

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)

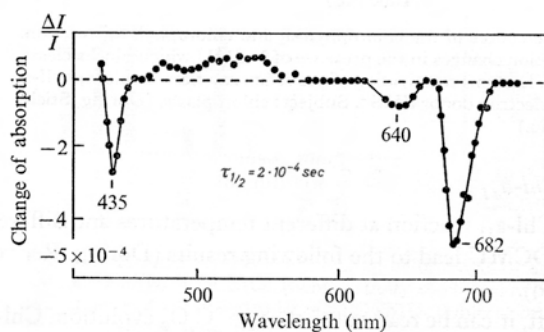
²⁾ 光合成研究の分野における先駆者の一人で、クロロフィル蛋白質に関する研究や細胞破砕器“French Press”の考案で有名な科学者。

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⁾の超遠心分画法による光化学系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

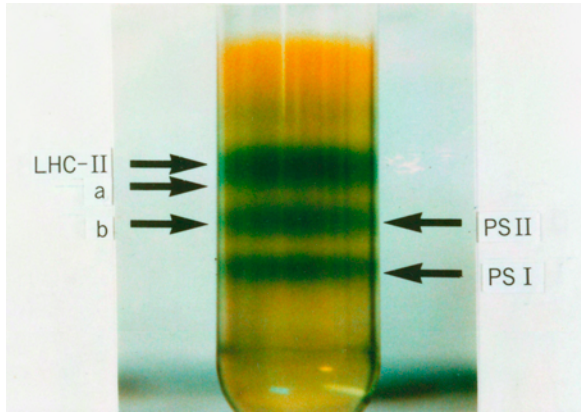


図1 蔗糖密度勾配遠心による色素蛋白質複合体類の分離

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 α 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

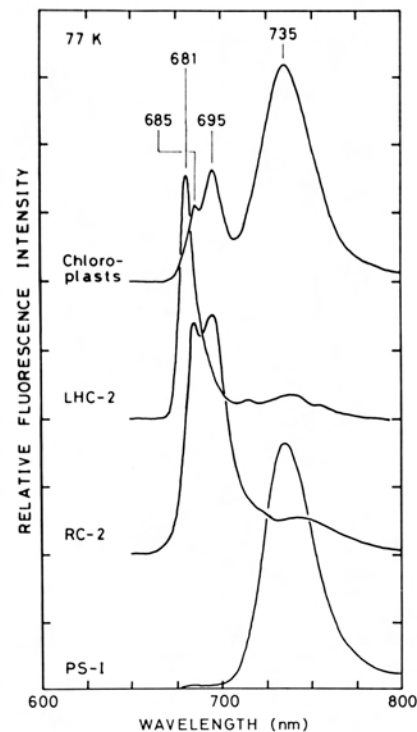


図2 単離された色素蛋白質複合体類の蛍光発光スペクトル(77 K)

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。

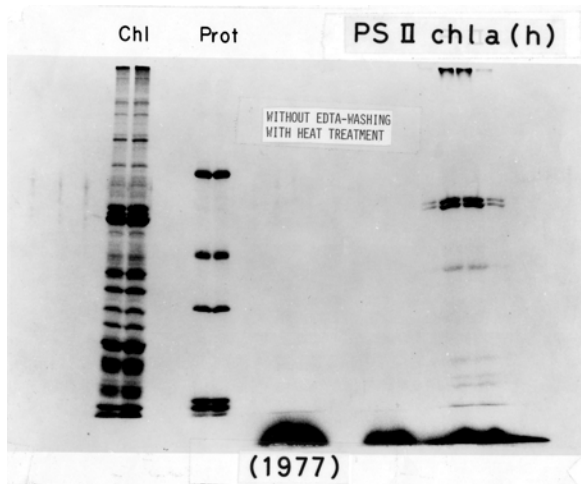


図3 光化学系II複合体のポリペプチド組成のSDS-PAGEによる分析（「PSIIchl a」が光化学系II複合体に対応）

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)

