

光合成研究

第20巻 第3号 (通巻59号) 2010年12月

NEWS LETTER Vol. 20 NO. 3 December 2010
THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

トピックス 光合成研究における最新動向 ICP2010 Beijing 参加報告	
山本 治樹 (名大)	143
トピックス 光合成タンパク質-色素複合体の酸化チタン電極上への組織化と光電流応答	
永田 衛男、南後 守 (名工大)	146
研究紹介 産業的に重要なシアノバクテリア <i>Arthrospira platensis</i> NIES-39 (通称スピルリナ) のゲノムの多様な特徴: 基礎から応用まで、個々の遺伝子から比較ゲノムまで	
成川 礼 (東大)、藤澤 貴智 (NITE)、岡本 忍 (ライフサイエンス統合データベースセンター)、得平 茂樹 (中央大)、吉村 英尚 (東大)、鈴木 石根 (筑波大)、増田 建 (東大)、持丸 真里 (駒澤大)、高市 真一 (日本医大)、粟井 光一郎 (静岡大)、関根 光雄 (NITE)、矢代 勲 (NITE)、小俣 せいほ (NITE)、宝田 裕美 (NITE)、片野 葉子 (NITE)、小杉 大樹 (NITE)、谷河 聡 (NITE)、大森 和子 (昭和女子大)、佐藤 直樹 (東大)、池内 昌彦 (東大)、藤田 信之 (NITE)、大森 正之 (中央大)	150
解説 リモートセンシングによる光合成研究のための樹冠形状の3次元化	
遠藤 貴宏 (東大)	161
解説特集「光エネルギーの新しい利用法と光合成研究の温故知新」	167
序文	
小林 正美 (筑波大)	168
解説 化学の視点からみた光合成 —人工光合成研究の現状と将来—	
村田 滋 (東大)	169
解説 光化学系 I — P700を中心に	
檜山 哲夫 (埼玉大 名誉教授)	178
解説 光化学系 II 反応中心同定への途 (回顧)	
佐藤 公行 (岡山大 名誉教授)	193
報告記事 若手の会第三回セミナー開催報告	
成川 礼 (東大)	207
報告記事 光合成学会若手の会第三回セミナーに参加して	
馬場 将人 (筑波大)	208
集会案内 第2回日本光合成学会年会およびシンポジウム開催予告	209
事務局からのお知らせ	209
日本光合成学会会員入会申込書	210
日本光合成学会会則	211
幹事会名簿	213
編集後記	214
記事募集	214
賛助法人会員広告	

光合成研究における最新動向

ICP2010 Beijing 参加報告

名古屋大学 大学院生命農学研究科

山本 治樹

1. はじめに

2010年8月22日から8月27日までの一週間、中国の北京において The 15th International Congress of Photosynthesis (ICP2010) が開催されました。会場である Beijing Friendship Hotel は北京首都国際空港からバスで1時間程度の所にあり、北京の中心街からは北西よりに位置しています。近くに北京大学や中国人民大学などの大学が密集していることから「大学区」とも呼ばれる地域です。当時の現地の気温は日本と大きく変わりませんでしたが、湿度がかなり低く気温の割に暑さを感じませんでした。むしろ朝夕は気温が大きく下がるため少し肌寒かった記憶が残っています。この国際会議では光合成全般に関わる研究を対象としているため非常に多くのトピックの発表があります。それらは主に 1) 光化学系複合体と電子伝達、2) 炭素固定反応、3) 環境応答と代謝制御、4) 人工光合成、5) 作物及びBiofuel生産のトピックに大きく分けられます。この他にも環境問題関連や、Bioinformaticsなどの分野もあります。近年話題となっているエネルギー問題のためか、Biofuel関連のトピックの規模が大きい印象を受けました。このように多岐にわたる光合成研究分野の研究者がそれぞれの発表、討論を行う場としてこの会議は3年に1度行われています。今回は14のプレナリーレクチャーと26の項目に分けられた136の口頭発表および450を超えるポスター発表より構成され、計600以上の発表がありました。参加者は中国人が多数を占めており、その他日本を含めたアジアの国々からも積極的な参加があったように伺えます。全ての研究発表について紹介することはできませんが、本稿では筆者の印象に残ったトピックを中心に簡潔にまとめたいと思います。

2. 光化学系複合体

光化学系の分野においては岡山大学の沈建仁先生による光化学系II (PSII) の結晶構造解析についての発表が高評を得ていました(図1)。シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* 由来の PSII の高解像度の構造解析に成功し、酸素発生中心であるD1蛋白質のMnクラスター周辺も詳細にその空間的な位置関係が明らかとなりました。これまでの構造解析では確認できなかった詳細な分子の配置まで解明され、酸素発生の基質となる水分子の所在についても報告がありました。生憎筆者は別会場の発表を聴いていたため、この発表を見ることができなかったことを残念に思います。この発表が終了した時にスタンディングオベーションが起こったと聞き、この発表のインパクトの大きさが伺われました。また Cheng-I Yao 博士によるPSIIを構成する蛋白質のターンオーバーに関わる蛋白質 SCPs についての報告も興味を引きました。シアノバクテリア *Synechocystis sp.* PCC6803 においてSCPsは光化学系のターンオーバーにおいて遊離のクロロフィルを結合することが報告されています。彼らはPSIを



図1 岡山大学の沈建仁先生の発表

* 連絡先 E-mail: yamamoto.haruki@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

欠損した変異株において¹⁵Nを用いたPSIIのチェイス実験を行い、PSIIの各サブユニットのターンオーバーを観察しました。¹⁵Nを含む条件においてもしばらくの間は¹⁵Nを含まないPSIIが新規合成されることから、完成したPSIIとは別にassemble前のPSIIの構成サブユニットのreservoir poolが存在することを提唱し、そのreservoir poolにおいてSCPsが重要な機能を果たしていることを示唆しました。また緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のPSI複合体のassembleについて岡山大学の高橋裕一郎先生が講演され、多くの方との議論が行われていました。このように光化学系の詳細な構造だけでなく、そのassembleといったダイナミックな機構をどのように明らかにしていくのか今後が楽しみです。

3. 環境応答と代謝制御

筑波大学の鈴木石根先生はヒスチジンキナーゼ (Hik) のシグナルインプットドメインを入れ変えたキメラ Hik を用いた環境応答メカニズム解析について講演されました。光応答では Eva Mari Aro 博士の STN7 と STN8 というキナーゼによる光化学系及び光捕集系サブユニットのリン酸化が光環境順応において重要であるという発表が印象に残っています。Bill Zerges 博士は活性酸素種 (ROS) のターゲットとして mRNA を挙げ、その防御機構として葉緑体内の stress granules (SGs) を解析しました。その結果、SGs が葉緑体内で mRNA を結合し ROS に対する防御において重要な働きを担っていることを示唆しました。同じく葉緑体内の転写制御で目を引いたのは、理研の蓑田歩先生の紅藻 *Cyanidioscyzoon merolae* 葉緑体にコードされる Ycf30 という転写制御因子の報告です。Ycf30 は高等植物の葉緑体には存在せず、紅藻において核とは独立してルビスコのオペロンの転写を活性化しています。これは進化の過程で葉緑体とその制御を核に依存していく、その途中段階を見いだしたと考えられ非常に興味深いと思います。筆者はクロロフィル生合成系に携わる研究をしているので、Bernhard Grimm 博士によるテトラピロール合成系の制御の発表にも興味を持ちました。制御因子として GUN4 とグルタミルtRNA還元酵素 (GluTR) に結合する蛋白質 (GluTRBP) の報告がありました。GluTRBPの遺伝学的解析やその局在性から、本来プロトポルフィリンIXから分岐するヘム合成系とクロロフィル合成系が GluTR の反応からすでに2つに

分離して存在しているという仮説も非常に興味深かったです。

4. 作物及びBiofuel生産

このトピックについては光合成関連遺伝子の制御機構改変による metabolic engineering が大きな盛り上がりを見せていました。Willem Vermaas 博士はシアノバクテリアに代謝改変を施す事により、脂肪酸合成の生物触媒として利用する事を提唱しました。シアノバクテリアにチオエステラーゼを導入することでアシル基転移蛋白質(ACP)から脂肪酸を遊離させ、さらに遊離の脂肪酸をシアノバクテリアにより再利用されないようにアシルACP合成酵素 (*slr1609*) を破壊したような株を用いました。さらに細胞の寿命や細胞壁合成に関わる遺伝子の改変を行い、生産性や脂肪酸抽出効率を上げるとのことでした。また作物の生産性向上については Klaas Jan van Wijk 博士の C4 光合成代謝経路の応用などが目を引きました。このようなトピックは今後ますます盛んになっていくと思いますが、実用化まではまだ時間がかかりそうです。応用技術とともにそれを支える基礎研究も一緒に発展していく必要があると考えます。

5. シアノファージ

このトピックは会議のメイントピックではありませんが、筆者の印象に残ったためここで少し紹介させていただきます。シアノファージにおける報告では Qinglu Zeng 博士による発表に注目しました。海洋性のシアノバクテリアである *Prochlorococcus* に感染するシアノファージが光化学系の遺伝子を保持し感染中に発現していることは以前から知られていました。シアノファージはそれ以外にカルビン回路における酵素反応の阻害剤となる CP12 という蛋白質をコードする遺伝子、そしてペントースリン酸経路の酵素であるグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ (*zwf*)、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (*gnd*) とトランスアルドラーゼ (*talC*) をそれぞれコードする遺伝子も保持していることが報告されています。彼らはこの事からシアノファージ感染後の宿主細胞の代謝経路の改変モデルを提唱しました。CP12によるカルビン回路の阻害によって炭素固定によるATPおよびNADPHの消費が抑制され、さらにシアノファージが持つペントースリン酸経路の酵素の発現によりこの経路が活性化し、

NADPHおよびリボースの生成活性が上昇します。この結果宿主細胞内はATPやNADPH、そしてリボースが蓄積した状態になり、それはまさにシアノファージにとって自身が増殖するためのエネルギー源および核酸を複製するための資源を潤沢に確保できる環境であるという仮説です。この他にもDebbie Lindell博士の報告ではシアノファージのゲノムにコードされるPSIIのコア蛋白質(D1蛋白質)が実際に機能を持ち、シアノバクテリアのPSII複合体に取り込まれているかどうかについて議論を行っていました。最近のメタゲノム解析により海洋性のシアノファージのゲノムにはPSII以外にPSIの遺伝子も発見されており、*psaJ*と*psaF*が融合したような新奇の遺伝子も報告されました。またLimor-Waisberg Keren博士はブロードホストのシアノファージがホストにおけるcodon usageの違いを克服するため、自身のcodonに対応するtRNAを持ち込むことも報告しています。これらの報告はシアノファージがシアノバクテリアに感染、増殖する過程でシアノバクテリア由来の遺伝子を取り込んでさらに感染増殖効率を上げるように進化していることを示しており、実に興味深いと考えます。

6. おわりに

大きなトピックごとに筆者が興味を持った発表についてまとめましたが、浅学のため炭素固定関連、人工光合成関連などは紹介できませんでした。それらを含め詳細はこの会議のProceedingsを参照して頂ければと思います。筆者は葉緑体にコードされるニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の機能解析というテーマで発表を行いました。テトラピロール代謝制御を専門とするB. Grimm博士と議論ができたので



図2 City tourで訪れた万里の長城

とても有意義な機会となりました。

プログラムのCity tourでは万里の長城(図2)や北京の中心に位置する故宮などを観光する事ができました。Partyでは授賞式があり、沈先生を始めたくさんの方の先生方が受賞をされていました。会議の後には連夜、街に夕飯を食べに行き北京ダックや鍋料理などを頂きました。まったく英語が通じないことには驚きましたが、物価の違いにより低料金で食事ができ満足しました。次回の国際光合成会議は2013年にUSのSt. Louisで行われる予定です。光合成研究のさらなる発展を期待しつつ、次回も参加発表ができるよう自身の研究に励みたいと思います。

謝辞

掲載した写真の一部は東京大学の渡辺麻衣さんに提供して頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

Received November 14, 2010, Accepted November 19, 2010, Published December 31, 2010

Participating Report on ICP2010 Beijing

Haruki Yamamoto*

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

光合成タンパク質-色素複合体の 酸化チタン電極上への組織化と光電流応答[§]

名古屋工業大学大学院 工学研究科

永田 衛男^{*1}、天野 瑞貴、南後 守²

1. はじめに

植物、光合成細菌などの光合成膜ではアンテナ (LH) 系、光化学反応中心 (RC) およびそれに続く電子伝達系が、光収穫、光電変換を経て、化学エネルギーへの効率の良い変換に重要な役割を担っている。このエネルギー変換はクロロフィルなどの色素と膜タンパク質の複合体からなるナノサイズの膜タンパク質-色素複合体で行われている。近年、これらの膜タンパク質-色素複合体の構造と機能の相関関係が、X線構造解析の進展などにより明らかになりつつある¹⁻³⁾。しかしながら、その構造と機能の関係はまだ十分に明らかではなく、学術的ならびに工学的にもその機能を人工的に構築することが求められている。なかでも、光合成膜で行われている光電変換システムは、安価で実用化が期待されている色素増感型太陽電池に展開可能であり、高効率かつクリーンな光電変換デバイスの実現も期待される。これらのナノサイズのタンパク質-色素複合体の光電変換能の評価や、エネルギー変換デバイスとしての利用を検討する上で、様々な電極上への組織化、集積化方法が盛んに研究されている^{4,7)}。

ここでは、光合成細菌由来の膜タンパク質-色素複合体であるアンテナ系コアタンパク質複合体 (LH1-RC) および植物由来の光化学系I (PSI) を光電変換材料として展開するために、LH1-RCの光電流応答^{4,7)}およびPSIを用いた色素増感太陽電池への展開について検討した結果について紹介する。

2. 光合成細菌由来のLH1-RCの電極上への組織化と光電流応答

紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* の LH1-RCのX線構造解析⁸⁾ならびに原子間力顕微鏡 (AFM) 観察⁹⁾が明らかとなり、それらに基づく情報から固体基板でもその安定性を確認できるようになってきた。最近、我々は LH1-RC を RC 同様に光電変換素子材料として用いる検討を世界に先駆けて行っている^{4,7)}。

これまでRCのみの光誘起電流測定は報告されているが、LH1-RCに関する報告例はない。そこで、我々は、光合成細菌の *Rhodospirillum rubrum* および *Rps. palustris* の LH1-RC を基板上に自己組織化してその光誘起電流を計測した^{4,7)}。LH1-RCは、アンテナ部分 (LH) をもつ RC であり、RC よりも分子断面積が大きいので多くの光を集めることが期待できる。基板とし

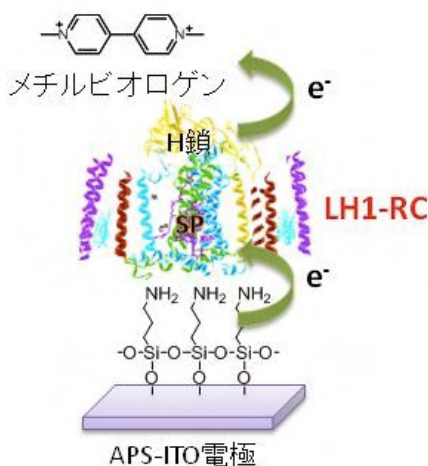


図1 APSで化学修飾したITO基板上でのLH1-RC複合体の組織化

§ 第1回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: nagata@dsc.rcast.u-tokyo.ac.jp

¹ 現所属: 東京大学 先端科学技術研究センター

² 現所属: 大阪市立大学 大学院理学研究科

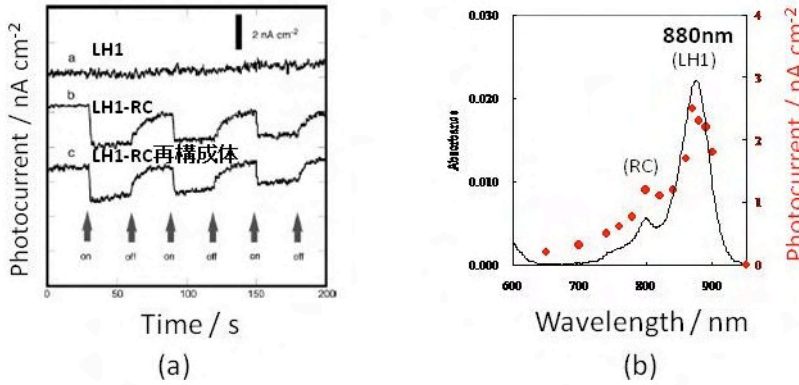


図2 (a) LH1-RCの光電流応答および、(b) その波長依存性と吸収スペクトル

て透明電極 (Indium Tin Oxide: ITO) をシランカップリング剤 ((3-aminopropyl) triethoxysilane: APS) で表面修飾したものを用いた (図1)。APSはアミノ基をもつので表面はカチオン性に帯電する。また、ITOを使うことで吸収スペクトルを用いてタンパク質-色素複合体の安定性の評価が可能である。その結果、興味深いことに、LH1-RCは再現性よくAPS-ITOに吸着し、RCのみやLH1のみと比較して安定性に優れていた。

Hunter らの LH1-RC のAFM の結果を参照すると⁹⁾、基板に静電吸着した LH1-RC の向きは RC の H 鎖が基板上面に向いており基板への吸着サイトは RC のスペシャルペア (SP) 側であることが示唆された (図1)。ここで、光電変換素子の設計にあたって重要なことは、RCのSPに電子を供給しH鎖側に電子が移動するセルを構築することである。そこで、電流応答メカニズムを考慮して、電子受容体としてメチルビオロゲンを添加し、電極に -0.2 V 電圧を加え、光誘起電流測定を行った。その結果、図1に示すように、LH1-RC および LH1-RC 再構成体の RC を含んだ複合体では光に反応して数 nA のカソード電流が流れたのに対し、LH1単独では電流の反応は認められなかった (図2a)。その光誘起電流は照射波長に依存し、LH1の吸収に対応する電流反応が大きくなっており、880 nmで最大の光誘起電流が生じた (図2b)^{4,7)}。つまり、LH1で吸収されたエネルギーはRCで光電変換されていると示唆された。図3に示すように、RC中の色素の酸化還元電位を考慮すると、RCのキノンから溶液中のメチルビオロゲンへは電子移動が生じにくい。そのため、励起されたスペシャルペア(SP*)から出た電子は、バクテリオクロロフィル a またはバクテリオフェオフィチンからRCのタンパク質のトリプトファン分子などのアミノ酸残基を通じてメチルビオロゲンに流れると

考えられた。そして、APS-ITO基板からRCのSPに電子が供給され、再び光電荷分離が起きていることが示唆された。これらの結果、LH1-RCを用いると基板上での薄膜の形成と同時に近赤外域 (700 nm - 900 nm) で安定な光誘起電流が得られることがわかった。

3. 高等植物由来のPSI複合体

の電極上への組織化と光電流応答

同様に、高等植物由来の光化学系 I (PSI) もその機能を保持したままAPS-ITO上に組織化可能である (図4a)。PSIはハウレンソウから単離・精製したものを用いた^{10,11)}。図4bに示したように電極上でのPSIの吸収スペクトルは、溶液中の吸収スペクトルと一致しており、電極上でもPSIは安定に存在していた。メチルビオロゲン共存下での光電流反応の波長依存性も吸収スペクトルと一致し 670 nm で最大の光誘起電流 (64 nA/cm²) を示した。ここでの光電変換機構はLH1-RCに似た機構であると考えられる。これらのことから、PSIはその光電変換能を保持したまま電極上に組織化され、その機能によって電極上で照射により電流反応を示すことがわかった。

4. PSIを用いた色素増感型太陽電池への応用

これまで、PSI を金などの電極基板上で組織化した例は報告¹²⁻¹⁵⁾ されているが、酸化チタン電極上に固定化した例はほとんど見当たらない。その理由として、PSIは直径 20 nm 程度で、ルテニウム色素分子などに

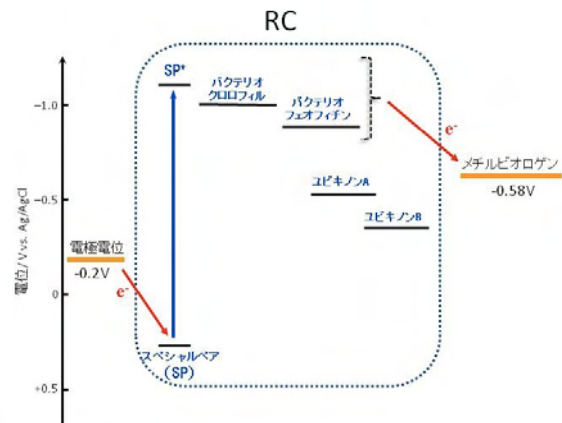


図3 RCの各色素のエネルギー順位

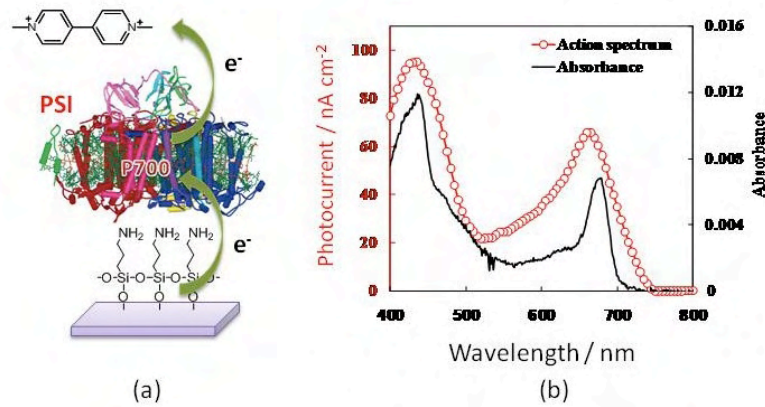


図4 (a) APS-ITO基板上的でのPSIの組織化および、(b) 光電流の波長依存性と吸収スペクトル

比べ圧倒的に大きく、色素太陽電池で利用されている一般的な酸化チタン微粒子 (10 nm程度) では複合体が細孔に入ることができず、吸着できないためと考えられる。そこで、我々は、比較的大きめの酸化チタン微粒子を使用した。酸化チタン電極の調製は Grätzel らの方法を参考にして行った¹⁶⁾。その後、PSI を含む溶液に浸漬させることにより電極を作成した。PSI に含まれるカルボキシル基が、酸化チタンと反応することによって容易に吸着できた。その結果、溶液中と比較すると酸化チタン電極上での PSI の吸収極大波長はおよそ 5 nm 短波長シフトしたが PSI の構造を保ったまま酸化チタン電極上へ固定化できていると考えられた。つぎに、それをスペーサー (25 μm) を介して白金対極とサンドイッチ型セルにして太陽電池を作成した(図5a)。また、電解液として色素増感型太陽電池で一般的なアセトニトリルを用いるとPSIが有機溶媒によって構造が壊れてしまうため、イオン液体ベースの電解質溶液にヨウ素系の酸化還元対を使用した(図5b)。PSIの吸収スペクトルと光電流の波長依存性を比較するとその形状が一致していることから、PSIは酸化チタン電極上で光電変換機能をもっていることがわかった。興味深いことに、酸化チタン電極を用いることでPSIの光電変換能は、光電流値の単純比較からAPS-ITO 電極の 40 倍以上向上し、670 nm (3.2 mW/cm²) の励起光で 2.9 μA/cm² の光電流値が得られた(図5c)。この結果より、電極基板として、酸化チタンナノ粒子を用いることで、広大な比表面

積を持つこれらの粒子上に多くのタンパク質色素複合体を固定化することができ、光電変換能の大幅な向上が達成されたといえる。

5. まとめ

今回の研究では、光合成細菌由来の LH1-RC および高等植物由来の PSI を、APS-ITO電極に組織化した。可視吸収スペクトルにより電極上へのタンパク質-色素複合体の組織化を確認した。また、溶液中で示す吸収帯に沿った光電流応答が認め

られ、LH1-RC および PSI は確かにその光電変換能を保持したまま電極上に組織化され、その機能によって電極上で光照射による電流応答を示すことがわかった。

また、同様に、酸化チタン電極へのPSIの組織化も行い、色素増感型太陽電池を作成した。その結果、APS-ITO透明電極の場合と同様に、PSIの吸収スペクトルと光電流の波長依存性の形状が一致していることから、PSIは酸化チタン電極上でもその機能を維持し、光電変換能を示すことがわかった。

これらの結果は、光電変換能を有する様々な複合体の透明電極上での機能評価の可能性を示唆した。また、酸化チタン電極への組織化および光電流測定

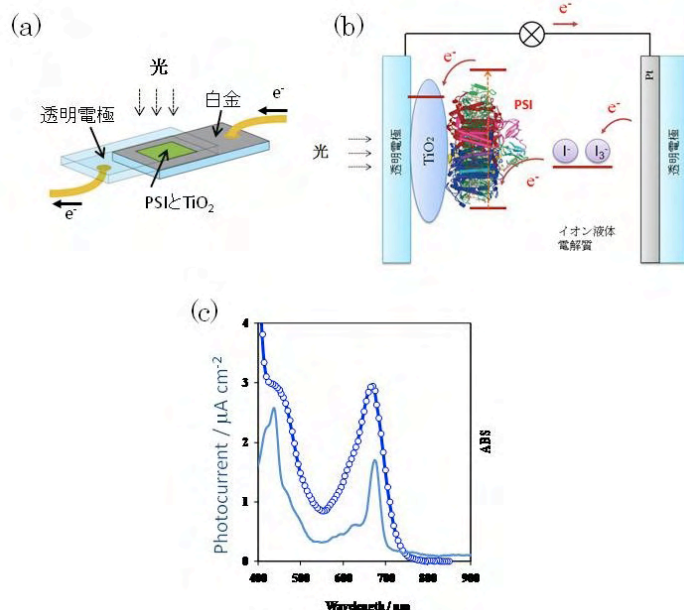


図5 (a) PSIを用いた色素増感型太陽電池、(b) そのメカニズム、および (c) 波長依存性と吸収スペクトル

功は、取り出せる電流値の上昇ももたらし、これらの複合体の色素増感型太陽電池への応用やナノスケールの光電変換デバイスの研究への新たな足がかりになると考えられる。

Received November 15, 2010, Accepted November 25, 2010, Published December 31, 2010

引用文献

1. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution, *Nature* 318, 618-624.
2. Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc*₁ complex from bovine heart mitochondria, *Science* 277, 60-66.
3. Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L. W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S. H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc*₁, *Nature* 392, 677-684.
4. Ogawa, M., Shinohara, K., Nakamura, Y., Suemori, Y., Nagata, M., Iida, K., Gardiner, A. T., Cogdell, R. J., and Nango, M. (2004) Self-assembled Monolayer of Light-harvesting 1 and Reaction Center (LH1-RC) Complexes Isolated from *Rhodospirillum rubrum* on an Amino-Terminated ITO Electrode, *Chem. Lett.* 33, 772-773.
5. Suemori, Y., Nagata, M., Nakamura, Y., Nakagawa, K., Okuda, A., Inagaki, J., Shinohara, K., Ogawa, M., Iida, K., Dewa, T., Yamashita, K., Gardiner, A., Cogdell, R.J., and Nango, M. (2006) Self-assembled monolayer of light-harvesting core complexes of photosynthetic bacteria on an amino-terminated ITO electrode, *Photosynthesis Research* 90, 17-21.
6. Kondo, M., Nakamura, Y., Fujii, K., Nagata, M., Suemori, Y., Dewa, T., Iida, K., Gardiner, A. T., Cogdell, R. J., and M. Nango (2007) Self-Assembled Monolayer of Light-Harvesting Core Complexes from Photosynthetic Bacteria on a Gold Electrode Modified with Alkanethiols, *Biomacromolecules* 8, 2457-2463.
7. Suemori, Y., Fujii, K., Ogawa, M., Nakamura, Y., Shinohara, K., Nakagawa, K., Nagata, M., Iida, K., Dewa, T., Yamashita, K., and Nango, M. (2007) Molecular assembly of artificial photosynthetic antenna core complex on an amino-terminated ITO electrode, *Colloids and Surfaces B* 56, 182-187.
8. Roszak, A. W., Howard, T. D., Southall, J., Gardiner, A. T., Law, C. J., Isaacs, N. W., and Cogdell, R. J. (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustri*, *Science* 302, 1969-1972.
9. Bahatyrova, S., Frese, R. N., Siebert, C. A., Olsen, J. D., van der Werf, K. O., van Grondelle, R., Niederman, R. A., Bullough, P. A., Otto, C., and Hunter, C. N. (2004) The native architecture of a photosynthetic membrane, *Nature* 430 1058-1062.
10. Burke, J. J., Ditto, C. L., and Arntzen, C. J. (1978) Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 252-263.
11. Krupa, Z., Huner, N. P. A., Williams, J. P., Maissen, E., and James, D. R. (1987) Development at cold hardening temperature. The structure and composition of purified rye light harvesting complex II, *Plant Physiol.* 84, 19-24.
12. Terasaki, N., Yamamoto, N., Tamada, K., Hattori, M., Hiraga, T., Tohri, A., Sato, I., Iwai, M., Iwai, M., Taguchi, S., Enami, I., Inoue, Y., Yamanoi, Y., Yonezawa, T., Mizuno, K., Murata, M., Nishihara, H., Yoneyama, S., Minakata, M., Ohmori, T., Sakai, M., and Fujii, M. (2007) Bio-photosensor: Cyanobacterial photosystem I coupled with transistor via molecular wire, *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 653-659.
13. Carmeli, I., Frolov, L., Carmeli, C., and Richter, S. (2007) Photovoltaic Activity of Photosystem I-Based Self-Assembled Monolayer, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 12352-12353
14. Frolov, L., Rosenwaks, Y., Richter, S., Carmeli, C., and Carmeli, I. (2008) Photoelectric Junctions Between GaAs and Photosynthetic Reaction Center Protein, *J. Phys. Chem. C* 112, 13426-13430.
15. Faulkner, C. J., Lee, S., Ciesielski, P. N., Cliffler, D. E., and Jennings, G. K. (2008) Rapid Assembly of Photosystem I Monolayers on Gold Electrodes, *Langmuir* 24, 8409-8412.
16. Ito, S., Murakami, T. N., Comte, P., Liska, P. Grätzel, C., Nazeruddin M. K., and Grätzel, M. (2008) Fabrication of thin film dye sensitized solar cells with solar to electric power conversion efficiency over 10%, *Thin Solid Films* 516, 4613-4619.

Photo-Current Responses of Photosynthetic Proteins/Pigments Complexes Assembled on TiO₂ Electrodes

Morio Nagata*, Mizuki Amano, Mamoru Nango
Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

研究紹介

産業的に重要なシアノバクテリア *Arthrospira platensis* NIES-39

(通称スピルリナ) のゲノムの多様な特徴：

基礎から応用まで、個々の遺伝子から比較ゲノムまで[§]

¹東京大学 大学院 総合文化研究科

²製品評価技術基盤機構

³ライフサイエンス統合データベースセンター

⁴中央大学 理工学部 生命科学科

⁵筑波大学 生命環境系

⁶駒澤大学 文学部 自然学科

⁷日本医科大学 生物学科

⁸静岡大学 若手グローバル研究リーダー育成拠点 (GRL)

⁹昭和女子大学 大学院 生活機構学専攻

成川 礼^{1*}、藤澤 貴智²、岡本 忍³、得平 茂樹⁴、吉村 英尚¹、鈴木 石根⁵、増田 建¹、持丸 真里⁶、高市 真一⁷、粟井 光一郎⁸、関根 光雄²、矢代 勲²、小保 せいは²、宝田 裕美²、片野 葉子²、小杉 大樹²、谷河 聡²、大森 和子⁹、佐藤 直樹¹、池内 昌彦¹、藤田 信之²、大森 正之⁴

1. はじめに

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物で、分類学上非常に大きなグループを形成している。形態学的に単細胞性/糸状性、分子状窒素の利用能力という観点から窒素固定/非窒素固定など様々に分類される。糸状性シアノバクテリアはさらに、窒素固定をするためのヘテロシストを分化する種としない種とに分けられる。窒素固定能力を持たない糸状性シアノバクテリア *Arthrospira* (通称スピルリナ) は、アフリカの塩湖であるチャド湖から単離され、糸状体が螺旋を巻いた構造をしている (図 1 A)。スピルリナは古くから食され、現在でも健康食品や色素の材料として産業的に生産されている。スピルリナは塩湖から単離されたため、好塩性・好アルカリ性形質を有し¹⁾、高塩・高アルカリ培地で培養することで、滅菌操作などをせずに開放環境でほぼ無菌的に大量培養することが可能である²⁾。また、螺旋形状の糸状体が大量の多糖を細胞外に放出することで、細胞同士が接着し、遠心操作をせずとも細胞の回収が可能である。これらの形質がスピルリナの産業利用を可能にしている

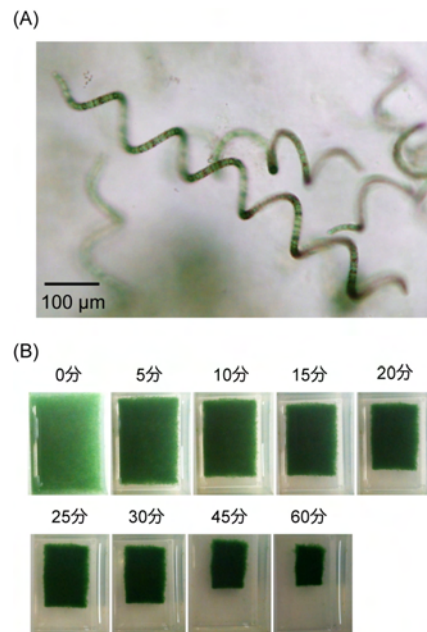


図1 *A. platensis* NIES-39の顕微鏡写真 (A) とcAMP依存的な細胞凝集 (B)

B: 四角い容器 (2.8×2.0×2.0 cm、縦×横×深さ) に入れた高濃度の *A. platensis* に対して cAMP を終濃度 5 μM 添加した後の経時変化。容器の形状依存的に *A. platensis* が凝集していることがわかる。

[§] 第1回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: narikawa@bio.c.u-tokyo.ac.jp

と考えられる。

一方、化石燃料の大量消費による大気CO₂濃度の上昇を軽減するため、再生可能エネルギーの導入が進められ、微細藻類やシアノバクテリアを用いたバイオ燃料やバイオマス生産が脚光を浴びている。有用形質を備えたスピルリナをバイオ燃料生産にも適用していくことが求められる。しかしながら、形質転換の報告例はあるものの、安定で汎用性のある形質転換系の確立には至っておらず、有用物質の生合成系の導入などには現状では適さない³⁾。遺伝的改変を加える代わりに、培養条件を変えることで代謝産物の動態を変化させる試みが報告されているが、そのさらなる改善は困難である⁴⁾。このような現状を打破するためにはゲノム情報は非常に有用である。スピルリナのゲノムを解析することで、新規有用物質の探索が可能となり、スピルリナを用いた光合成によるバイオ燃料・バイオマス生産の基盤情報となることが期待される。

スピルリナは応用的側面からの研究が盛んであり、抗ウイルス作用をもつ細胞外多糖スピランの研究や抗酸化作用を示すフィコシアニンの生産と精製に関する研究などがその代表例として挙げられる^{5,6)}。一方、生理的側面ではサイクリックアデノシン3',5'-リン酸(cAMP)に関する研究が挙げられる。スピルリナは細胞内にcAMPを蓄積するだけでなく、細胞外にもcAMPを放出することが知られている⁷⁾。また、高濃度のcAMPを培地に加えることで、細胞が急速に凝集する現象が報告されている(図1B)⁸⁾。培地に加えたcAMPを細胞が感知してこの反応を引き起こしていると仮定すると、これらの結果は、cAMPがスピルリナにおいて細胞間での情報伝達に関与していることを示唆し、学術的に興味深い現象といえる。

また、これまでに40近くのシアノバクテリアのゲノム解析が行われているが、窒素固定能力をもたない糸状性シアノバクテリアのゲノム解析は全く行われていなかったため、スピルリナのゲノムは糸状体形成のための遺伝子群を探索する点でも有用であることが期待される。このように応用・基礎など様々な側面で有用なスピルリナ *Arthrospira platensis* NIES-39 (*A. platensis*) のゲノムを解読したので⁹⁾、本稿ではその特徴的な性

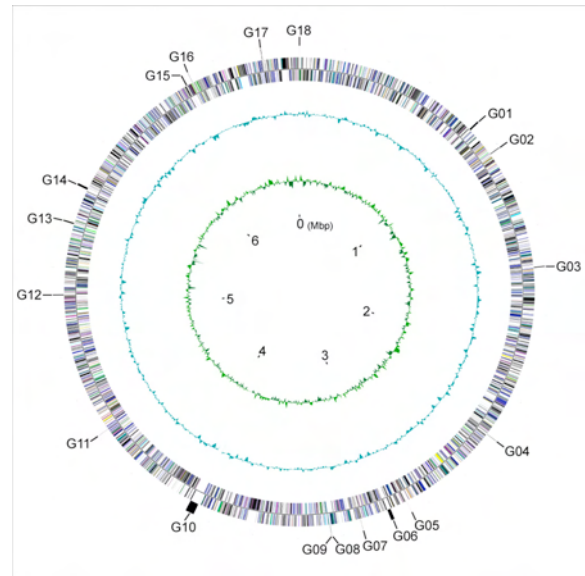


図2 *A. platensis* の環状ゲノムの模式図

最外縁のG01～G18と黒いバー：スーパーコンティグ間のギャップの位置と長さ。外側の環構造：順鎖、逆鎖上の推定タンパク質コード領域。色分けはCOGの機能分類に従った。真中の環構造：G+C含量、内側の環構造：GCスキュー。最内縁の0～6の数字と黒いバー：12時の位置を0 Mbpとしたときの、1 Mbp 毎のゲノムの位置。

