

解説

光化学系 I — P700を中心に‡

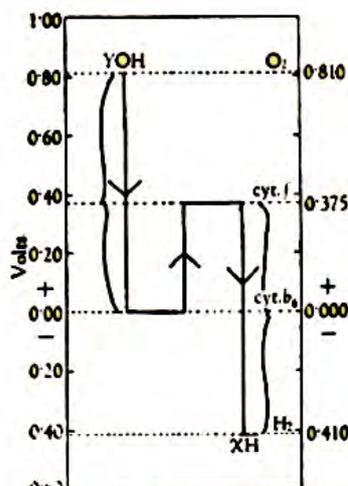
埼玉大学 名誉教授
檜山 哲夫*

1. 光化学系Iのこと

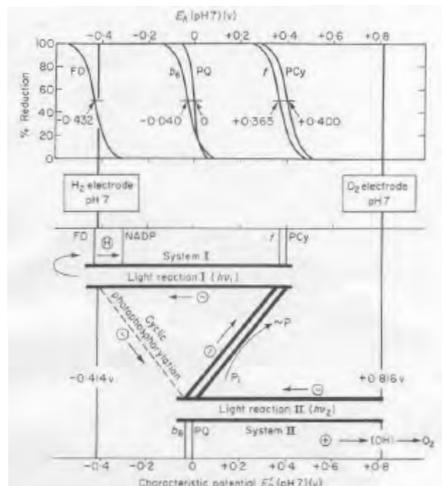
2つの光化学系という概念は、1960年代初めイギリスのHillとBendallやオランダのDuysensらが提唱した。Calvinが暗反応でノーベル化学賞をもらった頃のことである。これより前（1956年）に、巧妙な実験によって、光量子が最初にひきおこす反応はある種の色素（P₇₀₀と命名）の光酸化であるという光化学反応中心色素の概念を最初に提唱したのはオランダのKokである¹⁾。2つの光化学系説が提唱されたとき、KokのP₇₀₀

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）。

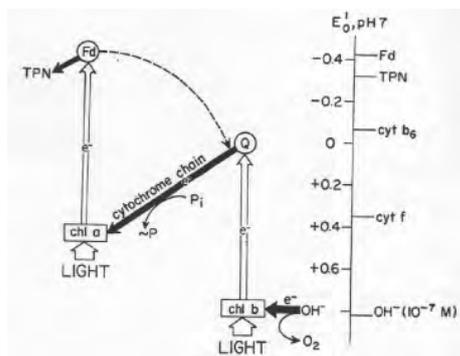
私が光合成の世界に入り込んだのは1967年秋だから、もうこうした概念はすっかり定着していた。この当時盛んにPSIの反応中心活性をもつ複合体を葉緑体のチラコイド膜から単離調製することが試みられていた。材料は高等植物（主にホウレンソウ）の葉緑体やシアノバクテリア（ランソウ）



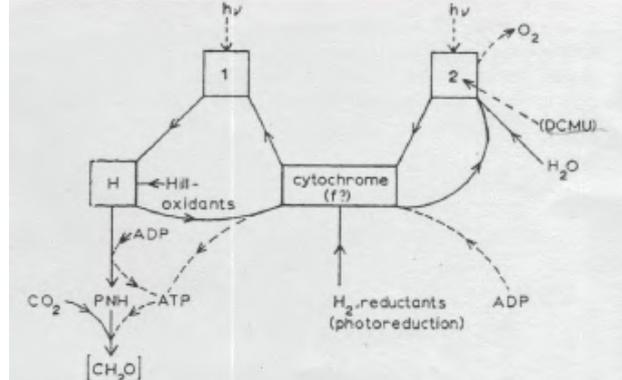
Hill & Bendall (1960) *Nature* 186, 136.



