

博士論文

光合成光化学系Ⅱにおける環状電子
移動と光阻害反応初期過程

平成8年8月

広島大学大学院生物圏科学研究科

黒岩 繁 樹

①

博士論文

光合成光化学系Ⅱにおける環状電子
移動と光阻害反応初期過程

平成8年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科
生物機能科学専攻

黒 岩 繁 樹

目次

略語	1
要旨	4
序論	9
第 I 章 P S II 内環状電子移動の解析	
緒言	21
I-1. 実験材料及び実験方法	
I-1-1 クロロフィル濃度の決定	25
I-1-2 P S II 粒子の調製	25
I-1-3 集光性蛋白質の除去	25
I-1-4 水分解系の除去	26
I-1-5 非ヘム鉄の除去	26
I-1-6 非ヘム鉄の Zn^{2+} への置換	27
I-1-7 チトクロム b-559 による反応中心濃度の定量	28
I-1-8 極低温 EPR 測定による非ヘム鉄 (Fe^{3+}) の定量	28
I-1-9 ICP-AES (ICP 多元素同時原子発光分光装置) による試料中の鉄及び亜鉛の定量	30
I-1-10 レーザーフラッシュフォトリス法	31
I-1-10-1 Q_A^- 再酸化過程	34
I-1-10-2 $P680^+$ 再還元過程	37
I-1-11 酸化還元電位依存性の測定	38
I-1-12 試薬類	41
I-2. 実験結果	
I-2-1 非ヘム鉄の除去と Zn^{2+} 置換の確認	42
I-2-2 Q_A^- 再酸化過程と $P680^+$ 再還元過程の比較	42
I-2-3 Q_A , Q_B 間電子移動阻害剤の効果	48
I-2-4 Q_A^- 再酸化過程と $P680^+$ 再還元過程の酸化還元電位依存性	48
I-2-5 Q_A^- 再酸化過程と $P680^+$ 再還元過程の pH 依存性	59
I-2-6 環状電子移動と非ヘム鉄との関連性	63
I-2-7 フラッシュ依存性の測定による環状電子移動の解析	63
I-2-7-1 Q_A^- 再酸化過程のフラッシュ依存性	65
I-2-7-2 $P680^+$ 再還元過程のフラッシュ依存性	67
I-3. 考察	69
第 II 章 P S II 光阻害反応初期過程の解析	
緒言	77
II-1. 実験方法	
II-1-1 光照射処理 (光阻害処理)	83
II-1-2 カラム処理	84
II-1-3 各機能分子 (Chl a, Chl b, β -Car, pheo a, PQ_A , キサントフィル類) の定量	85
II-2. 実験結果	
II-2-1 TrisPS II RC と $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC の機能分子組成	89

II-2-2	Chl a, Chl b, Pheo a, キサントフィル類の分子数の 光照射処理による変化	89
II-2-3	酸化側、還元側ともに阻害される条件における光阻害過程 (Mn ²⁺ , フェリシアナイドともに添加しない場合)	93
II-2-4	還元側阻害条件における光阻害過程 (Mn ²⁺ のみを添加した 場合)	98
II-2-5	酸化側阻害条件における光阻害過程 (フェリシアナイドのみを 添加した場合)	98
II-2-6	酸化側、還元側ともに機能している条件における光阻害過程 (フェリシアナイド及びMn ²⁺ を添加した場合)	103
II-2-7	酸素の効果	106
II-2-8	pH の効果	106
II-3.	考察	110
本研究の総括		121
参考論文		123
付録		
1.	PS II 粒子の調製方法	129
2.	集光性蛋白質の除去法	131
3.	水分解系の除去	132
4.	非ヘム鉄の除去	133
5.	非ヘム鉄のZn ²⁺ への置換	134
6.	325nm に見られる吸光度変化モデル	135
7.	レーザーフラッシュフォトリシス法で測定された緩和過程の解析 プログラム	137
謝辞		147
参考文献		148

略語

- Bchl b; bacteriochlorophyll b
Bpheo b; bacteriopheophytin b
C550; Q_A^- の電場による pheo a の吸収ピークシフトを利用した Q_A^- の指標
 β -Car; β -carotene
Chl; chlorophyll
Chl a; chlorophyll a
Chl b; chlorophyll b
CP43; Chlorophyll binding protein, アンテナクロロフィル結合蛋白質の一つ (分子量 約 43kDa)
CP47; アンテナクロロフィル結合蛋白質の一つ (分子量 約 47kDa)
Cyt b-559; チトクロム b-559
D; P680への電子供与体の一つであるチロシン残基
D1; 反応中心蛋白質複合体を構成する2つのコアサブユニットの1つ
D2; 反応中心蛋白質複合体を構成する2つのコアサブユニットの1つ
DCIP; 2,6-dichlorophenolindophenol
DCMU; 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
DM; n-dodecyl- β -D-maltoside
DTN; Sodium dithionite
Em; midpoint potential
EPR; Electron Paramagnetic Resonance
Fd; Ferredoxin, フェレドキシン
-Fe²⁺-TrisPS II RC; TrisPS II RCから非ヘム鉄を除去した試料。
FNR; Ferredoxin-NADP-Reductase, NADP還元酵素。
HEPES; N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HP; High Potential form, Cyt b-559 の高電位型
HPLC; High Performance Liquid Chromatography
ICP-AES; Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy
IP; Intermediate Potential form, Cyt b-559 の中間電位型