質をトピック毎に紹介する。

2. *A. platensis* のゲノム構造

A. platensis のゲノム配列は、製品評価技術基盤機構(NITE)のチームを中心に、ホールゲノムショットガン法により解読された。約1.5、5、40 kbpのインサートを持つ3種のライブラリーを構築し、各断片の両端の塩基配列を決定することで、約11倍ゲノムカバレッジに相当する計92,878のランダム配列を得、最終的に18個のスーパーコンティグにアセンブルした。これらのスーパーコンティグの方向と順序をオープンカルマッピング法¹⁾により決定した(図2)。残された18個のギャップ配列を埋めるためにプライマーウォーキングやトランスポゾンを経た配列決定によるギャップクローリングも試みたが、現状これ以上の改善はできていない。配列が未決定のギャップの全長は約95 kbと見積もられた。これらのギャップの両端の多くは、リピート配列のクラスターかファージ様配列で途切れており、その先もリピート配列が続き、コー

¹⁾ ガラス上に伸長して固定したDNAを制限酵素で切断後、蛍光顕微鏡下でそれぞれの断片の長さを測定し制限酵素地図を作成する。これをゲノム塩基配列からコンピューターによって作製された制限酵素地図と比較することで、スーパーコンティグの方向と順序の決定、ギャップ長の大まかな見積もりが可能となる。

ディング領域をあまり含まないことが期待された。18本のスーパーコンティグの全長は6,692,865 bp (GC含量は44.3%)であり、ギャップ配列を加えると*A. platensis*のゲノムは約6.8 Mbからなる一本の環状DNAであると推定された(図2)。なお、プラスミドは存在しなかった。他の多くのシアノバクテリア同様、GCスキューによってはDNA複製開始点の予測はできなかった。解読したゲノム配列中には、6630個のタンパク質をコードする遺伝子が予測された。2セットのrRNA遺伝子と20のtRNA種に相当する40のtRNA遺伝子を含む49のRNA遺伝子が予測された。6630個のタンパク質をコードする遺伝子のうち、5157個(78%)はデータベース上の何らかの遺伝子と相同であるのに対し、1473個(22%)は全く相同性のない遺伝子であった。マニュアルキュレーションにより、2539個(38%)の遺伝子は生物学的役割にアサインすることができた。なお、*A. platensis*では、各遺伝子を”NIES39_”を先頭に18個のスーパーコンティグを示すアルファベット(A~R)と5桁の番号で表す(例NIES39_A07840)。

3. 比較ゲノム解析による糸状体特異的遺伝子の探索

*A. platensis*は前述したように、窒素固定をしない糸状性シアノバクテリアとしてゲノム解析された初めての種であるため、比較ゲノム解析から糸状体形成や窒素固定に特異的な遺伝子を抽出するためのレファレンスとして利用出来るゲノムとして位置づけることができる。そこで、ゲノム解析が完了している39種のシアノバクテリア(*A. platensis*を含む)を以下の6つのグループに分類した; I: 単細胞性非窒素固定シアノバクテリア、II: 単細胞性窒素固定シアノバクテリア、III: 単細胞(温度条件によって糸状化)非窒素固定シアノバクテリア(*Synechococcus* sp. PCC 7002)、IV: 糸状性非窒素固定シアノバクテリア(*A. platensis*)、V: 糸状性窒素固定ヘテロシスト非形成シアノバクテリア、VI: 糸状性窒素固定ヘテロシスト形成シアノバクテリア。*Synechococcus* sp. PCC 7002は温度条件により、単細胞

が糸状化することが知られており(D. Bryant、私信)、単細胞性と糸状性の中間種として位置づけた。このように分類し、比較ゲノムツールであるCyanoClustを用いて¹⁰⁾、それぞれの分類特異的な遺伝子群を抽出した(表1)。全てのシアノバクテリアに共通の遺伝子クラスターを694個検出した。これらはハウスキーピング遺伝子、光合成関連遺伝子、シアノバクテリア固有の生理現象に関わる遺伝子であると示唆される。*A. platensis*にのみ特異的な遺伝子クラスターを1066個検出したが、これらは*A. platensis*に固有の形質に関与しているかもしれない。ヘテロシスト形成シアノバクテリアに特異的な遺伝子クラスターを223個、窒素固定シアノバクテリアに特異的な遺伝子クラスターを8個それぞれ抽出した。前者には*patN*や*hetP*、後者には*nif*遺伝子群がそれぞれ含まれていた¹¹⁾。

29個の遺伝子クラスター(これらのクラスターに含まれる*A. platensis*の遺伝子数は31個)が糸状性シアノバクテリア特異的に抽出された(表2)。それらの中には、既に*Anabaena* sp. PCC 7120において糸状体形成に関わると報告されている*fraC*や*fraG*が含まれていた^{12,13)}。単細胞と糸状体の中間的な種であると考えられる*Synechococcus* sp. PCC 7002と糸状性シアノバクテリアに保存されているクラスターが7個(*A. platensis*の遺伝子数も7個)存在し、これらも糸状体形成に関わる可能性が高い(表2)。これらの遺伝子群の中には、ヘテロシスト形成に関わる遺伝子群(*hetF*、*hetR*、*patU*)も含まれていた¹¹⁾。*A. platensis*がヘテロシストを形成しないにも関わらず、これらの遺伝子群が*A. platensis*にも存在するという事は、糸状体形成からヘテロシスト形成に至る分化過程が連続的に制御され、*A. platensis*の糸状体形成が単なる細胞分裂の異常による結果ではなく、細胞分化のための

表1 CyanoClustを用いた比較ゲノム解析のまとめ

	生理学的プロファイリング				
	全てに共通	<i>A. platensis</i> 特異的	ヘテロシスト特異的	窒素固定特異的	糸状体特異的
グループI(単細胞・非窒素固定)	0	X	X	X	X
グループII(単細胞・窒素固定)	0	X	X	0	X
グループIII(単細胞/糸状体・非窒素固定)	0	X	X	X	X/O
グループIV(糸状体・非窒素固定)	0	0	X	X	0
グループV(糸状体・窒素固定・ヘテロシスト非形成)	0	X	X	0	0
グループVI(糸状体・窒素固定・ヘテロシスト形成)	0	X	0	0	0
クラスター数	694	1066	223	8	29/7
<i>A. platensis</i> の遺伝子数	938	2056	0	0	31/7

表2 糸状性シアノバクテリア特異的な遺伝子クラスター

グループIV, V, VI特異的クラスター		
クラスター数	遺伝子ID	アノテーション
4981	NIES39_A00790	hypothetical protein
5158	NIES39_A00800	filament integrity protein (<i>fraC</i>)
4909	NIES39_A01310	NUDIX hydrolase
3571	NIES39_A03140	hypothetical protein
4548	NIES39_A04850	hypothetical protein
3571	NIES39_C00130	hypothetical protein
4852	NIES39_C00870	hypothetical protein
2616	NIES39_D00070	hypothetical protein
4736	NIES39_D00920	hypothetical protein
4710	NIES39_E01660	nuclease (SNase-like)
4588	NIES39_E02590	serine/threonine protein kinase
4667	NIES39_F00600	probable glycosyl transferase
4881	NIES39_K02770	hypothetical protein
4277	NIES39_K02780	hypothetical protein
4548	NIES39_L02410	hypothetical protein
4747	NIES39_L03440	hypothetical protein
2616	NIES39_L06030	hypothetical protein
5149	NIES39_L06180	hypothetical protein
5020	NIES39_M00320	hypothetical protein
4731	NIES39_M02510	DUF6 transmembrane protein (<i>sepJ, fraG</i>)
5143	NIES39_N00400	hypothetical protein (<i>patU</i>)
2616	NIES39_N00410	hypothetical protein
5032	NIES39_N00980	hypothetical protein
4826	NIES39_O03720	hypothetical protein
5058	NIES39_O03830	hypothetical protein
5102	NIES39_O03850	hypothetical protein
4991	NIES39_O04240	hypothetical protein
4590	NIES39_O06790	Alpha/beta hydrolase fold
4996	NIES39_Q00570	hypothetical protein
5045	NIES39_Q00580	hypothetical protein
4607	NIES39_R00660	hypothetical protein
グループIII, IV, V, VI特異的クラスター		
クラスター数	遺伝子ID	アノテーション
4298	NIES39_C02810	hypothetical protein
4333	NIES39_C03480	heterocyst differentiation protein (<i>hetR</i>)
4276	NIES39_D04070	hypothetical protein
4505	NIES39_J00800	hypothetical protein
3819	NIES39_J02400	heterocyst differentiation protein (<i>hetF</i>)
4311	NIES39_O06320	hypothetical protein
4255	NIES39_Q02800	hypothetical protein

*ピンクでハイライトした遺伝子群はシンテニーとして保存されている

重要なステップであることを示唆している。これらの遺伝子クラスターのいくつかはゲノム上で遺伝子の並び (シンテニー) としても保存されており、糸状体形成において協調的に働いている可能性が示唆された。多くの遺伝子は機能未知遺伝子であり、これらの遺伝子群の機能解析により糸状体形成の分子機構の解明が期待される。

4. 転移因子

原核生物では、トランスポザゼをコードする挿入配列 (IS) などの転移因子以外に、イントロンやファージ様配列など様々な転移因子が知られ、ゲノム構造の可塑性に大きく寄与している。*A. platensis* では

特にイントロンとファージ様配列についてユニークな特徴が見出された。グループIIイントロンは逆転写酵素をコードする領域があり、転移能を持つイントロンである。約150個のグループIIイントロンが *A. platensis* ゲノム中に見出され、うち71個は逆転写酵素をコードしていた。さらに88配列がグループIIイントロンの活性領域を保持していた。この数は他のシアノバクテリアに比べて圧倒的に多く (*Thermosynechococcus* には27個のグループIIイントロン、*Trichodesmium* には28個のグループIIイントロン活性領域)、グループIIイントロンが *A. platensis* ゲノム中で高度に転移・増殖した結果であると示唆される。

グループIイントロンは自身のイントロンを切り出し、エクソンを連結することで成熟RNAを作るリボザイムとして知られている。*A. platensis* のゲノム中に、生育に必須の酵素であるクラスIリボヌクレオチドリダクターゼ (RNR) をコードする遺伝子のコード領域に二つのグループIイントロンの挿入が検出された (図3A)。各々のイントロン中で挿入直後に終止コドンが存在するため、これらのイントロンは翻訳制御因子として働いている可能性が示唆される。グループIイントロンがタンパク質のコード領域内に検出されることは非常に稀で、シアノバクテリア *Nostoc punctiforme* ATCC 29413 のクラスII RNR に挿入されている例が報告されているのみである¹⁴⁾。RNRはそれぞれ全く相同性がない3つのクラス (クラスI、クラスII、クラスIII) に分類される。クラスI、II、III RNRはそれぞれ非ヘム鉄中心、5'-デオキシアデノシルコバラミン、S-アデノシルメチオニンと鉄硫黄クラスターにより生成されたフリーラジカルを用いて反応を触媒している。配列の異なるクラスIとクラスIIそれぞれのRNR遺伝子へのグループIイントロンの挿入が検出され、また、他のシアノバクテリアのクラスI・クラスII RNR遺伝子においても、グループIIイントロンやタンパク質レベルで切り出されるインテインが高頻度で挿入されていることから⁹⁾、RNRの配列を標的としているのではなく、RNRが触媒する反応経路を標的として、転移因子のホットスポットとなっていることが示唆される。面白いことに、クラスI RNR とクラスII RNR はシアノバクテリアにおいてほぼ相補的に存在している。図3Bに16S RNA配列を基にしたシアノバクテリアの系統樹に対して、クラスI、II、III RNRの分布を示した。この図から、クラスIとクラスIIが系統的

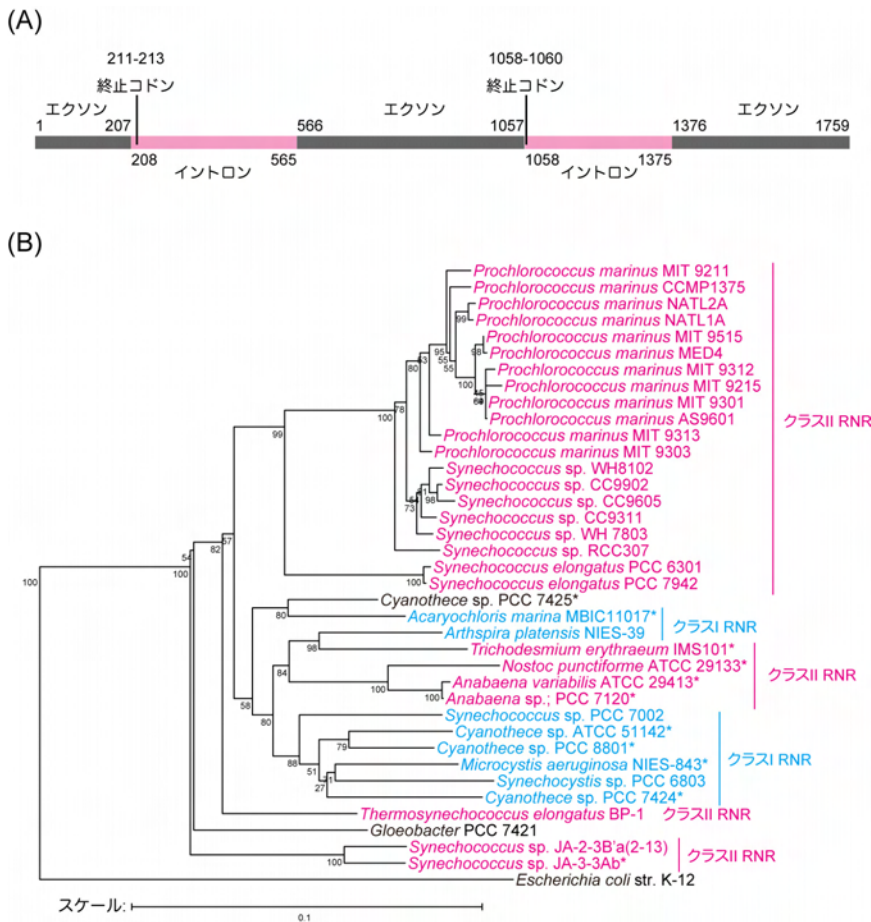


図3 クラスI RNRへのグループIイントロンの挿入 (A) と、クラスI、II RNRのシアノバクテリアにおける分布 (B)

A: クラスI RNRのコード領域は、2つのイントロン (ピンク) によって3つのエクソンに分断されている。数字は、推定開始コドンを基点とする塩基番号。イントロンが除去されると361個のアミノ酸残基から成るRNRタンパク質が翻訳される。B: 16S RNA遺伝子の系統樹に対して、RNRの分布を示した。水色でハイライトした種がクラスI RNRを、ピンクでハイライトした種がクラスII RNRをそれぞれ持ち、*を付けた種はクラスIII RNRを持つ。

にモザイク状に分布していることが分かる。クラスII RNRがより深い枝で分岐した種において広く保存されているため、祖先シアノバクテリアはクラスII RNRを持ち、進化の過程でクラスI RNRを獲得した種が出現した、ということが示唆される。クラスIII RNRは嫌気性酵素として知られ、嫌気環境での生育が示唆される窒素固定シアノバクテリアに主に存在する。また、*Gloeobacter* はクラスI、II、IIIいずれのRNRも検出されないため、全く新規のRNRの存在が期待される。

A. platensis のゲノム中の少なくとも18箇所において、12.5~25.5 kb のファージ様配列が存在した。これらの配列はそれぞれ多様化しているものの、ファージ感染関連遺伝子やダイレトリプートを作る小さな保存遺伝子などで構成され、ゲノム中の少なくとも295 kbの領域に相当していた。近縁種 *A. maxima* のドラフ

ト配列との比較から、ファージ様配列を介したゲノム再構成も見出されている。ISのトランスポザーゼに関しては、139個検出され、これは他のシアノバクテリアと同程度である。計612 kbがイントロン、ファージ様配列、ISやそれ以外の様々なリピート配列に相当し、他のシアノバクテリアと比べて非常に多いことが明らかとなった。このリピート配列の豊富さがギャップクローリングを困難にしたと推測される。

5. 情報伝達系

5.1. cAMP情報伝達系

cAMPはシアノバクテリアにおいて種々の情報を伝達するセカンドメッセンジャーとして働くことが知られている¹⁵⁾。*A. platensis* ゲノム中には22個のcAMP合成酵素 (アデニル酸シクラーゼ) をコードする遺伝子が存在し、これまでにゲノムが決定されたシ

アノバクテリアで最も多かった (図4)。最も近縁である *Trichodesmium* においてすら、13個しかアデニル酸シクラーゼ遺伝子は存在していなかった。中でも、膜貫通領域を持つアデニル酸シクラーゼが多く (10個)、細胞外の多くの環境情報を伝達するためにcAMPが多用されていることが示唆された。前述したように、*A. platensis* は細胞外にcAMPを放出し、外から加えたcAMPにより急速な細胞凝集を示すことが知られている⁸⁾。このような現象にこれらの膜貫通型アデニル酸シクラーゼが関わっていることが期待される。一方で、アデニル酸シクラーゼによって合成されるcAMPを結合する可能性が高いcNMP結合ドメインも計14個検出された (データ未提示)。中でも、N末端側にATP:ADPアンチポータードメインを有し、C末端側にcNMP結合ドメインを有するユニークなドメ

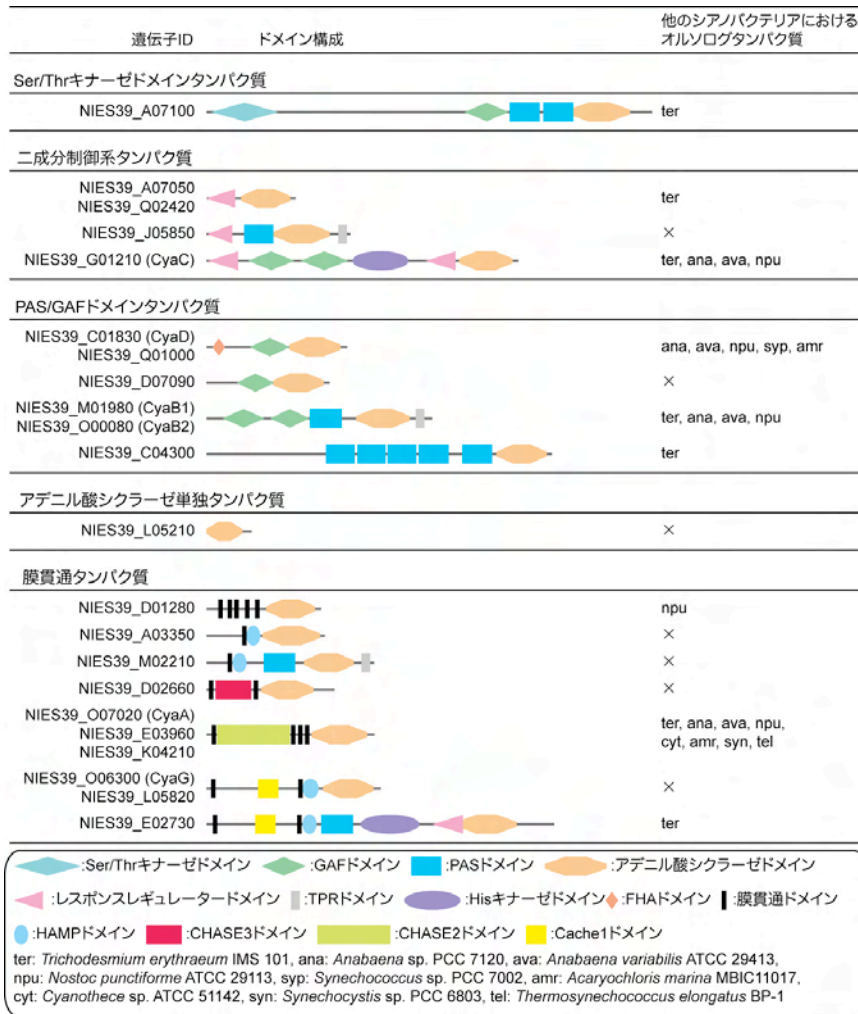


図4 *A. platensis* に見つかった22種のアデニル酸シクラーゼのドメイン構成

イン構成の遺伝子 (NIES39_A00950) が見出された。cAMP依存的な凝集に対して、細胞内ADPの減少と細胞内ATPの増加が伴うことが報告されているので、この遺伝子の関与が示唆される¹⁶⁾。

5.2. 二成分制御系

二成分制御系として84個のヒスチジンキナーゼ遺伝子が検出され、うち33個はレスポンスレギュレーターも持つハイブリッド型であった。また、レスポンスレギュレーター遺伝子は65個検出された。他の多くのシアノバクテリアには存在するリン酸センサー *sphS* 遺伝子が、*A. platensis* には存在しなかった。*SphS* を制御する *SphU* をコードする遺伝子も同様に存在しないが、レスポンスレギュレーター *sphR* やそのターゲット遺伝子である *phoA* や *pts* は存在することから、リン酸感知のために *A. platensis* 独自の制御機構の存在が示唆される¹⁷⁾。

5.3. 転写因子

A. platensis のゲノム中には、7つのシグマ因子が検出された。生育に必須である主要シグマ因子 SigA、3つのグループ2シグマ (SigB、SigC、SigD)、2つのグループ3シグマ (SigF、SigG) に対応する遺伝子がそれぞれ見出された¹⁸⁾。それ以外に、これまでに知られているクレードに属さない新規のグループ3シグマが1つ検出された。*A. platensis* のゲノム中に転写制御因子が66個検出された。この数はゲノムサイズに比して、淡水性を含む非海洋性シアノバクテリアの中では非常に少なく、海洋性シアノバクテリアの数と同程度であり、*A. platensis* が塩湖から単離されたことと関連しているのかもしれない。

5.4. PAS/GAFドメイン

PAS (Per/Arnt/Sim)、GAF (cGMP-binding/Adenylate cyclase/FhlA) ドメインスーパーファミリーは、それぞれアミノ酸配列は多様化しているが立体構造は高度に保存されているスーパーファミリーである。光やレドックスなどの環境センサーを多く含み、シアノバクテリアに特に豊富に存在することが知られている^{19,20)}。*A. platensis* においても、131個のPASドメインと58個のGAFドメインが検出された。これらのPASドメインの中には、6つのフラビン結合型ドメインが存在し、うち3つは光応答性ドメインに保存されたシステイン残基を有する。また、ヘム結合型も1つ存在する。GAFドメインに関しては、cAMP結合型GAFドメインがCyaB1、CyaB2オルソログに2つずつ (計4個) 見出された。*Anabaena* のCyaB1タンパク質において、生成物であるcAMPによって自己活性化する制御機構が知られているため、同様な生成物フィードバック機構の存在が示唆される²¹⁾。一方、開

環テトラピロール結合型 GAF ドメインは 18 個検出された。フィトクロム型である Cph1 や AphA のオルソログは検出されず、バクテリオフィトクロム型である AphB や AphC オルソログは検出された。また、青色光/緑色光吸収 TePixJ 型シアノバクテリオクロム GAF ドメインが 6 個、赤色光/緑色光吸収 AnPixJ 型シアノバクテリオクロム GAF ドメインが 2 個検出された²²⁾。

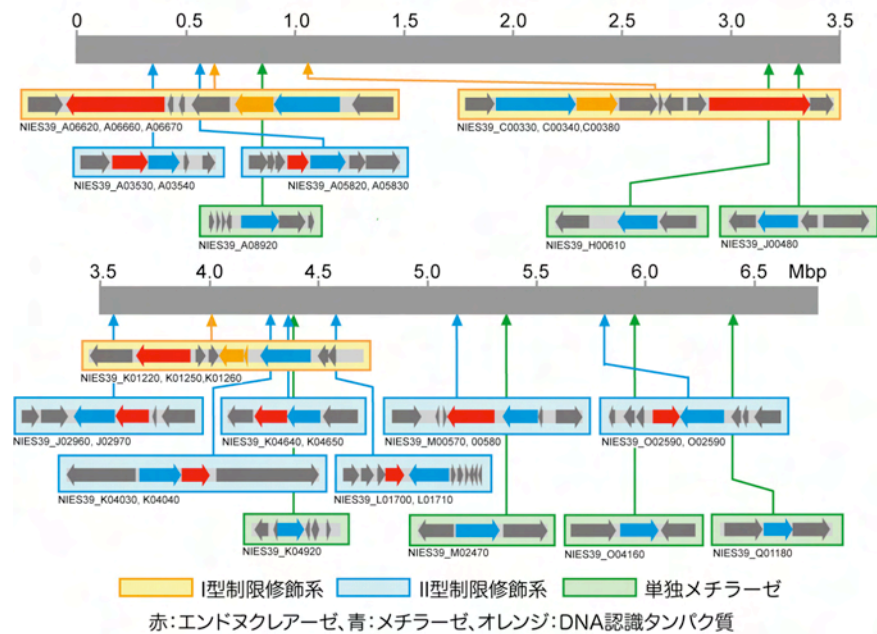


図5 ゲノム上における制限修飾系の位置と種類

5.5. 走化性制御系

A. platensis は滑走運動を行うことが古くから知られ、運動様式について詳細に調べられてきたものの、その運動制御についての知見はほとんどなかった。*A. platensis* ゲノム中に 8 つの走化性制御シグナル伝達タンパク質 (MCP; methyl-accepting chemotaxis protein) をコードする遺伝子が検出され、これらは何らかの走化性センサーとして機能することが示唆される。他の多くのシアノバクテリアでは光受容体型 MCP が存在するが、*A. platensis* では、光受容体型 MCP は検出されていない。3 つの MCP 遺伝子は、他の走化性制御因子である *cheY*、*cheA*、*cheW* などの *che* 遺伝子群とクラスターを形成していた (NIES39_A07840-NIES39_A07910、NIES39_E01010-NIES39_E01070、NIES39_H00230-NIES39_H00290)。他のシアノバクテリアの走化性遺伝子クラスターで高度に保存されている *patA* 遺伝子が二つの遺伝子クラスター (NIES39_A07840-NIES39_A07910、NIES39_H00230-NIES39_H00290) には存在していなかった。これらのクラスターには *Synechocystis* などの遺伝子クラスターには存在しない他の *che* 遺伝子群 (*cheR*、*cheB*、*cheC*) が存在していた。大腸菌において、CheR と CheB はそれぞれ MCP タンパク質のメチル化と脱メチル化を行い、鞭毛制御における一種の分子記憶として働くことが知られている。一方、CheC は CheY の脱リン酸化に作用することが知られている。これらの存在は、*A. platensis* において高感度な走化性制御システムが構築されていること

を示唆する。

6. ゲノム防御系

6.1. 制限修飾系

A. platensis ゲノム中に 3 つの I 型制限修飾系、8 つの II 型制限修飾系、7 つの単独で存在するメチラーゼが検出された (図5)。I 型制限酵素は特異的な認識部位で DNA に結合し、認識部位から様々な距離 (400~7000 bp) で二本鎖 DNA を切断する。一方、II 型制限酵素はパリンδροームを認識して特定の位置で切断し、切断点は認識部位内かそのごく近傍に限定されている。これらの数は他のシアノバクテリアと比べて非常に多く、これまでに形質転換系が確立できていない原因の一つであると考えられる。3 つの I 型制限修飾系は、中国のグループによって報告された *A. platensis* の I 型制限修飾系と一致した²³⁾。I 型制限修飾系はメチラーゼ、DNA 認識タンパク質、DNA 切断酵素をコードする 3 つの遺伝子 (*hsdMSR*) で構成されているが、2 つの I 型制限修飾系において、HsdM と HsdR はアミノ酸配列で 98% 以上保存されているのに対し、HsdS はモザイク状に保存されていた (図6)。HsdS は二つの DNA 認識ドメインがタンデムに並び、N 末、中央、C 末にそれぞれリンカー領域が存在する。NIES39_A06660 と ABB51216 (中国のグループが報告した HsdS) との保存性を調べると、N 末側の DNA 認識ドメインと中央のリンカー領域と C 末のリンカー領

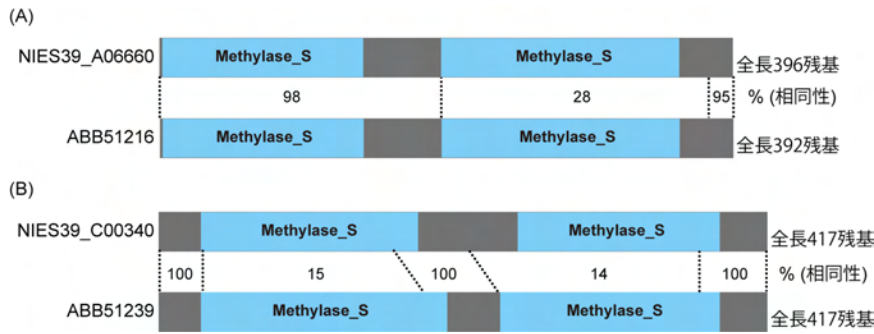


図6 *HsdS* 遺伝子の多様性
 水色：Methylase_Sドメイン（DNA認識ドメイン）、灰色：リンカー領域。

域は高度に保存されているが、C末側のDNA認識ドメインは有意に保存性が低かった（28%）（図6A）。一方、NIES39_C00340とABB51239（中国のグループが報告した*HsdS*）との保存性を調べると、N末、中央、C末のリンカー領域は高度に保存されているが、2つのDNA認識ドメインはともに保存性が非常に低かった（15%、14%）（図6B）。他のバクテリアでは*hsdS* がドメインシャフリングによってI型制限酵素の新たな認識部位を獲得したという報告があり、*A. platensis* でも同様の機構で²⁴⁾、1回あるいは2回の相同組み換えによりモザイク状に保存された*hsdS* が生じたと示唆される。このようにDNA認識系を多様化させることにより、外来DNAへの防御系を発達させてきたと考えられる。一方、8つのII型制限修飾系のうちの4つは中国のグループが報告したものと一致するが、残り4つは新規な制限修飾系であった。今回決定したゲノム配列の制限修飾系を基に形質転換系を確立していくことが重要であろう。

6.2. CRISPRシステム

CRISPR配列は一定のスペースを隔ててクラスター化されたリピート配列である。近年、多くのバクテリアやアーキアにおいて、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 配列がCasタンパク質と協調して、RNAiと同様の原理でファージに対する防御系として働いていることが分かってきた²⁵⁾。*A. platensis*にもCRISPR配列が3つ検出され、ゲノム上Casタンパク質の近くに存在していた。CRISPR1は34-43塩基の非リピート配列を間に置いて、35塩基のほぼ完全なリピート配列が17個並んでいる。CRISPR2は37-49塩基の非リピート配列を間に置いて、36塩基のほぼ完全なリピート配列が29個並び、

CRISPR3は32-41塩基の非リピート配列を間に置いて、35塩基のほぼ完全なリピート配列が23個並んでいた。

7. スピルラン合成系

*A. platensis*は細胞外にスピルランと呼ばれる硫酸多糖を蓄積することが知られている⁵⁾。スピルランは抗ウイルス作用など様々な生理活性が報

告されている。スピルランはラムノースを主成分とした硫酸多糖で、カルシウムを結合している。*A. platensis*ゲノム中には他のシアノバクテリアとよく保存されたラムノース合成系に加えて、異なった反応で合成すると示唆されるもう一つのラムノース合成系が存在していた。興味深いことに、二つめのラムノース合成系は大きな遺伝子クラスター(NIES39_C03080-C03190)を形成し、その中には、メチルトランスフェラーゼ遺伝子なども含まれていた。スピルランのラムノースの一部はメチル化していることが知られているため、この遺伝子クラスターがスピルラン合成に関与している可能性が示唆される。

8. トランスポーター

*A. platensis*のゲノム中には180以上のトランスポーターをコードする遺伝子が検出された。*A. platensis*の高アルカリ耐性は培地中のナトリウムを除去することにより失われる。また、細胞の光合成活性は高アルカリ(pH10.5)性でも高く保たれるが、単離チラコイドでの光合成活性は高アルカリ性で顕著に阻害されることが報告されている²⁶⁾。つまり、*A. platensis*では光合成などの生理活性がアルカリ耐性になっているのではなく、細胞外のナトリウムを利用した細胞内ホメオスタシス機構がアルカリ耐性に寄与しているといえる。これらのことから、*A. platensis*の好アルカリ性形質には、Na⁺/H⁺アンチポーターの関与が強く示唆されている。*Aphanothece halophytica*などの好塩性シアノバクテリアにおいて、高アルカリ下での高塩耐性に関わると考えられるNa⁺/H⁺アンチポーター(NapA)のオルソログ(NIES39_C00590)が*A. platensis*のゲノム中にも存在し、この遺伝子が*A. platensis*においても好塩・好アルカリ性形質に関与している可能性が示唆さ

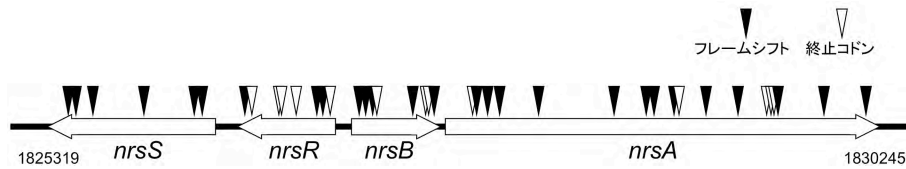


図7 *A. platensis* の典型的な偽遺伝子クラスター *nrsS/R/B/A* 領域における変異の位置と種類

れる²⁷⁾。

高アルカリ条件下で光合成を行うには、細胞質に HCO_3^- を蓄積する必要があると考えられる。細胞質において CO_2 から HCO_3^- に変換する NDH-1 は高親和性型 (NdhF3-D3-CupA-CupS) と低親和性型 (NdhF4-D4-CupB) の二種類知られているが、共に *A. platensis* ゲノムに存在していた。さらに、 HCO_3^- トランスポーターをコードする *bicA*, *sbtA* もそれぞれ存在し、*bicA* は *A. platensis* ゲノムにおいて、タンデムに2コピーに重複していた。一方、ABC 型の HCO_3^- トランスポーターである CmpA-B-C-D に対応する遺伝子群は相同性検索からは同定できていない。

9. 偽遺伝子クラスター

A. platensis のゲノム中には多くの偽遺伝子が存在し、それらの多くは複数の変異が検出され、偶発的に単発の変異で偽遺伝子化したものではないことが示唆された。中でも、ニッケル排出トランスポーターとその二成分制御系をコードする *nrsS/R/B/A* 遺伝子クラスターには、27 個のフレームシフト変異と 13 個の終止コドン変異が蓄積していた (図7)²⁸⁾。これらの変異は近縁種である *A. maxima* には検出されないことから、*A. platensis* NIES-39 株において、特異的にこれらの遺伝子群に変異が蓄積したと考えられる。新たなニッケルトランスポーターの獲得や、NIES-39 株の特異的な生育環境などによる変異が示唆されるが、NIES-39 株のニッケル耐性を調べることで、その遺伝的要因の解明が期待される。

10. その他の遺伝子群

反応中心、シトクロム *b6/f*、ATP 合成酵素、NAD(P) H デヒドロゲナーゼなど光合成系のほとんどの遺伝子は他のシアノバクテリア同様存在していたが、プラストシアニンやチトクロム *cM* などのチラコイドのルーメンに存在すべき電子伝達タンパク質は検出されていない。テトラピロール合成、カロチノイド合成、脂質合成などに関わる遺伝子群もほぼ他のシアノバクテリア

同様存在している。嫌気型 Mg プロトポルフィリン IX モノメチルエステル環化酵素や β -カロチンケトラーゼ (CrtW or CrtO) は検出されなかつ

た。しかしながら、ケトラーゼによって合成される 3-ヒドロキシエキネノンと結合したオレンジカロテノイドタンパク質の結晶構造が近縁種である *A. maxima* において報告されているため、新規のケトラーゼの存在が期待される²⁹⁾。運動関連の遺伝子としては、IV 型ピリ遺伝子群が同定された。近年、*Nostoc punctiforme* において IV 型ピリが滑走運動に関与することが報告されているため、*A. platensis* においても IV 型ピリが滑走運動に寄与しているかもしれない。また、*Phormidium* において滑走運動に必要な S レイヤータンパク質であるオシリンに相同なタンパク質も検出された。このタンパク質はヘモリシン様カルシウム結合ドメインを有し、海洋性 *Synechococcus* における遊泳運動に関わる SwmA とも相同性を示す。また、他のシアノバクテリアに比べて、ヘモリシン様カルシウム結合ドメインをコードする遺伝子が *A. platensis* ゲノム中に非常に豊富に存在し、細胞表層の構造が複雑化していることが推測された。*A. platensis* ゲノム中には既知の様々な毒素産生遺伝子は全く検出されず、食用としての安全性が確認された。

11. おわりに

A. platensis は最初に述べたように、基礎から応用まで様々な面で有用なシアノバクテリアであるが、形質転換系が確立していないために、これ以上の研究進捗がなかなか望めない状況であった。本研究により *A. platensis* ゲノムの全体像が理解でき、制限修飾系遺伝子群も同定できた。より発現しているメチラーゼをクローニングし、プラスミドをメチル化するなどの研究戦略により、形質転換系確立への道筋が開けるかもしれない。また、糸状体特異的遺伝子群、cAMP シグナル伝達系、スピラン合成系、 Na^+/H^+ アンチポーターなど *A. platensis* が持つ特異な形質に対応すると予測される遺伝子群が多数同定された。これらの遺伝子群の機能解析やバイオ燃料生産のための遺伝子導入なども将来的に期待できる。その重要性ゆえに、世界の様々な研究グループにより *Arthrospira* のゲノム解析が

行われていたが、原著論文としての報告には至っていなかった。おそらくリピート配列の豊富さが我々だけでなく他の研究グループにおいてもボトルネックになっていたのだろう。結果として、我々が世界に先立ち *Arthrospira* のゲノム構造を報告できたことは非常に喜ばしいことである。今後の形質転換や遺伝子の機能解析についても是非日本の研究グループが先鞭を切つて素晴らしい成果を報告していくことを期待して、本稿を終わりにしたい。

Received November 16, 2010, Accepted November 26, 2010, Published December 31, 2010

参考文献

1. Belkin, S., and Boussiba, S. (1991) Resistance of *Spirulina platensis* to ammonia at high pH values. *Plant Cell Physiol.* 32, 953-958.
2. 小俣達男、藤田祐一、前田真一 (2010) 光合成微生物は資源・エネルギー分野で人類に貢献できるか？—生産性を規定する諸要因の分析—, 光合成研究 20, 65-71.
3. Kawata, Y., Yano, S., Kojima, H., and Toyomizu, M. (2004) Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp PCC9438) with Tn5 transposase-transposon DNA-cation liposome complex. *Mar. Biotechnol.* 6, 355-363.
4. Carrieri, D., Momot, D., Brasg, I. A., Ananyev, G., Lenz, O., Bryant, D. A., and Dismukes, G. C. (2010) Boosting autofermentation rates and product yields with sodium stress cycling: application to production of renewable fuels by cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6455-6462.
5. Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., and Kojima, I. (1996) Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* 59, 83-87.
6. Eriksen, N. T. (2008) Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1-14.
7. Sakamoto, T., Murata, N., and Ohmori, M. (1991) The concentration of cyclic-AMP and adenylate-cyclase activity in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 32, 581-584.
8. Ohmori, K., Hirose, M., and Ohmori, M. (1993) An increase in the intracellular concentration of cAMP triggers formation of an algal mat by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 34, 169-171.
9. Fujisawa, T., Narikawa, R., Okamoto, S., Ehira, S., Yoshimura, H., Suzuki, I., Masuda, T., Mochimaru, M., Takaichi, S., Awai, K., Sekine, M., Horikawa, H., Yashiro, I., Omata, S., Takarada, H., Katano, Y., Kosugi, H., Tanikawa, S., Ohmori, K., Sato, N., Ikeuchi, M., Fujita, N., and Ohmori, M. (2010) Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res.* 17, 85-103.
10. Sasaki, N. V., and Sato, N. (2010) CyanoClust: comparative genome resources of cyanobacteria and plastids. *Database* 2010, bap025.
11. Kumar, K., Mella-Herrera, R. A., and Golden, J. W. (2010) Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000315.
12. Nayar, A. S., Yamaura, H., Rajagopalan, R., Risser, D. D., and Callahan, S. M. (2007) *FraG* is necessary for filament integrity and heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiol.* 153, 601-607.
13. Bauer, C. C., Buikema, W. J., Black, K., and Haselkorn, R. (1995) A short-filament mutant of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 that fragments in nitrogen-deficient medium. *J. Bacteriol.* 177, 1520-1526.
14. Meng, Q., Zhang, Y., and Liu, X. Q. (2007) Rare group I intron with insertion sequence element in a bacterial ribonucleotide reductase gene. *J. Bacteriol.* 189, 2150-2154.
15. Ohmori, M., and Okamoto, S. (2004) Photoresponsive cAMP signal transduction in cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 503-511.
16. Ohmori, K., and Ohmori, M. (2002) cAMP stimulates Na⁺-dependent ATP formation in the alkaliphilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Microb. Environ.* 17, 144-147.
17. Suzuki, S., Ferjani, A., Suzuki, I., and Murata, N. (2004) The *SphS-SphR* two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* 279, 13234-13240.
18. Osanai, T., Ikeuchi, M., and Tanaka, K. (2008) Group 2 sigma factors in cyanobacteria. *Physiol. Plant.* 133, 490-506.
19. Ohmori, M., Ikeuchi, M., Sato, N., Wolk, P., Kaneko, T., Ogawa, T., Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okamoto, S., Yoshimura, H., Katoh, H., Fujisawa, T., Ehira, S., Kamei, A., Yoshihara, S., Narikawa, R., and Tabata, S. (2001) Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 8, 271-284.
20. Ashby, M. K., and Houmard, J. (2006) Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 472-509.
21. Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J. U. and Schultz, J. E. (2002) A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.* 21, 3672-3680.

