

フェムト秒二次元分光による光化学反応の分析

時間分解分光は光化学反応のダイナミクスを追跡するための手法として広く用いられてきた。近年ではパルス整形技術が発展したことにより、分子集合体や機能性材料、大きなタンパク質複合体等の複雑系のダイナミクスを詳細に可視化することのできる多次元分光が注目を集めている。ここでは、フェムト秒二次元分光の実験原理と、その光合成反応初期過程への応用例について解説する。

米 田 勇 祐

1 はじめに

光合成、太陽光発電、光触媒など、光エネルギー変換に関わる光化学反応は数多く存在する。分子レベルでの現象に着目すると、光を吸収した分子はまず電子励起状態へと遷移し、反応しやすい活性化状態となる。一般的な分子の励起状態の寿命はナノ秒 (10^{-9} s) 程度であるため、光反応が効率よく進行するには、励起状態が失活する前に、ピコ秒 (10^{-12} s) からフェムト秒 (10^{-15} s) の時間スケールで反応が進行する必要がある。このような超高速で進行する化学反応を分析し、その物理化学的な機構を解明することは、高性能・高効率な光機能性材料や光エネルギー変換系を設計するための学理的指針を与えるため、現在も盛んに研究が行われている。

これまで、光化学反応を含むさまざまな超高速現象を観測するため、多種多様な時間分解分光法が開発されてきた。時間分解能の観点から特筆すべき業績として、1967年にミリ秒 (10^{-3} s) ～マイクロ秒 (10^{-6} s) の時間スケールで反応中間体を捉えることに成功した短時間エネルギーパルスによる研究、1999年に分子振動の実時間上での挙動を観測したフェムト秒 (10^{-15} s) 分光、2023年にアト秒 (10^{-18} s) パルスの生成技術に関する研究が、それぞれノーベル賞を受賞している。また、検出器の性能向上により、テラヘルツ・赤外といった低波数領域から、深紫外・軟X線といった高波数領域まで、幅広いエネルギー範囲での時間分解分光が可能となった。さらに、パルス整形技術の発展により、多次元分光のような、より多くの情報を含む高度な分光手法が広く利用されるようになった。本稿では、複雑な光化学反応を分析することのできる分光手法として、フェムト秒二次元分光について解説する。

時間分解分光測定で高い時間分解能を達成するためには、超短パルス光を用いる必要がある。フーリエ変換の関係から、超短パルス光を得るためには、周波数領域で広帯域のスペクトルを有するパルスを生成する必要がある (図 1a)。一方、タンパク質中の分子や分子集合体などの複雑系は、分子の局所的な環境によって異なる物性 (ここでは特に吸収スペクトル) や反応性を示す (図 1b)。そのため、超短パルス光を用いると、多様な吸収スペクトルを持つ分子種を同時に励起してしまうため、それぞれに由来した反応ダイナミクスの識別が困難である。フェムト秒二次元分光は、フェムト秒レベルの時間分解能で励起・観測周波数の相関を明らかにする分光手法であり、凝縮系における超高速ダイナミクスの解析に有効である。特に、フーリエ変換に基づいたフェムト秒二次元分光法は、最も高い時間分解能と周波数分解能を両立することのできる分光法として、さまざまな複雑系の光化学反応ダイナミクス研究に利用されている。本稿では、フェムト秒二次元分光の基本的な原理と、その応用例としていくつかの光合成系の測定例について解説する。