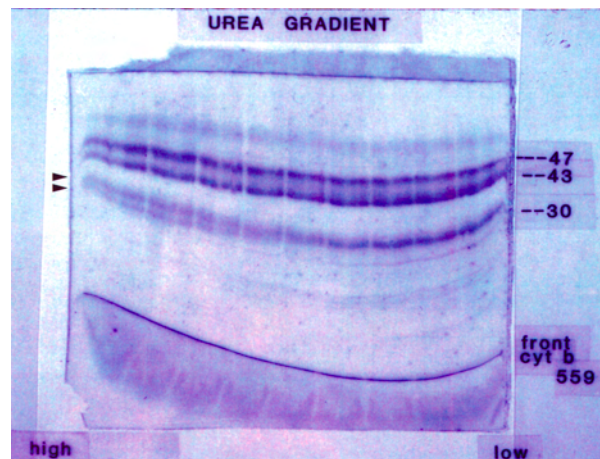


図4 尿素濃度勾配条件下でのSDS-PAGEによる光化学系II複合体のポリペプチド組成の分析（尿素濃度は、右から左へ、2 Mから8 Mの直線勾配）

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

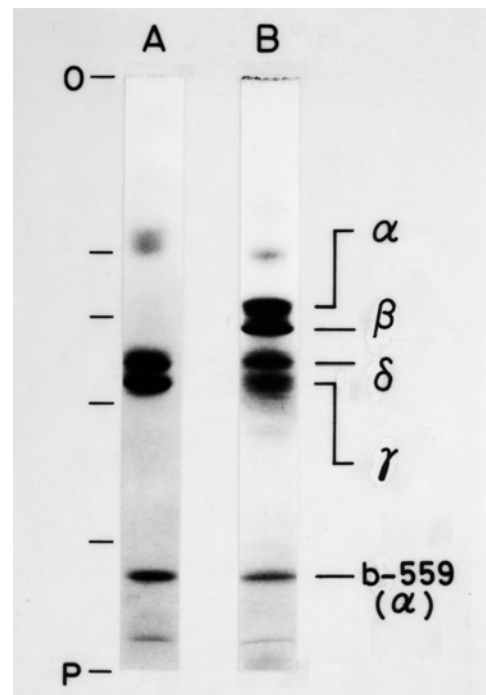


図5 D1/D2/Cyt *b*₅₅₉ 複合体 (A) と光化学系II複合体 (B) のポリペプチド組成

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づき、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

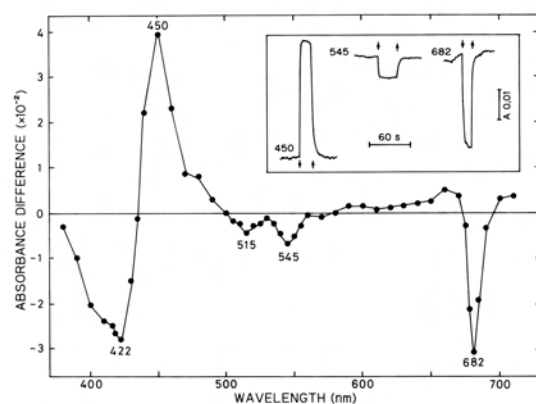


図6 D1/D2/Cyt b_{559} 複合体におけるフェオフィチンの光還元（明暗差スペクトル）

⁶ “反応中心”と言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。

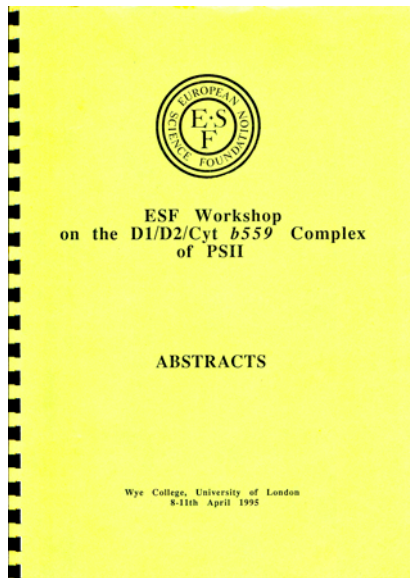


図7 D1/D2/Cyt *b*₅₅₉ 複合体に関するワークショップ講演要旨集の表紙

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

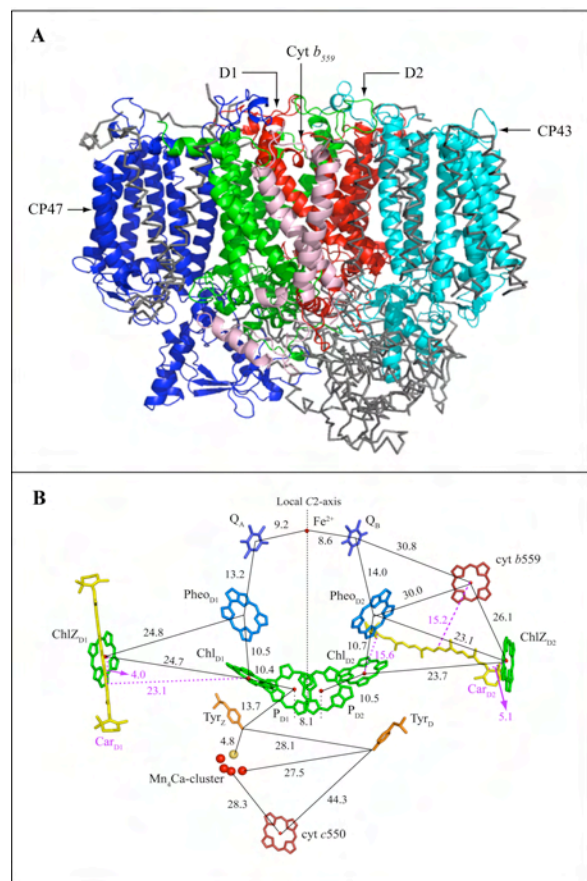


図8 結晶のX線解析で解明された *Thermosynechococcus vulcanus* の光化学系II複合体の構造（沈 建仁氏から提供された発表準備中の資料から）

(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 mangano-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