22. Ikeuchi, M., and Ishizuka, T. (2008) Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1159-1167.
23. Zhao, F., Zhang, X., Liang, C., Wu, J., Bao, Q., and Qin, S. (2006) Genome-wide analysis of restriction-modification system in unicellular and filamentous cyanobacteria. *Physiol. Genomics* 24, 181-190.
24. O'Sullivan, D., Twomey, D. P., Coffey, A., Hill, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2000) Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 36, 866-875.
25. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712.
26. Pogoryelov, D., Sudhir, P. R., Kovacs, L., Gombos, Z., Brown, I., and Garab, G. (2003) Sodium dependency of the photosynthetic electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Bioenerg. Biomemb.* 35, 427-437.
27. Laloknam, S., Tanaka, K., Buaboocha, T., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y., and Takabe, T. (2006) Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a betaine transporter active at alkaline pH and high salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6018-6026.
28. Lopez-Maury, L., Garcia-Dominguez, M., Florencio, F. J., and Reyes, J. C. (2002) A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 43, 247-256.
29. Kerfeld, C. A., Sawaya, M. R., Brahmandam, V., Cascio, D., Ho, K. K., Trevithick-Sutton, C. C., Krogmann, D. W., and Yeates, T. O. (2003) The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein. *Structure* 11, 55-65.

Various Genomic Aspects of an Economically Important Cyanobacterium,
Arthrospira (Spirulina) platensis NIES-39:
from basic science to applied science, from individual genes to comparative genomics

Rei Narikawa^{1*}, Takatomo Fujisawa², Shinobu Okamoto³, Shigeki Ehira⁴, Hidehisa Yoshimura¹, Iwane Suzuki⁵, Tatsuru Masuda¹, Mari Mochimaru⁶, Shinichi Takaichi⁷, Koichiro Awai⁸, Mitsuo Sekine², Hiroshi Horikawa², Isao Yashiro², Seiha Omata², Hiromi Takarada², Yoko Katano², Hiroki Kosugi², Satoshi Tanikawa², Kazuko Ohmori⁹, Naoki Sato¹, Masahiko Ikeuchi¹, Nobuyuki Fujita², Masayuki Ohmori⁴

¹Department of Life Sciences (Biology), The University of Tokyo

²Bioresource Information Center, Department of Biotechnology,
National Institute of Technology and Evaluation (NITE)

³Database Center for Life Science, Research Organization of Information and Systems

⁴Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, Chuo University

⁵Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

⁶Natural Science Faculty, Komazawa University

⁷Biological Laboratory, Nippon Medical School

⁸Division of Global Research Leaders, Shizuoka University

⁹Department of Life Sciences, Showa Women's University

リモートセンシングによる光合成研究のための樹冠形状の3次元化

東京大学 生産技術研究所 都市基盤安全工学国際研究センター
遠藤 貴宏*

1. はじめに

リモートセンシングは、対象物からの電磁波エネルギーである反射あるいは放射を計測することによって、対象の大きさ、形、物性を取得する技術である。具体的には、対象から返ってくる分光特性によって、分類、定性、定量を行っている¹⁾。

形状の計測に関するリモートセンシング技術は、近年、様々な電磁波エネルギー帯、リモートセンサの組合せにより、個体スケールから広域スケールまでの計測が可能になりつつある。広域スケールの場合、2006年1月24日に日本が打ち上げた陸域観測衛星 ALOS (Advanced Land Observing Satellite) に搭載されたパンクロマチック立体視センサ (PRISM) は、広域の地表面形状の情報を取得可能である^{2,3)}。また、現在全球レベルのデータが利用できるデータセットとしては、スペースシャトルに積み込んだ C バンドレーダを利用して作成された 90 m の空間解像度の SRTM (The Shuttle Radar Topography Mission) と Terra 衛星に搭載された ASTER センサ (Advanced Spaceborne Thermal Emission and Reflection Radiometer) の前方視、直下視、後方視の3方向の画像を利用して作成された 15 m の空間解像度の ASTER 全球3次元地形データ (ASTER GDEM) がある。また、航空機スケールの場合、従来からある航空写真による3次元化とは別に、レーザ光線を測距装置として利用した LiDAR (Light Detection And Ranging) が利用でき、植生や個体の形状を計測することが可能である^{4,5)}。ただし、画像取得型のリモートセンサデータは、特に、広域スケールの場合、地表を計測することが難しいため DEM (Digital Elevation Model) ではなく地上を被覆している対象の DSM (Digital Surface Model) であると考えた方がよい。

広域スケールの形状の推定ならば、上述した画像取得型のリモートセンシングデータが利用できる。しかしながら、個体スケールにおいて、分光特性を利用しクロロフィルや窒素などの生化学成分の定性、定量を行う場合や立地環境ごとに樹冠領域を推定する場合には、植生の形状の影響を考慮しなければならない。

そこで、本稿では、個葉から個体、群落まで光合成に関する変数をスケールアップするために必要な植生の形状に関するリモートセンシング研究に注目する。はじめに、形状が分光特性に与える影響を明らかにした上で、能動型センサ¹⁾である航空機 LiDAR による植生の形状に関する筆者の研究事例を述べる。

2. 形状の影響

個葉スケールのリモートセンシングでは、分光特性

表1 AOTF型ハイパースペクトルイメージャの主要諸元

General	
Wavelength	500 ~ 1000 nm
Number of bands	101 bands (5 nm is selected)
Wavelength resolution	5 nm >
Exposure time	Variable
Optical system	
Lens mount	Nikon AF mount
Lens	Ai AF Nikkor ED 14mm F2.8D, (Nikon, Japan)
Measurement distance	1m ~ ∞
AOTF	
Type	TVA-100 model, (Brimrose corp., USA)
Wavelength resolution	Variable 5 nm (800 nm)
CCD camera	
Type	BS-30L model, (Bitran corp., JPN)
Field of view	34° (Variable)
CCD element	Sony ICX074AL, (SONY, Japan)
Pixels@Lines	1360@1024
Bits	16 bits

* 連絡先 E-mail: tendo@iis.u-tokyo.ac.jp

¹⁾ 能動型センサ (active sensor) とは、対象物に向けて電磁波を照射し、対象物で反射された電磁波を収集するセンサ。

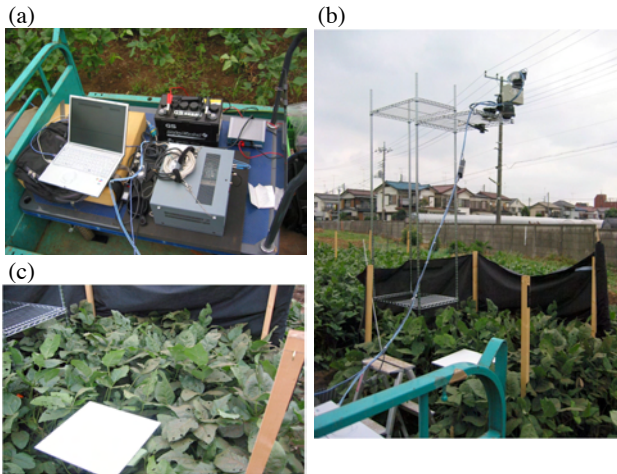


図1 ハイパースペクトルイメージ装置の概観とダイズ群落の計測概況

(a) ハイパースペクトルイメージ装置の概観、(b) ダイズ群落の計測概況、(c) ダイズ群落の生育状況。ダイズ群落が風で揺れるのを防ぐために、黒い布でダイズ群落を囲った。

からクロロフィルや窒素などの生化学成分の定性、定量を行っている。しかしながら、個体や群落スケールでは、形状の影響により生化学量とは無関係に分光特性が変化するため、個葉スケールで推定された分光特性と生化学量との関係をそのまま利用することはできない。

そこで、形状の分光特性への影響を時空間的に解析するため、鉛直上方からの計測が容易かつ形状が複雑な農作物としてダイズ (*Enrei* (艶麗)) を選び、研究室で開発したハイパースペクトルイメージ装置を用いて、2004年11月4日に西東京市にある東京大学農学部農場のダイズ群落で分光特性の時空間変化を計測した。計測対象としたダイズ群落は、7月4日に播種し、個体齢は131日、高さは約90 cmであった。利用したハイパースペクトルイメージ装置は、音響光学チューナブルフィルタであるAOTF (Acousto-Optic Tunable Filter) を分光素子として利用した装置である。AOTFに超音波振動を与えると回折する波長を変化させる特徴があり、本装置は、500 nm から1000 nm までの波長帯を5 nm 間隔で対象物の分光特性を画像として計測することができる。表1にハイパースペクトルイメージ装置の主要諸元を示す。図1 (a) にハイパースペクトルイメージ装置の概観、図1(b)にダイズ群落の計測概況、図1 (c) にダイズ群落の生育状況を示す。

計測として、ダイズ群落を8時30分から約1時間ごと

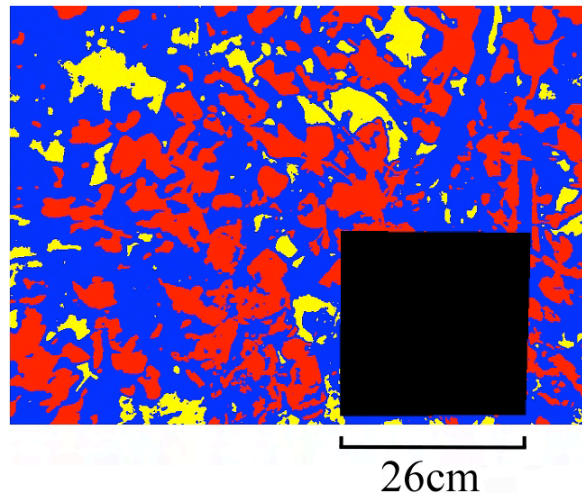


図2 SAM法によりミクセル分解を行った時刻12:30における光環境別の葉領域および影と土壌領域の空間分布結果の一例。

赤色は、直達光が当たった領域、青色は、直達光が当たらない領域、黄色は、影と土壌の領域を示す。計測値を反射率へ変換するために用いた標準白色板の領域を黒色で示す。

に定点観測を行い、分光特性を面的に取得した。ただし、16時を過ぎると太陽高度が低くなったため、16時10分まで計測した。解析として、はじめに、ハイパースペクトルイメージ装置で取得された放射量未補正の値を正規化するために、ダイズ群落とともに計測した標準白色板の値を用いて反射率へ変換した。次に、ミクセル分解手法の一つであるSAM (Spectral Angle Mapper) 法を用いて、解析領域の画素を直達光が当たる画素、直達光が当たらない画素そして影と土壌の画素の3つに分類した。その後、分類区分ごとに全画素中に占める画素数の割合を計算し、得られた結果をそれぞれの面積率とした。一方、分類区分ごとに各画素の分光特性の平均を計算し、それぞれの平均分光反射率とした。図2に時刻12時30分における光環境別の葉領域および影と土壌領域の空間分布結果の一例を示す。図3にそれぞれの面積率の時系列変化と太陽高度との関係、そして、図4に時刻12時30分におけるダイズ群落の葉領域の光環境別平均分光反射率と影と土壌領域の平均分光反射率を示す。

図2が示すように、直達光が当たる葉領域、直達光が当たらない葉領域そして影と土壌の領域は、空間的に不均一に存在した。しかしながら、図3が示すように、太陽高度がピークとなる11時半付近から2時間程度、それぞれの面積率の変化は、小さいことが分かった。この結果は、直達光の当たる葉領域と当た

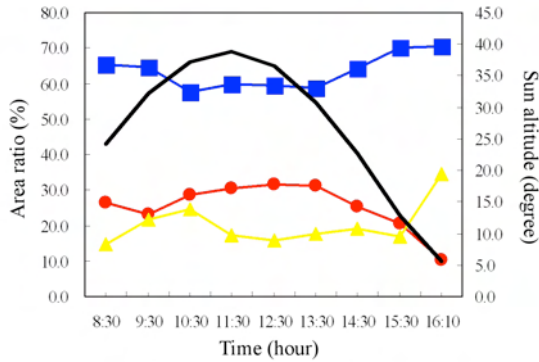


図3 ダイズ群落における光環境別葉領域および影と土壤領域の面積率の時系列変化と太陽高度との関係

●：直達光の当たる葉領域の面積率、■：直達光が当たらない葉領域の面積率、▲：影および土壤領域の面積率、—（実線）：太陽高度。

らない葉領域は、時空間的に変化するが単位面積当たりの割合として考えるとほぼ一定と仮定できる時間帯が存在することを示している。つまり、西東京市の農場におけるダイズ群落の形状は、特定の日射条件（時刻）に対して卓越した形状をしているのではなく、日中の日射を平均的に利用できる形状をしていると考えられる。一方、葉の日射状況には群落の形状が大きく影響するため、生化学成分の量に大きな変化が起こっていないにも関わらず葉領域の分光特性は大きく変化する（図4）。一般的に、分光特性から生化学量を推定する際に用いられる方法は、特定波長における分光反射率の比演算値、分光反射率の一次もしくは二次微分値が利用される場合が多い^{6,7)}。しかし、この結果は、受動的センサ²⁾を利用し個体や群落スケールの計測をする場合、個葉スケールで成り立っていた分光特性からクロロフィルや窒素などの生化学成分を定性、定量する推定式を利用できないことを示している。そのため、形状の影響による分光特性の変化を考慮しなければ、分光特性から生化学成分の定性や定量が困難であることを示している。

従って、個葉スケールの知見に基づいて、個体や群落スケールの光合成に関する研究を進めるためには、植生の形状を取得する技術が必要であることが分かる。

3. 航空機 LiDAR 計測

空間情報計測分野において、広域の対象物の形状を

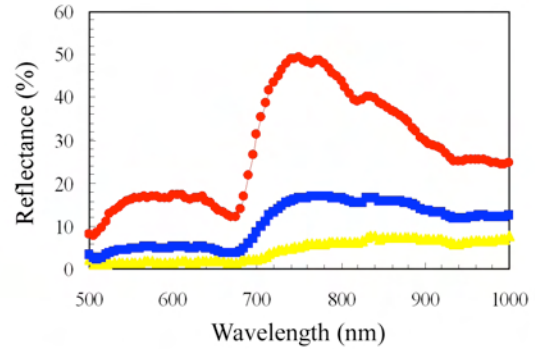


図4 時刻12:30におけるダイズ群落の葉領域の光環境別平均分光反射率と影と土壤領域の平均分光反射率

●：直達光の当たる葉領域の平均分光反射率、■：直達光が当たらない葉領域の平均分光反射率、▲：影と土壤領域の平均分光反射率。

計測するリモートセンシング技術は、間接的手法と直接的手法の2つがある。間接的手法は、異なる計測位置から同一対象を計測した2枚の画像を用いて3次元化する方法であり、直接的手法は、レーザ光線のような測距技術を用いて3次元化する方法である^{1,9)}。

形状が複雑な植物をより詳細に3次元化する場合、直接的手法が間接的手法より適している。何故ならば、2章で述べたように、間接的手法に分類される人工衛星もしくは航空機搭載型の受動型センサは、計測時に太陽光などの光源を必要とする。そのため、対象が植生のような複雑な形状の場合、計測時の幾何学的条件と植生の形状により影などの不可視領域が発生し、その領域の3次元化ができないという問題が発生する。例えば、日本のスギ林などの針葉樹林の場合、樹冠の北側が不可視領域となる。一方、直接的手法である能動型センサ、特に、レーザ光線を利用する地上型のレーザプロファイラや航空機LiDARは、近年、単位面積当たりに多くのレーザ光線を照射できるようになり、高速、高精度かつ広域的に植生の形状を取得することができるようになりつつある⁹⁾。航空機LiDARは、GPSと慣性計測装置により位置と姿勢情報が既知のとなったレーザ発信機からレーザ光線を対象物に向けて照射し、対象物で反射して戻ってきた散乱光を受信機で受信する。受信した散乱光の反射強度が設定した閾値を超えた場合、その時刻および位置と姿勢情報とから、空間上の対応する位置に点を生成する⁹⁾。図5にレーザパルス密度

²⁾ 受動型センサ (passive sensor) とは、太陽光の反射および対象物から放射される電磁波を収集するセンサ。

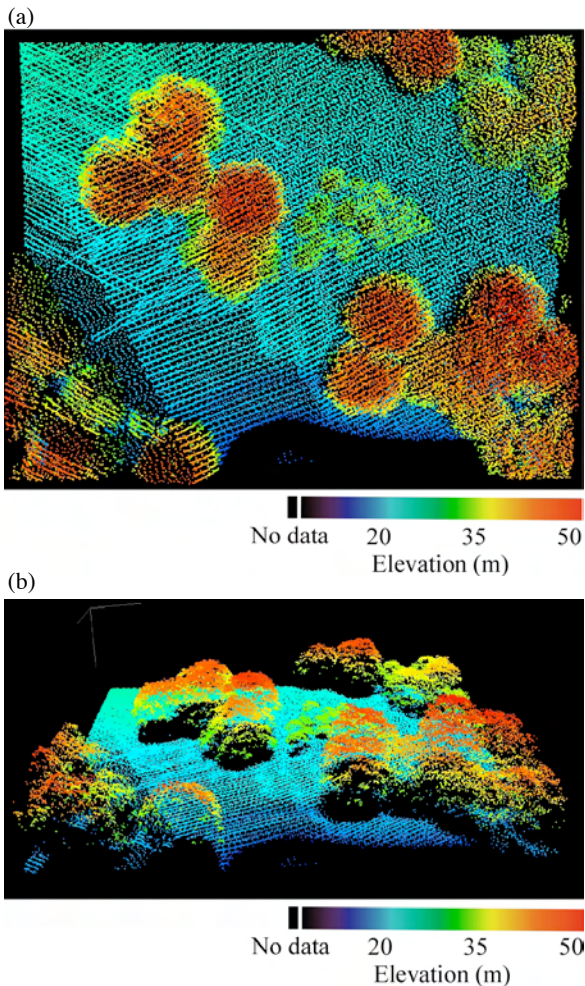


図5 航空機 LiDAR による代々木公園の計測結果の一部
 レーザパルス密度は、6 点/m²。(a) 鉛直方向からの視点 (方位角 0 度、仰角 -90 度)、(b) 斜めからの視点 (方位角 0 度、仰角 -30 度)。点群の色は、標高を示す。

6点/m²で計測した代々木公園の計測結果の一部を示す。

図5が示す通り、樹冠領域には受動型センサで発生するような不可視領域は存在せず、レーザ光線が樹冠表面と地上から返ってきているのが分かる。また、レーザパルス密度 6 点/m²でも、個体の樹冠形状が分かる。高レーザパルス密度で計測した航空機LiDARデータは、詳細な樹冠形状の再構築ができることから、光合成の場としての樹冠領域を推定するだけでなく、光合成に必要な日射量のシミュレーションのための入力変数や分光特性の補正のための形状情報として利用できる可能性がある。

4. 樹冠形状に関する研究

航空機LiDAR計測によって得られた点群データを樹冠領域や形状情報として利用するためには、樹冠上の

点群を面に変換する必要がある。複数点からの面の作成は、一般的に TIN (Triangulated Irregular Network) 手法を用いて DSM 化される。例えば、群落として特定期間の樹冠領域に当たる積算日射量ポテンシャルを推定する目的ならば、この TIN 化された DSM データに対して、時系列レイトレーシング法もしくはラジオンティ法を適用することにより求めることができる。一方、個体スケールで積算日射量ポテンシャルを推定するためには、まず、個体の樹頂点を探索し、個体の樹冠領域を決定する必要がある。個体の樹頂点と樹冠領域を決定する手法には、画像と LiDAR データとを利用する手法、画像のみを利用する方法、LiDARデータのみを利用する方法の3つがある¹⁰⁻¹²⁾。ただ、実際の処理としては、入力データを写真のようなラスタデータに変換し処理する手法とベクターデータであるLiDARの点群をそのまま利用する方法の2通りがある。ラスタデータとして処理する手法は、航空写真もしくはLiDARデータをはじめにラスタライズし、その後、ローカルマキシマムフィルターを適用し個体の樹頂点を推定する。次に、樹頂点をシード点としてウォーターシェッド法を適用し領域分割することによって樹冠領域を決定する。一方、ベクターデータとして処理する手法は、点の空間分布と高さ値を利用して、個体の樹頂点を推定する。次に、樹頂点付近の単位面積当たりのレーザパルス密度の変化もしくはTINの傾斜の変化を計算することによって樹冠領域を決定する。

どちらの手法も、樹頂点の推定精度は高いが、樹冠領域の推定において、樹冠の大きさが計算領域内で均一ならば精度は高く、樹冠の大きさが不均一だと精度は低いという傾向がある¹²⁾。この原因は、推定した樹冠のマージ方法が確立していないことに由来する。例えば、小さい樹冠を精度高く推定しようとすると、大きな樹冠に存在する枝の固まりを樹冠として抽出するため過大推定となる。その一方、大きな樹冠を正確に推定しようとすると、小さな樹冠が抽出されず過小推定となる。ただ、科学技術の進歩に伴い単位面積当たりのレーザパルス密度がより増加することが予測されているため、今後、樹冠形状がより詳細に計測されるはずである。そのため、樹冠領域を推定する精度も向上することが期待される。

5. 樹冠形状近似

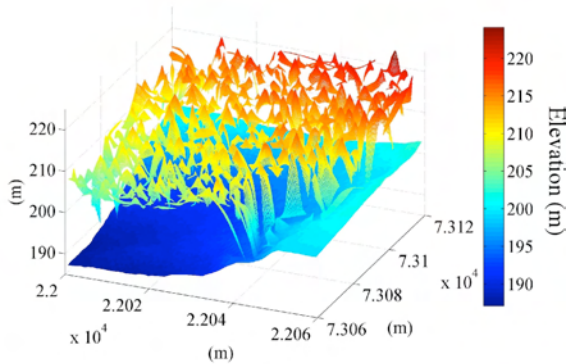


図6 LiDARデータから推定したスギ林の南東側林縁木の3次元樹冠形状近似結果と数値標高モデル (DEM)

図は、斜めからの視点 (方位角 20 度、仰角 -35 度)。x 軸、y 軸の数値は、ユニバーサル横メルカトル座標系での位置を示す。z軸の数値は、標高を示す。

前章で述べた通り、個体の樹冠領域を精度高く推定する技術はまだ開発段階であるが、今後、科学技術の進歩に伴って樹冠領域を精度高く推定できる可能性が高い。そのため、近い将来、立地環境ごとに個体スケールの樹冠形状を評価できる可能性がある。そこで、樹冠形状を数学的に3次元近似することによって、立地環境ごとに個体スケールの樹冠形状を客観的に評価できるか検討を行うため、2004年8月11日から12日にかけて青森県七戸町にある林齢44年のスギ林をレーザーパルス密度 11.1 点/m² という条件で計測を行った。図6にスギ林の南東側の林縁木に注目して個体ごと樹冠形状を3次元近似した結果を示す。樹冠形状の3次元近似は、Shengらが提案した円錐型に適した樹冠形状近似モデルを修正した式を利用した¹³⁾。

スギ林南東側の樹冠形状は、地表面まで樹冠が達している一方、林内の樹冠は小さい (図6)。林縁木の樹冠形状から、林内に風が侵入しないよう南東側の樹冠が厚くなるように施業が行われていることが推察される。この推察は、スギ林を管理している青森県十和田市上十三地区森林組合で行った施業方法に関するヒアリング結果と一致していた。

まだ開発段階ではあるが、個体ごとの樹冠形状近似結果は、葉領域の総面積や任意の風向に対する樹冠投影面積などを推定できるだけでなく、立地環境、樹冠形状および樹高との関係に基づいた成長量予測や風倒危険度予測のための入力変数になる可能性があるかと期待している。

6. おわりに

現在、我々が利用できるリモートセンシングセンサは、実験室スケールから全球スケールまでほぼ揃っていると見える。個葉スケールおよび大陸スケールにおける光合成に関する変数の推定手法は確立されたと考えられる一方、形状の影響を考慮しなければならない個体および群落スケールの手法は、まだ検討する必要がある。近年、形状を取得する手法は、科学技術の進歩に伴って急速に進化している。まだ、世界の数カ国に限定されるが、航空機LiDARについてもウェーブフォーム型という対象からの反射強度を連続的にスペクトルとして計測可能な新しいセンサの利用が可能になりつつある。このセンサは、樹冠内部の構造を計測できると期待されおり、樹冠の厚さが航空機LiDARで計測可能な時代が到来しつつあるのかも知れない。今後は今以上に、詳細かつ広域の立地環境に即した陸域生態系に関する変数の推定が求められるであろう。そのためには、形状の影響を考慮した推定手法の開発が必要であり、そのためにも生態系研究分野と空間情報計測分野との更なる協働を期待したい。

謝辞

岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所植物レドックス制御・研究グループ 小川健一博士には、本誌に出版する機会を与えていただいた。記してここに感謝の意を表します。

Received November 16, 2010, Accepted November 26, 2010, Published December 31, 2010

引用文献

1. 日本リモートセンシング研究会編 (2004) 改訂版 図解リモートセンシング, 社団法人 日本測量協会, 東京.
2. 田口仁, 遠藤貴宏, 沢田治雄, 安岡善文 (2009) ALOS/PRISMによる森林域におけるDigital Canopy Modelの抽出, 写真測量とリモートセンシング 48, 78-81.
3. 真屋学, 新名恭仁, 内田修, 村田雄一郎 (2009) ALOS/PRISM画像の標定精度と地物判読の評価, 写真測量とリモートセンシング 48, 59-63.
4. 平田泰雅 (2007) 航空機レーザー扫描仪によ

- る森林計測とその動向, 森林計画誌 41, 1-12.
5. 田口仁, 遠藤貴宏, 安岡善文 (2008) LiDAR点群データを用いた樹冠形状モデルに基づく単木樹冠抽出および樹高推定, 日本リモートセンシング学会誌 28, 331-341.
 6. 藤原栄朋, 遠藤貴宏, 米川智司, 安岡善文 (2005) ハイパースペクトルイメージングを用いた植物の水ストレスの評価手法に関する研究, 生産研究 57, 4, 390-393.
 7. 遠藤貴宏, 米川智司, 安岡善文 (2001) ハイパースペクトルイメージングを用いた個葉の生化学パラメタの面的推定に関する研究, 日本リモートセンシング学会 第31回学術講演会論文集, 245-246.
 8. 斉藤和也 監修, (2008) 図解 航空レーザ計測, 財団法人 日本測量調査技術協会, 東京.
 9. 葛岡成樹, 新井康平 (2001) レイトレーシングを用いた樹木モデルの評価, 日本リモートセンシング学会 第31回学術講演会論文集, 13-14.
 10. Koch, B., Heurich, U., Weinacker, H. (2006) Detection of Individual Tree Crowns in Airborne Lidar Data, *Photogrammetric Engineering & Remote Sensing* 72, 357-363.
 11. Mei, C., Durrieu, S. (2004), Tree Crown Delineation from Digital Elevation Models and High Resolution Imagery, *Proc. International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Science*, XXXVI 8/W2. <http://www.isprs.org/proceedings/XXXVI/8W2/mei.pdf> (30 April 2010)
 12. Endo, T., and Sawada, H. (2010) Development of an Individual Tree Crown Delineation Method using LiDAR Data, *Proc. International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Science*, XXXVIII 8, 675-678.
 13. 田口仁, 遠藤貴宏, 安岡 善文 (2008) LiDAR点群データを用いた樹冠形状モデルに基づく単木樹冠抽出および樹高推定, 日本リモートセンシング学会誌 28, 331-341.

3D Reconstruction of Crown Shapes for Photosynthesis Research using Remote Sensing

Takahiro Endo*

International Center for Urban Safety Engineering, Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

解説特集

「光エネルギーの新しい利用法と光合成研究の温故知新」

Editor

小林 正美

(筑波大学 応用理工学類 物質工学系)

序文

小林 正美

(筑波大学 応用理工学類 物質工学系)

P. 167

化学の視点からみた光合成 —人工光合成研究の現状と将来—

村田 滋

(東京大学 大学院 総合文化研究科)

P. 168 ~ 177

光化学系 I — P700を中心に

檜山 哲夫

(埼玉大学 名誉教授)

P. 178 ~ 192

光化学系 II 反応中心同定への途 (回顧)

佐藤 公行

(岡山大学 名誉教授)

P. 193 ~ 206

序文[‡]

筑波大学 応用理工学類 物質工学系

小林 正美^{*}

記念すべき「第1回光合成学会公開シンポジウム」が2010年6月4日～5日に東京大学駒場キャンパスで開催されました。シンポジウムの統一テーマは「光合成研究のダイナミックス」で、前半（4日）と後半（5日）の2つのサブセッションに分け、それぞれ小林と西田先生（埼玉大）が担当しました。

小林が世話人を担当しましたセッション1「光エネルギーの新しい利用法と光合成研究の温故知新」では、先ず「光エネルギーの新しい利用法」として、化学の観点から瀬川浩司先生（東京大学）に「植物の光合成に学ぶ色素増感太陽電池の研究開発」について、続いて村田 滋先生に「化学の視点からみた光合成 —人工光合成研究の現状と将来—」についてご講演していただきました。

続いて、「光合成研究の温故知新」として、檜山哲夫先生から「光化学系 I —P700を中心に」なる表題で、そして最後に佐藤公行先生から「光化学系 II 反応中心同定への途（回顧）」なる表題でお話を伺いました。

本特集は、このセッション1での講演内容をできるだけ分かり易く説明していただくことを目的としています。瀬川先生には、昨年の「光合成研究」12月号で既に執筆していただいておりますので、今回は村田先生、檜山先生と佐藤先生の3名の演者に執筆をお願いしました。

一読していただければお分かりになると思いますが、従来の解説記事とはかなり感触が異なります。論文、著書や学会発表からでは知ることができない、貴重な体験談が豊富に盛り込まれているからでしょう。そのため、特にこれから研究を進めていく若い研究者にとって、よい指針になるのではないのでしょうか。また各研究の歴史的背景が簡潔に分かりやすく記述されていますので、色々な面で役立つのではないかと期待しています。

「分かりやすく」しかし「詳細に」という編者の無理難題に応えてくださった村田先生、檜山先生および佐藤先生に、この場をお借りして深く御礼申し上げます。

なお、西田先生が担当なさいましたセッション2「最新の光合成研究と未来」の解説特集は、来年の4月号に掲載される予定です。ご期待ください。

[‡] 解説特集「光エネルギーの新しい利用法と光合成研究の温故知新」

^{*} 連絡先 E-mail: masami@ims.tsukuba.ac.jp

化学の視点からみた光合成 —人工光合成研究の現状と将来—[‡]

東京大学 大学院 総合文化研究科

村田 滋^{*}

1. はじめに

近年、化石燃料に代わる非蓄積型エネルギー資源の開発、および低炭素社会づくりのための温室効果ガス削減の両面から、太陽光エネルギーに対する関心が一段と高まっている。それに伴って、化学の分野においても、光エネルギー変換に関する研究が活発に行われ、人工光合成をキーワードとする研究も多く見られるようになってきた。ただし、現在において、“人工光合成”という言葉は様々な意味で用いられていることに注意する必要がある。人工光合成に関する研究と称される研究は様々に展開されているが、生物が営む光合成を人工的に模倣しようとする研究に限ってみると、実はほとんど進展していないのが現状である。本稿では、光合成の化学的意義を述べたあと、これまでの人工光合成に関する研究を概観し、さらに我々のグループで進めている脂質二分子膜を反応場とする光合成の人工的模倣に関する研究を紹介する。

2. 化学の視点からみた光合成

光合成とは何か

一般的に表記される光合成全体の化学反応式は、 $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ と非常に単純である。しかし、この反応は多数の段階を経て進行する極めて複雑な過程であり、その段階の多くはその過程に特異的に作用する酵素が触媒として関与している。1980年代以降、生物が光合成を行なう組織の構造が分子レベルで明らかにされ、光合成のしくみが化学的に解明されてきた¹⁾。それに伴って化学者たちも、生物が営む光合成が化学反応の集積であり、化学的に理解できる現象であるという認識に立つことができ、このしくみを人工的に模倣しようとする研究が大きく展開されることになった^{2,3)}。

さて、光合成とは何かと問われたとき、生物学的には様々な解答が可能であろうが、最も広義には、「光合成とは、光のエネルギーによって、環境中の物質から還元力を取り出し、その還元力とエネルギーを用いて行なう代謝系を全て含む反応」となる⁴⁾。この定義は、生命現象とかかわる部分を除けば、光合成の化学的な理解とよく一致する。少し化学的に言い換えると、「光合成とは、光のエネルギーによって、正の自由エネルギー変化をもつ酸化還元過程を駆動させる光エネルギー変換システム」ということができる。緑色植物は光のエネルギーによって水と NADP^+ から NADPH をつくり、これを用いて二酸化炭素 CO_2 をグルコース $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ に還元している。しかし、上記の定義からもわかるように、生物にとって、あるいは化学の視点からも、光合成の意義はグルコースを生産することではなく、還元力の生産にある。化学的には、グルコースは二酸化炭素の還元体の一形態に過ぎない。光エネルギーを用いて二酸化炭素を、より簡単な構造をもつ他の還元体、たとえば一酸化炭素 CO 、メタノール CH_3OH 、メタン CH_4 といった物質に変換するシステムも、もちろん光合成である。あるいは、二酸化炭素の代わりに水を還元するシステムをつくれば、水から水素が得られる。これらの還元物質は私達の食料にはならないが、燃料や化学製品の原料として利用できることを考えると、このようなシステムを人工的に構築しようとする研究の重要性は明らかである。