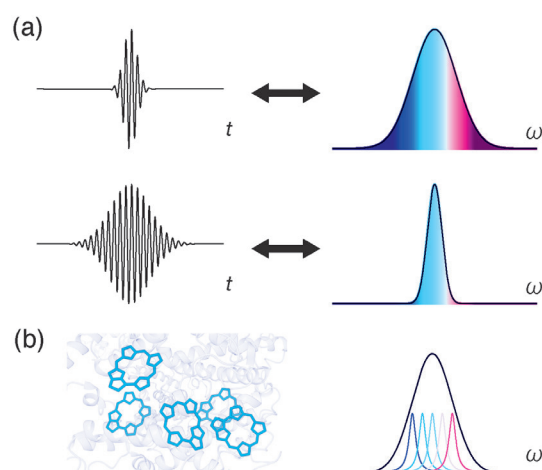


図 1 (a) 超短パルスの時間幅と周波数幅の関係性。 (b) 局所環境に応じて異なる吸収を示す分子のイメージ。

2 フェムト秒二次元分光

2.1 フェムト秒過渡吸収分光

まず、代表的な時間分解分光法としてフェムト秒過渡吸収分光について解説する(図2)¹⁾。過渡吸収分光は時間分解した紫外可視吸収スペクトルを測定する手法である。実験には二つのパルス光を用い、一つが励起パルス、もう一つがプローブパルスとして機能する(図2a)。この手法では、まず励起パルスによってサンプルを光励起し、反応を開始させる。その後、任意の遅延時間 T の後にプローブパルスをサンプルに導入し、反応過渡種の状態を記録する。プローブパルスは、プリズムや回折光子を用いて分光され、観測周波数 ω_{det} ごとに検出される。信号は励起パルスを照射した時としない時の差吸光度 $\Delta A(T, \omega_{\text{det}})$ として解析される(図2b)。すなわち、光励起に伴う基底状態濃度の減少に由来する「基底状態ブリーチ」が負の信号として、電子励起状態を含む過渡状態の生成に伴う新たな吸収に由来する「光誘起吸収」が正の信号としてそれぞれ検出される(図2b)。実際には、観測パルスが励起状態に作用して発光を誘起することに由来する「誘導放出」も負の信号として検出される。過渡吸収分光では遅延時間 T を変化させることで、光励起後の反応過渡種のスペクトルを高い時間分解能で追跡できる。また、信号を差吸光度として記録するため、中間体の定量評価が容易であるという利点も有する。

過渡吸収分光の時間分解能は、ストロボ写真のフラッシュと同様に、使用するパルス光のパルス幅に依存する。したがって、フェムト秒の時間分解能を得るには、フェムト秒のパルス幅を持つ超短パルス光を用いる必要がある。一方で、超短パルス光を生成するためには、フーリエ変換の関係により、広帯域なスペクトルを持つパルスを用いる必要がある。例えば、可視領域で 10

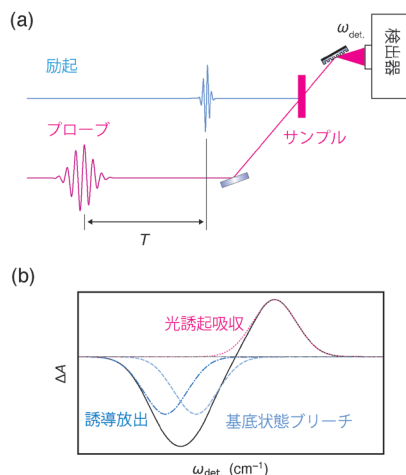


図2 (a) 過渡吸収分光のパルス配置。(b) 得られる差スペクトルのイメージ。

フェムト秒のパルスを得るには、約 50 nm の波長幅を持つ高帯域パルスが必要である。逆に、狭帯域なパルス光(例えば波長幅が約 5 nm のパルス)を用いると、パルス幅は 100 フェムト秒程度にしか圧縮できない。このように、過渡吸収分光においては、時間分解能と周波数分解能の間にトレードオフの関係が存在する。

2.2 フェムト秒二次元電子分光

上述のようなトレードオフを克服する手法として、二次元電子分光(two-dimensional electronic spectroscopy, 2DES)は有効である。2DESは基本的な原理は過渡吸収分光と類似しているが、励起パルスとして二つのパルスを用いる点が特徴的である(図3a)。2DESでは、これら二つのパルスの相対的な時間間隔 τ を精密に制御することで得られる干渉パターンを解析することで、励起周波数の分解能を得る。二つの励起パルスが時間的に完全に重なっている場合、パルス対のスペクトルは通常のパルスのスペクトルと同一である。しかし、時間間隔 τ をずらすと、その相対遅延に関する情報がスペクトルにフリンジパターンとして反映される(図3b)。この励起パルス対によって得られる信号強度は、線形応答の範囲では、パルス対のスペクトルとサンプルの吸収スペクトルの重なりに比例する。したがって、信号を時間間隔 τ の関数 $S(\tau, T, \omega_{\text{det}})$ として記録すると、 τ に対する干渉信号が得られる。この信号をフーリエ変換することで、周波数領域における「励起スペクトル」に相当する