I P' ; Cyt b-559 のもう一つの間電位型
L H C I ; Light-Harvesting Complex I, P S I に結合する集光性蛋白質複合
体
L H C II ; Light-Harvesting Complex II, 主に P S II に結合する集光性蛋白質
複合体
L P ; Low Potential form, Cyt b-559 の低電位型
 μ M C y t ; Cyt b-559 の濃度 (μ M) 、反応中心濃度に等しい。
M E S ; 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
M O P S ; 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
M Q ; menaquinone
P 680 ; primary donor chlorophyll a of PS II, 反応中心 (C h l a の 2 量体)
P 960 ; Rps. viridis における反応中心 (Bchl b の 2 量体)
P C ; Plastocyanin, プラストシアニン
Pheo a ; pheophytin a, フェオフィチン a
P M S F ; Phenylmethylsulfonyl fluoride
P Q_A ; plastoquinone A, プラストキノン A
P S I ; photosystem I, 光化学系 I
P S II ; photosystem II, 光化学系 II
PS II RC ; P S II から、集光性蛋白質 (L H C II) を除去した試料。
Q_A ; primary quinone acceptor of PS II, 第 1 キノン電子受容体
Q_A 活性 ; 反応中心の光励起に伴う Q_A 光還元活性。Q_A⁻ の生成に伴う 325nm にお
ける吸光度変化として観測される。
Q_B ; secondary quinone acceptor of PS II, 第 2 キノン電子受容体
Rps. viridis ; Rhodospseudomonas viridis
Rb. sphaeroides ; Rhodobacter sphaeroides
T r i s ; tris(hydroxymethyl) aminomethane
TrisPS II RC ; PS II RC から、T r i s 処理によって水分解系を除去した試料
U Q ; ubiquinone
Z ; primary electron donor, P 680 への第 1 電子供与体であるチロシン残基
Zn²⁺-TrisPS II RC ; TrisPS II RC の非ヘム鉄を Zn²⁺ に置換した試料

還元側；P S II内で電子を受け取る部分、すなわち Q_A 、 Q_B 周辺

環状電子移動； $Q_A^- \rightarrow P680^+$ 間で何かが中間に介在する電荷再結合反応

キサントフィル類；カロテノイドの中で、水酸基、カルボニル基、エポキシドなどの形で酸素を含むもの。本研究ではネオキササンチン、ヴィオラキササンチン、ルテインを検出した。

機能分子；反応中心P680へのエネルギー伝達機能に関係すると考えられる分子（Chl a, Chl b, カロテノイド）、および電子伝達機能に関係すると考えられる分子（P680を形成するChl a, pheo a, PQ_A ）

逆反応；back reaction, 本論文では、環状電子移動と明確に区別するために $Q_A^- \rightarrow P680^+$ の直接的な電荷再結合反応として定義する。ただし、環状電子移動も含めて $Q_A^- \rightarrow P680^+$ 間の電荷再結合反応をすべて逆反応と呼ぶことも多い。

酸化側；P S II内で電子を放出する部分、すなわちP680、Zおよび水分解系周辺

直線状電子移動；正常な電子移動（水 \rightarrow Z \rightarrow P680 \rightarrow Pheo a \rightarrow $Q_A \rightarrow Q_B \rightarrow$ キノンプール）

要旨

光合成光化学系Ⅱ (P S Ⅱ) は高等植物チラコイド膜上に存在する蛋白質複合体であり、光励起によって水から電子を奪う、光合成の初発反応の場である。P S Ⅱから放出された電子によって、最終的には還元力を持つN A D P Hが生成され、また、電子を受け渡す過程で生じたH⁺濃度勾配を利用してA T Pが作られ、チラコイド膜上における光エネルギーの化学エネルギーへの変換が完了する。P S Ⅱと類似した構造と機能を持つと予想されている、光合成細菌 (Rhodospseudomonas viridis および Rhodobacter sphaeroides) の光化学反応中心の単結晶X線構造解析の成功により、P S Ⅱ反応中心の構造および電子伝達機構が推定された。しかし、P S Ⅱは光合成細菌反応中心にはない水分解能を持つ特徴がある。またP S Ⅱは光合成細菌に比べてはるかに強い光にさらされる環境にあり、P S Ⅱ内で生じる危険なラジカルに対処しなければならない。そのため、強光照射により光合成能が落ちるといふ現象、即ち“光阻害反応”が生じる。近年、光阻害の機構に関する研究が注目を集めてきたが、P S Ⅱ反応中心を構成するD 1蛋白質の分解過程と光阻害反応との関係についての研究に比べ、D 1蛋白質分解にいたる前のその反応の初期過程及びその反応を防ぐための機構に関する研究は少なかった。この論文は、光阻害条件下での防御的な役割が予想されるP S Ⅱ内環状電子移動と光阻害反応の初期過程との関連について行った研究をまとめたものである。