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ってみることになった。

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だけだが)。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、私がい始めた 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

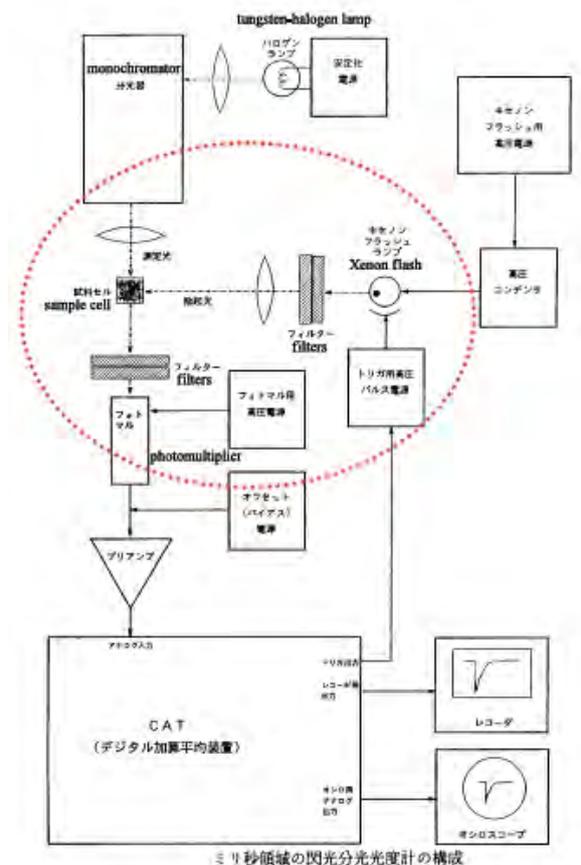


図2 An instrument set-up for measuring flash-induced absorbance changes in msec range¹⁰⁾.

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あたるようにし、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

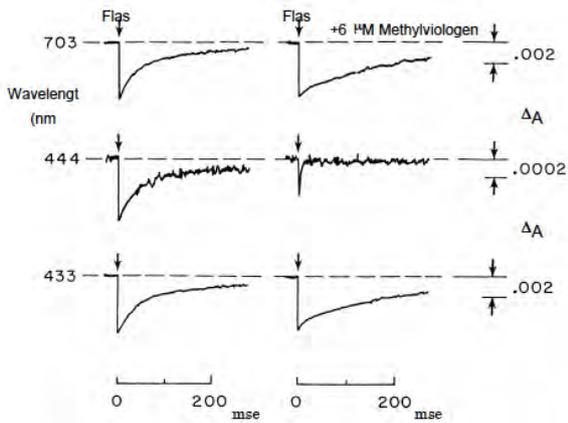


図3 Flash-induced absorbance changes at 703 nm (upper), 444 nm (middle) and 433 nm (lower), in the absence (left) and the presence (right) of methyl viologen. Photosystem I particles from spinach (D144) was used for the experiment.

(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標品も使った。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

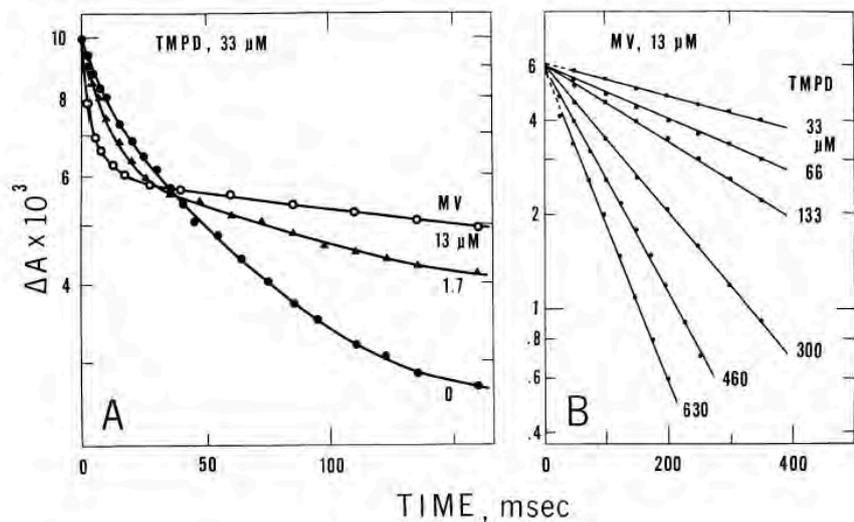


図4 Flash-induced absorbance changes replotted on semi-logarithmic chart paper. Details are described in the text and the original report¹²⁾.