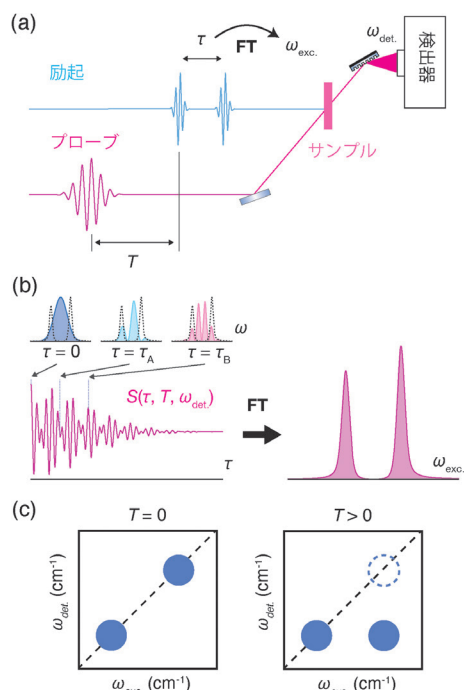


図3 (a) 二次元電子分光のパルス配置。(b) 二つの励起パルスによるスペクトル干渉と、得られる時間領域の信号(左)、およびフーリエ変換することで得られる励起スペクトルに相当する情報(右)。(c) 典型的な二次元スペクトル。

情報 $S(\omega_{\text{exc}}, T, \omega_{\text{det}})$ に変換することができる。このようにして、2DES では任意の遅延時間 T における励起・観測周波数の相関マップを取得できる。以上は光学的な観点から定性的に二次元分光の原理を説明したものであるが、三次の応答関数を用いたより詳細な理論的取り扱いについては文献を参照されたい²⁾。また、フェムト秒二次元分光では、慣習的に信号を透過率（もしくは光強度）で解析することが多く、そのため信号の符号が過渡吸収分光とは逆になる点に注意が必要である。

こうして得られる二次元スペクトルは、系の相互作用に関する豊富な情報を提供する。例えば、二つの分子が結合した系では、時間初期ではそれぞれの分子の励起に伴う信号が対角線上に対角ピークとして観測される（図 3c）。時間経過と共に、励起エネルギー移動が進行すると、新たな交差ピークが対角線の下側に出現する。一方、対角線の上側の信号は、低いエネルギーを持った分子から高いエネルギーを持った分子へエネルギー移動が進行する場合にのみ観測されるため、通常強くは観測されない。このように、二次元スペクトルの形状を解析することで、詳細なエネルギー移動経路を明らかにすることができる。

2・3 二次元電子振動分光

2DES は、さまざまな光化学反応を高い時間分解能と周波数分解能で解析することができる手法であり、複雑な化学反応ダイナミクスの解明に広く用いられてきた。一方、2DES に先立って報告された二次元赤外分光（two-dimensional infrared spectroscopy, 2DIR）は、分子の振動相関を検出する分光手法であり、分子構造に関する情報が得られやすい特徴を持つ。さらに、一般的な電子スペクトルの幅（約 1000 cm^{-1} ）に比べて、振動スペクトルの幅は狭い（約 10 cm^{-1} ）ため、局所環境に依存した分子の識別が容易である。しかし、2DIR は赤外パルスを用いた実験であるため、そのままでは光反応の研究には応用できない。

二次元電子振動分光（two-dimensional electronic-

vibrational spectroscopy, 2DEV）は、可視領域の励起パルス対を用いる点では 2DES と共通しているが、プローブパルスとして赤外パルスを用いる点が特徴的である³⁾。赤外パルスを用いた振動プローブでは、可視領域の電子スペクトルと比較して信号強度が弱く、さらに検出器も高価になりがちという課題がある。一方で、分子構造に関する情報を得やすく、局所環境によって異なる過渡種の識別が可能となるため、可視領域では区別が難しい信号も、赤外振動スペクトルの領域では明確に識別できる（図 4）。