人工光合成の考え方

光合成を「光のエネルギーによって、正の自由エネルギー変化をもつ酸化還元過程を駆動させる光エネルギー変換システム」と定義し、生命現象の本質的な理解と模倣によって、このようなシステムを人工的

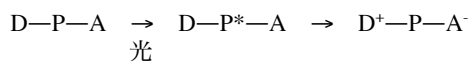
[‡] 解説特集「光エネルギーの新しい利用法と光合成研究の温故知新」

^{*} 連絡先 E-mail: cmura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

に構築しようとする研究を人工光合成に関する研究とよぼう。模倣といっても、生命のしくみをそのまま再現しようというのではなく、適切にモデル化し、化学者が普通に用いている分子を使って同じ機能をもつ反応系を構築するのである。そのためには、以下の分子システムをつくる必要がある。

1) 光吸収分子と光電変換反応系

光合成生物の光化学系では、光励起された反応中心から隣接する電子受容性分子に電子移動が起こり、ここで光エネルギーは電荷分離状態がもつエネルギーに変換される。人工光合成においても、このしくみは必須である。この光電変換反応系は、光吸収分子Pと電子受容性分子A、および電子供与性分子Dの三元系D-P-Aが基本的な構造となり、次式のエネルギー変換過程を実現する。



ここでP*は光吸収分子Pの励起状態を表す。この過程で重要なことは、電荷再結合過程を効果的に抑制し、電荷分離状態を長寿命化することである。光合成生物の光化学系では、電子伝達系によって電荷再結合過程が見事に抑制されている。

2) 酸化還元触媒反応系

光エネルギーによって生じた電荷分離状態を化学的に固定するということは、光電変換反応系で生じたA⁻で還元反応を行い、D⁺で酸化反応を行うということを意味する。このためには、多電子的な酸化反応、および還元反応を実現するための触媒が必要となる。光化学系Iでは鉄-硫黄クラスターを含むフェレドキシン-NADP⁺還元酵素によってNADP⁺の二電子還元反応が達成されている。一方、酸化側の光化学系IIでは、4個のマンガン原子から構成されるクラスターにより水の四電子酸化反応が実現している。人工光合成において、最終的に酸化還元反応による物質変換をめざすのであれば、光合成生物がもつこれらの優れた酵素に代わる触媒を開発しなければならない。

3) 反応系のシステム化

光合成生物では、光吸収と電子伝達にかかわる分

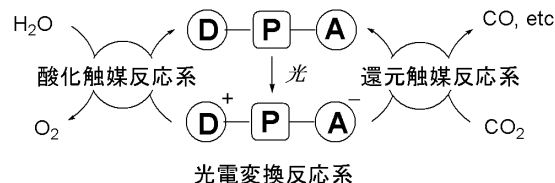


図1 人工光合成システムの概念図

光電変換反応系は、光吸収分子P、電子受容性分子A、および電子供与性分子Dから構成される。酸化触媒反応系、および還元触媒反応系は、光電変換反応系で生成したD⁺とA⁻を用いて、それぞれ多電子的な酸化反応、還元反応を触媒する。

子がタンパク質中に適切な距離と配向をもって固定され、これが光電変換が極めて効率よく行なわれる要因となっている。さらに、緑色植物では、光化学系Iと光化学系II、およびシクロクローム b_6/f 複合体がチラコイド膜に適切に配置され、それらが有機的に連結されることによって、水の酸化とNADPHの生産を可能にしている。人工光合成においても、上記の光電変換反応系と酸化還元触媒反応系をそれぞれ構築したうえで、さらにそれらを一つのシステムとして機能させるしくみが必要となる(図1)。

3. 人工光合成に関する研究の現状

前項で述べたとおり、光合成を人工的に模倣するといっても様々な要素があり、実現には相当の困難があることは想像に難くない。それでも人工光合成の研究は、物理化学、無機化学、有機化学といった化学のすべての分野にかかわる領域横断的な研究課題であること、さらに生命科学やエネルギー問題、環境問題と深い関連があることから、多くの化学者の興味を集めている。現在におけるこの分野の研究を概観してみよう。

表1には、人工光合成に関する研究と称されている様々な研究について、1) 光エネルギーをどのようなエネルギーに変換するか、および2) 人工光合成システムを構築するにあたりどのような物質を用いるか、の二つの観点から分類して示した。現在、実用化に向けた研究が進んでいる色素増感太陽電池や有機薄膜太陽電池も、電荷分離状態を経由する光エネルギー変換システムであるから、広い意味での人工光合成といえる。また、酸化チタン(IV)をはじめとする無機半導体を用いた光酸化還元反応も、光エネルギーを用いた物質変換システムであるから、人工光合成に関す

表1 人工光合成に関する研究の分類

		どんなエネルギーに変換するか	
		光電変換 (電気エネルギー)	物質変換 (化学エネルギー)
どんな物質を用いるか	無機半導体	色素増感太陽電池	本多-藤嶋効果 光触媒・水の可視光分解
	有機超構造分子	長寿命電荷分離状態の形成 超高速励起状態ダイナミクス	
	分子システム	有機薄膜太陽電池	二分子膜を用いた 電荷分離・物質変換

る研究に含めることができる。ただし、これらのシステムは、前項で述べた光合成生物が営む光合成を模倣したシステム、すなわち光電変換反応系と酸化還元触媒反応系を独立に構築し、それらを連結した光-化学エネルギー変換システムとはかなり様子が異なる。したがって、ここでは、表1に掲げた研究を“広義の人工光合成研究”とし、生物が営む光合成を模倣したシステムの構築に関する研究を“狭義の人工光合成研究”とよぶことにしよう。表1では、右下に位置する分子システムを用いた物質変換系に関する研究が、狭義の人工光合成研究に相当する。まず、無機半導体、および有機超構造分子を用いた“広義の人工光合成研究”について、研究の現状を簡単に紹介する。なお、本稿では光エネルギーによる物質変換に焦点を絞るため、色素増感太陽電池や有機薄膜太陽電池については述べない。

無機半導体を用いる水の光分解

無機半導体を用いた光-化学エネルギー変換の研究は、1972年に我が国の本多と藤嶋によって発見された本多-藤嶋効果に始まる⁵⁾。これは、酸化チタン(IV) TiO₂と白金Ptで電池を構成し、TiO₂側に光照射すると電流が流れ、TiO₂極から酸素が、Pt極から水素が発生するというものである。この研究は水の光分解が達成されたことから画期的な研究であったが、TiO₂が紫外光しか吸収しないこと、およびエネルギー変換効率が低いことから、このままでは水素の供給源として利用することはできなかった。

その後、可視光化とエネルギー変換効率の向上に関する研究が精力的

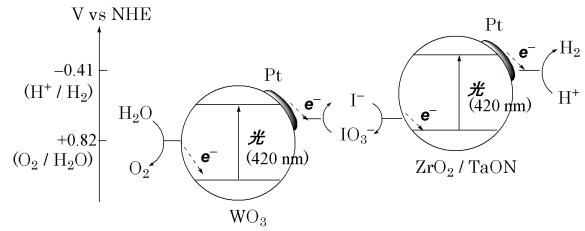


図2 堂免らによる2種類の無機半導体を用いる水の二段階可視光分解の模式図⁸⁾

に行なわれた^{6,7)}。最も注目されている研究の一つとして、2010年に堂免らは、WO₃とZnO₂/TaONの2種類の無機半導体微粒子を用いることによって、量子収率6.3%で水の二段階可視光分解を達成している (図2)⁸⁾。図からわかるように、この反応のエネルギースキームは、緑色植物の光合成におけるZ-スキームを連想させる点でも興味深い。

有機超構造分子を用いる電荷分離状態の長寿命化

この研究は、光吸収分子P、電子受容性分子A、および電子供与性分子Dを共有結合で連結した有機超構造分子D-P-Aを合成し、その励起状態のダイナミクスを超高速分光法によって解析するものである。これは、光合成生物の反応中心における基本構造D-P-Aが、電荷分離状態の形成と長寿命化において重要な役割を果たしていることの検証を意図した研究である。1989年にアリゾナ州立大のグループは、光吸収部位Pとしてポルフィリン、電子供与性部位Dとしてβ-カロテン、電子受容性部位Aとしてキノンを配した図3aのような分子を合成し、選択的にPを光励起することによる電荷分離状態 D⁺-P-A⁻の生成を直接観測した。D⁺-P-A⁻の生成量子収率は0.04、寿命は300

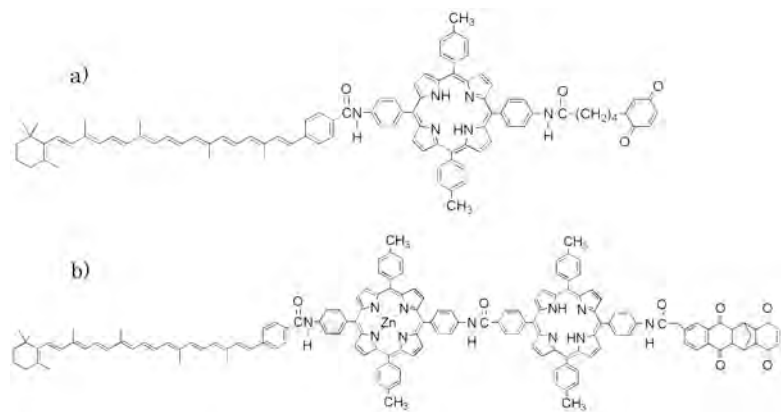


図3 光吸収分子P、電子受容性分子A、および電子供与性分子Dを共有結合で連結した有機超構造分子

a) 三元系分子D-P-A, b) 五元系分子D-P-A1-A2-A3

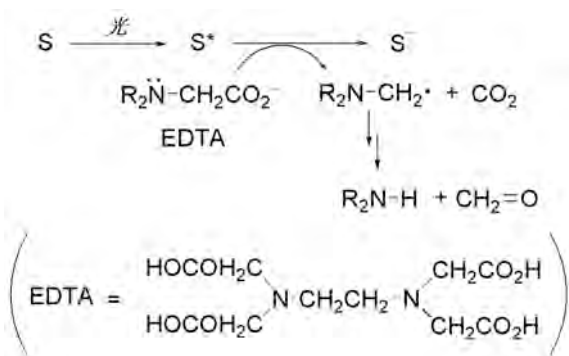


図4 犠牲試薬EDTAの構造と分解機構

Sは増感剤を表す。EDTAは光励起された増感剤S*に電子を与えると二酸化炭素を放出して不可逆的に分解する。これによってS⁻が電荷再結合反応を起こすことなく、長寿命化する。

nsであり、DあるいはAを連結して正電荷と負電荷を引き離すことにより、格段に電荷分離状態が長寿命化することが実証された⁹⁾。

その後、この研究は、電子受容性分子AとしてフラーレンC₆₀を用いることの有効性が示され、様々なD-P-C₆₀分子が合成されてその励起状態のダイナミクスが調べられた¹⁰⁾。また、さらに電子伝達系を延長した分子も合成され、たとえば、図3bに示す五元系分子D-P-A₁-A₂-A₃では、電荷分離状態D⁺-P-A₁-A₂-A₃⁻は55 μsと著しく長寿命化することが示された¹¹⁾。

酸化還元触媒反応系の開発

遷移金属の微粒子や遷移金属錯体分子には、水の還元反応や二酸化炭素の還元反応に対して触媒作用を示すものが知られている。このような触媒と適切な増感剤、すなわち光吸収分子と電子供与性分子を組み合わせることによって、光水素発生系^{12,13)}、あるいは二酸化炭素光還元系¹⁴⁾を構築する研究が広く行なわれている。ただし、この分野における多くの研究では、電子供与性分子として、電子を供与することによって不可逆に分解する、いわゆる“犠牲試薬”が用いられている。代表的な犠牲試薬であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の構造と分解機構の概略を図4に示す。EDTAは、その酸化体が速やかに不可逆的に分解する性質をもつ。これにより、増感剤還元体 S⁻ の電荷再結合過程が抑制され、S⁻を長寿命化することができる。犠牲

試薬を用いたS⁻の長寿命化は、還元触媒反応系の開発研究には有効な手段である。しかし、犠牲試薬の分解過程においてエネルギーが放出されることを考慮すると、犠牲試薬を用いた系は、反応系全体として光エネルギー変換システムとはよべないことに注意しなければならない。

白金PtやパラジウムPdの微粒子は水の還元反応の触媒作用をもつことが古くから知られており、1970年代後半には、可視光を吸収するルテニウムRu錯体を増感剤とし、メチルビオロゲン MV²⁺ を電子伝達体、Pt微粒子を触媒とする、犠牲試薬を用いた光水素発生系が報告されている(図5)^{12,13)}。最近では、一分子で触媒機能をもついわゆる分子触媒に関する研究が進み、水の還元反応に対して触媒作用をもつPt錯体¹⁵⁾や、二酸化炭素還元反応の触媒となるコバルトCo錯体¹⁴⁾などが報告されている。

このような還元触媒反応系の研究に比べて、酸化触媒反応系の研究はかなり遅れている。水の酸化反応に触媒作用を示す物質として、IrO₂やRuO₂の微粒子が知られている。最近になって、ルテニウムRuの複核錯体を分子触媒として用いる水の光酸化反応系がいくつか報告されるようになってきた¹⁶⁾。なお、酸化触媒反応系の研究では、電子を受容すると不可逆的に分解するペルオキソ二硫酸イオンS₂O₈²⁻やコバルト(III)錯体などが還元端の犠牲試薬として用いられる。

4. 二分子膜を反応場とする人工光合成の研究

すでに述べたように、光合成生物が行なっている光合成を人工的に模倣するためには、光電変換反応系と酸化還元触媒系を構築し、それらをシステム化しなければならない。このような狭義の人工光合成システムはまだ達成されていないばかりか、その研究もほとんど進んでいない。

まず、直面する問題は、光電変換反応系において、いかに電荷再結合過程を抑制し、電荷分離状態を長寿命化するかということである。犠牲試薬を用いずに、可逆的に酸化還元反応を行なう電子供与体を用

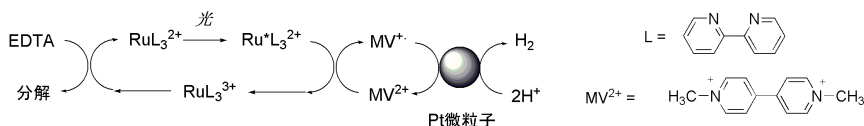


図5 ルテニウムRu錯体を光吸収分子、メチルビオロゲンMV²⁺を電子伝達体、Pt微粒子を触媒とする、犠牲試薬EDTAを電子供与体を用いた光水素発生系

いて長寿命の電荷分離状態を発生させるためには、やはり光合成生物がもつ反応中心のように方向性をもった電子移動を実現させ、正電荷と負電荷の距離を引き離すしくみが必要である。次に、考慮しなければならないことは、酸化還元触媒反応系と連結できるようなシステムの設計である。たとえば、図3に示したような有機超構造分子によって長寿命の電荷分離状態が実現したとしても、この分子を酸化還元触媒反応系と連結することは容易ではない。

これら二つの問題を同時に解決する方法の一つは、光合成生物がもつしくみをシステムごと模倣することである。緑色植物ではチラコイド膜に埋め込まれた光吸収分子や電子伝達系によって、全体として膜の内水相から外水相への方向性をもった電子移動を実現させ、膜の内側で水の酸化、膜の外側でNADPHの生産とカルビン回路を經由するCO₂の還元を行なっている。したがって、緑色植物が営む光合成の最も根源的な姿は、「光エネルギーによって膜の内側から外側へ正の自由エネルギー変化をもつ電子移動を行なわせ、生じた電荷分離状態と、膜内外のそれぞれに配した触媒によって酸化還元反応を実現する過程」ということができる。このような考察に基づいて進められている研究が、二分子膜を反応場とする人工光合成の研究である。

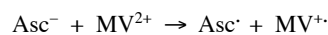
ベシクルを反応場とする光誘起電子輸送

光合成生物がもつチラコイド膜を模倣した人工光合成の反応場には、ベシクルとよばれる球状脂質二分子膜を用いることができる。生体分子であるリン脂質をはじめ、ベシクルを形成する両親媒性分子は多数知られている¹⁷⁾。両親媒性分子を水に投じて超音波を照射すると、数千の脂質分子が自己集合化して、数十nm程度の大きさをもつ球状二分子膜が形成され

る(図6)。ベシクルの内水相は厚さ ~5 nm程度の疎水性二分子膜によって外水相と隔てられている。疎水性二分子膜は物質透過性に選択性をもち、水などの電氣的に中性な分子は比較的容易に透過することができるが、イオンの透過は極めて遅い¹⁸⁾。したがって、ベシクルの内水相から外水相に電子を輸送し、膜の内外に電荷分離状態を形成させることができれば、疎水性二分子膜が電荷再結合反応の障壁になり、電荷分離状態が長寿命化することが期待できる。

光合成の人工的な模倣を志向したベシクルを反応場とする光誘起電子輸送反応の研究は、1970年代後半から行なわれている。1978年にカルピンは、長鎖アルキル基を導入してベシクル疎水場に取り込まれるように設計したルテニウムRu錯体を光吸収分子として、内水相に封じたEDTAから外水相のMV²⁺へと、正の自由エネルギー変化をもつ電子移動が光化学的に進行することを示した¹⁹⁾。この報告は、犠牲試薬EDTAを用いていることから、光エネルギー変換系としての意義は薄いだが、ベシクル疎水場を通して内水相から外水相へと光化学的に電子を輸送できることを示した点では画期的であった。

これ以降、ベシクルを反応場とする様々な光誘起電子輸送反応系が報告されたが^{20,21)}、2000年代前半に我々のグループでは、可逆的な酸化還元過程を行なうアスコルビン酸イオンAsc⁻を電子供与性分子とする光誘起電子輸送反応系の構築に成功した(図7)^{22,23)}。光照射(360 nm)によって、リン脂質からなるベシクル疎水場に取り込ませた光吸収分子ピレン誘導体PyXを励起すると、Asc⁻から電子移動が起こり、内水相付近にピレンラジカルアニオンPyX⁻が発生する。PyX⁻の電子は電子交換によって疎水場を横断し、外水相付近にあるPyXに輸送され、最終的にメチルビオロゲンMV²⁺をその一電子還元体MV⁺へと還元する。MV⁺は波長 604 nm に吸収極大をもつ鮮やかな青色をもち、この吸収を手掛かりに光誘起電子輸送反応の進行を追跡することができる。酸素を除いておけば、MV⁺は安定に存在する。この系で進行する全体の反応は次式で示される。



この過程は正の自由エネルギー変化(ΔG = + 12.7 kcal mol⁻¹)をもつ電子移動過程であり、光照射しな

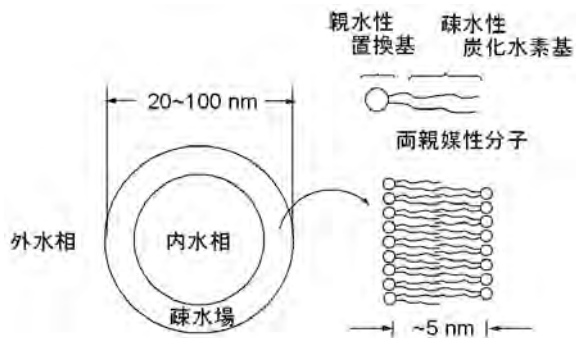


図6 ベシクルの構造

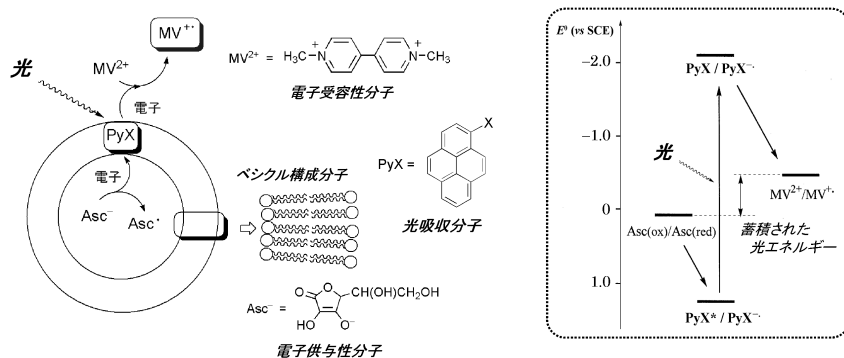


図7 ベシクルを反応場とする光誘起電子輸送反応系の模式図とエネルギー図

光照射によって、内水相の電子供与性分子から外水相の電子受容性分子へと正の自由エネルギー変化 ($\Delta G = + 12.7 \text{ kcal mol}^{-1}$) をもつ電子移動反応が進行し、光エネルギーは電荷分離状態のもつエネルギーとして蓄積される。

ければ進行しない。また、ベシクルという反応場がなければ、励起されたPyXに対するAsc⁻からの電子移動によりPyX⁻とAsc⁻が生成しても、直ちに電荷再結合過程が進行するため、MV^{•+}は蓄積しない。この電子移動過程が観測されたのは、ベシクルを反応場とすることによって、内水相から外水相へと方向性をもった電子移動過程が実現したためである。

これまでの光合成に関する考察に照らして考えると、図7に示した光誘起電子輸送反応システムは、光合成の光電変換反応を適切にモデル化した系であることがわかる。さらに、ベシクル界面は触媒分子を固定する足がかりとなるので、ベシクルは“狭義の人工光合成研究”のために適した反応場であるといえる。

人工光合成への展開

図7に示したベシクルを反応場とする光誘起電子輸送システムは、光合成の基本的な要素を満たしているが、以下の点において人工光合成システムとして不完全である。

まず、ピレン誘導体は可視光領域に吸収がないため、この光誘起電子輸送システムは可視光では駆動しないことがあげられる。次に、この電子輸送反応の量子収率は、現在のところ最適な反応条件でも0.1程度であり、量子収率1で進行する光合成生物の光化学系における光電変換反応系には遠く及ばない。第三に、MV^{•+}やAsc[•]は一電子還元反応、あるいは一電子酸化反応によって生じた不安定な化学種である。人工光合成を実現する、すなわち光エネルギーを化学エネルギーとして固定するためには、この光誘起電子輸

送反応系を酸化還元触媒反応系と連結しなければならない。

我々のグループでは、これらの点を改良して、この光誘起電子輸送反応系を、光合成を人工的に模倣した高効率な光エネルギー変換システムへと進化させるための研究を継続している。反応系の高効率化と高機能化の研究は、図8に示したような四つの観点に基づいて行なわれている。

以下にそれぞれについて、最近の成果を簡単に述べる。

1) 増感剤

ピレン誘導体PyXは有機光化学における一重項増感剤としてしばしば用いられており^{24,25}、一重項励起状態の寿命が比較的長いこと、光物理的性質や光化学的反応性がよく知られていること、また様々な置換基の導入が可能で系統的な研究が可能である、といった利点をもつ。様々な置換基XをもつPyXについて、ベシクルを反応場とする光誘起電子輸送反応の増感剤としての性能をMV^{•+}の生成初速度により比較し

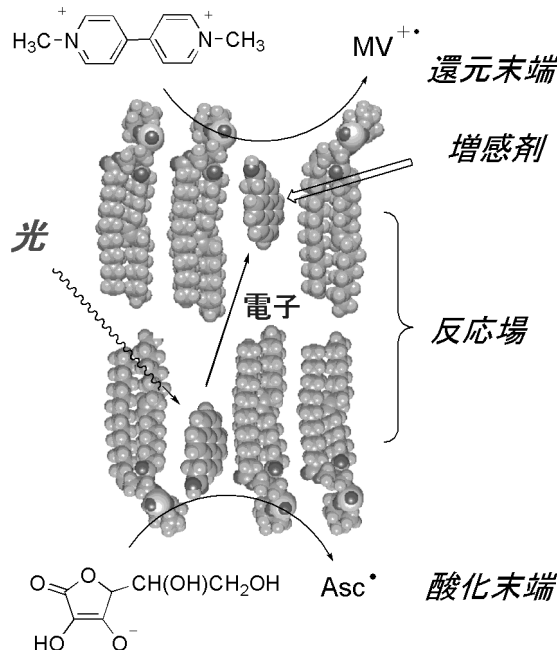


図8 ベシクルを反応場とする光誘起電子輸送反応の模式図とその高効率化・高機能化のための改良点

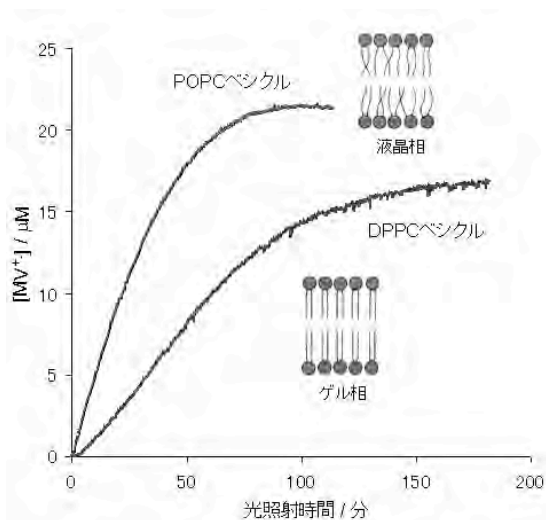


図9 ベシクルを反応場とする光誘起電子輸送反応における光照射に伴うMV²⁺還元体の蓄積 (増感剤: PyCH₂OH)

た。その結果、ピレン自身 (X = H) ではMV⁺の生成が見られず、電子輸送反応の増感剤として機能するためには、Xとして-CH₂CO₂Hや-CH₂OHなどの親水性置換基が必要であることが判明した。この結果は、図8に示すように、内外水相の電子供与性分子、電子受容性分子とPyXとの電子移動反応過程はベシクル界面で進行し、この過程を効率よく進めるためには、増感剤をベシクル界面に固定するための親水性置換基が必要であることを意味している。また、吸収の長波長化についても検討を行なっている。PyXのXとしてピレン環と共役できるカルボニル基C=Oをもつ置換基を導入すると、吸収端を400 nm付近まで伸ばすことができるが、可視光化のためには、増感剤の分子骨格を基本的に変更する必要がある。

2) 反応場

ベシクルを構成するリン脂質の構造を変えるとベシクルの性質が変化し、それに伴って光誘起電子輸送反応の効率も変化する。特に、リン脂質の疎水基の構造を変えると、ベシクルのゲル-液晶相転移温度が変化し、疎水場の流動性を制御することができる²⁶⁾。たとえば、疎水基として2本の長鎖アルキル基をもつリン脂質DPPCのゲル-液晶相転移温度は41°Cであり、室温では疎水場は流

動性の低いゲル状態にある。一方、2本の疎水基のうち1本に二重結合をもつリン脂質POPCでは、ゲル-液晶相転移温度は-3°Cに低下し、疎水場は液晶状態にあり、脂質分子は横方向に自由に流動している。このようなリン脂質の構造の、光誘起電子輸送効率に対する影響を調べるため、同一の増感剤を用いて、DPPCおよびPOPCベシクルを反応場に用いて電子輸送反応を行った。図9に示すように、光誘起電子輸送反応は、ベシクル疎水場がほとんど流動性のないDPPCベシクル中でも、流動性の高いPOPCベシクル中と同程度に進行した。この結果は、増感剤が横方向に移動できないDPPCでは、ベシクルが形成される際に増感剤の集合化が起り、図8に示すように増感剤が内外で接近した位置に存在する領域が形成され、その領域で電子輸送反応が進行していることを示唆している。この領域は、光合成生物のチラコイド膜に存在する光化学系タンパク質複合体に相当する部分が自然に形成されたものと見ることができ、興味深い。

3) 還元末端

前述したとおり、MV²⁺の一電子還元体MV⁺は、Pt微粒子を触媒とする水の還元反応の電子伝達体として機能する。したがって、原理的には、ベシクルを反応場とする光誘起電子輸送反応系にPt微粒子を添加すれば、光水素発生系が完成する。しかし、物事はそう簡単ではない。Pt微粒子は一般に、凝集を防ぐために界面活性剤で保護されているので、ベシクルを溶解させる作用をもつ界面活性剤を共存させることは電子輸送反応系の効率を著しく低下させることになる。また、光誘起電子輸送系では、内水相にAsc⁻を高濃度に溶かすために、ベシクル分散液のイオン強度がかなり高くなっている。このような条件ではPt微粒子は容

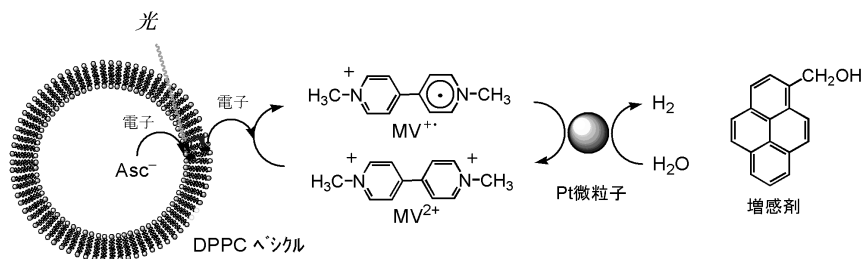


図10 ベシクルを反応場とする光誘起電子輸送反応系と、白金微粒子を用いる還元触媒反応系の連結による光水素発生システム

内水相 [AscNa] = 0.20 M, 外水相 [MV²⁺] = 20 mM, [Pt] = 10 mM, Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)

易に凝集してしまう。

このような困難を克服するために、Pt微粒子の調製法、内水相に封じるAsc⁻の濃度、さらに緩衝液の濃度やpHを様々に検討した結果、少量ながら水素が発生する条件を見出すことができた(図10)。この系は、犠牲試薬ではなく、可逆的に酸化還元反応を行なう電子供与体から供給された電子と光エネルギーを用いて、水を水素に還元する光エネルギー変換システムといえることができる。推定される水素発生の量子収率は0.16%程度であり、まだ改良を重ねる必要がある。現在、Pt微粒子の代わりに分子触媒を用いる光水素発生系を検討している。

4) 酸化末端

我々の光誘起電子輸送反応系は、アスコルビン酸イオンAsc⁻以外にも、システインなど可逆的に酸化還元反応を行なう電子供与性分子を用いることができる。電子供与性分子の酸化電位とMV²⁺還元体生成初速度とは相関があり、電子供与性が高いものほど生成初速度が大きくなる傾向が見られた。

4. おわりに

東京大学教養学部では3年ほど前から、生命環境科学系の佐藤直樹先生の主宰による“光合成の科学”と題する全学自由ゼミナールが行なわれている。生命科学の分野で光合成研究の最先端におられる先生方が、交代で様々な角度から光合成を解説するユニークなゼミナールである。生命科学の先生方の寛容なお心から、門外漢である筆者もそのゼミナールに加えていただき、1コマ分、人工光合成の話をしている。最初は、生命科学に興味のある学生にとって人工光合成など、所詮、化学者の遊びに過ぎないと受け取られるのではないかと危惧していた。しかし、講義後の感想を見ると、彼らの多くは、この研究の意義や面白さをちゃんと理解してくれていることがわかって安堵した。人工光合成の話聴いて、改めて生命の偉大さを認識したという感想もあれば、是非、将来このような研究をしてみたいという学生もいた。

筆者の願いとして、光エネルギー変換システムの人工的な構築は人類に課せられた課題であること、そしてその優れた手本が我々の身のまわりの植物にあることを、できるだけ多くの若い人々に知って欲しいと思う。太陽光エネルギーを用いて水から水素を取り

出すシステム、あるいは二酸化炭素をメタノールに還元するシステム、その実用化はたとえ何百年先になろうとも、化学者たちは、人工光合成に関する研究の歩みを止めてはならないと思う。

Received September 30, 2010, Accepted November 04, 2010, Published December 31, 2010

引用文献

1. 垣谷俊昭・三室 守 (2000) 電子と生命 pp 17-111, 共立出版.
2. Collings, F., and Critchley, E. Ed., (2005) *Artificial Photosynthesis*, Wiley.
3. Hammarström, L., and Hammes-Schiffer, S. Ed., (2009) *Acc. Chem. Res.* 42, pp 1859-2029.
4. 園池公毅 (2008) 光合成とは何か pp 221-227, 講談社.
5. Fujishima, A., and Honda, K. (1972) Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode, *Nature* 238, 37-38.
6. Bard, A. J., and Fox, M. A. (1995) Artificial photosynthesis: Solar splitting of water to hydrogen and oxygen, *Acc. Chem. Res.* 28, 141-145.
7. Kudo, A., and Miseki, Y. (2009) Heterogeneous photocatalyst materials for water splitting, *Chem. Soc. Rev.* 38, 253-278.
8. Maeda, K., Higashi, M., Lu, D., Abe, R., and Domen, K. (2010) Efficient nonsacrificial water splitting through two-step photoexcitation by visible light using a modified oxynitride as a hydrogen evolution photocatalyst, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5858-5868.
9. Gust, D., Moore, T. A., and Moore, A. L. (1993) Molecular mimicry of photosynthetic energy and electron transfer, *Acc. Chem. Res.* 26, 198-205.
10. Liddell, P. A., Kuciauskas, D., Sumida, J. P., Nash, B., Nguyen, D., Moore, A. L., Moore, T. A., and Gust, D. (1997) Photoinduced charge separation and charge recombination to a triplet state in a carotene-porphyrin-fullerene triad, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1400-1405.
11. Gust, D., Moore, T. E., Moore, A. L., Macpherson, A. N., Lopez, J. M., DeGraziano, J. M., Gouni, E., Bittersmann, E., Seely, G. R., Gao, F., Nieman, R. A., Ma, X. C., Demanche, L. J., Luttrull, D. K., Lee, S.-J., and Kerrigan, P. K. (1993) Photoinduced electron and energy transfer in molecular pentads, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11141-11152.
12. Kirch, M., Lehn, J.-M., and Sauvage, J.-P. (1979) Hydrogen generation by visible light irradiation of aqueous solutions of metal complexes. An approach to the photochemical conversion and storage of solar energy, *Helv. Chim. Acta* 62, 1345.
13. Kiwi, J., and Grätzel, M. (1979) Protection, size

- factors, and reaction dynamics of colloidal redox catalysts mediating light induced hydrogen evolution from water, *J. Am. Chem. Soc.* *101*, 7214-7217.
14. Matsuoka, S., Yamamoto, K., Ogata, T., Kusaba, M., Nakashima, N., Fujita, E., and Yanagida, S. (1993) Efficient and selective electron mediation of cobalt complexes with cyclam and related macrocycles in the *p*-terphenyl-catalyzed photoreduction of CO₂, *J. Am. Chem. Soc.* *115*, 601-609.
 15. Sakai, K., and Ozawa, H. (2007) Homogeneous catalysis of platinum(II) complexes in photochemical hydrogen production from water, *Coord. Chem. Rev.* *251*, 2753-2766.
 16. Xu, Y., Duan, L., Tong, L., Åkermark, B., and Sun L. (2010) Visible light-driven water oxidation catalyzed by a highly efficient dinuclear ruthenium complex, *Chem. Commun.* *46*, 6506-6508.
 17. Kunitake, T. (1992) Synthetic bilayer membranes: Molecular design, self-organization, and application, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *31*, 709-726.
 18. 葛生道生 (1996) 生体膜-生命の基本形を形づくるもの pp 1-25, 吉岡書店.
 19. Ford, W. E., Otovos, J. W., and Calvin M. (1978) Photosensitized electron transport across phospholipids vesicle walls, *Nature* *274*, 507-508.
 20. Robinson, J. N., and Cole-Hamilton D. J. (1991) Electron transfer across vesicle bilayers, *Chem. Soc. Rev.* *20*, 49-94. b)
 21. Lymar, S. V., Parmon, V. N., and Zamaraev, K. I. (1991) Photoinduced electron transfer across membranes, *Topics in Current Chemistry* *159*, 1-65.
 22. Yoshida, A., Harada, A., Mizushima, T., and Murata, S. (2003) Electron transport across vesicle bilayers sensitized by pyrenes: Design and syntheses of unsymmetrically substituted bifunctional pyrenes acting as excellent sensitizers, *Chem. Lett.* *32*, 68-69.
 23. Mizushima, T., Yoshida, A., Harada, A., Yoneda, Y., Minatani, T., and Murata, S. (2006) Pyrene-sensitized electron transport across vesicle bilayers: dependence of transport efficiency on pyrene substituents, *Org. Biomol. Chem.* *4*, 4336-4344.
 24. Murata, S., Nakatsuji, R., and Tomioka, H. (1995) Mechanistic studies of pyrene-sensitized decomposition of *p*-butylphenyl azide: Generation of nitrene radical anion through sensitizer-mediated electron transfer from amines to the azide, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 793-799.
 25. Ikeda, S., Murata, S., Ishii, K., and Hamaguchi, H. (2000) Mechanistic studies of the pyrene-sensitized photodecomposition of *N*-phenylglycine: Acceleration of the photodecomposition by the addition of an electron acceptor, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* *73*, 2783-2792.
 26. 大西俊一 (1993) 生体膜の動的構造 [第2版] pp 67-88, 東京大学出版会.

