、もはや単なる生物学的の興味の対象ではなく、レーザー分光学、量子物理化学、生化学の実験場であり、人工光合成、太陽電池、光センサーなどの分子設計の模範であり続けるだろう。

本稿では、植物で働く光化学系1反応中心の電子励起移動と電子移動を取り上げる。植物が二酸化炭素を還元する強い還元力を生成するのは光化学系1であり、水を酸化して酸素を発生する光化学系2と並び、全ての植物に共通する光合成タンパク質である²⁾。

2. 色素の配列構造と電子吸収スペクトル

光を利用した電荷分離反応を起こす最小単位が反応中心であり、それは色素とタンパク質の複合体である。Fig. 2に示した光化学系1反応中心の結晶構造は植物と同様の

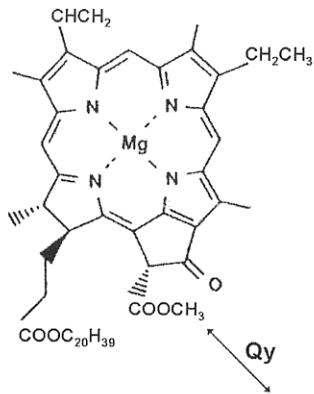


Fig. 1 Molecular structure of chlorophyll *a*.

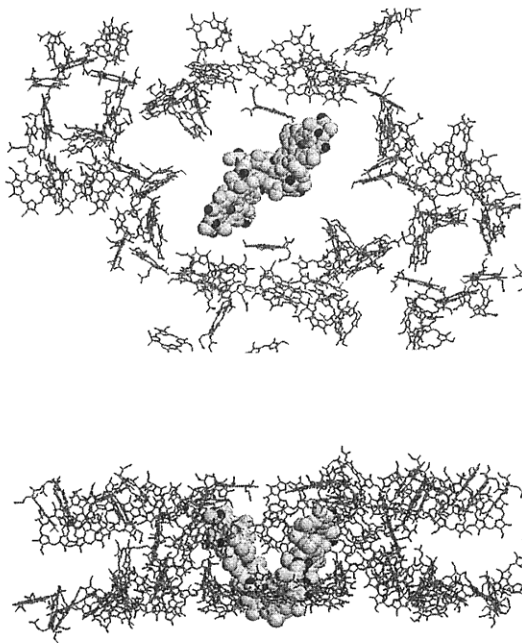


Fig. 2 Arrangement of chlorophyll molecules (Chl) in the crystal structure of photosystem I reaction center complex. Proteins and other cofactor molecules are not shown. The view directions in the upper panel is along the normal of the photosynthetic membrane. The view direction in the lower panel is parallel to the membrane plane. The Chls in the electron transfer and antenna systems are shown by atomic spheres and sticks, respectively. The structural data were downloaded from the Protein data bank (1JB0).

光化学系1をもつシアノバクテリアの一種である *Synechococcus elongatus* から得られたものである³⁾。これによれば、P700あたり96個のChlが光化学系1反応中心に結合している。うち6個がFig. 3のように電子移動系を構成している。電子移動系以外のChlは専ら電子励起エネルギーを電子移動系に運ぶために存在し、アンテナ系と呼ばれるが、アンテナ系は電子移動系を取り囲むリング状の構造を示し、電子移動系と同一のタンパク複合体に埋め込まれている。

Fig. 4の最低励起一重項状態を示す電子吸収スペクトル(Qyバンド、遷移双極子モーメントの方向はFig. 1参照)を見ると、構造のない単一のピークだけがあるように見え