2・4 フェムト秒超短パルス対の発生と制御

最後に、二次元分光において重要なフェムト秒超短パルス対の発生と時間制御の方法について解説する。フーリエ変換に基づいた分光手法として代表的なものには、NMR や FT-IR が挙げられる。可視領域に近い周波数領域を扱う FT-IR では、マイケルソン干渉系を用いて得られる赤外光のインターフェログラムをフーリエ解析することで赤外スペクトルを取得できる。一方、可視領域のフーリエ分光を行う場合、可視光の光周期は約 2 フェムト秒と非常に短いため、光学遅延をアト秒レベルの精度で制御し、さらに相対位相を測定の間固定しておく必要がある。そのため、マイケルソン干渉系のような従来の干渉系では、相対位相や遅延を長時間安定に保持することが難しく、十分な測定精度を確保するのは困難である。可視領域において、長時間にわたって相対位相や遅延を高精度で保持しながらパルス対の時間制御を行う方法として、回折光学素子とウェッジガラスを組み合わせる方法、パルス整形器を用いる方法、複屈折性ウェッジ結晶を利用する方法などが存在する。後者の二つの手法を採用した測定システムは既に市販されており、近年ではより簡便に測定が行えるようになりつつある。ここでは、これら二つの手法の基本原理について解説する。

パルス整形器を用いた方法では、音響光学素子によってパルス対の発生と制御を行う手法が現在の主流である（図 5a）⁴⁾。この方法では、音響光学素子に音響波を印加すると同時にパルスを入射する。この時、音響波によって媒質の密度が変化し、これが「回折格子」として作用することで、パルスの一部が回折される。パルス整形器では、この音響波のパターンを制御することにより、回折光の時間波形を任意に調整できる。これにより、パルス対の生成が可能となり、相対位相や遅延も任意に制御できる。また、現在では音響波のパターンを 100 kHz 程度で更新できるため、高繰り返しレーザーにおいてもショットごとに異なる位相・遅延を持ったパルス対を生成し、高速な信号取得が可能である。しかし、パルス整形器の回折効率を使用する素子やパルスの波長・スペクトル幅に依存するため、実験条件によっては十分なスループットを確保することが難しい。例えば、可視領域

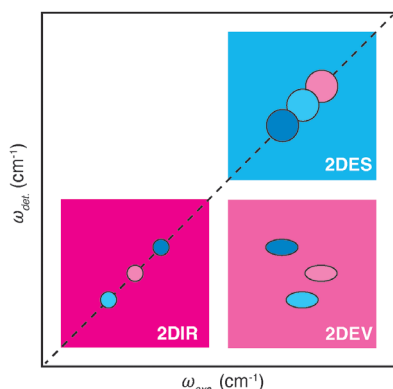


図 4 二次元分光の周波数領域の模式図

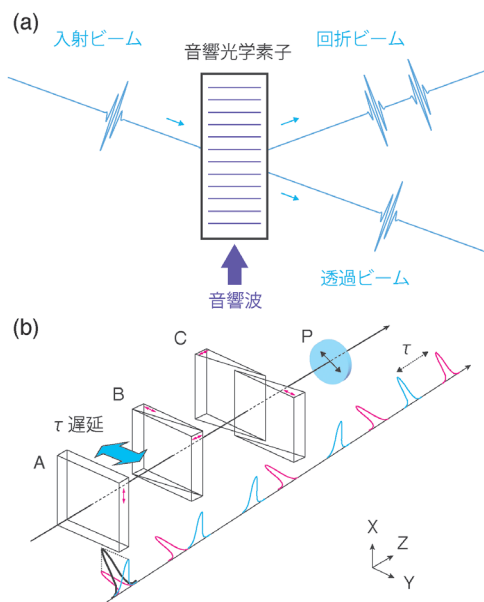


図5 (a) 音響光学素子を用いたパルス対の生成. (b) 複屈折性ウェッジ結晶を用いたパルス対生成と相対遅延の制御.