Photosynthesis from the Viewpoint of Chemistry
- Overview of Studies on Artificial Photosynthesis -

Shigeru Murata*

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

解説

光化学系 I — P700を中心に‡

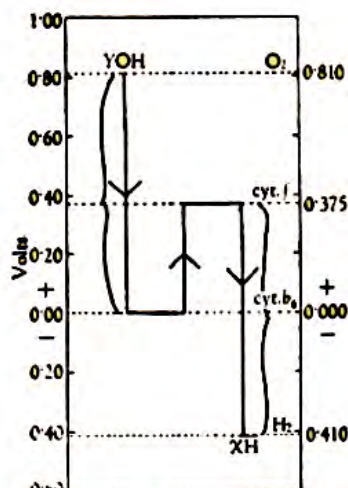
埼玉大学 名誉教授
檜山 哲夫*

1. 光化学系Iのこと

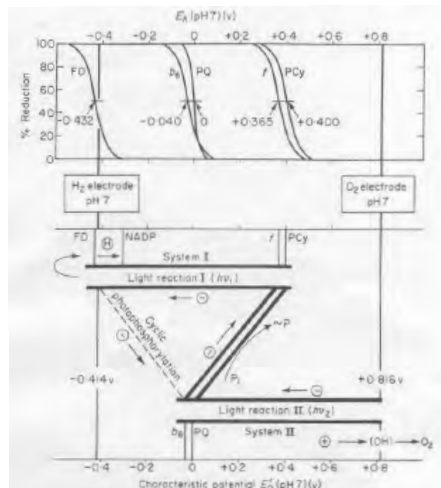
2つの光化学系という概念は、1960年代初めイギリスのHillとBendallやオランダのDuysensらが提唱した。Calvinが暗反応でノーベル化学賞をもらった頃のことである。これより前（1956年）に、巧妙な実験によって、光量子が最初にひきおこす反応はある種の色素（P₇₀₀と命名）の光酸化であるという光化学反応中心色素の概念を最初に提唱したのはオランダのKokである¹⁾。2つの光化学系説が提唱されたとき、KokのP₇₀₀

は光化学系I（以後PSIと省略）に帰属された。ちなみにHill-Bendallが1960年に最初に2つの光化学系として出した模式は番号がなくZ型でもなかった。番号は、1961年に紅藻で実験したオランダのDuysensが長波長側で励起される系を1、短波長側を2と定義したのが最初で、のち1965年の総説でHillは、I, IIとローマ数字に変えてZ型のZ-Schemeが登場した。Photosystemという語が作られ、形も現在のN型（Arnon式）に変わっていった（図1）。

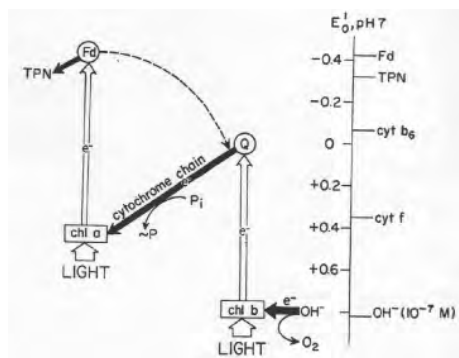
私が光合成の世界に入り込んだのは1967年秋だから、もうこうした概念はすっかり定着していた。この当時盛んにPSIの反応中心活性をもつ複合体を葉緑体のチラコイド膜から単離調製することが試みられていた。材料は高等植物（主にホウレンソウ）の葉緑体やシアノバクテリア（ランソウ）



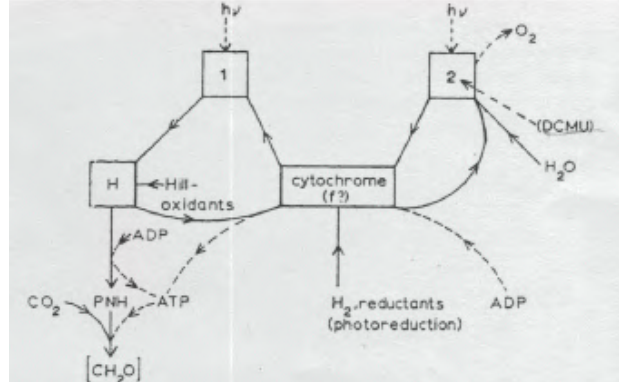
Hill & Bendall (1960) *Nature* 186, 136.



Hill (1965) *Essays in Biochem.* 1, 121.



Arnon et al. (1963) *Nature* 199, 1247.



Duysens (1961) *Nature* 190, 510.

図1

‡ 解説特集「光エネルギーの新しい利用法と光合成研究の温故知新」

* 連絡先 E-mail: thiyama@mail.saitama-u.ac.jp

で、東工大で柴田和雄教授と、院生だった小川晃男さんがSDS-PAGEを使った先駆的研究を始めた。そのうちチラコイド膜を可溶化するため、TritonX-100やジギトニンのようなおだやかな非イオン系界面活性剤が使われるようになった。これらは今日ではクロロフィルなどの色素と多くの機能性低分子がタンパク質（サブユニット）に結合したもので構成される複合体であることが分かっているが、当時はもっぱら明反応（部分反応）の測定に使われていた。私が1969年に移ったオハイオの C.F.Kettering 研究所はこうした研究の中心のひとつで、丁度小川さんもここで活躍していた。電子供与体としてアスコルビン酸などをプラストシアニンまたは適当な人工電子伝達物質（インドフェノール類、メチレンジアミン類等）と共に与えると、鉄イオウタンパク質であるフェレドキシンおよび FNR (Ferredoxin-NADP reductase: フェレドキシンNADP還元酵素) の存在下で、NADPを光還元する能力があることまで当時分かっていた。ちなみにこれは主として1960年代初めにBerkeleyのArnon研究室にいた新勝光さんなどの日本人研究者の業績である（数年後に私もこのArnon研に行き、彼の最後のPostDocになったのだが）。またメチルビオローゲン (methylviologen. もともと除草剤パラコートとして開発された) が、フェレドキシンの代わりに電子を受け取る人工電子受容体として働くことも当時知られていた。それから50年近くたち、現在は、結晶解析で立体構造が解明され、大小様々の10数種のタンパク質サブユニットと、集光用の大量のクロロフィル分子の他、P₇₀₀、ビタミンK₁、と3種の鉄イオウクラスターで構成されていることが分かっている (図7)。詳しくは総説を読みたい^{2,4)}。

2. 私が光化学系Iを知るまで

私は大学院を出てポストドクとしてアメリカに渡るまで、光合成についてほとんど何も知らなかった。教養学部で磯谷遥先生に解糖系とクレブスサイクルを教わり、生化学に目覚めて、卒論では農学部森林化学教室で木材腐朽菌をやり、大学院は応用微生物研究所で水島昭二さんの指導のもと、乳酸菌を使った「解糖系の定量的解析」を手伝ったり、北原覚雄教授（当時乳酸菌の世界的権威）が1930年代に発見したラセマーゼ（現在の乳酸ラセマーゼ Lactate racemase）の精製というテーマで、乳酸菌を培養しては破碎して抽出、硫酸分画、カラムクロマトなどを来る日も来る日も繰

り返し、体力だけが勝負で、学部時代勉強しないで山歩きばかりしていた私にはよく向いた仕事だった。それでも世界で初めて乳酸ラセマーゼを精製したり⁵⁾、論文を3つほど書いて、福井作蔵・柳田友道両先生のお世話で何とか学位を頂いた。

その当時、隣の研究室で柳田先生が酸素電極を組み立てて居られたり、当時名大から早大理工学部に移って来たばかりの大西劉教授の研究室で、手作り測定器を使ったり、もともと小学生の頃から好きだった電気や機械いじりの虫がうごめき始め、生化学に電子工学を取り入れた分野を勉強したくなった。

当時、こうした研究者としてアメリカのBritton Chanceという人が最も有名であった。この人は学部では電気工学を専攻し大学院で物理化学をやり、その後はミトコンドリアの酸化還元・リン酸化反応を独自に開発したユニークな2波長分光装置などで測定し次々に成果を発表していて、この分野は彼の独壇場であった。「蛇に怖じず」やら若気の至りやらで課程修了前年(1966)の夏に手紙を出すのと何とすぐ返事をもらい、曲折はあったが翌年の秋にはPhiladelphiaの彼の研究室に入ってしまった。研究室といっても実際はJohnson Research Foundationというペンシルバニア大学の医学部附属の研究所である。現地では皆JFとよんでいた。JFは7階建ての建物の5階と6階を占めているだけで大して広くないが、そこに何と150人もの人々がひしめいていた。

さて曲折の一つは行く直前（その年の夏）東京で開催された国際生化学会議にChance教授がやってきてついでに「面接」されてしまったことである。彼の宿舎だった日本橋の旅館にはもう一人の日本人の志望者が来ていて一緒に面接を受けた。この人の英会話は文法も発音もひどいものなのに良くしゃべり気弱な私はかすんでしまった。結局2人とも採用されたのだが、私の会話力ではと気をきかせてくれたようで、現地へ行ってみると日本人ばかり居る研究室へまわされた。そこは助教授と2人のテクニシャンだけでこじんまりしていて大変良い雰囲気だった。唯一の欠点は、日本語が通じてしまうので、うっかりしていると朝から晩まで日本語ばかり。廊下からときどき英語が聞こえてくると「あっそうか私はアメリカにいるのだ！」なんて感じで、なかなか英語が上達しない。この助教授がまだ30代の新進気鋭で既に当時から世界的に著名だった西村光雄先生である。

もともと光合成には興味があったので、それは良かったのだが、話はそう単純ではなかった。机とイスは西村研究室にあったが、すぐ隣のJohn Williamson教授の研究室に「派遣」されてしまった。私の大学院での研究は、前述のようにラセマーゼだが、初めは研究室の助手だった水島昭二氏の当時日本では評判だった「解糖系の定量的解析」という研究シリーズの一部をお手伝いした。これは当時世界的によく始まりかけていた代謝調節研究のはしりともいえる。水島さんはまもなくこれを止めてしまい、当時先端の生体膜研究に移行してゆくのだが、私の行ったChanceの研究所の1部門が動物の肝臓を使って代謝調節の研究をやっていた。これを主宰しているJohn Williamson氏はイギリス人だが、小柄で研究所の当時非常に沢山居た日本人たちは、チビジョンとか陰で呼んでなぜか嫌っていた。私のそれまで出したPaperは全て代謝関係だったから、チビジョンに引っ張り込まれたのだろう。

そこでアッセーに使う大腸菌の酵素（何であったか記憶にない）の精製を手伝った。日本人たちには同情されたが、私は初めて英語を使って研究を手伝う快い緊張感で結構楽しかった。同じ頃入ってきた日系人のポストドクが化学屋で酵素は全く分からないということで技術指導もした。どうもWilliamsonは英語のできない私に「配慮」したつもりもあったかもしれない。幸いこの人は3世で全く日本語は話せなかったもので、待望の英語の勉強には大いに役だった。私の指導が良かったのか1月くらいで目的を達して多少の信用を得、たぶん西村先生ががんばってくれたのだろう。西村研に戻れた。しかし、まだ直ぐには光合成に入れなかった。

Chance先生にとって光合成は道楽で、本業はミトコンドリアの電子伝達・酸化的リン酸化ということもあって、最初は光合成とは直接関係ない別の仕事を与えられた。西村先生も相当迷惑だったろう。私は微生物屋（Microbiologist）ということになっていたもので、当時物理屋のポストドクが扱っていてあまりうまく行っていなかった単細胞緑藻 *Chlamydomonas* の変異株（Pale green mutant）というのを与えられ、結構苦労した。色素構成がおかしくなった変異株で光合成をやれないどころか「光に弱く」なっていて、暗いところで炭素源を与えて育てる。それでも比較的短期間になんとか菌体がとれるようになった。Chance先生の目的はミトコンドリアをとることで、ふつう藻類では葉

緑体が多くミトコンドリアを分けてとるのは至難だが、葉緑体が少ない変異株ならやりやすいだろうとの目論見である。当時研究所では様々な生物からミトコンドリアをとっている人たちが世界中から招かれてきていた。阪大からRacker研究室を経てこられた大西智子博士（実は先述の大西劉氏の奥様）は、これも当時難しかった酵母のミトコンドリアをやっておられたから、道具はそろっていた。だがどうしても画分から緑色が抜けず、結局粗膜破片標品（要するにつぶしただけ）の状態で多少残っている光合成系電子伝達について、いろいろな測定をやることになった。

幸いなことにChance先生は忙しくて（その理由は後で述べるが）、あまりうるさく言わず西村先生の薦めで、先生の持っているChanceの考案した2波長分光光度計（JFの附属工場で作されたもの）で測定をやってみた。西村先生はもっぱら紅色光合成細菌を使って当時最先端のリン酸化の研究をされていたので、それに関係する試薬がいろいろあり、使ってみなさいと言われるままに、入れては起こる変化を次々に調べていった。結果が出るとはじめて勉強して、またやってみるということを繰り返しているうち、何とかPSIのまわりのサイクリック電子伝達系として話がまとまってきた^{6,7)}。結局この研究所にいた2年間で3回ほど学会発表もしたし、3,4報の論文も出した。1969年秋、西村先生は九大教授に赴任され帰国。私はまた紆余曲折を経てまもなく当時光合成研究のメッカの一つだったオハイオのCharles F. Kettering Research Laboratoryというところに移った。

Ketteringという人は数々の重要な発明をして自動車会社（GM）の幹部になった人だが、一面のトウモロコシに囲まれたオハイオの片田舎に育ち、植物に強い興味を持っていたそうだ。引退後、私財を投じて故郷に光合成研究のための施設をつくったのがこの中西部オハイオ州の真中辺にある人口5千の小さな村Yellow Springsにある研究所である。Kettering財団では、Sloan-Kettering研究所の方が有名であるが同じ人物である。ここで私は初めて「PSIの初期反応」というテーマを与えられた。またまた紆余曲折（といっても研究室のお家騒動で私が行ったときは終わっていたのだが）のお陰でいきなり当時まだ珍しかったルビーレーザーの20ナノ秒パルス光で励起してマイクロ秒領域で吸光度の時間変化を測定する閃光分光法（Flash photolysis）装置をあてがわれた。当時生物試料用のこ

うした装置は世界中に3つくらいしかなかった。ひとつは以前いたChanceの研究所、もう一つはベルリンのH. T. Wittのところにあったが、このOhioの装置は全く世に知られていなかった。というのは私が行ったときようやく完成したばかりだったからだ。後述のようにこれを作った人は、私の着く直前にポストとケンカして出ていってしまったので、Chance研からやって来た私が面倒を見るはめになった。ポスのBacon Keという人は、現在の中華人民共和国が成立する寸前にアメリカに逃れて、苦学して物理化学でPhDをとった苦勞人である。一見中国の「大人」だが、実は怒りっぽくひがみっぽい人格的に問題がある人で、私が行く直前に他にも1人のポストドクと2人のスタッフが逃げ出していたことが来てみて初めてわかった。

さてレーザー実験だが、私もChanceの所でやっているのをちょっと見ただけだったので、一から始めた。あれやこれややっているうちに半年ほどでQスイッチルビーレーザーなるものをひとりで分解掃除組み立てまで出来るようになった。シアノバクテリア *Plectonema* の生細胞を使った仕事をなんとかまとめて、翌年春にシンポジウムで発表、論文にもしたが⁸⁾、なにしろレーザーはお守りが大変。マイクロ秒領域の測定もノイズがひどく、何となくミリ秒のところばかり見るようになってしまった。幸い論文も一つ出したし、レーザー技術者(?)としてもポスの信用を得て、あまりうるさく言ってくるなくなったのを幸いに、扱いやすいキセノン閃光を使って、のんびりとミリ秒領域を見ていた。

3. 光化学系 I にのめりこむ

ポスのもともとの命令は、 P_{700} とそれに電子を供給していると考えられていたシトクロム f の酸化還元の様子を生きた細胞で直接分光学的に観察して証明せよというものであった。ポスのアイデアは、その当時評判高かった Bill Parson の研究のまねである。Parsonは、Chance研でレーザーを使って光合成細菌でシトクロム c と P_{700} に相当する P_{870} との関係をきれいに証明していた。同じことを緑色植物のモデルと考えられるシアノバクテリア(当時はランソウといった)の生細胞を使ってやってみろというわけである。結局Parsonの実験のようにきれいなデータは出なかったが、とにかくまとめて書いたのが上記論文である⁸⁾。そんなこともあって、もともと苦手な生きた細胞をやめ、つぶして膜部分だけにしたもので系を単純化した上、レーザー実

験はお休みしてキセノンフラッシュを使うミリ秒領域に移った。

さて当時の私は今考えると、それまで2年間曲がりなりにも光合成の世界に居たにしては実にお粗末だった。もともと勉強嫌いで、直接今やっている実験の周囲しか勉強しない怠け者だから当然であろう。 P_{700} なんて術語も、ちょっと光合成を勉強していれば常識の単語のはずだが、不勉強な私は一から始めなければならなかった。いざ集中して勉強してみると、この P_{700} なるもの実はそれほどよく分かっていないのではないかと思い始めた。前述のように、オランダのKokという物理化学者が1956年ころに最初に発表したのが、この天才の一連の論文は簡単な結果の記述と考察が主で、実に読みにくい。方法も回転円盤を使って間欠照射をくりかえし、短時間で起こる速い変化を測定しようとする巧妙なものだ¹⁾。そこにある結論はしかしながら50年後の今でもほとんど正しい。その後1960年代にはベルリンのWittが登場する。この人も天才で、イギリスのNorrishとPorterが始めた閃光分光法(1967年ノーベル賞)を光合成研究用に大幅に改良した装置を駆使して、次々に独断的な論文を出している。私が始めた1969年は、もう彼のこの種の研究の末期である。彼の論文の記述はKokに輪をかけたすごい「簡潔」なものながら同じく結論は今日でもほとんど正しい。ただし「ほとんど」というところがミソである。私のオハイオでの仕事はWittの追試から始まった。マネといった方が正しい。論文といっても、Kokは2つくらいしかないし、後は全部Wittであるから、数は知れている。その代わりしっかりと読んだ。

一方、ポスのKe氏は、実は電気はダメで配線図も読めない。にもかかわらず研究所の電気工作室の専属技師2人と、自分の研究室に雇った軍隊上がりのテクニシャンをうまく使ってWittの装置を再現してしまった(実際は私の前任者がほとんどやったらしいことが後で分かったが)。豊富な研究費があったとはいえ、完全に人まかせで Signal averager (加算平均装置)を備えた世界に2つしかない装置を作らせたのは一つの才能である。ちなみにChance研の装置は、レーザーこそ使っているものもって原始的な加算平均できない低感度なもので、変化が大きくて測定の楽な光合成細菌にしか使えなかった。私の前任者の Don Gorman 君は私とほとんど同じくらいの歳の人で、Harvardの学部では数学専攻だったが Levine のところ(当時 Levine

の *Chlamydomonas* の数々の光合成変異株は有名だった) で遺伝学の PhD をとった秀才である。エレクトロニクスは私と同じアマチュアだったようだが、良くまとまった装置に出来上がっていた (この shy で好人物のユダヤ人は、遂に Ke 氏の下にいたたまれず、私と入れ替わりに他の研究室に引き抜かれた)。

レーザーは1960年にメイマンが発明したルビーレーザーであって、私を使い始めた1969年にはこれを作って売っているベンチャー企業が既にいくつもあった。パルス幅を 20 ナノ秒に集中 (Giant pulse 発生) させるため Q スイッチというものがついていた。後にはずっと扱いやすい Pockel cell が使われるようになったが、当時は回転ミラー式というやつで、エアタービン駆動の小さな鏡が数万 rpm でサイレンのような大騒音を発して回る。ルビーレーザーの本体は、6-7 ミリ径で長さ 10 センチくらいのピンク色のルビー棒の両端面を完全に近い平行に磨きあげたものである。回転ミラーの反対側の面だけハーフミラーにしてある。まわりをかこむピカピカに磨いた金属壁は楕円形断面で、ルビー棒は焦点に配置され、もうひとつの焦点にはキセノン閃光管がある。まさに高校の数学と物理で習った通り、キセノンからの強力な白色閃光は、ルビーに集中し大量の光量子がたたき込まれる。この pumping により、いわゆる coherent な単色光 (レーザー光線) が、ハーフミラーの面から飛び出してくる。

大事なことは、回転ミラーとルビーの両端の 3 つの面が完全に平行になるよう調整することである。閃光管からは 1 回の閃光で大変なエネルギーが出るため、ルビーの温度が上がらないよう水冷式になっていた。この水はルビーと直ぐそばに位置する閃光管を直接冷やす。数千ボルトの電圧が常にかかっている閃光管が水に漬かっている恐ろしさ。循環水はイオン交換樹脂を通しながらイオンフリーに保つ。純水は完全なる絶縁体であることを改めて認識した。それでも毎日使っていると 1 月位で僅かながらも汚れてきて出力が下がってくる。そこで分解掃除が必要になる。組み立て終わると、ヘリウムネオンレーザーを使って光軸の再調整 (三つの面を平行にすること) を完全にやらないと絶対光らない。うまくいくようになるのに数ヶ月かかった。面白かったが実に大変なので簡単なキセノンフラッシュにすら替えした。

4. P₇₀₀ と P₄₃₀

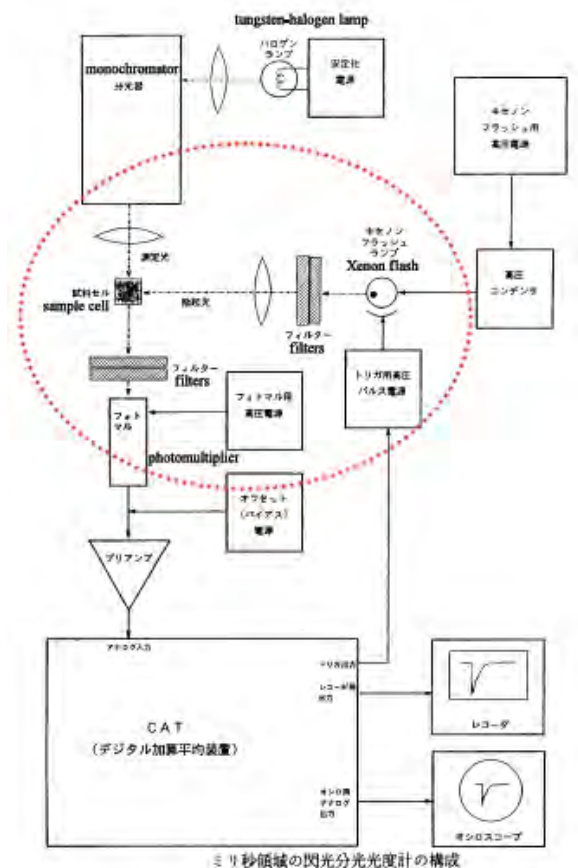


図2 An instrument set-up for measuring flash-induced absorbance changes in msec range¹⁰⁾.

測定装置を図2で簡単に説明する。複雑に見えるが楕円で囲んだ部分が肝心である。試料には弱い単色光 (測定光) が常時当たっている。透過した光が検出器 (フォトマル) で電流に変換されその強さがモニターされる。測定光と直角の方向から強い作用光 (この場合レーザーやキセノンランプの閃光) が試料に照射される。閃光分光法では、非常に短い時間内に十分に強い光をあて光化学反応中心分子 (色素) を励起し、その結果起こる光化学反応を吸光度の時間変化として測定し解析する。「非常に短い」というのは時間変化測定の時間スケールに比較してという意味だし、「十分に強い」というのは色素分子のほとんど全部を励起できる強さ (単位時間に単位断面積を通過する光量子の数) という意味である。フォトマルにはフィルターがかけられ測定光だけが当たるようにし、強い閃光の影響を全く受けないようにする。閃光の方もフィルターを通す。このフィルターの相補的 (補色的) 組み合わせは非常に重要である。測定は閃光をあてる少し前から開始される。全てデジタル式の Signal averager

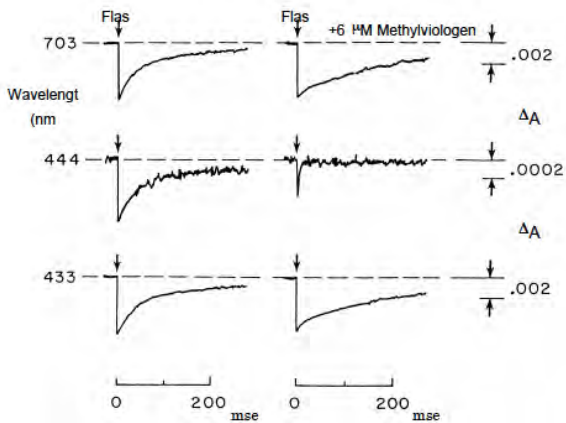


図3 Flash-induced absorbance changes at 703 nm (upper), 444 nm (middle) and 433 nm (lower), in the absence (left) and the presence (right) of methyl viologen. Photosystem I particles from spinach (D144) was used for the experiment.

(Computer for Averaging Transient: CATともいう積算記録装置)でタイミングが制御され、加算平均されて測定記録される。

図3は実際の測定例である。矢印のところで閃光が発せられる。その前のトレースが暗所での吸光度を示している。一番下の段のトレース(測定光は433 nm、閃光は700 nm)を見ると、閃光があたった瞬間、トレースは下に一気に下がる。吸光度が低くなったことを示す。この変化は除々にもとに戻っていく。強い短い閃光で瞬間的に吸光度が下がり、次に暗所でももとに戻ってゆく過渡現象(緩和現象)を測定しているわけである。こうした装置はその後カリフォルニアに移ってから無謀にも自分で作りはじめた。丁度最初のマイコンキットが発売されたこの時期にSilicon Valleyに住んでいてこのAltairという元祖PCキットを買ったりしたのだが、結局TTLロジックICを組み合わせてCATを作ってしまった。当時PCは残念ながら使いこなせなかった。最後に出来た1台を埼玉大学に持ち帰った⁹⁻¹¹⁾。ちなみにCATは1970年当時アメリカでは数社から市販されていて2-3千ドルだった。軍事・宇宙・民生などに需要があったのだろう。

もとにもどる。はじめはシアノバクテリアをつぶして膜部分だけにしたものを試料にしていろいろやっていた。当時、先にKetteringに来ていて様々なPSI粒子を発表していた小川晃男さんが残っていた製品も使った。電子供与剤としてよく使われるアスコルビン酸とTMPD (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine)だけを入れた試料に閃光を当てて、ミリ秒領域での吸光度時間変化を見ていた。PSIの電子受容体として先に述べたメチルビオローゲン(MV)が当時知られていたわけだが、不勉強な私は気づかず入れていなかった。実験結果が出てから文献を読むことが多い私がWittの報告を読んでいてMVのことに気づいた。あわてて入れてみた。そうしたら劇的な変化が起こった。

再び図3の下の段をご覧ください。これは430 nm付近での吸光度変化である。P₇₀₀は光で可逆的に酸化される色素であって、酸化型と還元型の差スペクトルには700 nmと430 nm付近にピーク(酸化型から還元型を減じた差スペクトルでは谷—図5参照)があるということはKokの時代から分かっていた。700 nmでは蛍光による干渉が問題になる。だから蛍光のない430 nm付近を測定していたわけだ。MVを入れる前は、左のトレースのように、半減期30ミリ秒くらいで戻ってゆく。そこへMVを入れたら、ずっと遅くなり半減期は100ミリ秒以上になった(右トレース)。これは妙である。今測定しているのはP₇₀₀のはずであるから、閃光で最初起こる吸光度の減少はその酸化(光酸化)を意味する。戻りは暗所における再還元である。この還元は、予め加えてある電子供与体(アスコルビン酸と

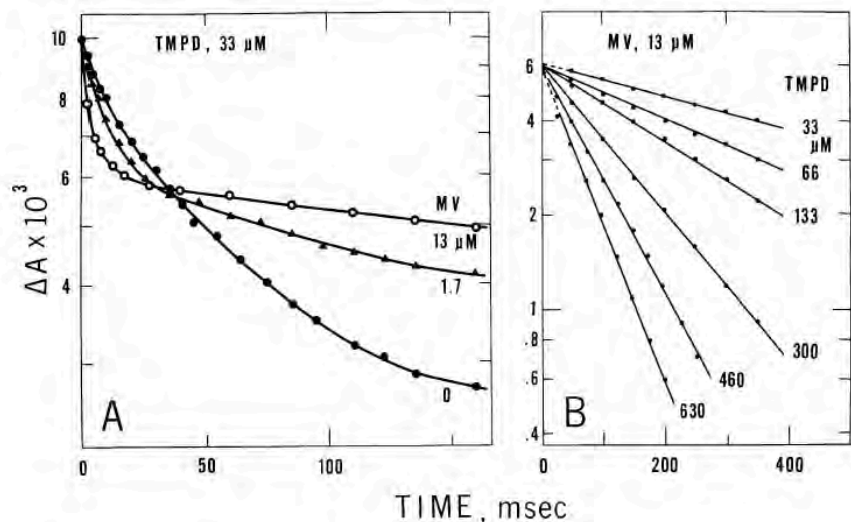


図4 Flash-induced absorbance changes replotted on semi-logarithmic chart paper. Details are described in the text and the original report¹²⁾.

TMPD) による化学的還元である。とするとMVのような電子受容体(弱い酸化剤)が、この戻りに影響を与えしかも遅くするというのはどういうことか? P₇₀₀の化学的還元反応は、人工電子供与体が十分量ある状態の擬一次反応だとWittは論文で書いている。このトレースを片対数方眼紙にプロットして見てようやく事態が分かり始めた(図4)。

MVなしのコントロールは予想に反して直線にならない(左図の●)。MVをたっぷり入れると直線になったが、50ミリ秒以下の初めの時期に非常に速い減衰を示す別のフェーズ(相)が見えてきた(左図の○)。

直線になった相に着目して時間スケールを長くし還元剤TMPDの濃度を変えて見た(図4右)。すると、勾配が濃度に比例する典型的な擬一次反応の様相が現れた。直線相と速い相について測定光の波長を変えて別々にプロットしたのが図4である。

大きい●が速い相、小さい●が直線相である。直線相はKokが最初に報告しその後Wittが測定して発表しているP₇₀₀の差スペクトルとよく似ているし、擬一次反応の様相から、純粋のP₇₀₀の差スペクトルであると見た。図5は実は少し後に非常に慎重に測定して得た結果で、吸光係数とともに今でも標準として引用されているもので¹⁴⁾、最初はまだ少し荒っぽいものだったが¹³⁾定性的には傾向は同じである。

さて、速い相(大きい●)は430 nm付近に山がある以外はかなり違うスペクトルである。特にP₇₀₀の特長である700 nm付近には全く変化がない。さらに重要なことに気づいた。P₇₀₀にはいくつかの等吸収点(Isosbestic point: 分光学用語で差スペクトルがゼロになる波長)があることをWittが報告している。私が

改めて精密に測定したこのスペクトルでは 407 nmと445 nmの付近であるが、そこでこの速い相は決してゼロにならなくてはつきりと吸収変化がある(図5)。したがってP₇₀₀とは別のものであると考えた。この時点でこの未知のものを極小点が430 nm付近にあることからP₄₃₀と命名した。さらにP₇₀₀の等吸収点で測定すればこの速い相だけの減衰特性が見られるはずである。ちょっと戻って、図3(左)を見ていただく。驚くことにMVのないとき703 nm, 444 nm, 433 nmの減衰特性が見事に同じであった。MVを入れると、P₇₀₀だけ見ているはずの703 nmでは減衰が遅くなるだけだが(上段右)、433 nmでは速いものと遅いものと2相になり、大部分をしめる遅い相は703 nmにおけるのと同じ減衰特性であった(下段右)。ところが444 nmでは全部が速くなってしまった(中段右)。

MVは無色であるが還元型は青色で、もう一つの等吸収点である575 nmでは吸収がある。これを利用してMVの還元そのものを測定した結果が図6である。MVを少しだけ入れると575 nmでの吸収増加が444 nmでの減衰と同じ様相で観測された(右)。別の実験でMV濃度がある程度以上になると対数プロットで直線になるし勾配は濃度に比例することも確認した。P₇₀₀とTMPDの関係と同じ(擬一次反応)であるが、TMPDが還元剤であるのに対してMVは酸化剤であるから、P₇₀₀の暗所における再還元と同時にP₄₃₀の暗所における再酸化を見ていることになる。ということはP₇₀₀が光酸化されると同時にP₄₃₀は光還元されているということになる。

どうもこれは当時までいろいろな物質がいろいろな人によって提唱されていたが証拠不十分で、未だナゾとされていた Primary acceptor (初期電子受容体:

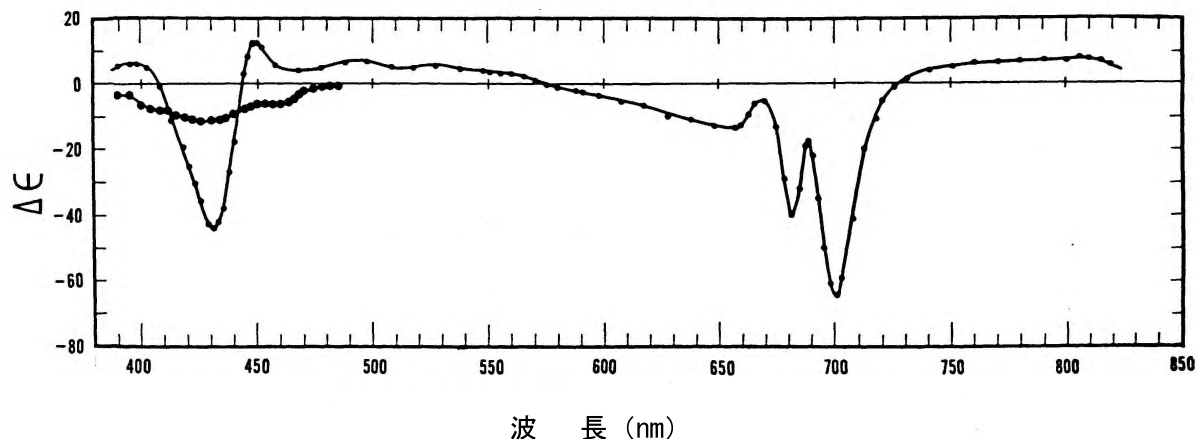


図5 Flash-induced light-minus-dark difference spectra of P₇₀₀ and P₄₃₀¹⁴⁾.

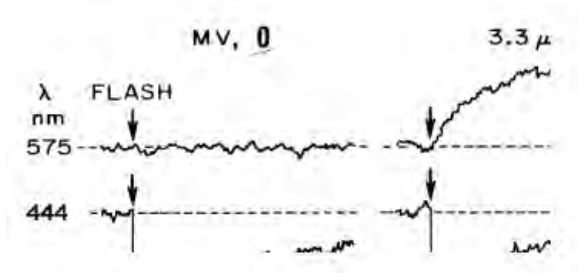


図6 Flash-induced absorbance changes at 575 nm (upper) and 444 nm (lower), in the absence (left) and the presence (right) of methyl viologen.

Photosystem I particles from spinach (D144) was used for the experiment.