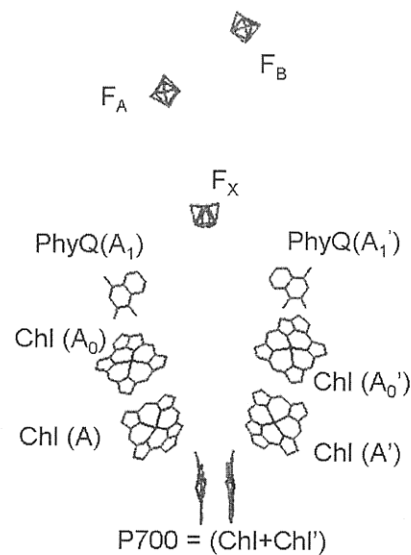


Fig. 3 The molecular arrangement of the electron transfer cofactors of photosystem I reaction center. There are 6 Chls, 2 phylloquinones (PhyQ), 3 iron-sulfur centers (F_X , F_A , F_B). P700 is a heterodimer, which consists of Chl and its structural isomer (epimer, Chl'). The structural data were downloaded from the Protein data bank (1JB0).

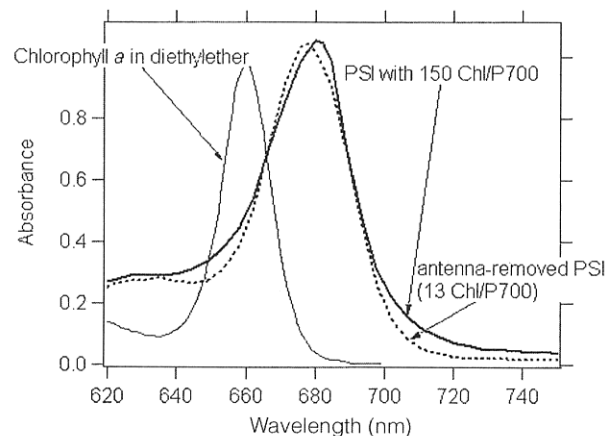


Fig. 4 Absorption spectra of isolated photosystem I reaction center. The one isolated from spinach contains about 150 Chls per P700 (PSI with 150 Chl/P700), and the one treated with diethyl-ether contains only 13 Chls per P700 (antenna-removed PSI). The absorption spectrum of monomer Chl in diethylether is also shown.

る。Chl単量体のスペクトルと比較すれば、光化学系1の吸収スペクトルはピーク波長が長波長側にずれており、かつスペクトル幅が広いことがわかる。個々のChl分子がタンパク質中で置かれた環境や周囲のChlとの相互作用により、異なる長波長シフトを示していることがわかる。このように吸収スペクトルが重なる多数のChlを含んでいる光化学系1では、電子移動や励起移動の詳細な議論は容易ではない。特に反応中心は電荷分離反応を起こすと、電荷分離状態が長寿命で、基底状態に戻りにくく、分光学的な測定を難しくしている。電荷分離反応を起こさない光捕集色素タンパク系の研究には無い困難である。

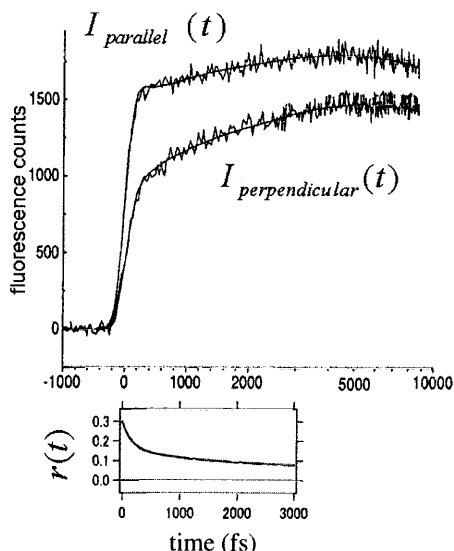


Fig. 5 Time- and polarization-resolved fluorescence of photosystem I reaction center (from a cyanobacterium) that contain about 100 Chl/P700. The excitation and detection wavelengths were 650 and 725 nm, respectively. The repetition rate of the laser was 250 kHz. The lower graph shows the polarization anisotropy calculated from the parallel and perpendicular components. The upper graph is reproduced with permission from ref. 4 (© American Chemical Society).