で波長幅が 100 nm 程度の場合、回折効率は 10～30 % 程度である。

複屈折性ウェッジ結晶を用いた方法では、一連の複屈折性結晶ブロック（ここでは三つ）を利用し、直交した偏光成分の間に任意の遅延を与える（図 5b）⁵⁾。まず、光学軸が X-cut の最初のブロック（A）に対して 45° の偏光パルスを入射すると、偏光が直交する二つの成分に分離され、時間的な遅延が生じる。次に、光学軸が Y-cut の結晶を用いた二つ目のブロック（B）を挿入し、一つ目で生じた遅延とは逆の遅延を付加する。最後に、三つ目のブロック（C）で屈折を補償し、45° の偏光子を用いて、遅延のついた同軸パルス対として投影する。この方法では、二つ目のブロック（B）の挿入量を調整することで、Y 偏光のパルスに対してのみ遅延を付加することができる。この手法は TWINS (Translating-Wedge-based Identical pulses eNcoding System) と呼ばれ、広帯域パルスを用いた場合でも、パルス整形器を用いる方法に比べて高いスループットを実現できる。また、必要とされる光学素子が比較的安価であるという利点も持つ。

3 二次元分光の応用例

ここからは実際にフェムト秒二次元分光を光合成タンパク質に応用した例について解説する。

3.1 2DES による FMO 複合体のエネルギー移動経路に関する研究

光合成初期過程においては、アンテナ複合体と呼ばれるタンパク質複合体が光を吸収し、その励起エネルギーを反応中心と呼ばれる光電変換の行われる場へと輸送す

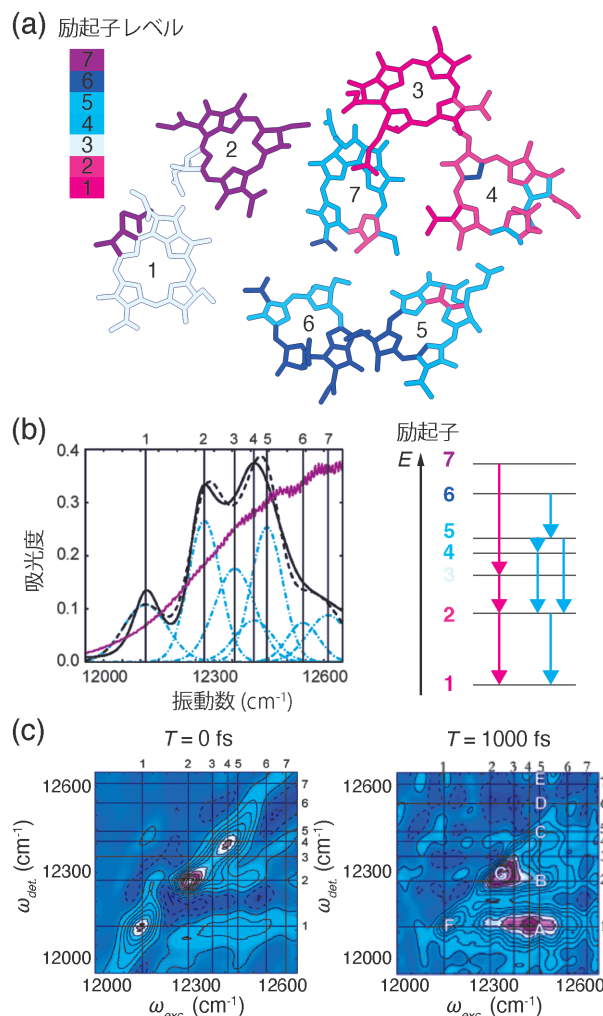


図6 (a) FMO 複合体の分子配置 (PDB ID: 3ENI). (b) FMO 複合体の吸収スペクトル (左) と、明らかになったエネルギー移動経路 (右). (c) FMO 複合体の遅延時間 0 fs および 1000 fs の 2DES 測定結果.

図は文献⁷⁾より一部抜粋.