P₇₀₀が酸化され飛び出す電子を最初に受け取る分子) そのものではないか。ちなみにMVのないときの減衰曲線は逆数プロットで直線になった。これを古典的二次反応でP₄₃₀が直接P₇₀₀を還元している様子を表していると説明した。ここまでは一人でコツコツ考えながら実験していて、そのうちに事の重大さに気づきだんだん興奮しつつあったのだが、数ヶ月間ボスに何も報告していなかった。

1970年秋のある日、遂に「何やってる」と聞かれました。私のPrimary acceptor 仮説を話したが信用しない。その後これらの現象がホウレンソウと他の数種のシアノバクテリアでもあることを確認したり、他にいくつもしつこく実験して証拠を固めたところで、まだ理解していないボスを差し置いて1970年の末ごろ研究所内でセミナーを開き、数十人の前で発表して評判になった。そして翌1971年2月には、アメリカ生物物理学会で初めて公表した。その間にいくつも論文を書いた。いろいろ曲折があったが速報は5月に *Proc. NAS* に出せた¹²⁾。6月にイタリアであった第2回国際光合成会議で世界に発表したが、何となく皆あつけにとられていた感じだった¹³⁾。Chance先生だけはうれしそうに握手を求めにきてくれたが、Witt氏は私が近づいたらソッポを向いて行ってしまったのは今でも覚えている。ちなみにChanceとWittは当時誰でも知る犬猿の仲で元の弟子の仕事を喜ぶChance氏をWitt氏は見ている不快だったこともあるが、後で私と同年代のWitt研の人たちと話してわかったことだが、自分たちが見落としていたので、してやられたという悔しさが強かったらしい。

Witt vs. Chance の話はリン酸化で有名な Mitchell (1978年ノーベル賞) だの緩和現象解析のNorrish,

Porter, Eigen (1967年ノーベル賞) だのが絡んでいて複雑である。私が最初にJFに来た1967年秋、ほっておかれた理由のひとつは、当時Chance先生は毎日スウェーデンからの電話を待っていてピリピリしていたからと聞いた。ずっと後で仲良くなったスウェーデンの老教授(授賞委員)の話では、それまで毎夏休暇はスウェーデンでヨット遊び(彼は大金持ちの上何とヨットでオリンピック金メダリスト)をし、露骨に受賞運動していたとかで、委員会の不興を買ったらしい。1966年夏に私がもらった彼の手紙がスウェーデンから来た理由がその時初めて分かった。結局この年は前記3人しかこの分野では受賞できなかった。Witt氏はMitchell説を支持する論文を発表していて、当時反Mitchell陣営の急先鋒だったChance先生がお好きなのははずはない。なお、50代半ばだったお二人とも最近まで現役で活躍していてWitt氏などは後述のようにPSIの結晶解析をNatureに発表している。再び閑話休題。

なぜWitt研が見逃したのか。Signal averagingを最初にノイズだらけの生物試料のFlash photolysis 実験に採用したのはWittである。Chance研はレーザで一発勝負だったので信号の強いバクテリアしか使えなかった。しかしこの積算平均法は両刃の剣である。くりかえし実験の積算であるから一回一回全て同じ現象が起こらないと何を平均しているのか分からず失敗する。P₇₀₀の光酸化と暗所での再還元は可逆反応で実験(閃光照射)を繰り返す前に完全に初期状態に戻っている必要がある。要するに閃光と閃光の間隔は十分長くとらねばならない。Wittはこのことも十分理解していて彼のあるPaperには正しい説明(言い訳?)とともにつぶれて極く小さくなってしまったP₇₀₀の閃光実験のトレースが堂々と載せられている。愚直な私は「なるほどそれなら」ときちんと間隔をとって実験した結果Wittが十分間隔をとらずつぶしてしまったP₄₃₀を見つけたというわけである。先述の「Wittはほとんど正しかった」というのはこのことである。

P₄₃₀とP₇₀₀に関しては、この時期やった測定結果で埼玉大学に来てから書いたもの¹⁶⁾も含めて多数の論文を発表できた¹²⁻¹⁶⁾。中でもP₇₀₀の吸光係数(extinction coefficient)の論文¹⁴⁾は未だに引用される私のベストセラーである。これについてもちょっと触れたい。

ある日、実験を終えてサンプルを装置にいたままひとまず帰宅した。この研究所では朝9時から5時までとなっていて、研究者ですら5時以降ほとんど誰も働

かない。私も歩いて5分のところに住み5時に帰宅、ただ夕食後にもどり大体10時くらいまで仕事をしていた。この日もどつてみると放置していたキュベットが青く変色している。エッと思ったが、そのままFlashをあてて測定したら、妙なKineticsになった。いろいろ検討した結果、この青い色はTMPDの酸化物(Wurster's blue)でMVの代わりにP₄₃₀の電子受容体になっていると結論した。Wurster's blueの分子吸光係数が分かればP₄₃₀とそしてなにより重要なP₇₀₀の吸光係数が分かるはずとその後いろいろ工夫して実験測定を繰り返した結果が上記論文¹⁴⁾というわけである。アスコルビン酸・TMPDというのは電子伝達系の実験で定番の電子供与体である。その夜は夕食後すぐには実験室に戻らず村に唯一の映画館で当時流行のヒッピー映画を見てからだったので実験にもどるのが遅くなってしまい、長時間空気に晒されたキュベット上層のアスコルビン酸が酸化しTMPDが青くなってしまったのだ。ちょっとしたSerendipityである。そこでこれを再現するため、アスコルビン酸を入れずさらにちょっと空気を吹き込んだりして本来還元剤のTMPDのごく一部を酸化型にするというtrickyな実験をした。

こんなことでいい気になって初めて行ったヨーロッパでの会議の後、2週間も観光旅行しているうちに、Ke氏は一足先に帰ってきて、その秋シカゴで開催予定の光合成シンポジウムの講演を申し込んだりいろいろ動きはじめていた。

5. 地下実験とEPRなど

私はこの年(1971年)の秋、Ke氏のもとを去り、かねてから招かれていたカーネギー研究所植物部門(Carnegie Institution of Washington Department of Plant Biology)という西海岸カリフォルニアのスタンフォード大学構内にあるやはり民間の研究所に移っていた。これは旧知の村田紀夫さんのお世話であった。鉄鋼王カーネギーが「学問の進歩などに役立てよ」と遺言して残した莫大な財産で運用されるこの財団は首都ワシントンに本部があり、東部には、地震学・地学関係や動物発生学それから有名なCold Spring Harborなどいくつかの研究所をもつが、植物研究所だけ西部にある。所長のC. S. French(知る人ぞ知るフレンチプレスの発明者)の自由にやれとの雰囲気でも本当にノンビリしてしまい、ここに3年も居てコンピュータとエレクトロニクスばかり勉強していた。一方私がCarnegieに移つ

てもなく開かれたシカゴのシンポジウムではKe氏が集まっていた全米の光合成研究者を前にしてこの「大発見」を公表した。当時アメリカは不景気でヨーロッパの国際会議に出た人が少なかつたせいか、私の「業績」は乗っ取られたみたいになった。さらに彼は翌1972年には単著でBBAにReviewまで書いてしまい、読むほうとしては便利なこともあって、遂に私のOriginalより遥に頻繁に引用されることとなった。再び閑話休題。

この時期このSilicon Valleyとよばれるマイクロプロセッサが生まれた地でいろいろ体験できて実に楽しかった¹⁵⁾。実験は昼間スタッフのDave Forkと二人で、彼が長年私のようなVisitorたちと組んできた装置でやった。これは地下にある2人入ると一杯になってしまう小部屋で、扉を閉めると真っ暗になるのでレンズなどの光学系とフォトマルまでが全てむき出しで部屋全体が分光光度計になっている。ここで息を潜めて実験した。私の直前には村田紀夫さんがForkとここで仕事をしていた沢山論文を出しており、彼から聞いてはいたが実物を見てびっくりした。

私はここでKeのところでも勉強してきたGorman君の閃光回路など組んだりCATを買ってもらったりしてP₇₀₀の実験を続ける準備をしたのだが、相変わらずのポストドクの身分ではやりにくい。そのうちFrench先生に気に入られてスタッフになれそうになったとき先生は定年で所長をやめ、新しい所長は光合成屋ではなかったこともあってこの話はフイになった。

スタンフォード大学はサンフランシスコの南に位置するが湾を隔てて車で1時間位東北へ行った所にカリフォルニア大学のバークレー校がある。そこには有名なCalvin(ノーベル賞ばかりで恐縮)が居たのだが、もうひとり光合成の有名人D.I. Arnon氏がいて私を招いてくれた。彼の研究室は1960年代にPSIの出口でフェレドキシンや酵素が関与するNADP還元の生化学的メカニズムを確立したことで有名だが、当時は「3つの光化学系説」というのに固執していた(この説はつい最近までときどき浮上ってきていたが¹⁷⁾、彼が1994年に85歳で現役のまま亡くなられた後、消えた)。他に直ぐ行くところもなかったし、シリコンバレーを離れたくなかつたし、Berkeleyというヒッピーの聖地にも興味があつたので1974年秋に引っ越した。

ここでの身分は、Research Biochemist といって大学の職員録にも載っていて、10年以上居る人はザラで単

なるポストドクではない身分らしかったが、決して終身雇用ではなかった。給料はまた大分上がったけど、仕事は2人の相棒と3人で2波長分光光度計でArnon説を支持するデータを出すことだった。1人でやれる実験をなぜ3人がかりでやっていたのか今でも分からない。2波長分光光度計は、前述のようにChanceが開発し、私が以前西村研で使っていたものである。Arnon研のはその後Amincoという会社が商品化したものである。これが私の招かれた理由の一つと分かった。

毎朝午前中一杯、教授と4人で午後の実験の計画のためディスカッションをやる。私の行くまではこの2人がArnon先生の指示をただ聞くだけで話は直ぐ終わっていたようだが、私はArnon先生の「3つの光化学系説」が嫌いなのですぐタテ突く。この説はP₇₀₀なんか要らないという話で、吸光係数まで出している私の気に入るはずはない。当然議論は長引く。当時既に60過ぎのArnon先生はさすがに大物で30半ばの若造の話の腹を立てず辛抱強く聞いてはくれた。だが絶対自説は曲げない。私の英語は以前怒りっぽいKe氏との白熱した議論 (debate) でかなりうまくなっていたはずだが、ここで一段と磨きがかかった。なにしろ毎日である。ちなみにKe氏もそうだったがArnonも18歳になってアメリカに逃げてきたユダヤ人で、どちらも苦勞人だからしっかりと英語を話し且つ書ける。

さて午後からの実験は5時前には終わらせ相棒2人は帰宅。その後私はこの機械で自由に自分の考えた実験をやった。Arnon研には当時同世代で同じ身分のポストドクが5、6人さらにAssistant Professor (MalkinやKnaffなど皆私と同じくらいの歳) が数人、皆Arnon先生独裁のもとに仕事をやっていた。毎朝皆で仕事前にキャンパスの裏にあるコーヒー屋 (今のStarbucksの前身みたいなもの) に抜け出す。ここで1時間ほど先生の悪口を中心としたおしゃべりでウサをはらす。私の英語ではとてもこのアメリカ人たちの会話に入れなかったけどリスニングの練習になった。その中でときどき出てくる語句にUnderground experimentというのがあった。聞いているうちどうやら核兵器の地下実験ではなく、ボスに無断でコッソリやる実験のことらしいと分かった。私もこうして地下実験をやり、P₇₀₀に関する論文を2つ書いた。それを同じパークレーキャンパスのCalvin研でしゃべった時、私としては不得意な数学を少し使った内容のため、そこの物理化学者につかれた以外はおおむね受けがよかったので、Arnon

先生の名前も付けて完成品の原稿を渡したのだけれど一向に見てくれない。しつこく催促して結局1年後にようやく発表できた^{18,19)}。

研究費は潤沢にあり、私は職員としていろいろな設備の購入で業者との交渉やら人を雇う交渉までやるようになっていた。Arnonは、ついにEPR (電子スピン共鳴装置: ESR) にまで手を出し、ドイツのBruker社のものを一番安かったという理由で買ってしまった。先生は機械に全く弱いので、私がお守りをするという前提であった。ところが来て見るとまだ製品化されたばかりの試作品みたいな代物。次々に部品はすっ飛び、そのたびにサービスマンが東海岸のアメリカ支社から飛行機でやってくる。この人は物理のPhDをもつ実に有能なアメリカ人ですっかり仲良くなりずいぶん勉強になった。Bruker社は後にNMRで超有名になるが当時は駆け出しの会社だったのだ。

液体ヘリウムが使い放題だったこともあって、イギリス製の熟練を要する微妙なクライオスタットも1年近くで使いこなすまでになった。今度は分光計に代わって高価なこの機器で再び「3つの光化学系説」の証明にいそしんだわけである。装置が充分使いこなせるようになった頃また夜の「地下実験」を始めた。

話は戻るが1971年にP₄₃₀を発表したとき同じ*Proc. NAS*誌の1号前にやはりPSIの初期受容体として「膜結合型フェレドキシン」が発表されていた²¹⁾。実はこれをやったのはArnon研のMalkinで、Calvin研のBeardenと一緒にやった「地下実験」なのだ。液体ヘリウム温度で始めて観測できるこの信号は、世間一般も私自身もP₄₃₀と同じものとして議論してはいたが、状況証拠でしかなかった。余談だがMalkinはすでにこの頃Arnonとはあまり口もきかなくなっていて、悪口渦巻くコーヒー店の集まりはMalkinの主催であった。だから彼は新しいEPRに触らせてもらえなかった。

私の方は知らん顔で、ここへ来て私も低温EPRを使えるようになったので可視分光法と直接に比較してもっとはっきりした結論を出そうと思ったのである。分光実験の方は、カーネギー研究所で私が以前作った装置をDave Forkが未だ使っていたので、そこで一緒にやることにした。こちらは夜というわけにいかないので、何度か休暇をとり100マイルを車ですっ飛ばして出かけていった。

パークレーとカーネギーでやっていたこの地下実験の結果を発表したのは、結局帰国して埼玉大学に来て

からだった²⁰⁾。結論は「P₄₃₀はComponent X (A₂)である」というものであった。Component Xとは最初に見つかった「膜結合フェレドキシン」(Malkin-Beardenが発見、後にCenter Aと命名された)とは別の鉄イオウクラスターで、数年後にカナダのBoltonらが発表したものである。A₂というのは又別の研究者(Sauerら)が分光学的に観測して命名したもので、私が彼らの記載しているスペクトルをプロットし直して差スペクトルを出して見るとP₄₃₀そっくりになるのだ²²⁾。ところが彼らは考察でA₂と命名しP₄₃₀とは別物として扱っているが、その理由を以下に説明する。

Component Xは現在 FeS_x と省略される鉄イオウクラスターで、大サブユニット (PsaA/PsaB) に結合しているものだが、非常に強い還元状態(低い酸化還元電位)で初めて見えてくるEPR信号(g = 1.76付近)として発見された。Center A や少し後で Evans の見つけた Center B はもっと高い電位で還元されることから、同じく非常に低い電位で初めて見えてくるA₂を、より初期の受容体として位置づけた。ただしComponent X 発見以前にたてられた Ke の P₄₃₀=Center A/B 説をそのまま受け入れてしまったため、P₄₃₀=A₂(Component X)の可能性を見逃してしまった。私がやった実験を簡単に説明する。もともとP₄₃₀は閃光によって現れ瞬時に消える過渡現象として記述された。これと液体窒素で凍結して液体ヘリウム温度で初めて観測できるCenterだのComponentだのとそのまま関連付けるのは不可能である。そこで連続光照射でP₄₃₀を観測することを試みた。結果としてP₄₃₀の暗所での再酸化が氷温で非常に遅くなることを見つけ、時系列的にSamplingして瞬時に凍結後EPR測定してKineticsを描いた。これを連続分光測定の結果と比較して430nmに山のあるスペクトルを示すのは Center A でも Center B でもなくComponent X (A₂)であると結論した(図7)。

この説は当時から無視され、最近Ke氏の書いた回顧録²³⁾でも未だ完全に無視されている。埼玉大学にき

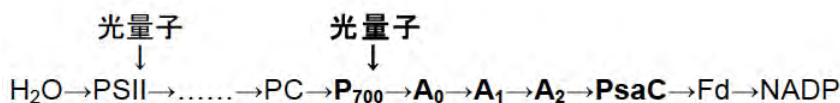


図7 PSI付近を中心とした電子の流れ

PC, プラストシヤニン; A₀, 多分PsaA/Bに結合したChlorophyll a; A₁, Vitamin K₁; A₂, PsaA/Bに結合した4Fe4Sの鉄イオウクラスター; Component Xと同じ; PsaC, このタンパク質に結合した2個の4Fe4Sクラスターが実際の電子伝達体。Center A/Bと同じと考えられる; Fd, 2Fe2Sクラスター; フェレドキシン。

てからも大日向光君(現日本化薬)らがかんばって実験してくれた結果、これをサポートする結果が出て論文も書いているのだが²⁴⁾。

6. PSI複合体、サブユニットそしてクロロフィル a' など

そうこうしているうち、1978年暮れに九大の西村先生から電話を頂き、埼玉大学に行かないかとのこと。埼玉大学の鈴木浩一先生からもお電話を頂いた。滞米生活も12年近くなり、両親も老いてきたことだし有り難くお受けして翌年4月帰国、助教授として赴任。未だ独身ながら既に齢40だった。

さて埼玉大学で最初の数年は当時できたばかりの基生研(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)の客員部門で藤田善彦教授の助教授を兼任して頻りに愛知県岡崎市に出張していた。基生研では、未だ何もない新しい研究室に藤田先生と三室守助手と一緒に次々と機械を購入し据え付けた。パークレーでの2年間の経験を買われ、低温EPRが購入されることになったとき、機種選定の段階で隣の生理研の某教授とうっかりアメリカ式debateをやってしまい、この医学系の大ボスの大変なお怒りを買ってしまったことが後で分かった。結局この方は当時自分の使っていたNMRがBruker製で、コンピュータが共通で使えるからとの理由だったらしいが、結局、Bruker EPRが入ってきた。Berkeleyではクライオスタットも含めて4万ドル(当時2千万円未満)払ったとArnon先生から聞いていたのだが、Bruker日本支社の最初の見積りは本体だけで4千万円というのもびっくり。機械も外観こそ多少代わったが、相変わらず初期故障の連続。ただここでも日本人の若いサービスの人が有能で、1年かけてとにかく日本ではじめてのバイオ用液体ヘリウム低温EPRを立ち上げた²⁵⁾。そのあと私の後任の伊藤繁氏がその後も次々に起こる故障を修理してくれて、日本最初の生物試料用低温EPRが完成した。2年間の客員任期とその

後数年出入りしていた間、早稲田の桜井英博さんや井上和仁君(現神奈川大)らとやった仕事はかなりの数の論文になった。

埼玉大学では初めて持った自分の研究室で、これからはじっくりとPSI複合体の精製

に専念する決意をしていた。初めての卒業研究生は、山口淳二君（現北大）など3人も来て、その一人加藤顕君は修士課程に残って、翌年の森仁志君（現名大）と共にその後の研究室のPSI研究の礎を作ってくれ、数年後には成果が出始めた²⁶⁾。私の手製のHPLCと東ソーから頂いた高価なSWカラムを駆使してコツコツとやっていた井上敬介君（現コーワ）は、修士2年の1986年秋になって分子量8千位のタンパク質をホウレンソウからかなり大量にとった。2人で電車によって当時江東区にあったABI東京支社に出かけ、N-末端アミノ酸配列解析をお願いした。試料はキレイで量も充分な上、やってくれた女性が実に有能な方だったので一発で30残基以上判明した。配列をよく見ればシステインが3つもあったのに日ごろの不勉強がたたり重大さに気付かずにいた。これがCenter A/Bのアポタンパク質(PsaC)であることが分かったのは、このシーケンスをその頃世界で初めて葉緑体(タバコ)DNAの全塩基配列をきめ発表されたばかりの杉浦昌弘教授(名大遺伝子実験施設)に送り、結果を知らされたその年の暮れである。

ORFの中にこのタンパク質のアミノ酸配列にそっくりのものを見つけたとのこと。ちなみに、この杉浦グループの仕事はほぼ同時に完成したゼニゴケ葉緑体DNAの仕事(京大の小関・大山グループ)の業績とともに、この後世界中で始まった全ゲノム研究の嚆矢で、我が国が誇るべき業績である。後で分かったがPsaCについては当時阪大の和田・松原チームとデンマークのビール会社研究所でそれぞれ全く独立にシーケンスが出つつあり、翌1987年はこれらの論文がほぼ同時に出て久しぶりに世界の檜舞台に出た喜びを味わった²⁷⁾。

この年は、春には埼玉大学キャンパスで1000人からの参加者のあった日本植物生理学会大会を開催するお世話をしたり、教授に昇進、夏には3ヶ月アメリカに出張して、私的には東京に引っ越したり、かつてのP₄₃₀の1971年とともに私にとって印象深い年であった。その後修士を出て会社にいていた清水徳朗君(現農水省)が、埼玉大学に出来たばかりの博士課程に遺伝子の技術を持って戻ってきた。それからは理研の井上頼直さんの研究室から頂いた好熱性シアノバクテリアのいくつかのPSIサブユニット遺伝子をクローニングし、配列決定が続いた²⁸⁻³⁰⁾。そのうち古木正人君(現ホーネン)が偶然熱ショックタンパク質

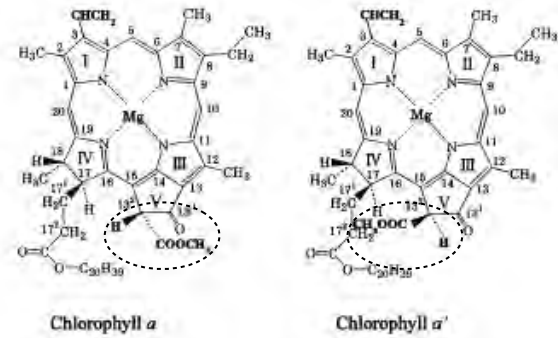


図8 Structures of chlorophyll *a* and its epimer, chlorophyll *a'*. Difference is shown by the circles.

(HSP:分子シャペロン)の遺伝子をひっかけ³¹⁾、それを機会にこの世界にも入り込み、丁度このころ来てくれた仲本準氏が現在大きく発展させつつある³²⁾。

話をPSIに戻す。少しさかのぼって、1984年暮れか1985年初めだったか定かではないが当時基生研に教授で移ったばかりの村田紀夫さんに東大生産技術研究所の渡辺正氏(当時助教授)を紹介された。彼は工学系の化学者だがクロロフィル類のHPLCによる定量分析法を開発し、いろいろな植物試料を分析しているうちにそれまで人工産物とされていたクロロフィル*a*のエピマー Chlorophyll *a'*(クロリン環のメトキシカルボニル基に関する立体異性体: 図8右)がどの試料にもクロロフィル*a*の数百分の1だけ含まれていることに気付いた。その量比がクロロフィル*a*: P₇₀₀比に近いとらみ、「P₇₀₀=Chlorophyll *a'*」仮説を立てた。私がP₇₀₀定量の「権威」ということで、村田氏が紹介したわけである。

早速手伝った。その結果はP₇₀₀: *a'*比は1:2ということで1985年に発表された³³⁾。当時P₇₀₀はクロロフィル*a*の2量体(ダイマー)と考えられていたから、このときの結論は「*a*ではなく*a'*のダイマーである」というものだった。

翌1986年理科大から修士課程に入ってきた久保彰男君が大サブユニット2つだけで光化学活性をもつ標品を作った。これは当時間違いなく世界初だったのだが、実際発表したのは翌年卒論で入ってきた高野康宏君(現テイジン)がより再現性のある方法を開発してくれてからであった³⁴⁾。当時、私も自ら低温室に出入りして、特に強い界面活性剤(LDS)を使ってPSI標品を作った。これはほんの少しだけクロロフィル*a*が残っているほとんど無色の標品で大サブユニット(現在のPsaAとPsaB)だけで構成され活性は全くない。

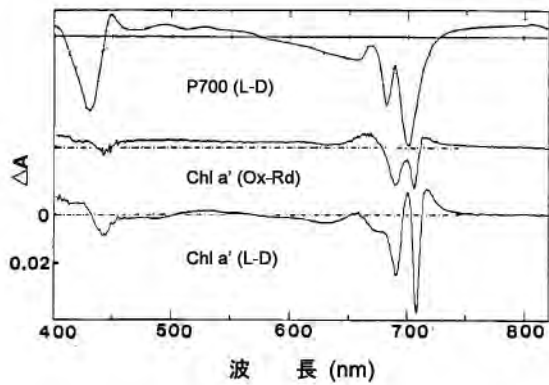


図9 Light-minus-dark difference spectrum of P700 (upper), chemically induced (middle) and light induced (bottom) oxidized-minus-reduced difference spectra of reconstituted P700 (PsaA/PsaB protein complex + chlorophyll a').

これに、当時渡辺さんの院生だった小林正美君（現筑波大）が持ってきたChlorophyll a' の純品を混ぜたら P700が出来るかしらと思ったのだ。結果は驚いたことに予想通りで（図9）、化学的酸化還元（中段）、明暗（下段）共にP700の差スペクトル（上段）とかなり良く似ている。この実験は今振り返ると自分で全てやった最後のものになってしまったが、とにかくすぐに発表した³⁵⁾。FEBS Letters だったから世界中皆読んだはずだが反響はなかった。1990年代になって岡崎であったある国際シンポジウムでこの話をしたら、アメリカの研究者たちは初めて聞くようなビックリした顔をしたが、その後も相変わらず総説などでもほとんど無視されて来た。その間、渡辺研究室で抽出法などが改良された結果、どうしても1:1になるということで、私たちはヘテロダイマーの可能性を示唆した³⁶⁾。

話は変わって1992年名古屋で国際光合成会議があったとき、私が座長をやったPSIの部会の発表者の一人は何とあのWitt先生だった。当時80歳近かった（と思っていたが最近調べたら実は70歳で今の私より若い！）、PSIの結晶解析で3次元構造を発表して話題をさらい、翌日の朝日新聞に座長の私のコメントと共に載った。まだここではP700の三次構造ははっきりしていなかったが、10年近く後に彼らは相当細部まで立ち入った構造をNature誌に発表した。当時79歳のWitt氏がどこまで関与したのかは別として、この2001年の論文には、P700の構造が Chlorophyll a と Chlorophyll a' のヘテロダイマーとして姿を現した³⁷⁾。私たちの最初の発表から20年近く経ってChlorophyll a' もようやく認知されたようだ。Witt氏は2007年に85歳でお亡くなりにな

なると聞いた。ごく最近2004年の彼の多分最後の総説³⁸⁾を見つけたが、渡辺さんの仕事はひとつしか引用されていない。

私は若いころからいろいろな機器にとりつき仕事をする癖があったが最後に抱え込んだのはペプチドシーケンサで、10年近く使い込んだこの島津製の機械は私の定年とともに廃棄されてしまったらしいが、随分役立った。PSIIの方々には評判のよくないPsaYの論文³⁹⁾はその集大成である。

おわりに

私がP700に取り組み始めて一生懸命過去の論文を読んで理解しようとしていたとき、参考になったのはKokとWittのだけと言ってよかった。Wittの論文は数多かったけれど、それでも知れたもので、今考えると楽だった。そして、ものまねの追実験ができる稀な環境にいたのも幸いだった。研究にも流行がある。或るテーマに大勢の研究者が或る時期集中するのは進展に大いに寄与するが、或る説に人気が集まる時は気をつける必要がある。結構多くの研究者が原典をしっかり読んでなくて、自分で考え判断していない場合が多い。既成概念（いわゆる定説）にはいつも疑念をもって「自分で調べ自分で実験し自分で考えること」がいかに大切かということも実感した。Wittらの結晶構造も決して最終的なものではないかもしれない。金科玉条とせず見直す必要がある。

Serendipityというものは天から降ってくる運ではない。リングが落ちるのを見ていた人は無数にいたはずだが、常に考えを巡らせていたPrepared mindのニュートンだけがそれを見て力学の法則に思い至ったという。偉そうなことを言わせていただき失礼。

光合成を離れ既に6年、最新の進歩は全く勉強していない私が温故知新などといって古い話をして不勉強をごまかしてしまった。思い出話は老化防止に有効だそうだが、振り返ってみると、ここにお名前を出させて頂いた方以外にも実に多くの方々にお世話になってきたことを改めて思う。最後にこのような機会を与えてくださった光合成研究会と筑波大の小林さんに深く感謝し、おわびとともにこの独断と偏見に我田引水と自画自賛までしてしまった拙文を終わらせて頂く。

Received October 4, 2010, Accepted November 4, 2010, Published December 31, 2010

引用文献

1. Kok, B. (1956) On the reversible absorption change at 705 m μ in photosynthetic organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 22, 399-401.
2. Hiyama, T. (1996) Photosystem I: Structures and Functions. in *Handbook of Photosynthesis* (Pessarakli, M., Ed.) pp 195-217, Marcel Dekker. (改訂版2004年出版)
3. 檜山哲夫 (1989) 光化学系Iを構成する蛋白質. 蛋白質核酸酵素 34, 768-772.
4. 檜山哲夫 (1988) 鉄イオウクラスタの生化学. *CACS Forum* 8, 2-8.
5. Hiyama, T., Fukui, S., and Kitahara, K. (1968) Purification and properties of lactate racemase from *Lactobacillus sake*. *J. Biochem. (Tokyo)* 64, 99-107.
6. Hiyama, T., Nishimura, M., and Chance, B. (1970) Energy and electron transfer systems of *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Two cyclic pathways of photosynthetic electron transfer in the pale green mutant. *Plant Physiol.* 46, 163-168.
7. Hiyama, T., Nishimura, M., and Chance, B. (1969) Energy and electron transfer systems of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Photosynthetic and respiratory cytochrome systems of the pale green mutant. *Plant Physiol.* 44, 527-534.
8. Hiyama T., and Ke. B. (1971) Laser-induced reactions of P700 and cytochrome *f* in a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *Biochim. Biophys. Acta* 226, 320-327.
9. 檜山哲夫 (1983) 生物試料の微小吸収変化の測定、「微小スペクトル変化の測定」(井上頼直編), 学会出版センター.
10. 檜山哲夫 (1998) ミリ秒・マイクロ秒の領域, 「計算機分光学の原点」(前田浩五郎編), pp83-92, 時潮社.
11. 檜山哲夫 (1999) 雑談 --- パソコン昔話など 埼玉大学総合情報処理センターニュース 7, 16-19.
12. Hiyama, T., and Ke, B. (1971) A new photosynthetic pigment, "P430": its possible role as the primary electron acceptor of photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1010-1013.
13. Hiyama, T., and Ke, B. (1971) P430: a possible primary electron acceptor of photosystem I. in *Proc. II International Congress of Photosynthesis* (Forti, G., Ed.) pp491-497.
14. Hiyama, T., and Ke, B. (1972) Difference spectra and extinction coefficients of P 700. *Biochim. Biophys. Acta* 267, 160-71.
15. Hiyama, T., and Ke, B. (1971) A further study of P430: a possible primary electron acceptor of photosystem I. *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 99-108.
16. Hiyama, T. (1985) Quantum yield and requirement for the photoreduction of P700. *Physiol. Veg.* 23, 605-610.
17. 檜山哲夫 (1996) 光化学系I不要説—光合成明反応の見直しは必要か? 蛋白質核酸酵素 41, 2130-2131.
18. Hiyama, T., McSwain, B. D., and Arnon, D. I. (1977) Correlation of redox levels of component electron carriers with total electron flux in an electron-transport system. P-700 and the photoreduction of NADP⁺ in chloroplast fragments. *Biochim. Biophys. Acta.* 460, 65-75.
19. Hiyama, T., McSwain, B. D., and Arnon, D. I. (1977) Evidence for two types of P-700 in membrane fragments from a blue-green alga. *Biochim. Biophys. Acta* 460, 76-84.
20. Hiyama, T., and Fork, D. C. (1980) Kinetic identification of component X as P430: a primary electron acceptor of Photosystem I. *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 488-496.
21. Malkin, R., and Bearden, A. J. (1971) Primary reactions of photosynthesis: photoreduction of a bound chloroplast ferredoxin at low temperature as detected by EPR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 16-19.
22. Sauer, K., Mathis, P., Acker, S., and van Best, J. A. (1978) Electron acceptors associated with P-700 in Triton solubilized photosystem I particles from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 503, 120-134.
23. Ke, B. (2002) P430: A retrospective, 1971-2001. *Photosynthesis Res.* 73, 207-214.
24. Hiyama, T., Ohinata, A., and Kobayashi, S. (1993) Paraquat (methyl viologen): Its interaction with primary photochemical reactions. *Z. Naturforsch.* 48c, 374-378.
25. 檜山哲夫 (1983) 電子スピン共鳴法. 実験生物学講座 4 (生化学的実験法) 丸善.
26. Hiyama, T., Katoh, A., Shimizu, T., Inoue, K., and Kubo, A. (1987) Preparation and properties of photosystem-I reaction center complex. in *Progress in Photosynthesis Research*, Biggins J. ed. Vol II, pp45-48, Martinus Nijhof Publishers.
27. Hayashida, N., Matsubayashi, T., Shinozaki, K., Sugiura, M., Inoue, K., and Hiyama, T. (1987) The gene for the 9 kd polypeptide, a possible apoprotein for the iron-sulfur centers A and B of the photosystem I complex, in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet* 12, 247-250.
28. Shimizu, T., Hiyama, T., Ikeuchi, M., Koike, H., and Inoue, Y. (1990) Nucleotide sequence of the *psaC* gene of the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Nucleic Acids Res.* 18, 3644.
29. Shimizu, T., Hiyama, T., Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1992) Nucleotide sequences of the *psaA* and *psaB* genes encoding the photosystem I core proteins from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Plant Mol Biol* 18, 785-91.
30. Sue, S., Sugiya, K., Furuki, M., Shimizu, T., Inoue, Y., Nakamoto, H., and Hiyama, T. (1995) Nucleotide sequence of the *psaD* gene from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Photosynth. Res.* 46, 265-268.

31. Furuki, M., Tanaka, N., Hiyama, T., and Nakamoto, H. (1996) Cloning, characterization and functional analysis of *groEL*-like gene from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which does not form an operon with *groES*. *Biochim. Biophys. Acta* 1294, 106-110.
32. Nakamoto, H., and Hiyama, T. (1999) Heat-shock proteins and temperature stress in 'Handbook of Plant and Crop Stress', M. Pessarakli ed., Marcel Dekker, pp 399-416.
33. Watanabe, T., Kobayashi, M., Hongu, A., Nakazato, M., Hiyama, T., and Murata, N. (1985) Evidence that a chlorophyll *a'* dimer constitutes the photochemical reaction center 1 (P700) in photosynthetic apparatus. *FEBS Lett.*, 191, 252-256.
34. Hiyama, T., Yanai, N., Takano, Y., Ogiso, H., Suzuki, K., and Terakado, K. (1990) A Photosystem-I Reaction center complex constituted only by two subunits. in *Current Research in Photosynthesis*, Vol II, 587-590.
35. Hiyama, T., Watanabe, T., Kobayashi, M., and Nakazato, M. (1987) Interaction of chlorophyll *a'* with the 65 kDa subunit protein of photosystem I reaction center. *FEBS Lett.* 214, 97-100 .
36. Kobayashi, M., Watanabe, T., Nakazato, M., Ikegami, I., Hiyama, T., Matsunaga, T., and Murata, N. (1988) Chlorophyll *a'*/P700 and pheophytin *a'*/P680 stoichiometries in higher plants and cyanobacteria bacteria determined by HPLC analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 936, 81-89.
37. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411, 909-917.
38. Witt, H. T. (2005) Personal perspective: Steps on the way to building blocks, topologies, crystals and X-ray structural analysis of Photosystems I and II of water-oxidizing photosynthesis. in *Discoveries in Photosynthesis* (Govindjee *et al.* Eds.) pp 237-259, Springer (PDF available free from Internet).
39. Hiyama, T., Yumoto, K., Satoh, A., Takahashi, M., Nishikido, T., Nakamoto, H., Suzuki, K., and Hiraide, T. (2000) Chromatographic separation of a small subunit (PsbW/PsaY) and its assignment to Photosystem I reaction center. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 117-124.

P700 and P430 - A Retrospective and Personal Review

Tetsuo Hiyama*

Professor Emeritus, Saitama University

光化学系 II 反応中心同定への途 (回顧) †

岡山大学 名誉教授

佐藤公行*

まえがき

本稿の目的は、光化学系II反応中心を構成するポリペプチドが同定されるに至った経緯を振り返ることである。順序としては、時代背景の理解のために「クロロフィル蛋白質」の単離に向けてなされた先人の努力の跡を一瞥したのち、化学的実体としての光化学系IIの確立、光化学反応中心の同定へと流れた研究の歴史を辿ることになる。なお、客観的な記述となるように努めたつもりではあるが、著者自身の経験と見解に基づく部分が多く、個人的な回顧文となっていることを許して頂きたい。

仮説・検証によって認識を深めて行くのが科学の手法であるが、現実の人間活動としては試行錯誤や偶然の結果に導かれることも多く、光化学系IIに関する研究の場合もそうであったように思う。古い話題が中心ではあるが、本稿が逸話や年代記の次元を超えて研究展開のダイナミズムの一端を伝えるものとなることを願っている。

(1) 前史

近代科学の展開は爆発現象のような様相を呈し、研究の局面は短期間のうちに大きく変転している。20世紀前半には Willstätter (1915)、Fischer (1930)、Woodward (1965) のノーベル賞受賞 (括弧内は受賞年) の研究に代表されるように「クロロフィル」の化

学に関する研究が進展し、解き明かされたその複雑な分子構造に光合成の秘密が隠されているのではないかとの憶測をも生んだ¹⁾。しかし一方、多くの研究者の心には“生体内のクロロフィルは蛋白質との複合体の形で機能している”との思いが根強く、光合成の活性を担う「クロロフィル蛋白質」を単離しようとする試みが繰り返されて来たが、長い間成功を見るには至らなかった²⁾。以下に引用する文章³⁾はこのような事情を伝えるもので、1971年にアメリカ合衆国で開催された Joseph Priestley による光合成発見200周年を記念するシンポジウムで Stacy French²⁾が行った講演の一部である。

The chemistry of chlorophyll extracted from leaves with alcohol or other solvents is well known. However, this extracted chlorophyll is only part of the complex existing in living cells. In its functional state, chlorophyll is combined with proteins as insoluble particles that contain also lipids, carotenoids, and even carbohydrates. The main reason for our ignorance about the chemistry of this natural green coloring matter which absorbs the sunlight used to drive photosynthesis is that the material itself is not soluble, and hence cannot easily be prepared in pure form for chemical analysis (French, 1971).