3. 励起エネルギー移動

まず励起エネルギー移動の素過程をみた研究例を紹介する。吸収スペクトルにおいて重なりが大きい多数のChlがある場合、光励起後の最初の励起エネルギー移動が必ずしも大きなスペクトル変化をもたらさない可能性が大きい。一方、Fig. 2の結晶構造において隣り合うChlを見た場合、分子配向が大きく異なる場合が多い。このような場合は励起されているChlの遷移双極子モーメントの方向に敏感な測定をするといふ。文献4では、蛍光偏光解消を和周波生成蛍光測定 (fluorescence up-conversion method, 技術的詳細については文献5を参照) を用いて時間分解した。直線偏光した励起光を用いた場合に、励起光の偏光と平行な蛍光偏光成分と垂直な蛍光偏光成分とを分離して検出しそれらの比で決まる異方性($r(t)$)を計算した。異方性の定義は

$$\frac{I_{\text{parallel}}(t) - I_{\text{perpendicular}}(t)}{I_{\text{parallel}}(t) + 2I_{\text{perpendicular}}(t)} \quad (1)$$

である。励起波長が650 nmの場合、異方性の最初の大きい変化は160フェムト秒の時定数を示した。必ずしもすべての励起エネルギー移動が大きな配向変化を伴うわけではないので、励起エネルギー移動の素過程は160フェムト秒以下の時間で起こっていると考えられる。励起波長は650 nmであり、どのChlが励起されるか特定はできないから、160フェムト秒というのは異なるChlが励起された光化学系1集団を観察した集団平均値である。

電子励起エネルギーは隣接するChl間を移動しながら、最終的には電子移動系に到達する。しかし、多数のChlの

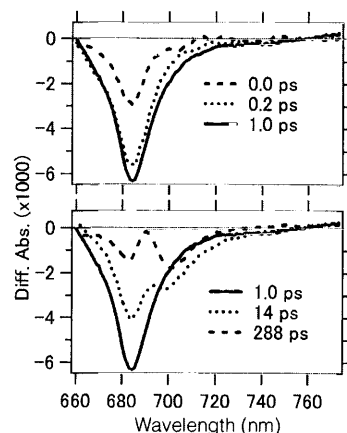


Fig. 6 Spectra of transient absorbance changes of photosystem I reaction center that contains about 150 Chls/P700. The excitation wavelength was 630 nm. Femtosecond white continuum pulses were used as the probe beam. The repetition rate of the laser was 1 kHz.

間の励起エネルギーの差は熱揺らぎ程度しかない。680 nmと690 nmの光子エネルギーの差は 210 cm^{-1} であり、常温では $kT = 200 \text{ cm}^{-1}$ である。もし、同等のChlが並んでいれば、励起エネルギー移動には一定の方向性はなく、行ったり来たりランダムウォーク(乱歩)に近い様式であると考えるべきであろう。電子移動系のP700の吸収極大は大多数のアンテナChlに比べれば長波長側に吸収極大を示すが、P700よりも長波長側に吸収を示すアンテナChlが少数存在する。それらを長波長吸収Chlと呼ぶ⁶⁾。それらの存在が励起エネルギー移動の方向性に大きな影響を与えるようだ。Fig. 2の結晶構造では、アンテナリングの中に二量体的Chlが3組、三量体的Chlが1組あると考えられている³⁾。

Fig. 6では過渡吸収スペクトルの測定によって、異なる吸収極大を示すChlへ励起エネルギーが移動する様子を時間分解している。Chlは電子励起されると基底状態の吸収とほぼ同じ波長に鋭い負の吸収変化(褪色: photobleaching)を示す。吸収極大波長と蛍光極大波長の差(ストークスシフト)が約5 nmしかないので、誘導放射の信号は褪色の信号と重なって現れる。スペクトル形状の変化はサブピコ秒の時間領域では小さい。しかし、1ピコ秒から14ピコ秒で、負の吸収変化の重心が長波長へ動くことがわかる。そして、さらに時間が経ち288ピコ秒では二つの褪色のピークが見える。この最後に残る信号はP700が酸化された(電子を放出した)信号である(差スペクトルP700+/P700)。