本論文の第Ⅰ章では、P S Ⅱ内環状電子移動の性質と機構に関して論述したものである。P S Ⅱ内の通常の (正常の) “直線状電子移動” 経路では、クロロフィル2量体である反応中心 (P680) が、光による電荷分離を起こしてP680⁺となり、電子がフェオフィチンa (Pheo a), それぞれプラストキノンAから成るQ_A, Q_Bと受け渡され、Q_Bは2個の電子と2個のH⁺をそれぞれ得た後、プラストキノールAとなり、チラコイド膜中のプラストキノンと入れ替わり、光合成光化学系Ⅰ (P S Ⅰ) へと電子が受け渡される。それと同時に、P680⁺によってチロシン残基である第1電子供与体 (Z) が酸化され、生じたZ⁺はさらに水分解系と呼ばれる部分を通して水を酸化する。一方、“環状電子移動”は電荷分離で生じた電荷をP S Ⅱ内で再結合させてしまう過程であり、一見、光エネルギーを浪費するだけのように見える。しかし、水分解系が失われて、電子の供給が停止した場合や、チラコイ

ド膜が還元型プラストキノン（プラストキノールA）で充満してP S IIからの電子の放出が停止した場合などは、P S II内で電子をバイパスする機構によって、反応性の高いラジカルを消去することが重要になると予想される。

従来から、環状電子移動経路中の電子伝達分子としてP S II蛋白質複合体に存在するチトクロム b-559 が機能しているのではないかという報告があったが、チトクロム b-559 の酸化還元過程は、光照射に伴い、還元と酸化が同時に起こるため、明確な還元及び酸化の速度定数を解析するのは極めて困難であった（注）。定常光を用いた実験でのみ得られるデータの解析の結果、得られたチトクロム b-559 経路の環状電子移動速度は半減期 35~100ms であり、直線状電子移動における $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 電子移動が 100~200 μ s の半減期で起こるのと比較してかなり遅く、生理的な条件下では機能していないとも考えられてきた。しかしチトクロム b-559 は少なくとも二つの電位型を持ち、条件によっては相互に変換しうるという特徴を持ち、その生理的意義は現在に至るも議論を呼んでいる。

また、P S II 反応中心にはもう一つの機能の不明な鉄イオンである、非ヘム鉄が Q_A 、 Q_B 間に存在する。非ヘム鉄の酸化還元状態は基本的には液体ヘリウム温度によるE P R測定によって決定するほかなく、当然生理的条件下での酸化還元状態の時間変化は測定しえない。非ヘム鉄に関して、その酸化還元電位が pH 変化することと、パルス光照射蛍光測定より、酸化された状態の非ヘム鉄は Q_A^- から半減期数 μ s以下で電子を受け取るということが分かっているのみであった。

本章では、P S IIの水分解系を除去した系で、反応中心P 680と Q_A 及び Q_B それぞれの酸化還元に伴う吸光度時間変化を、レーザーフラッシュフォトリス法で観測することで環状電子移動の挙動を解析した。その結果、水分解系の代わりに人工電子供与体として Mn^{2+} を加えることで、直線状電子移動のみ起こる条件にすると消滅する電子移動過程（P 680⁺再還元過程と Q_A^- 再酸化過程で、それぞれ観測される半減期 100~200 μ s の成分、およびP 680⁺再還元過程で観測される 700 μ s~1ms の成分）として環状電子移動の存在を明確にした。このP 680⁺再還元過程、 Q_A^- 再酸化過程、それぞれで観測される半減期 100~200 μ s 成分の環状電子移動量の酸化還元電位依存性は、チトクロム b-559 の高電位型（ $E_m \doteq 440mV$ ）

（注） Q_A^- により生ずる電場がチトクロム b-559 のヘムの吸収スペクトルに変化をもたらす electrochromism のため、チトクロム b-559 の酸化還元の過渡現象を正確に測定できないと言われている。