† 解説特集「光エネルギーの新しい利用法と光合成研究の温故知新」

* 連絡先 E-mail: ksato@rose.ocn.ne.jp

¹⁾ 歴史上、「クロロフィル蛋白質」を単離しようとする数多くの試みが繰り返され、数々の呼称が提案されて来たが、それらは定着することはなかった。以下に示すのは、そのうちの幾つかの例である (括弧内は、提唱者と提唱された年号)。Chloroglobulin (Tswett, 1901; Rabinowitch, 1945); Chlorophylle naturelle (Lubimenko, 1927); Phyllochlorin (Mestre, 1930; Smith, 1938); Chloroplastin (Stoll, 1936); Photosynthin (French, 1939); Chlorophyllin (Wassink, 1948; Thornber, 1979); Phytochromoproteid (Sapozhnikov & Maslova, 1956)

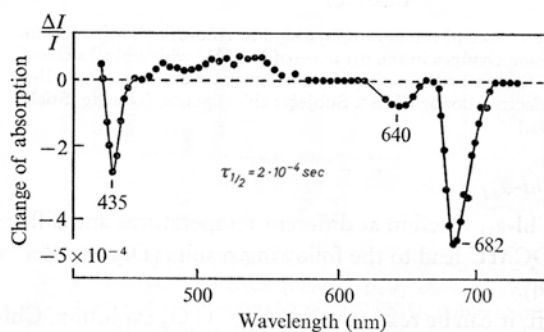
²⁾ 光合成研究の分野における先駆者の一人で、クロロフィル蛋白質に関する研究や細胞破砕器“French Press”の考案で有名な科学者。

この文章からはクロロフィル蛋白質研究の苦難の歴史とそれに携わって来た研究者の思いを読み取ることが出来るが、講演が行われた時点では事態は既に次の局面へと展開しており、光合成の機能につながるクロロフィル蛋白質に向けての先駆的な研究が遂行されていた。その一つはオーストラリアのCSIROで行われた Boardman & Anderson (1964)⁴⁾の超遠心分析法による光化学系I (PSI) と光化学系II (PSII) の分離で、他は徳川生物学研究所 (1970年3月に閉鎖) で行われた Ogawa, Obata & Shibata (1966)⁵⁾の電気泳動法による二種類のクロロフィル蛋白質 (CP-IとCP-II) の単離であった。

(2) 「光化学系II」の確立

光合成の電子伝達系が二つの光化学反応で駆動されていることは、Emerson & Lewis (1943) による作用スペクトルの測定を契機に、Emersonら (1957) による二波長光相乗効果 (Emerson enhancement effect) の発見、Hill & Bendall (1960)⁶⁾・Duysensら (1961)・Wittら (1961)・Losadaら (1961) などの反応速度論的な解析ならびに熱力学的な考察、Levineら (1963) の突然変異株を用いた解析などによって、PSIとPSIIが直列的に機能する“Z-スキーム (模式)”として定式化されて行った (なお、PSIIの光化学反応を駆動する“反応中心色素 P₆₈₀”が Döring らによって分光学的に同定されたのは1968年のことである⁷⁾—付図参照)。

このモデルを基礎付ける生化学的な研究も同時に進められ、その先陣を切ったのが前述の Boardman & AndersonとOgawaらの成果であったと言える。なお、PSIIの標品に着目すると、この段階で確立していたのは、(1) 遠心分画で得られるグラナチラコイドに富んだ画分で、後の“BBY粒子”⁸⁾の原型となった膜標品と、(2) SDSゲル電気泳動により得られ、光化学的に



付図 P680の差吸収スペクトル (Döringら (1969)⁸⁾の図を Wittの総説 (1971)⁹⁾から転載)。

は不活性で、集光 (アンテナ) の機能を担う蛋白質 “Light-harvesting chlorophyll *ab* protein (LHCP) (Thornber & Highkinが1974年に命名⁹⁾、OgawaらのCP-II)”の二種類であったことになる。

(3) PSIIの機能を担う「色素蛋白質複合体」

このような状況下で、PSIIの光化学活性を保持した標品の単離が試みられ、Huzisigeら (1969)¹⁰⁾、Vernonら (1971)¹¹⁾、Wesselsら (1973)¹²⁾などによる初期の重要な貢献があった。著者がこの研究分野に参入したのはこの段階で、California 大学 San Diego 校 (UCSD) の Warren Butler (フィトクロムの分光学的な発見者) の研究室に留学していた時 (1975-1977年) のことであった。当時、Butlerはクロロフィルが *in vivo* で発する蛍光の反応光応答の速度論的な解析からPSIIとPSIの間のエネルギー移動 (spill over) を論じており、色素系間のエネルギー分配相互作用を説明する “Tripartite model” を提唱していた¹³⁾。このモデルでは、葉緑体の低温蛍光スペクトルに見られる三つの発光成員 (典型的には、F-685、F-695、F-735) の色素蛋白質への帰属が基本的な問題であった。

このことがあって、ポスドク2年目の著者が取り組むことになった (実際には、自由に選ばせて頂いた) 研究テーマは、葉緑体の主要なクロロフィル蛋白質を純化し、その分光学的特性を明らかにすることであった (なお、Butler研は光生物学を看板とする研究室で、分光学的な測定に関してはユニークな装置を備えていたが、生化学的な解析のための道具立てには乏しかった。一例を挙げれば、超遠心機のローターを備えておらず、隣の研究室のものを週末に借用すると言った具合であった)。実験材料として用いたのは当時のモデル植物ホウレンソウで、試行錯誤の末に辿りついた界面活性剤は光合成研究の分野で歴史的に使われて来た天然化合物ジギトニン^{4,12,14)}であった。なお、ジギトニンの溶解性に関しては、The Merck Indexでは “practically insoluble in water forming a soapy suspension” と記載されており、市販品はバッチによって溶解特性が大きく異なることがあるので、再現性のある界面活性剤処理を行うことには困難が伴った。そこで考案した方法は、可溶性の画分を凍結乾燥によって粉末化することで、このようにして得られる粉末ジギトニンは水に自由に分散するため再現性の良い実験結果が得られるようになった (なお、水溶性のジギト

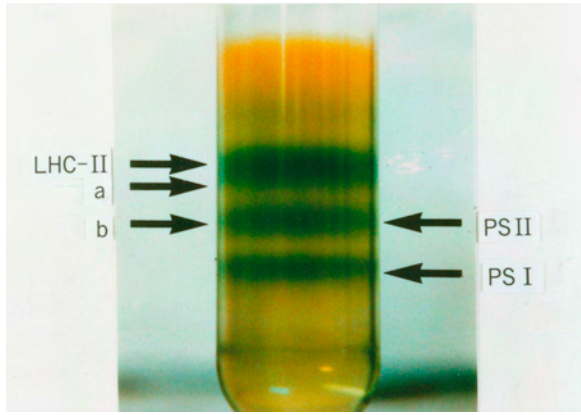


図1 蔗糖密度勾配遠心による色素蛋白質複合体類の分離

ニンは1987年ごろから市販されるようになってい

る)。ところで、チラコイド膜可溶化物の分離に関しては、(1)クロロフィルの蛍光と吸収の“*in vivo form(s)*”に影響を与えないこと、(2)すべての主要なクロロフィル蛋白質を同時に精製できること、(3)生化学的なスケールで標品が得られることの三つが当時の著者の目標であったため、採用された方法はショ糖密度勾配遠心(既に、過去の研究において活用されていた¹²⁾)とAmpholineカラムを用いる等電点電気泳動であった(補助的に、イオン交換クロマトも併用)。

このような方法による精製の一段階で達成された分離の例が図1に示されている¹⁵⁾。これらの研究により、相互に混在しない状態で色素蛋白質複合体が分離できるようになり¹⁵⁻¹⁷⁾、この流れの中で、一定の色素組成、一定のスペクトル特性をもつ化学的な実体としてPSII複合体(PSII core complex)が確立されて行った¹⁷⁾。この段階で、*in vivo* 蛍光成員のクロロフィル蛋白質への帰属が確定し(図2)¹⁸⁾、また、PSII複合体がクロロフィル*b*やキサントフィルを全く含まず、クロロフィ

ル*a*と*β*-カロチンを含むことなどの事実も明らかになった。表1として示されているのは、上記の方法で精製されたPSII複合体に含まれる機能性分子等の組成比で、1983年の初期の段階で著者らが到達していた結果をまとめたものである(同年3月開催の国際シンポジウム³の会議録から改変して転載—機能性分子等の記号が現在とは異なっている場合が含まれる)¹⁹⁾。

著者の見解では、膜上の反応成員が個別に存在して機能しているのではなく、機能単位ごとに集合して「超分子複合体」を形成していることが光合成系においても強く実感できるようになったのがこの時期であったと思う。また、おおよそこの段階に至って、適当な界面活性剤を選ぶことで、膜蛋白質であるクロロフィル蛋白質を水溶性蛋白質と全く同じように取り扱うことができ、例えばクロマトグラフィーによって精製し、結晶化することも可能であるとの信念を生化学者が獲得したと言える(1984年のRackerの総説²⁰⁾参

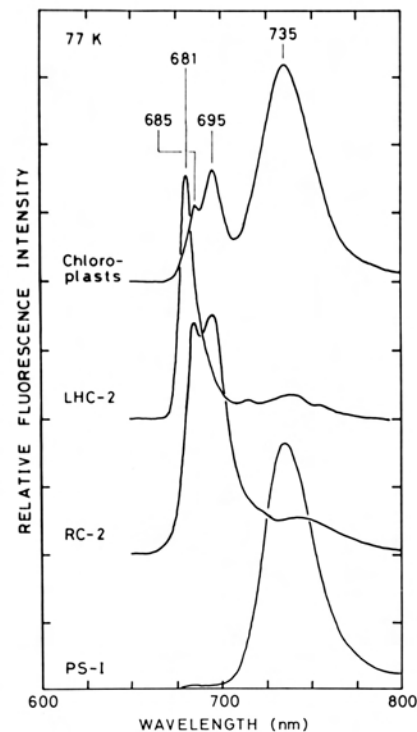


図2 単離された色素蛋白質複合体類の蛍光発光スペクトル(77 K)

³ 1983年3月15-17日、“Photosynthetic Water Oxidation and Photosystem II Photochemistry”と題する国際シンポジウムが、井上頼直(以下、敬称略)が中心になって和光市で開催された。この会には世界から数多くの研究者が集まり、当時急速に展開していた主題に関する広範囲の議論がなされた(この会の参加者の中から、その後この研究分野をリードすることとなる数多くの研究者が育った)。なお、この会の会議録は下記のような形で出版されている。

Inoue, Y., Crofts, A. R., Govindjee, Murata, N., Renger, G. and Satoh, K. (eds.) The Oxygen Evolving System of Photosynthesis, Academic Press, Inc. (1983)

表1 光化学系II複合体に含まれる機能性成員の分子数比 (文献19掲載の表を一部改変)

Components	Molecular Ratios	References
Chlorophyll <i>a</i>	40-70	
Pheophytin <i>a</i>	2	Satoh et al. (in press), Omata, Murata & Satoh (in prep.)
β -Carotene	10	Larkum & Anderson (1982), Omata, Murata & Satoh (in prep.)
Plastoquinone	2	Omata, Murata & Satoh (in prep.)
Q(PQ1)*	1	Satoh & Mathis (1981)
B(PQ2)	+	Satoh et al. (in press), Nakatani et al. (in press)
P-680*	1	Satoh & Mathis (1981)
Z(D1)*	1	Satoh & Mathis (1981)
Species for		
EPR signal II _L	+	Satoh, Koike & Inoue (in press)
EPR signal II _D	+	Satoh, Koike & Inoue (in press)
Cytochrome <i>b</i> ₅₅₉	1	Satoh (1981), Satoh et al. (in press)

*Data from flash absorption spectroscopy.

(註) この表は文献19 (Satoh, 1983) 掲載の Table I を以下の3点で改変したものである。

- (1) 本稿の記述に一致させるため、Tableのタイトル中の“PSII Reaction Center”を“PSII Core Complex”に書き換えた (本文参照)。
- (2) 原著ではReferencesが文献番号で示されているが、ここでは著者名 (年号) で表記した。
- (3) 原著ではモル比が確定していない成員については Molar Ratios の欄に記入がないが、この表では“+”の記号で存在を意味するものとした (なお、Chlorophyll *a* などの成員のモル比はフラッシュ分光学的に測定された P-680 を基準にした概数である)。

照)。

ところで、前述のようなジギトニンの溶解性の問題もあり、また、精製の過程が大がかりで複雑であったためか、著者の開発した方法を用いてPSII複合体を調製することは他の研究者にとっては必ずしも容易なことではなかった模様である⁴。この事態を解決したのは岡山大学で指導した最初の学生の一人であった山田宣昭で、彼は一段階のカラムクロマトグラフィーで全ての色素蛋白質が精製できる汎用的な方法を完成し (Yamada, Itoh & Satoh (1985)²¹)、ショ糖密度勾配遠心と等電点電気泳動による精製方法に置き換えることを可能にした。なお、このことが可能になったのは、東洋曹達工業 (現: 東ソー) が新しいクロマト担体の開発に成功し、“Toyopearl”として発売したことに依っている (Katoら (1982)²²)。また一方、界面活性剤については、1980年ごろから糖骨格をもつ非イオン性で温和

な Dodecyl maltoside や Octyl glucoside などが一般に利用されるようになった (Camm & Green)²³。

(4) ポリペプチド組成

一方、以上のようにして純化されたPSII複合体のポリペプチド組成の決定には、今では信じられないことであるが、約4年に及ぶ歳月を費やすこととなった。著者らが最初にPSII複合体のポリペプチド組成を発表したのは1977年に開催されたReading (UK) での国際光合成会議の場⁵で、その際の講演で示したのは図3のゲルに相当するものであった。著者が最初にSDS-PAGEに手を染めたのは1976年のことで、UCSDでの隣の研究室の分子生物学者が手書きのメモで教えてくれたLaemmli (1970)²⁵の方法によるものであった。この時、メモの記述に従って試料はサンプルバッファー中で加熱処理 (100°C、1分間) された。ところが、染色

⁴ 方法の複雑さに関連して脚注として書かせて頂くが、後に“D1/D2/Cyt *b*₅₅₉複合体”をDEAE-Toyopearlクロマトグラフィーにより精製することに成功した時 (後述)、成果発表の場で多くの研究者から手法の伝授を求められた。D1/D2/Cyt *b*₅₅₉複合体の精製方法は、ここに述べたPSII複合体の場合とは対照的に極めて簡単なものであったため、多くの研究者によりこの標品が利用され、1989年にStockholm (スウェーデン) で開催された国際光合成会議ではこの複合体に関する数多くの研究発表がなされることとなった。この辺りの事情は、Photosynthesis Research誌の最近号 (2010年) に掲載された回顧文の中に“Satoh was very gracious at the Congress and fully described details of the isolation procedure to anyone who asked.”と記されていることから伺える (G ovindjee & Seibert)²⁴。

⁵ 以前には研究交流に占める国際光合成会議 (International Congress of Photosynthesis) の役割が大きかったので、本稿でもこの会議との関連で書かれている部分が多い。このため、この会議の開催年と開催地を末尾に付表として記載した。

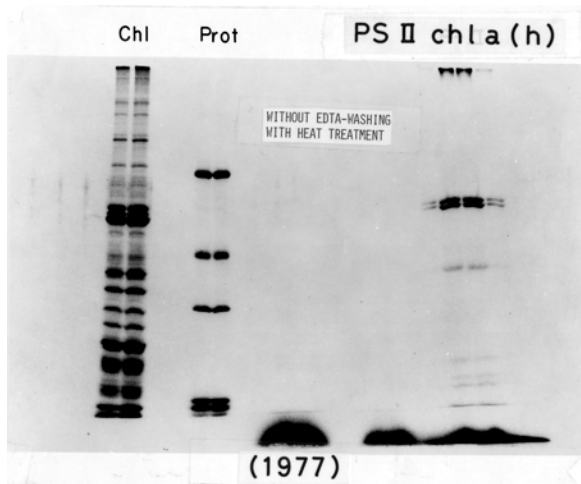


図3 光化学系II複合体のポリペプチド組成のSDS-PAGEによる分析（「PSIIchl a」が光化学系II複合体に対応）

されたゲルを見ると、分析ゲルの原点付近に大きなCBBの染色バンドが検出された（最初は、そのことは気にしないで、分離されたシャープなバンドに感激していた）（図3）。突破口となったのは“加熱処理を忘れた実験”で、これにより原点のバンドは完全に消滅し、45 kDa近傍と25-30 kDaの領域に非常に“diffuse”なバンドが検出されるようになり、これらの成分が等電点電気泳動による精製の過程でPSIIの活性と完全に挙動を共にすることが確認された¹⁷⁾。なお、この時点で同時に明らかになったことは、主成分として検出されていたシャープなバンドは、恥ずかしいことに、PSII複合体標品に含まれていた実際上唯一(?)の混在物CF₁（既に、そのポリペプチド組成は決定されていた）によるものであった。この混在物の除去は、界面活性剤による可溶化の前にチラコイド膜をEDTAまたはNaBrで処理する手法の導入で即座に解決された（1979年）¹⁷⁾。これらの結果は、1980年にHalkidiki（ギリシャ）で開催された国際光合成会議で報告された。

乗り越えなければならなかったもう一つの壁は、SDS-PAGEでPSIIのポリペプチドが“diffuse”なバンドを与えることであった。この問題を解決したのは1981年に「光合成による太陽エネルギーの変換」と題する日米共同研究でMichigan州立大学（MSU）のCharles Arntzenの研究室に派遣されていた時のことである。当時、チラコイド膜のSDS-PAGEによる分離で、30 kDa 領域には多数の、時として奇妙に振る舞う蛋白質バンドがあることが報告されていた（特にPSIIに関連して）。それらは、(1) Ellisによって“peak D”として記

述されていた³⁵S-メチオニンの取り込みで測られる生合成が極端に速い葉緑体の蛋白質²⁶⁾（非常に強く放射ラベルされるがその位置には際立ったCBB染色バンドが検出できないので、“CBB-unstainable protein”ではないかと疑われたこともある）、(2) Kuwabara & Murata (1979) がその重要性を予見して(?)チラコイド膜から単離していた蛋白質²⁷⁾、(3) Pfisterら(1981) による除草剤耐性変異株の解析過程で明らかにされた除草剤受容（結合）蛋白質²⁸⁾、(4) Metz & Bishop (1980) が *Scenedesmus* の酸素発生能を欠く突然変異株において分子量シフトしていると報告していた蛋白質（文献85参照）²⁹⁾、(5) 純化されたPSII複合体に含まれるこの領域のサブユニット成分などであった。

問題の解決に寄与したのはSDS-PAGEの分析ゲルの中に尿素を入れる実験で、これによりLaemmliの方法では“diffuse”なバンドを形成するPSII複合体の30 kDa領域の成分が高濃度尿素の存在下で明瞭に2本に分かれることが示された（図4）³⁰⁾。なお、この実験が行われたのは1981年の11月、最初の発表は同月Michigan州の小村で開催されたMidwest Photosynthesis Conference（アメリカ中西部で毎年開催されている“光合成研究会”）であった。

以上により、PSII複合体（この時期の文献では、“PSII chlorophyll a protein”、“PSII reaction center complex”、“PSII core complex”などと、用語が混乱している）のポリペプチド組成が確定し、それらは、著者の当時の呼称ではα~δサブユニットとシトクロムb₅₅₉ (Cyt b₅₅₉) であるということになった（図5の(B)

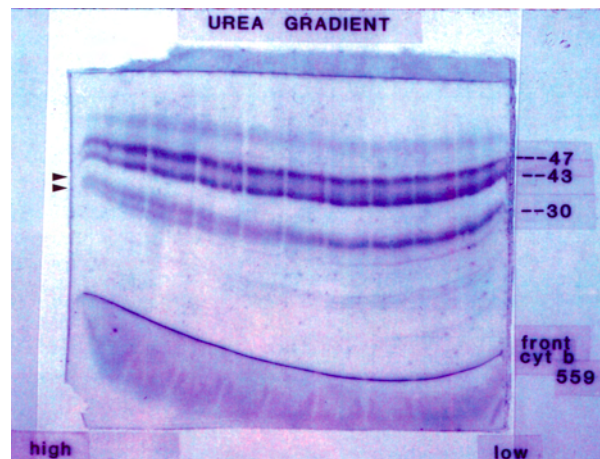


図4 尿素濃度勾配条件下でのSDS-PAGEによる光化学系II複合体のポリペプチド組成の分析（尿素濃度は、右から左へ、2 Mから8 Mの直線勾配）

参照) (但し、 α - δ サブユニットの呼称³¹⁾は、CF₁のサブユニットとの混乱を招くとの理由で、最終的には学界から拒絶された)。要約すると、この段階で、PSII複合体は一定のポリペプチド組成をもつ化学的な実体として確立したことになる^{30,31)}(当時、著者はPhotochemistry & Photobiology 誌から“Yearly review”としてこの分野の研究の進展をまとめることを求められたが、その総説での結論の一つは、ハウレンソウやエンドウなどの陸上植物で確立したPSII複合体のポリペプチド組成は、Bruce Dinerらが調製した緑藻クラミドモナスの標品³²⁾や、Sakae Katoh (加藤 栄)らが別府温泉水から単離したシアノバクテリア *Synechococcus* sp.の標品³³⁾など、進化的には広範囲に及ぶ酸素発生型光合成生物の間で共通しているとの認識に到達したと言う点であった³¹⁾。

(5) サブユニットの機能

1983年の段階で、 α -サブユニットはCP-47、 β -サブユニットはCP-43のアポ蛋白質のそれぞれに相当することは自明のこととなっていた。CP-47とCP-43は、Ogawaら (1966)³⁾ およびThomberら (1966)³⁴⁾によるCP-I (PSI chlorophyll *a* protein) とCP-II (LHCP) の分離の成功を引き継いで、より温和な条件で部分的に解体したチラコイド膜成分を電気泳動 (SDSまたはLiDSを用いた) にかけて分離しようとする数多くの試みの中でその存在が確認されたもので (例えば、Macholdら (1977)³⁵⁾、PSIIに含まれる主要なクロロフィルの結合蛋白質であることを疑う余地はなかった。これらの成分は、最初は、それぞれ第三、第四のクロロフィル蛋白質と言う意味で“CP-III”、“CP-IV”、または、クロロフィル *a* のみを含む第二、第三の蛋白質として“Chla-P2”、“Chla-P3”などと呼ばれていたが、Camm & Green (1980)²³⁾によりアポ蛋白質の分子質量に基づく命名法として“CP-47”と“CP-43”が (“CP-29”などとともに) 提案され、今日に至っている (詳しくは、Camm & Green (2004) の総説³⁶⁾参照)。

一方、 γ -サブユニットと δ -サブユニットの同定については幾分込み入った経緯があった。1981年にPfisterら²⁸⁾により行われた *Amaranthus hybridus* の除草剤耐性“biotype”のチラコイド膜成分を¹⁴C-azido-atrazineを用いて光アフィニティーラベルする実験の解析から、問題の30 kDa領域に除草剤結合蛋白質 (B蛋白質) が存在することが示され、続いて、この蛋白質がPSIIのキ

ノン結合蛋白質 (Q_B蛋白質) と同一であることが確認され³⁷⁾、また、以前にEllisによって記述されていた生合成速度の大きい葉緑体の蛋白質 (peak D)²⁶⁾に一致することが明らかになった (文献30参照)。一方、1983年に出版された著者らの論文³⁰⁾では、ハウレンソウから純化されたPSII複合体の γ -サブユニット (30-kDa蛋白質) がアトラジン結合蛋白質に一致することが証明された。なお、この蛋白質をコードする遺伝子は、1982年、葉緑体遺伝子 *psbA* (葉緑体ゲノム上の遺伝子で、PSII関連遺伝子として最初に同定されたことから“*A*”を名乗っている) としてその塩基配列が報告された (Zurawskiら³⁸⁾)。一方、 δ -サブユニット (32-kDa蛋白質) の正体については、この段階では不明のままであった。

光化学系II複合体の構成サブユニットが確定したことにより、各サブユニットの役割の解明が進められた。例えば、京大・食研のグループ (浅田研) と共同で行った実験がその一例で、D1、D2蛋白質が明暗条件下で選択的にヨウ素ラベルされることが見出された (Takahashi, Takahashi & Satoh (1986)³⁹⁾)。この研究は、Signal II (表1参照) と呼ばれていた EPR シグナル (明暗条件への応答の差で、Signal II_L と Signal II_D) を与える PSII の電子供与体側の成分の本体 (*Thermosynechococcus* の場合、それぞれ、D1蛋白質

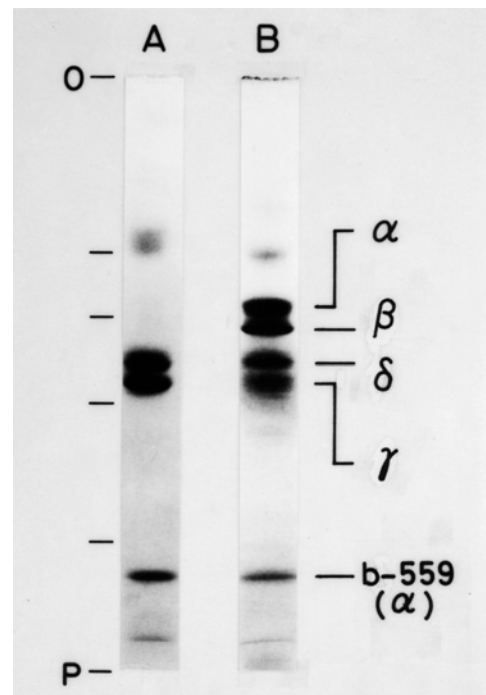


図5 D1/D2/Cyt *b*₅₅₉ 複合体 (A) と光化学系II複合体 (B) のポリペプチド組成

質上のTyr-161とD2蛋白質上のTyr-160のラジカル)の同定に至ったMSUにおける Babcock と McIntosh のグループによる研究^{40,41)}に貢献したものと思っている。

(6) 遺伝子の同定

1984年に入って、葉緑体ゲノム上に存在する遺伝子の塩基配列が続々と報告される事態となり、上述のPSII複合体サブユニットの全ては葉緑体遺伝子の産物であることが明らかになった。構成ポリペプチドのN-末端分析から解析を進めようとしていた生化学者にとっては突然の展開で、分子生物学隆盛の時代の到来を強く印象付けるものであった⁴²⁾。このような展開の下で、PSII複合体のサブユニットをコードする遺伝子は下記のようにイタリックで示す形容詞で呼ばれることが分子生物学者によって決められて行った。即ち、 α -サブユニット (apoCP-47) をコードする遺伝子は *psbB*⁴³⁾、 β -サブユニット (apoCP-43) は *psbC*^{44, 45)}、シトクロム*b*-559の二つのサブユニットの遺伝子は *psbE* と *psbF*⁴⁶⁾等々と言った具合である。

なお、この展開の中で明らかになった興味ある事実の一つは、葉緑体ゲノムに *psbA* 遺伝子³⁸⁾ と塩基配列が類似するもう一つの遺伝子 *psbD* が存在することであった^{44,45,47,48)}。この遺伝子にコードされる蛋白質は“D1-like protein”と論文に書かれたこともあったが、最終的にはPSII複合体の δ -サブユニットであることで決着した。なお、 γ -サブユニットと δ -サブユニットは、現在ではD1およびD2蛋白質と呼ばれている。このような呼称に至った経緯は以下のとおりである。1970年代、Rockefeller大学 (USA) に研究室を開設した Nam-Hai Chua はクラミドモナスのチラコイド膜蛋白質の機能を網羅的に解明しようとする野心的なプロジェクトをスタートさせ (以上は著者の推測)、SDS-PAGEで分離されるポリペプチドに#1から#19に及ぶ番号を付した (この番号付けでは、例えば、前述のCP-47のアポ蛋白質は#5、CP-43のそれは#6となる)⁴⁹⁾。ところが、この番号付で“diffuse”であるが故にカウントされなかった蛋白質バンドがあった。これらが上述のような遺伝子の同定に至る過程で見直され、“diffuse (D)”なバンド1と2 (即ち、D1とD2蛋白質) と名付けられることとなった訳である。

(7) 「酸素発生能」をもつ蛋白質複合体

以上に述べたPSII複合体の分離精製の過程では、著

者の関心は専ら光化学反応中心にあったため、活性測定には人工的な電子供与体 (例えば、1,5-diphenyl carbazide (Vernon & Shaw (1969))⁵⁰⁾) が用いられていた。このこともあり、PSII本来の機能である水分解による酸素発生の活性は通常失われていた。しかし、酸素発生系を安定化させるように抽出と精製に使うバッファーのpHを変化させた著者らの実験 (Tang & Satoh (1985)⁵¹⁾) で、膜表在性蛋白質 (33kDa蛋白質) の一部を保持した複合体が単離され、これが酸素発生の活性を示すことが明らかになった (1984年10月の初旬に投稿されたこの論文は、同年6月に他界した故 Warren Butler に捧げられた)。この研究の成果は、従来考えられがちであった膜標品ではなく、蛋白質複合体がPSIIにおける酸素発生の最小単位であることを示した最初のものとなった (なお、PSII複合体が33 kDa蛋白質を結合した状態で精製されることは、前年の1984年、Yuasa, Ono & Inoue⁵²⁾により報告されていたが、この標品では酸素発生の活性を検出することはできなかった)。以上の結果は、同じ年、日本国内の東大駒場と理研和光の二つのグループ、Satohら (1985)⁵³⁾とIkeuchiら (1985)⁵⁴⁾、によって確認されることとなった。その後、調製方法に大幅な改良が加えられ (Shenら (1992)⁵⁵⁾)、*Thermosynechococcus* からの標品はPSIIの構造解明において決定的な役割を演ずることになった (後述)。

話は前後するが、酸素発生系に関与する蛋白質 (Oxygen Evolving Factor) を単離しようとする試みは以前からなされていたが、*in vitro* の条件では活性低下が著しいことがあって研究は暗礁に乗り上げていた。これを打ち破る契機となったのが1980年のSpector & Wingetの論文⁵⁶⁾で、ここで彼らはチラコイド膜から抽出した65 kDaのMn結合蛋白質と水分解活性を失った膜をリポソーム上に再構成することで酸素発生の機能が発現すると報告した。この結果は“他の研究者の立ち会いの下では再現できない類のもの”であったが、歴史的にはこれを契機に酸素発生系の生化学的研究に火がつけられることになった。先陣を切ったのはÅkerlund & Jansson (1981)⁵⁷⁾の研究で、1981年のGordon会議でのÅkerlundの発表では、チラコイド膜をYamashita & Butler (1968)⁵⁸⁾の方法でTris処理 (あるいは塩処理) すると、酸素発生能の失活に伴ってチラコイド内腔の膜表在性蛋白質が遊離することが示され、遊離される蛋白質の同定と膜への再構成による活性発

現に向けた研究が開始されることとなった。なお、この実験で遊離する蛋白質の一つはKuwabara & Murata (1979) が既に精製に成功していた前述の33 kDa蛋白質 (後のPsbO)²⁶⁾であった。24 kDa と 18 kDa 蛋白質 (現在の呼称によればPsbPとPsbQ) が酸素発生系に関係する成員としてデビューしたのはこの時である。なお、酸素発生系における膜表面蛋白質の機能に関する研究においては日本のグループの貢献が非常に大きく、例えば Murata & Miyao (1985) による総説⁵⁹⁾がある (註3で示した文献にも日本の研究者から多くの報告が寄せられている)。

(8) P680アポ蛋白質は？

光化学系II複合体のポリペプチド構成がほぼ確定し、1983年にBrussels (ベルギー) で開催された国際光合成会議のころから、研究者の関心の中心は「光化学反応中心」を宿すポリペプチドの同定に向いていた。最初に注目を浴びたのはCP-47で、その根拠は遺伝子 (*psbB*) の塩基配列から推定されるアミノ酸配列情報に基づくものであった。即ち、Kyte & Doolittle (1982)⁶⁰⁾ が提唱したハイドロパシー分析の解析結果から“in the putative secondary structure of CP-47, His and Cys residues are arranged in a manner suitable to accommodate the RC chlorophylls, i.e., P-680”のような見方が示され⁴³⁾、この見解には多くの実験的な支持が得られた。それらは、(1)クロロフィル結合蛋白質に着目してPSIIを部分解体する解析において、活性は何時もCP-43ではなくCP-47と並行する事実が複数の研究グループにより、複数の実験材料で明らかにされたこと、(2) 分子生物学の手法で *psbB* 遺伝子の発現を失活させた *Synechocystis* PCC6803 株 (Δ CP-47) が色素蛋白質複合体を形成するがPSIIの初期反応の活性を示さないこと⁶¹⁾、(3) 電気泳動法によって単離されたCP-47が、PSII反応中心近傍のクロロフィルが発すると推定されるF-695蛍光を発すること、(4) 閃光を用いる解析で、この標品がPSIIの初期反応と見做される光化学活性を示すことなどと、多岐にわたっていた (文献84、86参照)。このため、CP-47がPSIIの反応中心であるとの考えは1986年ごろに至るまでの約3年間にわたって学界では支配的となり、多くの総説や教科書ではこの見解に基づいた模式図が流布していた (一例を挙げれば、1984年刊行のTIBSに掲載された総説⁶²⁾がある。因みに、1986年に日本の二つのグループによって達成

された葉緑体ゲノム解読の論文においても、*psbB*遺伝子がコードする蛋白質は“PSII P₆₈₀ apoprotein”と書かれている)。このような状況下で、P₆₈₀の活性をもつPSII標品 (CP-47) の単離が多くの研究室で試みられたことは言うまでもない。

一方、“P₆₈₀はCP-47に宿る”ことを断定する論文が書かれる中であって、これとは異なる見解をとる立場も現れた。UCSDの George Feher らの研究⁶³⁾によって紅色光合成細菌の光化学反応中心についての理解が大きく進んで、その一種 *Rhodospseudomonas (Blastochloris) viridis*について結晶構造の解明に成功したのが1985年のことである。この偉業を成し遂げたドイツの研究グループのMichel & Deisenhofer (1985)⁶⁴⁾は、紅色細菌の光化学反応中心を構成するL、Mサブユニットとアミノ酸配列の相同性が高い蛋白質がQ_B結合蛋白質であることに気づいて、D1/D2ヘテロダイマーがPSIIの反応中心である可能性を指摘した。この立場に立ったのは Achim Trebst (Univ. Bochum) で、1986年にFEBS Lettersに掲載された彼の論文⁶⁵⁾では、“...It is consequent therefore to suggest that the 32 and 34 kDa peptides form also the reaction center of photosystem II. However, so far the 47 kDa peptide is thought to be the reaction center peptide of photosystem II.”となっている。この段階では、D1/D2ヘテロダイマー説を支持する実験事実は皆無であった (逆に、D1/D2蛋白質を欠くと思われる標品がPSIIの活性を示すとする報告もなされていた)。

(9) D1/D2/Cyt *b*₅₅₉ 複合体

1985年から1986年にかけて、著者らの研究室ではPSII複合体の更なる解体に向けた解析が進められていた。ところで、表1に示されるように、単離されたPSII複合体においては酸化還元反応に関与する成員に較べて色素成員 (クロロフィル*a*とβ-カロチン) の分子数が圧倒的に多いので、複合体は“アンテナ”と“反応中心”で構成されていると考えるのが当時の著者らにとっては自然なことであった。そんな中、D1とD2蛋白質がクロマト上で挙動を共にすることに気付き、高濃度 (4%) のTriton抽出の処方でこれを追及して行くことになった。実験を直接担当したのは半年間の留年を決めていた4年生の難波治で、1986年4月の段階で図5 (A) に示すようなポリペプチド組成の標品に到達した⁶⁶⁾。一段階のイオン交換クロマトグラフィーで精

製されるこの色素蛋白質はDEAEカラムへの親和性が強く、殆どすべて（98%以上?）のクロロフィル（蛋白質）が洗い流された後に溶出されて来るのが特徴的で、PSII複合体との比較（図5）から、D1およびD2蛋白質とPSIIの“enigmatic”な成分と言われていた Cyt b_{559} の α -サブユニットと β -サブユニットを含むものであることが明らかになった（後に、Ikeuchi & Inoue (1988)⁶⁷⁾により低分子領域の分析がなされ、PsbIの存在が確認された）。一方、この標品の色彩について言えば、見慣れたクロロフィル蛋白質に典型的な緑色を呈するものではなかった。吸収スペクトルの分析では、最大吸収波長がフェオフィチンの吸収帯に一致することが判明し、また、定量的な色素分析の結果、フェオフィチン a 2分子当たり（根拠は後述）5分子余りのクロロフィル a を結合した色素蛋白質複合体であることが明らかになった⁶⁶⁾（なお、後に行われた注意深く調製された標品についてのKobayashiら（1990）の精密な測定⁶⁸⁾により、6分子のクロロフィル a と2分子の β -カロチンが含まれていることが確定した。また、その後なされたクロロフィルの反応性や存在状態の解析、そして何よりも結晶のX線解析(Zouniら(2001))で解明されたシアノバクテリアのPSII複合体中におけるクロロフィルの位置の確定（図8の(B)参照）の結果から、反応中心の中核部分には6分子のクロロフィル（P₆₈₀を含む）が配置されていることが今では一般的な合意となっている。なお、当時、光合成細菌の研究者からはクロロフィルの値は4になる筈だとの指摘を受け、実際にD1/D2/Cyt b_{559} 複合体に含まれるクロロフィルが反応中心当たり4分子であるとする論文も書かれている）。

ところで、上のようにして単離されたD1/D2/Cyt b_{559} 複合体で最初に観測された光化学活性は、Klimovら（1977）⁶⁹⁾により確立されたPSIIの第一次電子受容体フェオフィチン a の光還元に相当するもので、定常光照射の開始と終結に反応して可逆的に吸収変化する成分の差スペクトルは図6のようなものであった。定量的な分析では、化学的に求められる2分子のフェオフィチンのうちの1分子が飽和光条件下で還元される勘定になり⁶⁶⁾、この事実は紅色光合成細菌の光化学反

応中心の場合に一致するものであった。これらの結果は“D1とD2蛋白質を中心に構築される色素蛋白質複合体がPSIIの反応中心を担う”とするヘテロダイマー説の支持へと導くものであった。この実験結果は、参加の途中で立ち寄ったUCSDのFeherの研究室で行った三重項クロロフィルのEPR特性に関するデータと共に、1986年8月にRhode Island (USA)で開催された国際光合成会議の場で発表された^{70,71)}。会議での熱い議論の後、ピコ秒光フラッシュ照射に反応するフェオフィチン a 還元の直接観測による初期電荷分離反応の確認⁷²⁾、反応で形成される初期電荷対の再結合やこれに関連する諸反応の解析⁷³⁾、特異抗体を用いるD1、D2蛋白質存在の再確認⁷⁴⁾など、確証のための更なる実験が行われ、また、Gordon会議をも含めた数多くの国際的な討議の場を経て、D1/D2/Cyt b_{559} 複合体がPSII反応中心として広く受け入れられることになった^{75,76)}。

以上の結果は、多方面に波及効果を生むこととなった。解析のターゲットが明確にされたことで急に視界が広がり、研究の方向性にも大きな変化が見受けられた。その範囲はPSIIの初期過程に関する物理化学的な解析からD1蛋白質を鍵成分の一つとする生物学的な動態の解析に及ぶものであった（状況を示す一例として、著者らの発表からほぼ9年が経過した1995年にD1/D2/Cyt b_{559} 複合体を主題に開かれたワークショップの講演要旨集の表紙を図7に掲げる）。そんな中で何よりも重要であったのは、酸素発生型光合成と酸素非発