このような過渡吸収スペクトルを多数の時間で測定し、過渡吸収データ $\Delta Abs(\lambda, t)$ が得られる。これに対し、全波長にわたって共通の時定数を使って指数関数によりカーブフィッティングを行う(global curve fitting)。もし4つの指数関数成分があるとすれば

$$\Delta Abs(\lambda, t) = \sum_{n=1}^4 DAS_n(\lambda) \exp[-t/\tau_n] \quad (2)$$

と $\Delta Abs(\lambda, t)$ を近似表現する⁷⁾. この結果得られた $DAS_n(\lambda)$ を Fig. 7 に示す. 負の振幅は褪色信号が無くなるような正方向への時間変化を示し, 正の振幅は褪色信号が現れるような負方向への時間変化を示す. 0.2ピコ秒の DAS は, 630 nm という光を吸収して分子振動的に励起された Chl が電子的に励起されているが振動的には基底状態へ緩和する様子を示す. 5ピコ秒の DAS は負の振幅と正の振幅を同程度の面積で示しており, 電子励起状態の消失は僅かで, 主に 685 nm 近辺で吸収する Chl から 705 nm 近辺で吸収する Chl へ励起エネルギーの移動が起きていることがわかる. 54ピコ秒の DAS は負の振幅が支配的である. これは電子励起状態がなくなり, 電荷分離状態へと転換されていることを示す. すなわち, 電子励起エネルギーが長波長吸収 Chl や P700 など比較的長波長側で吸収する Chl に到達するには 5ピコ秒程度の時間がかかるということである. 隣り合う Chl の間の励起移動が 0.16ピコ秒程度で起これば, ランダムウォークするうちに 4組あるアンテナリング内の長波長吸収 Chl に捉えられるまでの平均時間が 5ピコ秒であるというのは妥当な数字であろう. そして, 見かけ上の励起エネルギーの移動がなくなると, P700 に補足された励起エネルギーが少しづつ電荷分離状態へと転換されていく. Fig. 6, 7 は, ほうれん草由来の光化学系 I 反応中心についての結果であるが, このような超高速過程の全体像は多くの植物, シアノバクテリアから得られた光化学系 I に共通である⁶⁾.

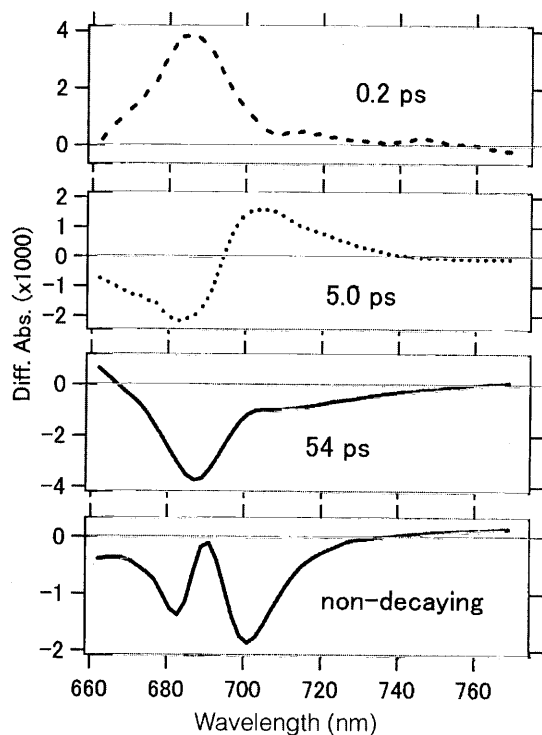


Fig. 7 Decay-associated spectra obtained by the global curve fitting of the transient absorbance changes as shown in Fig. 6. Three exponentially decaying components and one non-decaying component were necessary and sufficient for the signal-to-noise ratio in the time window from -1 ps to 300 ps. See main text for the definition.