る。光エネルギーの吸収・伝達を担うのはアンテナ複合体に緻密に埋め込まれた色素分子であり、これら励起エネルギー移動素過程はフェムト秒からピコ秒の超高速な時間スケールで進行する。Fenna–Matthews–Olson (FMO) 複合体（図 6a）は緑色硫黄細菌が持つ光合成タンパク質で、ベースプレートと呼ばれる光合成膜外側に存在する大きな光捕集系と反応中心を橋渡しする役割を持つ。FMO 複合体は七つのバクテリオクロロフィル (BChl) 分子を含んでおり、これら BChl はタンパク質中での環境が少しずつ異なる。こうした分子同士が相互作用すると、複数の分子に励起が非局在化した「励起子状態」を形成するため、FMO 複合体は複雑な吸収スペクトルを示す（図 6b）。さらに、そのエネルギー移動も非常に高速に進行するため、通常の時間分解分光法ではその詳細な分子間相互作用・エネルギー移動ダイナミクスを明らかにすることは困難であった。

この FMO 複合体の分子間相互作用・エネルギー移動経路を明らかにする上で 2DES は有力な実験手法であっ

た⁶⁾⁷⁾。図 6c に FMO 複合体の 2DES の測定結果を示す。励起直後は主にそれぞれの BChl によって構成される励起子状態が励起されたことに対応する信号が対角線上に検出されている。一方で、光励起後 1 ピコ秒 ($T=1000$ fs) においては、対角線の下側に信号が出現してくる様子が観測されている。この結果は高いエネルギーを持つ励起子から、低いエネルギーの励起子へと励起エネルギーが伝達されていることを示している。二次元スペクトルの詳細な理論解析を行うことにより、FMO 複合体におけるエネルギー移動では、単純に段階的にエネルギー準位を下るのではなく、分子によって異なる経路を経ることが明らかとなった (図 6b)。

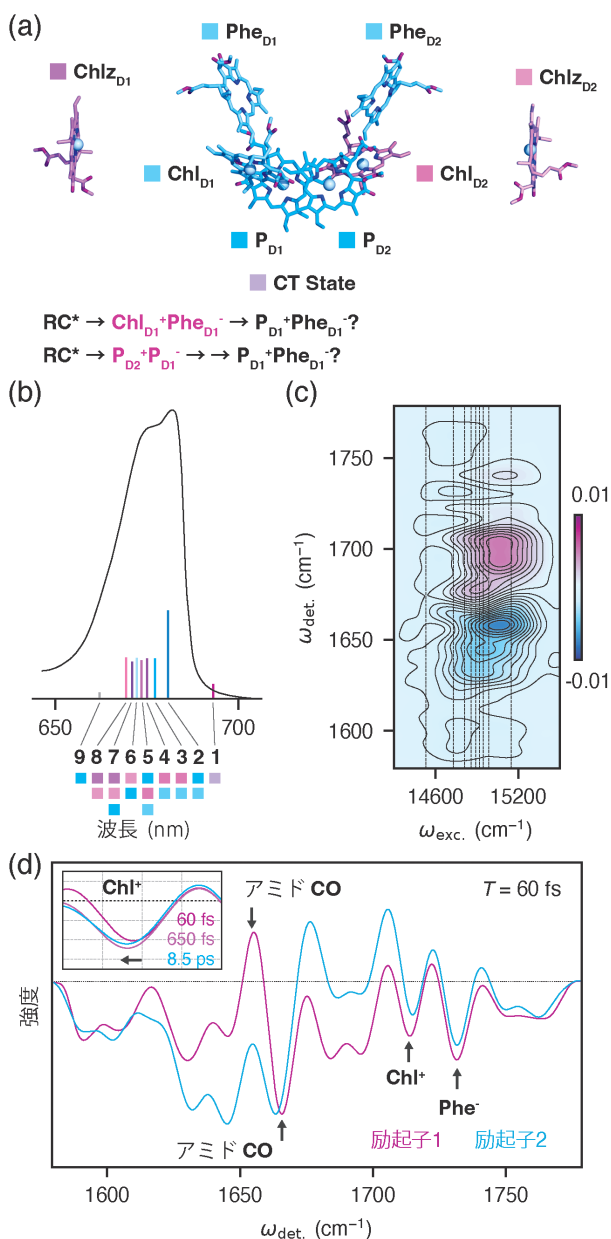


図 7 (a) PSII-RC の分子配置 (PDB ID: 3WU2). (b) PSII-RC の線形吸収スペクトル. (c) 励起直後の 2DEV スペクトル. (d) 励起子 1, 2 のエネルギーに沿った 2DEV データのスライス. 挿入図は励起子 1 の Chl⁺ 信号領域における時間変化を示す.
図は文献⁸⁾より改変.