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:

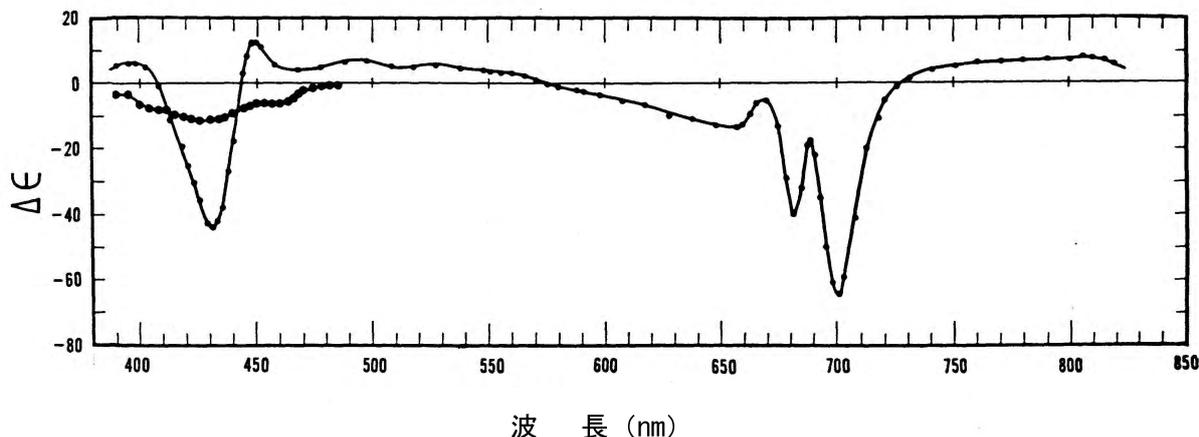


図5 Flash-induced light-minus-dark difference spectra of P₇₀₀ and P₄₃₀¹⁴⁾.

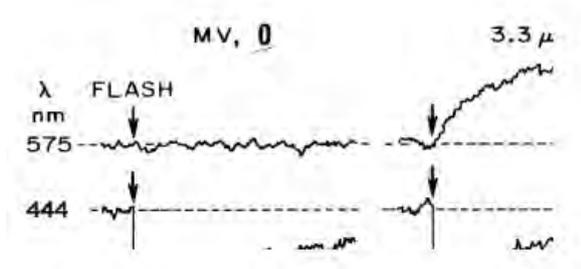


図6 Flash-induced absorbance changes at 575 nm (upper) and 444 nm (lower), in the absence (left) and the presence (right) of methyl viologen.

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してきていたが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ったので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、どちらも苦学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。それを同じバ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。

バ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

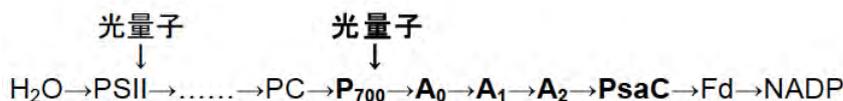


図7 PSI付近を中心とした電子の流れ

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発見したとのこと。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

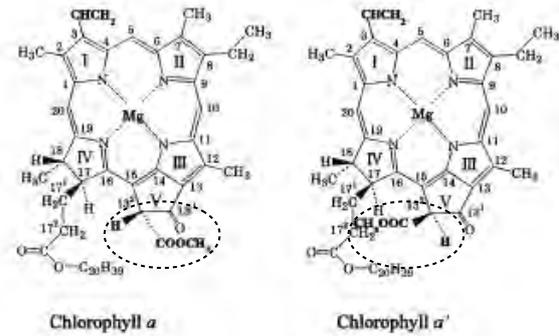


図8 Structures of chlorophyll *a* and its epimer, chlorophyll *a'*. Difference is shown by the circles.

(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。

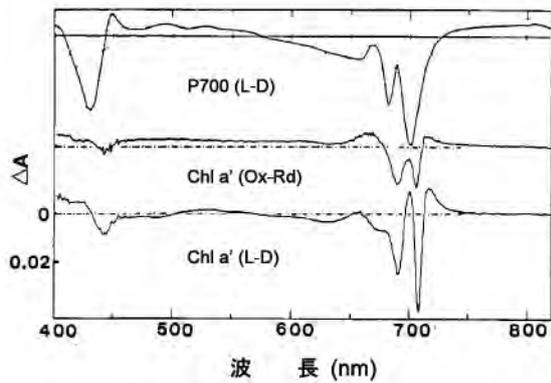


図9 Light-minus-dark difference spectrum of P700 (upper), chemically induced (middle) and light induced (bottom) oxidized-minus-reduced difference spectra of reconstituted P700 (PsaA/PsaB protein complex + chlorophyll *a'*).

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とき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