4. 超高速電荷分離

100分子以上の Chl が存在する光化学系 I では, P700 への励起エネルギー移動に時間がかかり, 電荷分離のみのダイナミクスを観測することは事実上不可能である. そこで役立つのが Fig. 4 に吸収スペクトルを示したアンテナ除去光化学系 I 反応中心である. 電子移動の活性は保ったままアンテナ Chl の大部分をエーテルにより抽出しているのである⁸⁾. このサンプルでは 6 個の Chl からなる電子移動系の他, 約 7 個程度のアンテナ Chl しか残されていない. また特に長波長吸収 Chl が除去されやすく, P700 が最も長波長側に吸収を示すことになり, 選択励起が行い易い. 励起波長を 699 nm に選んで, Chl のラジカル (P700⁺A⁻ and/or P700⁺A₀⁻, Fig. 3 参照) の吸収変化を時間分解した実験を Fig. 8 に示す⁵⁾.

レーザーパルスの時間間隔内で P700 がすばやく還元型に戻る化学的条件下では, Chl ラジカル, すなわち電荷分離状態の信号が 0.8ピコ秒と 9ピコ秒で立ち上がっている (振幅比は 50:50). この 0.8ピコ秒の成分が P700 の電子励起状態から直接起こる最も純粋な電荷分離のダイナミクスを示している. 9ピコ秒の成分は励起エネルギーが一旦周囲の電子アクセプター Chl などに移動し, また戻ってきてから起こる電荷分離と考えられる¹¹⁾. 実は, アンテナ除去光化学系 I 反応中心からは電子アクセプターであるフィロ

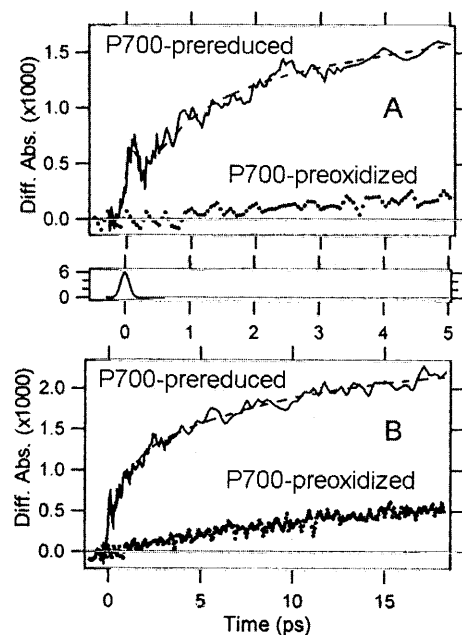


Fig. 8 Temporal profiles of the transient absorbance changes of antenna-removed photosystem I reaction center. Excitation and probe wavelengths are 699 nm and 738 nm, respectively. Repetition rate of the laser was 1 kHz. Two chemical conditions were employed. Under the P700-prereduced conditions, P700 was chemically reduced at a rate much faster than the photooxidation rate. Under the P700-preoxidized conditions, P700 was chemically oxidized in the ground state. The two panels show the same data on different time scales. Reproduced with permission from ref. 9 (© American Chemical Society).

キノン (Fig. 3参照) も除去されているので¹⁰⁾, 電子アクセプター-Chlのいずれか(A, A', A₀, and/or, A₀')が電子を受け取った状態が蓄積している様子がピコ秒領域では観測されている。対照実験として, P700が初めから酸化されている化学的条件下では, このようなChlラジカルの信号は無く, 遅く小さな吸収増加しかない¹¹⁾。

分子間電子移動の速度は二つの因子の積で決まる。第一の因子は電子授受にかかわる分子軌道の重なりで決まる電子因子であり, 第二は, 電子移動した前後に必要な原子核(タンパク質も含む)の平衡位置のずれで決まる核因子である¹²⁾。光合成の超高速電子移動の多くでは, 核因子は最適化されており, 電子移動の速度は電子因子で決まることが多い¹³⁾。この関係を利用して, 筆者らはP700と最近接のChl(AまたはA')の間の π 電子系を形成する原子間最短距離を4.7(± 0.2)Åと予測したが⁹⁾, これは後に発表された結晶構造での値を正確に予言していた。

5. 問題点と将来展望

概観を与える事を主目的とした本稿では, 敢えて立ち入った議論を避けたが, 光化学系Iの初期過程には下記のような重要な問題が残っている。

- ①見かけ上2つある電子移動経路は片方しか使われないのか? 過渡的にでも片方へ電子が流れないのか?
- ②電子励起状態をいかに記述すべきか? 近接したChl間の励起状態がどの程度非局在化しており, それがいかに電子移動に影響するか?