3・2 2DEV による光化学系 II 反応中心の電荷分離ダイナミクスに関する研究

上述のように 2DES は、ある程度紫外可視吸収スペクトルが明確に区別できる系においては強力な手法となりうる。一方で、吸収スペクトルが密集したような系に対しては、交差ピークの時間発展からダイナミクスを明らかにすることが困難であるといった課題もあった。例えば、植物の持つ光化学系 II は酸素発生を担う地球上で最も重要なタンパク質複合体である。光化学系 II 反応中心 (PSII-RC) は電荷分離 (CT) を行うことができる最小単位のタンパク質であり、擬似的な C_2 対称性を持つ (図 7a)。この対になったタンパク質は D₁, D₂ と呼ばれ、それぞれがスペシャルペア (P_{D1}, P_{D2})、アクセサリクロロフィル (Chl_{D1}, D₂)、フェオフィチン (Phe_{D1}, D₂) と呼ばれる反応中心分子と、周辺クロロフィル (Chl_{D1}, D₂) と呼ばれるアンテナ分子を持つ。D₁, D₂ はほぼ同じ分子配置を持つにもかかわらず、タンパク質環境や分子間の相互作用の違いによって、電子移動は D₁ 側において進行することが知られている。しかし、PSII-RC の吸収スペクトルは 680 nm 付近に一つバンドを示すのみで、これら八つの分子と電荷分離状態によって構成される励起子状態の区別がつかない (図 7b)。こうしたスペクトルの複雑性もあって、PSII-RC における電子移動過程においては、初めの電子受容体が Phe_{D1} であるのか、あるいは P_{D1} であるのかは長い間議論されてきた (図 7a)。

この PSII-RC のスペクトルの複雑性を克服し、電子移動ダイナミクスを明らかにするため、筆者らは 2DEV 測定を応用した⁸⁾。PSII-RC の励起直後の 2DEV スペクトルを図 7c に示す。この赤外観測領域では主にクロロフィルのケト CO モードを観測することができ、励起状態では低波数シフト、カチオンでは高波数シフトすることが知られている。それに加えて、電荷分離に応答した周囲タンパク質のアミド CO モードが低波数側に観測される。2DEV スペクトルは観測軸 (縦軸) に対して非対称であることがわかる。このことは励起周波数に応じて異なる励起子が励起されていることを示す。

励起子モデルでは、八つの分子と一つの電荷分離状態から、図 7b, c に示すエネルギーを持つ九つの励起子状態を導出している。これらの中で励起子 1 は CT 状態によって特徴づけられ、最も低いエネルギーの位置に弱い振動子強度を持っているとされる。そこで、励起直後の 2DEV スペクトルを励起子 1, 2 のエネルギーに沿って断面図を比較した。両者は Chl⁺, Phe⁻ に由来したピークを 1716 cm^{-1} および 1730 cm^{-1} 示すが、励起子 1 は 1657 cm^{-1} 及び 1666 cm^{-1} に反応中心における電荷分離に応答したアミド CO モードに由来する信号をより強く示すことがわかった (図 7d)。このことは、低エネルギー側に存在する励起子 1 が強い CT 性によって特徴づ

けられ、また CT 状態が直接励起可能であることを示している。さらに、励起子 1 のエネルギーに沿った断面図はクロロフィルカチオンのバンドが数ピコ秒の時間スケールで 1713 cm^{-1} にレッドシフトする様子が観測された。このクロロフィルカチオンのレッドシフトはホールが Chl_{D1} から P_{D1} へ移動するダイナミクスに対応すると考えられ、PSII-RC の電子移動初期過程では、 Chl_{D1}^+ Phe_{D1}^- が最初に生成していると結論することができた。

4 多次元分光の展望

レーザー光源の安定性向上や高出力・高繰返し化により、フェムト秒二次元分光は今日では一般的な手法になりつつある。さらに、パルス整形技術の進展に伴い、過渡吸収（透過率）信号の測定にとどまらず、蛍光や光電流のアクションスペクトルを二次元的に取得する手法も開発されている。特に、光電流を検出する二次元分光測定は、系の出力を直接評価することができるという利点があり、近年では光合成系の光電流発生の研究にも応用されている⁹⁾。また、高繰返し光源で超短パルス光を慣習的に得ることも可能となり、近年では三つのサブ 10 フェムト秒パルスを用いることで、励起状態の振動相関を $0\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ の広い範囲で検出できる励起状態二次元ラマン分光測定が、より高品質かつ高分解能で実施可能になっている¹⁰⁾。

