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, Tatsunokuchi, Ishikawa 923-1292,

Japan

(Received ******, 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はほとんど 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(S₁)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。



Fig. 1 Molecular structure of chlorophyll a.

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¹⁰。 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⁾。



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).

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 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Ch1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. 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 photosytem 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.

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、図6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よい。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

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

である。励起波長が650nm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650nmであり、どのChlが励起されるか特定はできないから、160フェムト秒と言うのは異なる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。



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

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 の間の励起エネルギーの差は熱揺らぎ程度しかない。 680nmと690nmの光子エネルギーの差は210 $c m^{-1}$ であり、常温では $kT = 200 cm^{-1}$ 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、行ったり来たりのランダムウォーク(乱歩) 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 の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5nm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)。



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.

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

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

と $\Delta Abs(\lambda,t)$ を近似表現する ^{γ}。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、630nm 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1 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1に共通である^の。

4. 超高速電荷分離

100分子以上の Chl が存在する光化学系1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1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⁺A⁻ a, 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¹⁰⁾。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¹⁰⁾。実は、アンテナ除去光化学系1反応中心からは電 子アクセプターであるフィロキノン(Fig. 3 参照) も除去 されているので¹¹⁾、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。

分子間電子移動の速度は二つの因子の積できまる。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2は、電子移動した前後で必要な原 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、これは結晶構造で の値を正確に予言していた。



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).

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1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1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 吉原經太郎副学長、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

A.J. Hoff, and J. Deisenhofer: Phys. Rep. 287 (1997) 1 - 247.
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. Krauβ: 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. Amesz 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,吉原經太郎:「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, M. Iwaki: Plant Cell Physiol. **41** (2000) 1085-1095.

9) Kumazaki, S.; Ikegami, I.; Furusawa, H.; Yasuda, S.; Yoshihara, K. J. Phys. Chem. B 105 (2001) 1093-1099.

10) 熊崎茂一、吉原經太郎 分光研究 **46**, (1997) p.3-15.

11) S. Itoh, M. Iwaki, I. Ikegami: Biochim. Biophys. Acta **1507** (2001) 115 – 138.

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, P.L. Dutton: Nature **355** (1992) 796-802.