これらの問題は, 実験的なレーザー分光学単独で解決できる問題ではなく, 理論化学的, 光物理学的な慎重な考察を要する。また, 光化学系Iに限定された問題ではなく, 光合成生物の進化, 分化の秘密に迫る重要な側面である。多様な光合成反応中心の分子設計が明らかになりつつある現在, 超高速レーザー分光学はそれらを系統的

に比較するために必要な道具の一つであることは間違いない。

謝 辞

紹介した私自身の研究は, 北陸先端科学技術大学院大学の吉原 経太郎副学長, 帝京大学薬学部の池上 勇教授らとの共同研究です。またその途上で, 名古屋大学理学部の伊藤 繁教授, ユニバーシティーカレッジ(ロンドン)の岩城 雅代博士から貴重な助言を得ました。感謝の意を表します。

参考文献

- 1) A. J. Hoff and J. Deisenhofer: *Phys. Rep.* **287** (1997) 1 - 247.
- 2) 伊藤 繁: 光環境と生物の進化, 日本光生物学協会編 (共立出版, 2000) p. 44 - 61.
- 3) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, and N. Krauß: *Nature* **411** (2001) 909 - 917.
- 4) J. T. M. Kennis, B. Gobets, I. H. M. van Stokkum, J. P. Dekker, R. van Grondelle, and G. R. Fleming: *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 4485 - 4494.
- 5) R. Jimenez and G. R. Fleming: in *Biophysical Technique in Photosynthesis*, ed. J. Ames and A. J. Hoff, (Kluwer Academic Publishers, 1995) 63 - 74.
- 6) B. Gobets and R. van Grondelle: *Biochim. Biophys. Acta* **1507** (2001) 80 - 99.
- 7) 熊崎 茂一, 吉原 経太郎: 「超高速化学ダイナミクス: フェムト・ピコ秒領域の化学」日本化学会編, 季刊化学総説 **44** (学会出版センター, 2000) p. 149 - 161.
- 8) I. Ikegami, S. Itoh, and M. Iwaki: *Plant Cell Physiol.* **41** (2000) 1085-1095.
- 9) S. Kumasaki, I. Ikegami, H. Furusawa, S. Yasuda, and K. Yoshihara: *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 1093 - 1099.
- 10) S. Itoh, M. Iwaki, and I. Ikegami: *Biochim. Biophys. Acta* **1507** (2001) 115 - 138.
- 11) 熊崎 茂一, 吉原 経太郎: *分光研究* **46** (1997) p. 3 - 15.
- 12) 垣谷 俊昭: 光・物質・生命と反応 (下) (丸善, 1998) p. 93 - 132 (20章).
- 13) C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Farid, and P. L. Dutton: *Nature* **355** (1992) 796-802.

レーザーワード

超高速レーザー分光学 (ultrafast laser spectroscopy)

ピコ秒, フェムト秒, アト秒領域の時間幅を持ったレーザーパルスをつつまたは複数利用して, 電気回路の時間的応答限界を超える時間分解能を実現する分光学一般を指す。光(X線—可視光線—赤外線)によって開始され得る全ての現象が研究対象になり得る。例えば, 結晶, ガラスなどの光応答特性, 光化学, 光生物学等である。いわゆる不確定性原理(あるいはフーリエ変換限界)によって, 短いパルス時間幅の実現のためには広いスペクトル

幅が必要である。しかし, 必ずしもエネルギー分解能を犠牲にしている訳ではなく, 正確な時間応答関数を得ることでスペクトル幅以下の精度でエネルギー準位の情報を得ることも可能である。レーザーの発明以来, レーザーパルス時間幅短縮技術と伴に発展してきた歴史があるが, 1990年代以降, 光源の安定化が急速に進み, 研究対象は大きく拡大した。(熊崎 茂一)