最後に、ここまで紹介してきた時間分解分光法は、光励起によって反応を同期させ、そのダイナミクスを分析するものであった。一方で、多くの化学反応、特に液相中の反応では、反応の始状態や終状態を含むさまざまな状態が、常に揺らぎを伴う統計的平衡状態として存在している。こうした熱平衡状態にある分子種間で進行する化学反応ダイナミクスを明らかにすることは、通常のアンサンブル測定では容易ではない。蛍光相関分光法 (FCS) は、単一分子レベルで光子統計の揺らぎの相関を解析することにより、分子の拡散や反応ダイナミクスを明らかにする手法であり、これまでポリマーやタンパク質の折りたたみダイナミクスの研究に用いられてきた。しかし、従来の FCS は蛍光強度や蛍光寿命に関する解析が主流であった。実際の溶液中では電子・振動スペクトルや超高速ダイナミクスも揺らぎによる変調を受けると考えられるが、既存の手法ではこれらの物性や反

応性の揺らぎの相関を明らかにすることは困難であった。この FCS にフーリエ変換分光法を組み合わせることで、筆者らは蛍光相関の励起スペクトル分解に成功している¹¹⁾。今後、測定システムのさらなる改良によって、蛍光励起スペクトルの二次元相関測定が可能になると期待される。

謝辞 本稿で紹介した一部の成果は、カリフォルニア大学パークレー校 Fleming 教授及び研究室の皆さんと Iwai 博士、分子科学研究所倉持准教授との共同研究で得られた成果です。この場を借りてお礼を申し上げます。

文 献

- 1) R. Berera, R. van Grondelle, J. T. M. Kennis : *Photosynth. Res.*, **101**, 105 (2009).
- 2) G. S. Schlau-Cohen, A. Ishizaki, G. R. Fleming : *Chem. Phys.*, **386**, 1 (2011).
- 3) E. A. Arsenaault, P. Bhattacharyya, Y. Yoneda, G. R. Fleming : *J. Chem. Phys.*, **155**, 020901 (2021).
- 4) J. A. Myers, K. L. M. Lewis, P. F. Tekavec, J. P. Ogilvie : *Opt. Express*, **16**, 17420 (2008).
- 5) J. Réhault, M. Maiuri, A. Oriana, G. Cerullo : *Rev. Sci. Instrum.*, **85**, 123107 (2014).
- 6) T. Brixner, J. Stenger, H. M. Vaswani, M. Cho, R. E. Blankenship, G. R. Fleming : *Nature*, **434**, 625 (2005).
- 7) M. Cho, H. M. Vaswani, T. Brixner, J. Stenger, G. R. Fleming : *J. Phys. Chem. B*, **109**, 10542 (2005).
- 8) Y. Yoneda, E. A. Arsenaault, S.-J. Yang, K. Orcutt, M. Iwai, G. R. Fleming : *Nat. Commun.*, **13**, 2275 (2022).
- 9) M. López-Ortiz, L. Bolzonello, M. Bruschi, E. Fresch, E. Collini, C. Hu, R. Croce, N. F. van Hulst, P. Gorostiza : *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **16**, 43451 (2024).
- 10) Y. Yoneda, H. Kuramochi : *J. Phys. Chem. A*, **127**, 5276 (2023).
- 11) Y. Yoneda, H. Kuramochi : *J. Phys. Chem. Lett.*, **15**, 8533 (2024).



米田 勇祐 (YONEDA Yusuke)

分子科学研究所 (〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中 38)。大阪大学大学院基礎工学研究科博士後期課程。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》超高速分光を用いた反応ダイナミクスとメカニズムの解明。《趣味》楽器演奏 (マンドリンチェロ)、自転車 (ヒルクライム)、バイク、アニメ鑑賞。

E-mail : yyoneda@ims.ac.jp