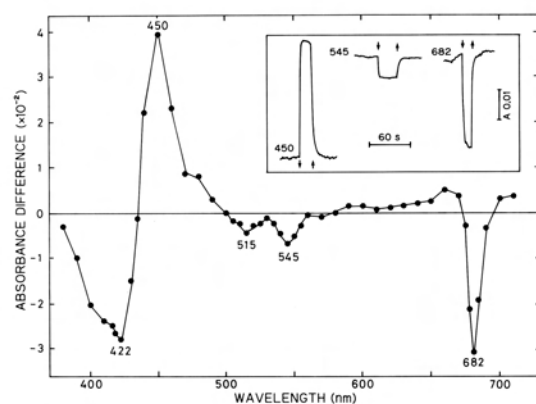


図6 D1/D2/Cyt b_{559} 複合体におけるフェオフィチンの光還元（明暗差スペクトル）

⁶ “反応中心”という用語は時として曖昧に使われる。限定的にこれを定義すると「初期電荷分離反応と、分離された電荷の安定化の機能を備えた最小の単位」となる。この観点に立てば、D1/D2/Cyt b_{559} 複合体は第二次電子受容体であるプラストキノンと結合していないことなどもあって、初期電荷分離の機能は備えているが電荷安定化の能力を欠いていることになる。したがって、この標品をPSII反応中心と呼ぶかどうかについては議論が残る。

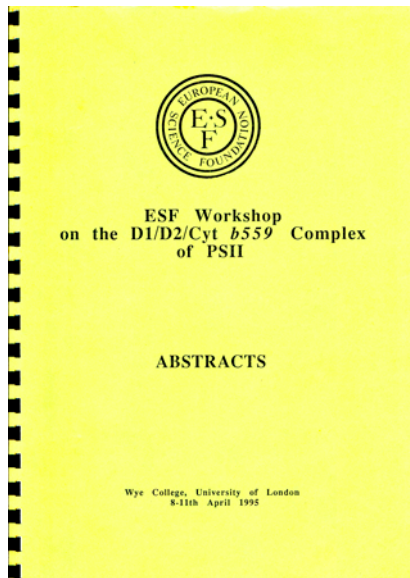


図7 D1/D2/Cyt *b*₅₅₉ 複合体に関するワークショップ講演要旨集の表紙

生型光合成との間の進化的なつながりを示す確かな証拠が提供できたことであると思っている（なお、紅色光合成細菌の光化学系とPSIIの類似性に関しては、ポリペプチド構成の話とは無関係に、植物で明らかにされたQ_AとQ_Bが機能するいわゆる“two-electron gate”⁷⁷⁾が紅色光合成細菌でも機能していること、紅色光合成細菌の系に類似してPSIIの第一次電子受容体としてフェフィチンが関与していること⁶⁹⁾などの事実が、反応解析の側から既に示されていた）。

あとがき

上述のようにしてPSII反応中心が同定されて15年ほどの歳月が流れた2001年、Brisbane（オーストラリア）で開催された国際光合成会議の場で、この研究分野にとって画期的な研究報告がなされた。それは、Yamaokaら（1878）⁷⁸⁾によって実験材料として確立されていた別府温泉産の好熱性シアノバクテリアの一種 *Synechococcus* sp.（後の *Thermosynechococcus elongatus*）がヨーロッパに渡り、ベルリンのHorst WittのグループがPSII複合体の結晶構造解析に成功したことの発表であった（Zouniら（2001）⁷⁹⁾）。この結果は和歌山の温泉で Teruo Ogawa（小川晃男）が単離した近縁のシアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* について Kamiya & Shen（2003）⁸⁰⁾によって確認され、その後、Ferreiraら（2004）⁸¹⁾、Guskovら（2009）⁸²⁾などの研究を経て、今年（2010年）北京で開催された国際光合成会議の場では分解能が1.9Åと原子レベルにま

で到達したことが報告された（Shenら）⁸³⁾。このような事態の進展は、PSIIにユニークな高電位形成と水分解による酸素発生の化学機構の解明、人工的な水分解や水素生産系の構築、反応系の動態を支える生物学的仕組みの解析による制御系の解明など、研究の飛躍的な躍進を期待させるものである。

ところで、これらの解析で明らかにされたPSIIの構造の中では、D1とD2蛋白質は複合体の中心に位置して機能しており、CP-47とCP-43がそれらに隣接して配置されていることなど、生化学的な解析でもたらされた結果が、時を経て構造生物学的に裏付けられていることに先ずは安心している（図8）。浮き彫りにされてくる構造を目にしての感想は、時から時へと、先人達の肩の上からの眺望は飛躍的に拡大して行くが、期

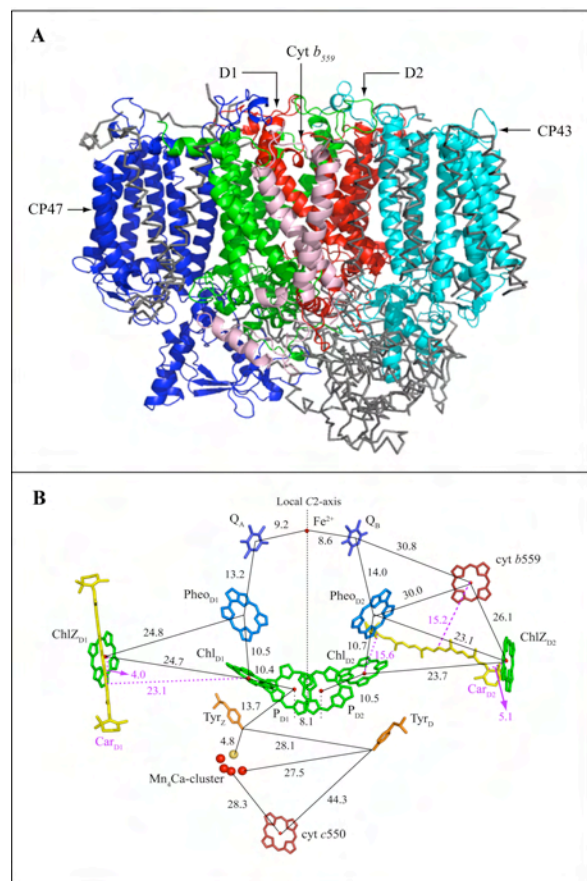


図8 結晶のX線解析で解明された *Thermosynechococcus vulcanus* の光化学系II複合体の構造（沈 建仁氏から提供された発表準備中の資料から）

(A) 1.9 Å 分解能の結晶構造（単量体の構造のみ）一赤：D1；緑：D2，青：CP-47；シアン：CP-43；ピンク：チトクロム *b*₅₅₉（その他のサブユニットはグレーのスタックモデルとして表示）；(B) 1.9 Å 分解能の結晶構造における反応中心の各色素の配置と電子伝達鎖（数値は各補欠因子間の距離をÅで表したもの）

付表 国際光合成会議の開催年と開催地

1968	Freudenstadt (Germany)
71	Stresa (Italy)
74	Rehovot (Israel)
77	Reading (UK)
80	Halkidiki (Greece)
83	Brussel (Belgium)
86	Rhode Island (USA)
89	Stockholm (Sweden)
92	Nagoya (Japan)
95	Montpellier (France)
98	Budapest (Hungary)
2001	Brisbane (Australia)
04	Montréal (Canada)
07	Glasgow (UK)
10	Beijing (China)
13	St. Louis (USA) (予定)

待を裏切るかのように地平は限りなく遠ざかって行くようにも見えることである。なお、紙面の都合で文献の多くを省略したので、必要な場合には著者らの別の総説⁸⁴⁻⁸⁷⁾を参考にして頂きたい。

Received September 27, 2010, Accepted October 29, 2010,
Published December 31, 2010

参考文献

- 柴田桂太 (1931) 炭素及び窒素の同化作用, 岩波講座 (生物学), (岩波書店) pp. 28-39. (English trans: Gest, H. and Togasaki, R. K. (1975) Carbon and nitrogen assimilation. *Japan Science Press, Tokyo*)
- Kupke, D. W., and French, C. S. (1961) Relationship of chlorophyll to protein and lipoids; molecular and colloidal solutions. Chlorophyll units. in *Encyclopedia of Plant Physiology* (in German), Vol. V(1), Springer, pp. 298-322.
- French, C. S. (1971) The distribution and action in photosynthesis of several forms of chlorophyll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2893-2897.
- Boardman, N. K., and Anderson, J. M. (1964) Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* and their possible role in the light reactions of photosynthesis. *Nature* 203, 166-167.
- Ogawa, T., Obata, F., and Shibata, K. (1966) Two pigment proteins in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 223-234.
- Hill, R., and Bendall, F. (1960) Function of the cytochrome components in chloroplasts; a working hypothesis. *Nature* 186, 136-137.
- Döring, G., Bailey, J. L., Kreutz, W., and Witt, H. T. (1968) The active chlorophyll-*a*_{II} in light reaction II of photosynthesis. *Naturwissenschaften* 55, 220-224.
- Berthold, D.A., Babcock, G. T., and Yocum, J. F. (1981) A highly resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.* 134, 231-234.
- Thorner, J. P., and Highkin, H. R. (1974) Composition of the photosynthetic apparatus of normal barley leaves and a mutant lacking chlorophyll *b*. *Eur. J. Biochem.* 41, 109-116.
- Hizisige, H., Ushiyama, H., Kikuchi, T., and Azi, T. (1969) Purification and properties of the photoactive particle corresponding to photosystem II. *Plant Cell Physiol.* 10, 441-455.
- Vernon, L. P., Shaw, E. R., Ogawa, T., and Raveed, D. (1971) Structure of photosystem I and photosystem II of plant chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 14, 343-357.
- Wessels, J. S. C., van Alphen-van Waveren, O., and Voorn, G. (1973) Isolation and properties of particles containing the reaction center complex of photosystem II from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 292, 741-752.
- Butler, W. L., and Strasser, R. J. (1977) Tripartite model for the photochemical apparatus of green plant photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3382-3385.
- Smith, E. L. (1938) Solutions of chlorophyll-protein compounds (phyllochlorins) extracted from spinach. *Science* 88, 170-172.
- Satoh, K., and Butler, W. L. (1978) Low temperature spectral properties of subchloroplast fractions purified from spinach. *Plant Physiol.* 61, 373-379.
- Satoh, K. (1982) Fractionation of thylakoid-bound chlorophyll-protein complexes by isoelectric focusing. in *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, (Edelman, M., Hallick, R. B. and Chua, N. -H., Eds.) Elsevier Biomed. Press (Amsterdam), pp. 845-856.
- Satoh, K. (1979) Polypeptide composition of the purified photosystem II pigment-protein complex from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 546, 84-92.
- Satoh, K. (1980) F-695 emission from the purified photosystem II chlorophyll *a*-protein complex. *FEBS Lett.* 110, 53-56.
- Satoh, K. (1983) Photosystem II reaction center complex purified from higher plants. in *Oxygen Evolving System of Photosynthesis* (Inoue, Y., Crofts, A. R., Govindjee, Murata, N., Renger, G. and Satoh, K., Eds.) Academic Press (Tokyo), pp. 27-38.
- Racker, F. (1984) Resolution and reconstitution of biological pathways from 1919 to 1984. *Fed. Proc.* 42, 2899-2909.
- Yamada, Y., Ito, N., and Satoh, K. (1985) A versatile chromatographic procedure for purifying PS II reaction center complex from digitonin extracts of spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 26, 1263-1271.
- Kato, Y., Nakamura, K., and Hashimoto, T. (1982) Evaluation of conventional and medium-performance anion exchangers for the separation of proteins. *J. Chromatogr.* 253, 219-225.
- Camm, E. L., and Green, B. R. (1980) The extraction of

- chlorophyll-protein complexes by the non-ionic detergent, octyl- β -D-glucopyranoside. *Plant Physiol.* 66, 428-432.
24. Govindjee, and Seibert, M. (2010) Picosecond spectroscopy of the isolated reaction centers from the photosystems of oxygenic photosynthesis—ten years (1987-1997) of fun: A tribute to Michael R. Wasielewski on his 60th birthday. *Photosynth. Res.* 103, 1-6.
 25. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 26. Ellis, R. J. (1977) Protein synthesis by isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 463, 185-215.
 27. Kuwabara, T., and Murata, N. (1979) Purification and characterization of 33 kilodalton protein of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 581, 228-236.
 28. Pfister, K., Steinback, K. E., Gradner, G., and Arntzen, C. J. (1981) Photoaffinity labeling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 981-985.
 29. Metz, J. G., and Bishop, N. I. (1980) Identification of a chloroplast membrane polypeptide associated with the oxidizing side of photosystem II by the use of low-fluorescent mutants of *Scenedesmus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 560-566.
 30. Satoh, K., Nakatani, H. Y., Steinback, K. E., Watson, J., and Arntzen, C. J. (1983) Polypeptide composition of a photosystem core complex; presence of a herbicide-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 724, 142-150.
 31. Satoh, K. (1985) Protein-pigments and photosystem II reaction center. *Photochem. Photobiol.* 42, 845-853.
 32. de Vitry, C., Wollmann, F. -A., and Delepelaire (1984) Function of the polypeptides of the photosystem II reaction center in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 767, 415-422.
 33. Yamagishi, A., and Katoh, S. (1983) Two chlorophyll-binding subunits of the photosystem II reaction center complex isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 836-846.
 34. Thornber, P. J., Smith, C. A., and Bailey, J. L. (1966) Partial characterization of two chlorophyll-protein complexes isolated from spinach-beet chloroplasts. *Biochem. J.* 100, p.14-p.15.
 35. Machold O., Meister, A., Sagromsky, H., Hoyer-Hansen, G., and von Wettstein, D. (1977) Composition of photosynthetic membrane of wild-type and chlorophyll *b*-less mutants. *Photosynthetica* 11, 200-206.
 36. Camm, E. L., and Green, B. R. (2004) How the chlorophyll-proteins got their names. *Photosynth. Res.* 80, 189-196.
 37. Steinback, K. E., McIntosh, L., Bogorad, L., and Arntzen, C. J. (1981) Identification of the triazine receptor protein as a chloroplast gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7463-7467.
 38. Zurawski, G., Bohnett, H. J., Whitheld, P. R., and Bottomley, W. (1982) Nucleotide sequence of the gene for the Mr 32,000 thylakoid membrane protein from *Spinacia oleracea* and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of Mr 38,950. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7699-7703.
 39. Takahashi, Y., Takahashi, M., and Satoh, K. (1986) Identification of the site of iodide photooxidation in the photosystem II reaction center complex. *FEBS Lett.* 208, 347-351.
 40. Debus, R. J., Barry, B. A., Babcock, G. T., and McIntosh, L. (1988) Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 427-430.
 41. Debus, R. J., Barry, B. A., Sithole, I., Babcock, G. T., and McIntosh, L. (1988) Directed mutagenesis indicates that the donor to P680⁺ in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry* 27, 9071-9074.
 42. Malcolm D. B. (1978) The decline and fall of protein chemistry? *Nature* 275, 90-91.
 43. Morris, J., and Herrmann, R. G. (1984) Nucleotide sequence of the gene for the P₆₈₀ chlorophyll *a* apoprotein of the photosystem II reaction center from spinach. *Nucleic Acids Res.* 12, 2837-2850.
 44. Alt, J., Morris, J., Westhoff, P., and Herrmann, R. G. (1984) Nucleotide sequence of the clustered genes for the 44 kd chlorophyll *a* apoprotein and the "32 kd"-like protein of the photosystem II reaction center in spinach plastid chromosome. *Curr. Genet.* 8, 597-606.
 45. Holschuh, K., Bottomley, W., and Whitfeld, P. (1984) Structure of the spinach chloroplast genes for the D2 and 44 kd reaction-centre proteins of photosystem II and for tRNA^{Ser} (UGA). *Nucleic Acids Res.* 12, 8819-8834.
 46. Herrmann, R. G., Alt, J., Schiller, B., Widger, W. R., and Cramer, W. A. (1984) Nucleotide sequence of the gene for apocytochrome *b*-559 on the spinach plastid chromosome; implications for the structure of the membrane protein. *FEBS Lett.* 176, 239-244.
 47. Rasmussen, O. F., Bookjans, G., Stummann, B. M., and Henningsen, K. W. (1984) Localization and nucleotide of the gene for the membrane polypeptide D2 from pea chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 3, 191-199.
 48. Rochaix, J.-D., Dron, M., Rahire, M., and Malone, P. (1984) Sequence homology between the 32 K Dalton and the D2 chloroplast membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 3, 363-370.
 49. Chua, N. -H., and Bennoun, P. (1975) Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*: wild-type and mutants strain deficient in photosystem II reaction center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2175-2179.
 50. Vernon, L. P., and Shaw, E. R. (1969) Photoreduction of 2,6-dichlorophenol by diphenylcarbazide: A photosystem 2 reaction catalyzed by Tris-washed

- chloroplasts and subchloroplast fragments. *Plant Physiol.* **44**, 1645-1649.
51. Tang, X. -S., and Satoh, K. (1985) The oxygen-evolving photosystem II core complex. *FEBS Lett.* **179**, 60-64.
 52. Yuasa, M., Ono, T., and Inoue, Y. (1984) Isolation of photosystem II reaction center retaining 33 kDa protein and Mn, a possible structural minimum of photosynthetic O₂-evolving system. *Photobiochem. Photobiophys.* **7**, 257-266.
 53. Satoh, K., Ohno, T., and Katoh, S. (1985) An oxygen-evolving complex with a simple subunit structure—"a water-plastoquinone oxidoreductase"—from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *FEBS Lett.* **180**, 326-330.
 54. Ikeuchi, M., Yuasa, M., and Inoue, Y. (1985) Simple and discrete isolation of an O₂-evolving PS II reaction center complex retaining Mn and the extrinsic 33 kDa protein. *FEBS Lett.* **185**, 316-322.
 55. Shen, J.-R., Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1992) Stoichiometric association of extrinsic *c*-550 and 12 kDa protein with a purified oxygen-evolving photosystem II core complex from *Synechococcus vulcanus*. *FEBS Lett.* **301**, 145-149.
 56. Spector, M., and Winget, G. D. (1980) Purification of a manganese-containing protein involved in photosynthetic oxygen evolution and its use in reconstituting an active membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 957-959.
 57. Åkerlund, H. -E., and Jansson, C. (1981) Localization of a 34000 and a 23000 Mr polypeptide to the luminal side of the thylakoid membrane. *FEBS Lett.* **124**, 229-232.
 58. Yamashita, T., and Butler, W. L. (1968) Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts. *Plant Physiol.* **43**, 1978-1986.
 59. Murata, N., and Miyao, M. (1985) Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 122-124.
 60. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
 61. Vermaas, W. F. J., Williams, J. G., Rutherford, A. W., Mathis, P., and Arntzen C. J. (1986) Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 lacks the photosystem II chlorophyll-binding protein CP-47. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9474-9477.
 62. Barber, J. (1984) Has the manganese-protein of the water splitting reaction of photosynthesis been isolated? *Trends Biochem. Sci.* **8**, 79-80.
 63. Feher, G. (1971) Some chemical and physical properties of a bacterial reaction center particle and its primary photochemical reactants. *Photochem. Photobiol.* **14**, 373-387.
 64. Michel, H., and Deisenhofer, J. (1985) X-ray diffraction studies on crystalline bacterial photosynthetic reaction center; a progress report and conclusions on the structure of photosystem II reaction centers. in *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, (Staehelein, L. A., and Arntzen, C. J., Eds.) Vol. 19, Photosynthesis III, Springer-Verlag (Berlin), pp. 371-381.
 65. Trebst, A. (1986) The topology of plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch.* **41c**, 240-245.
 66. Nanba, O., and Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center containing D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 109-112.
 67. Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1988) A new 4.8-kDa polypeptide intrinsic to the PS II reaction center, as revealed by modified SDS-PAGE with improved resolution of low-molecular-weight proteins. *Plant Cell Physiol.* **29**, 1233-1239.
 68. Kobayashi, M. Maeda, H., Watanabe, T., Nakane, H., and Satoh, K. (1990) Chlorophyll *a* and β -carotene content in the D1/D2/cytochrome *b*-559 reaction center complex from spinach. *FEBS Lett.* **260**, 138-140.
 69. Klimov V. V., Klevanik, A. V., Shuvalov, V. A., and Krasnowsky, A. A. (1977) Reduction of pheophytin in the primary light reaction of photosystem II. *FEBS Lett.* **82**, 183-186.
 70. Okamura, M. Y., Satoh, K., Isacson, R. A., and Feher, G. (1987) Evidence of the primary charge separation in the D₁D₂ complex of photosystem II from spinach. in *Progress in Photosynthesis Research*, (Biggins, J., Ed.), Vol. I, pp. 379-381.
 71. Satoh, K., and Nanba, O. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of γ and δ subunits (D-1 and D-2) and cytochrome *b*-559. in *Progress in Photosynthesis Research* (Biggins, J., Ed.), Vol. II, pp. 69-72.
 72. Danielius, R. V., Satoh, K., van Kan, P. J. M., Plijter, J. J., Nuijs, A. M., and van Gorkom, H. J. (1987) The primary reaction of photosystem II in the D1-D2-cytochrome *b*559 complex. *FEBS Lett.* **213**, 241-244.
 73. Takahashi, Y., Hansson, Ö., Mathis, P., and Satoh, K. (1987) Primary radical pair in the photosystem II reaction center. *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 49-59.
 74. Satoh, K., Fujii, Y., Aoshima, T., and Tado, T. (1987) Immunological identification of the polypeptide bands in the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of photosystem II preparations. *FEBS Lett.* **216**, 7-10.
 75. Evans, M. C. W. (1987) Plant reaction centre defined, *Nature* **327**, 284-285.
 76. Satoh, K. (1988) Reality of P-680 chlorophyll protein: Identification of the site of primary photochemistry in photosynthesis. *Physiol. Plant.* **72**, 209-212.
 77. Bouges-Bocquet, B. (1973) Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **314**, 250-256.
 78. Yamaoka, T., Satoh, K., and Katoh, S. (1978) Photosynthetic activities of a thermophilic blue-green alga. *Plant Cell Physiol.* **19**, 943-954.

79. Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409, 739-743.
80. Kamiya, N., and Shen, J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98-103.
81. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303, 1831-1837.
82. Guskov A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zuni, A., and Saenger W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinines, lipids, channels and chloride. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16, 334-342.
83. Shen, J.-R., Umena, Y., Kawakami, K., and Kamiya, N. (2010) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at an atomic resolution. *Abstract of the 15th International Congress of Photosynthesis (Beijing, 2010)*, p. 87.
84. Satoh, K. (2003) The identification of the photosystem II reaction center: a personal story. *Photosynth. Res.* 76, 233-240.
85. Satoh, K., and Yamamoto, Y. (2007) The carboxyl-terminal processing of precursor D1 protein of the photosystem II reaction center. *Photosynth. Res.* 94, 203-215.
86. Satoh, K. (2008) Protein-pigments and the photosystem II reaction center: a glimpse into the history of research and reminiscences. *Photosynth. Res.* 98, 33-42.
87. Satoh, K., Wydrzynski, T. J., and Govindjee (2005) Introduction to photosystem II. in *Photosystem II: The Light-Driven Water:Plastoquinone Oxidoreductase* (Wydrzynski, T. J., and Satoh, K., Eds.) Springer (Dordrecht), pp. 11-22.
88. Döring, G., Renger, G., Vater, J., and Witt, H. T. (1969) Properties of the photoactive chlorophyll- a_{II} in photosynthesis. *Z. Naturforsch.* 24(b), 1139-1143.
89. Witt, H. T. (1971) Coupling of quanta, electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis. Results by pulse spectroscopic methods. *Quarterly Review of Biophysics*, 4, 365-477.

Identification of Photosystem II Reaction Center (Reminiscences)

Kimiyuki Satoh*

Professor Emeritus, Okayama University

報告記事

若手の会第三回セミナー開催報告

東京大学 大学院総合文化研究科

成川 礼

10月16~17日にかけて、若手の会第三回セミナー『みんなで光合成研究 その2』を東京大学本郷キャンパスにて開催しました。PD、博士課程の学生を中心に25名の参加がありました。初日は参加者全員による自己・研究紹介を行い、その後、「太栄館」にて懇親会を行いました。二日目は、『多様な光合成研究を知ろう』ということで、生物材料や手法などが多様な4人の講師の方々々にセミナーを行っていただきました。大西紀和先生には、緑藻クラミドモナスの基本的解説から最新研究の動向まで、溝口正先生には、光合成色素から脂肪酸まで様々な機能分子の精密構造解析による新展開を、近藤徹さんには、ESRを用いた光合成研究を方法論の観点から、今村壮輔先生には、基礎研究の立場からの応用研究へのアプローチについて、それぞれ分かりやすく解説いただきました。今回の若手の会参加を通じて新たに本会へ入会された方々もいらっしゃいました。今後も本会の発展の一助となり、何より、参加者の皆様の研究発展に繋がるような若手の会を運営していきたいと考えております。寺島研究室や池内研究室の方々には事前準備から当日の雑用までお手伝いいただき感謝いたします。馬場将人さん(筑波大学)にご執筆いただいた参加報告記事もあわせてご覧ください。



セミナーの集合写真

報告記事

光合成学会若手の会第三回セミナーに参加して

筑波大学 植物代謝生理学研究室

馬場 将人

光合成学会若手の会は「誰でも気軽に参加できる会」「ユーモアのある会」だと、参加した経験をお持ちの先輩方に聞き、期待に胸を躍らせながら自己紹介を準備しました。この会では、自己紹介の機会が参加者全員に与えられるとのこと。私にとっては初めての体験で新鮮でしたが、これはぜひ継続して欲しい、素晴らしい趣向だと思います。

当日頂いた要旨集を見て驚愕。最近こそ「微細藻類 *Botryococcus braunii* を用いたバイオマス生産」という少し流行りのテーマも扱っていますが、元々は「微細藻類 *Chlamydomonas reinhardtii* の高CO₂順化機構と予想される、細胞外タンパク質の組成変化」という、世界でも稀な研究を行っている私をして、研究紹介、自己紹介ともユニークな若手研究者が目白押しでした。前評判に納得しつつ、なんだか安心しました。

自己紹介では、みなさんが自分の研究を熱く魅力的に紹介する様子がなにより印象的でした。同じく若手研究者として、そのひたむきな姿勢には奮起を促されました。ひとつの発表に対し、専門分野に拘らない質疑応答が気兼ねなく交わされるので、進行は充実しつつも和やかなものでした。特に記憶に残ったのは、初めて触れた生物物理学研究の発表でした。お恥ずかしながら、私はこれまで光合成酸素発生反応の研究背景を知らずにおりました。鈴木博行さん（東京理科大学）が発表されたフーリエ変換型赤外分光法を用いた一連の研究において、ある生命現象が物理学的に理解される過程を知り、自分が持っていたイメージとは大きく異なる生物学のありかたに深

い感銘を受けました。

配慮の行き届いた運営にも助けられ、懇親会では、当日初対面であった方々ともまったりとお話することが出来ました。質疑応答の枠では収まり切らなかった議論を尽くし、あるいは楽しく談笑するうち、自然と会に馴染むことができたように思います。

二日目は『多様な光合成研究を知ろう』ということで、なるほど多様性溢れるテーマが並びました。大西紀和先生（岡山大学）が発表された *C. reinhardtii* や、今村荘輔先生（中央大学）の発表にあった *Cyanidioschyzon merolae*、*Pseudochoricystis ellipsoidea* は、私にとってはなじみの生物材料ですが、他の方にとっては真新しく映ったのではないのでしょうか。光合成生物をより深く理解するためには、研究手法はもちろん、生物材料の多様性を考慮することがやはり必要だと思います。実際、私も本セミナーにて、陸上植物のCO₂利用について深く知る機会に恵まれ、新たな見解を得ることが出来ました。

終わってみれば、気軽な雰囲気でありつつも情報量の多いセミナーでした。これには、多様な研究を柔軟に受け入れる若手の会のスタイルが関係していると思います。もちろん気さくな先輩方や円滑な運営も、初めて参加した私をサポートしてくれました。本稿をお読みになり興味をもたれた方は、ぜひ一度参加してみることをお勧めします。

最後になりましたが、セミナーを主催いただきました会長の成川礼先生（東京大学）ならびに運営の皆さまに、この場を借りて深く御礼申し上げます。

集会案内

第2回日本光合成学会年会およびシンポジウム開催予告

来年の日本光合成学会年会およびシンポジウムは、以下の日時・場所で開催される予定です。詳細については、次号に掲載する予定です。ポスター発表など、概要はおおむね例年通りです。皆様の多数のご参加をお待ちしています。

テーマ： 「光合成生産と光合成の光エネルギー変換メカニズム (仮)」

オーガナイザー： 太田 啓之 (東京工業大学)、野口 巧 (名古屋大学)

日時： 平成23年6月3日 (金)、4日 (土)

会場： 京都大学

京都大学百周年時計台記念館 (百周年記念ホール、国際交流ホール)

事務局からのお知らせ

★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費 (個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000) を郵便振替 (加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290) にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

★会員名簿管理方法の変更と会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。昨年度、長期滞納者を名簿から削除するの願いをしましたが、会費徴収状況は未だに健全な状態にはありません。そこでお願いです。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、今までどおり会費未納が印字されています。1年間会費を滞納された場合、次年度より会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の1年分もあわせてお支払いいただきます。2011年1月に名簿の変更を行いますので、複数年度の会費滞納者はおられなくなります。今年度は従来通りですので、現在、複数年度の滞納のある方は (封筒に未納年が印字されています)、今年度分まであわせてお支払いください。納められた会費は、古い未納年から順に充当いたしております。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局 (shikanai@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp) までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

日本光合成学会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

] 氏名（漢字）（必須）

氏名（ひらがな）

氏名（ローマ字）

] 所属

] 住所1

〒

] 住所2（自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入）

〒

] TEL1

] TEL2（必要な方のみ記入）

] FAX

] E-mail

個人会員年会費 1,500円（会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む）

賛助法人会員年会費 50,000円（上記と会誌への広告料を含む）

（振込予定日：平成 年 月 日）（会員資格は1月1日～12月31日を単位とします）

*複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に（何年度～何年度分）とお書き下さい。

連絡先

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

池内・成川研究室内 日本光合成学会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>

郵便振替口座 加入者名：日本光合成学会 口座番号：00140-3-730290

日本光合成学会会則

第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

第4条 会員

1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

第5条 組織および運営

1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

2. 幹事

幹事数名をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定され

る。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。
2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。
 - 1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項
 - 2) 前年度の事業経過
 - 3) 当年度および来年度の事業計画
3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。
 - 1) 会計に係わる事項
 - 2) 会則の変更
 - 3) その他の重要事項

第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

付則

- 第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。
- 第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。
- 第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。
- 第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

1. 幹事会：

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。
2. 事務局：

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期（10年）を目途に再任されることが望ましい。
3. 次期会長：

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。
4. 常任幹事会：

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

幹事会名簿

- 浅田浩二 福山大学生命工学部
池内昌彦 東京大学大学院総合文化研究科
池上 勇 帝京大学薬学部
泉井 桂 近畿大学生物理工学部生物工学科
伊藤 繁 名古屋大学大学院理学系研究科
井上和仁 神奈川大学理学部
臼田秀明 帝京大学医学部
榎並 勲 東京理科大学理学部
大岡宏造 大阪大学大学院理学研究科
大杉 立 東京大学大学院農学生命科学研究科
太田啓之 東京工業大学
バイオ研究基盤支援総合センター
大政謙次 東京大学大学院農学生命科学研究科
小川健一 岡山県生物科学総合研究所
小野高明 茨城大学工学部生体分子機能工学科
小俣達男 名古屋大学大学院生命農学研究科
垣谷俊昭 名城大学理工学部教養教育/
総合学術研究科
金井龍二 埼玉大学 (名誉教授)
小池裕幸 中央大学理工学部
小林正美 筑波大学大学院数理工学研究所
坂本 亘 岡山大学資源生物科学研究所
櫻井英博 早稲田大学 (名誉教授)
佐藤和彦 兵庫県立大学大学院生命理学研究科
佐藤公行 岡山大学 (名誉教授)
佐藤直樹 東京大学大学院総合文化研究科
佐藤文彦 京都大学大学院生命科学研究科
鹿内利治 京都大学大学院理学研究科
重岡 成 近畿大学農学部
島崎研一郎 九州大学大学院理学研究院
嶋田敬三 首都大学東京都市教養学部
沈 建仁 岡山大学大学院自然科学研究科
杉浦昌弘 名古屋市長立大学
大学院システム自然科学研究科
杉田 護 名古屋大学遺伝子実験施設
杉山達夫 中部大学生命健康科学研究所
- 鈴木祥弘 神奈川大学理学部
園池公毅 東京大学大学院新領域創成科学研究科
高市真一 日本医科大学生物学教室
高橋裕一郎 岡山大学大学院自然科学研究科
田中 歩 北海道大学低温科学研究所
都筑幹夫 東京薬科大学生命科学部
寺島一郎 東京大学大学院理学系研究科
徳富(宮尾)光恵 農業生物資源研究所
光合成研究チーム
鞆 達也 東京理科大学理学部
南後 守 名古屋工業大学応用化学科
西田生郎 埼玉大学大学院理工学研究科
西山佳孝: 埼玉大学理工学研究科
野口 巧 筑波大学大学院数理工学研究所
長谷俊治 大阪大学蛋白質研究所
林 秀則 愛媛大学
無細胞生命科学工学研究センター
原登志彦 北海道大学低温科学研究所
彦坂幸毅 東北大学大学院生命科学研究科
久堀 徹 東京工業大学資源化学研究所
檜山哲夫 埼玉大学理学部 (名誉教授)
福澤秀哉 京都大学大学院生命科学研究科
藤田祐一 名古屋大学大学院生命農学研究科
前 忠彦 東北大学大学院農学研究科
牧野 周 東北大学大学院農学研究科
増田 建 東京大学大学院総合文化研究科
松浦克美 首都大学東京都市教養学部
皆川 純 北海道大学低温科学研究所
三室 守 京都大学大学院地球環境学堂
宮地重遠 海洋バイオテクノロジー研究所
村田紀夫 基礎生物学研究所
山本 泰 岡山大学大学院自然科学研究科
山谷知行 東北大学大学院農学研究科
横田明穂 奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
和田 元 東京大学大学院総合文化研究科

編集後記

本号の名古屋大学の山本さんの紹介記事にもありますが、私も8月に北京で開催された国際光合成会議に参加してきました。いろいろと興味深い話題がありましたが、やはり最も印象に残ったのは岡山大学の沈先生の発表後の、聴衆全員によるスタンディングオベーションでした。その詳細については、本号の佐藤公行先生の解説記事もご覧ください。紹介記事にもある万里の長城へのツアーにも参加してきましたのですが、暑い最中に急勾配の階段を延々と登るもので、非常にしんどいものでした。しかし、参加した光合成研究者たちの体力を知る上では興味深かったとも言えます。さて本号の解説特集は、今年の春に行なわれたシンポジウムの演者による「光エネルギーの新しい利用法と光合成研究の温故知新」（筑波大学 小林正美先生編）です。後半の「光合成研究の温故知新」は、光合成研究の歴史を知る上で有用な資料であるとともに、読み物としても楽しめる内容です。若い世代の方々には（私も含めて?）、光化学系IIの反応中心タンパク質である”D1”の語源を初めて知った人も多かったのではないのでしょうか? ひとすべ暑かった夏も過ぎ、この号を編集している現在は、秋から冬に差し掛かろうとしています。春のシンポジウムから思うと、時間の経つ早さに戸惑いつつも、後少しでひとすべ多忙であったこの1年を何とか乗り切れそうだとの安心感も感じています。年末から正月にかけて、休める方もそうでない方もおられると思いますが、皆様よいお年をお過ごしください。

＜東京大学 増田 建＞

記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方々からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎いたします。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集担当、増田 (ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp) まで御連絡下さい。

「光合成研究」編集委員会

編集担当 増田 建 (東京大学)
発行担当 和田 元 (東京大学)
編集委員 栗栖源嗣 (大阪大学)
編集委員 野口 航 (東京大学)
編集委員 増田真二 (東京工業大学)

日本光合成学会 2009-2010年役員

会長 池内昌彦 (東京大学)

事務局 鹿内利治 (京都大学)

常任幹事 沈 建仁 (岡山大学) (日本光生物学協会)
常任幹事 和田 元 (東京大学) (会誌担当)
常任幹事 増田 建 (東京大学) (会誌担当)
常任幹事 佐藤直樹 (東京大学) (ホームページ担当)
常任幹事 寺島一郎 (東京大学) (企画担当)
常任幹事 高市真一 (日本医科大学) (企画担当)
常任幹事 小川健一 (岡山県生物科学総合研究所) (企画担当)
常任幹事 西田生郎 (埼玉大学) (企画担当)
常任幹事 小林正美 (筑波大学) (企画担当)
常任幹事 原登志彦 (北海道大学) (企画担当)
常任幹事 牧野 周 (東北大学) (企画担当)
常任幹事 伊藤 繁 (名古屋大学 名誉教授) (企画担当)
常任幹事 太田啓之 (東京工業大学) (企画担当)

会計監査 小池裕幸 (中央大学)

光合成研究 第20巻 第3号 (通巻59号) 2010年12月31日発行

日 本 光 合 成 学 会

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

池内・成川研究室 日本光合成学会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>

郵便振替口座 加入者名: 日本光合成学会 口座番号: 00140-3-730290