の酸化還元状態の変化とよく対応し、高電位型が酸化型のとき環状電子移動が大きく観測できた。さらに、それぞれの $100\sim 200\ \mu\text{s}$ 成分の環状電子移動量は大きく pH の影響を受け、pH 6.5 を変化の中間点として、高い pH では環状電子移動が大きく観測できた。ところが、チトクロム b-559 の電位は pH 依存性を示さないため、この現象は pH の影響を受ける別の因子の存在を示している。その因子として $-60\text{mV} / \text{pH unit}$ で電位が変化することが報告されている非ヘム鉄 ($E_m \approx 400\text{mV}$, pH 7.0) であると仮定すれば、非ヘム鉄からチトクロム b-559 への電子移動を考えた場合、pH 6.5 付近で非ヘム鉄の電位はチトクロム b-559 の高電位型の電位である 440mV と等しくなる。そのため、これ以下の pH では、その電子移動が抑えられ、これ以上の pH では、その電子移動が増大すると考えられる。これを裏付けるように、環状電子移動量は非ヘム鉄を持つ試料の方が、それを除去した試料の 2 倍近い pH 変化を示した。これらの事実から環状電子移動とチトクロム b-559 の高電位型及び非ヘム鉄との関わりが明らかになった。

さらに詳細に環状電子移動過程に関して調べる目的で、励起フラッシュごとに P 680^+ 再還元過程と Q_A^- 再酸化過程を測定した。 P 680^+ 再還元過程では、最初の光励起で Z から P 680^+ へ電子が移動する過程が観測され、それ以降の光励起で $100\sim 200\ \mu\text{s}$ 成分が出現した。 Q_A^- 再酸化過程では、最初の光励起で Q_A^- から非ヘム鉄 (Fe^{3+}) へ電子が移動する過程が観測され、それ以降の光励起で $100\sim 200\ \mu\text{s}$ 成分が出現した。このことから、最初の光励起で Z^+ と還元型非ヘム鉄 (Fe^{2+}) が蓄積することによって、初めて $100\sim 200\ \mu\text{s}$ 成分の環状電子移動が生じることも示された。一方、 P 680^+ 再還元過程で観測される半減期 $700\ \mu\text{s}\sim 1\text{ms}$ 成分の環状電子移動は非ヘム鉄とチトクロム b-559 の高電位型を通らない直接的電子移動である可能性が示されたが、 Q_A^- 再酸化過程でこれに対応する成分を分離するのは困難であるため、特定するには至らなかった。

第 II 章では、環状電子移動量と、エネルギー伝達および電子伝達機能に関係すると考えられる分子 (以下、機能分子と略す) の数、特に β -カロテン、プラストキノン A の数に注目して、PS II 光阻害反応初期過程について研究したものである。D1 蛋白質分解にいたる“前”の光阻害反応の初期過程を解析するためには、まず、蛋白質分解に伴って各機能分子が失われる影響を除かなければならない。そのために、“蛋白質分解酵素阻害剤存在下”で光照射処理を行った試料を用いて環状電子

移動量の時間変化を測定するとともに、光照射処理した試料を陰イオン交換樹脂に吸着させて、反応系から離脱した機能分子類や、すでに分解が開始した反応中心複合体を洗い落とし、D1蛋白質分解開始直前の反応中心複合体中の各機能分子の数をHPLCを用いて測定した。

光照射処理によって、PS II複合体中の β -カロテン、プラストキノンAの分子数の変化のみが顕著であった。またある特定の光照射条件下で半減期100~200 μ s成分の環状電子移動量は、約1分の半減期で減少を示した。この時間領域では Q_A 、 Q_B の本体である PQ_A の数の減少は見られず、環状電子移動量の減少を機能分子レベルで説明できるものは β -カロテンのみであり、 β -カロテンの分子数は100~200 μ s成分の環状電子移動量と一次の相関を示した。

第I章で環状電子移動とチトクロムb-559の高電位型は強い相関性を持つことを示したが、チトクロムb-559に関する報告では、 β -カロテンはチトクロムb-559の光酸化に必要であるといわれている。また、水分解系を破壊したPS IIに対して光照射処理を行うと、チトクロムb-559は高電位型(HP)が半減期約1分で中間電位型(350mV)に変化し、最終的には、低電位型(LP)に変換すると報告されている。これらの半減期と減少成分の割合は本研究で示された β -カロテン及び環状電子移動量の挙動とかなりよく一致しており、 β -カロテンが損傷することによってチトクロムb-559のHPが失われることが予想される。

従って、100~200 μ s成分環状電子移動経路のチトクロムb-559のHP、 $P680^+$ 間に β -カロテンは位置すると考えられる。そこで β -カロテンは環状電子移動によって過剰な電子を酸化側に戻していると考えられる。

このとき β -カロテンの損傷はフェリシアナイド存在下の酸化的环境下では特に激しく、無酸素状態でも損傷はくい止められないことから活性酸素によって損傷したとは考えられず、明らかに β -カロテンが $P680^+$ によって酸化された結果と考えられる。また、反応中心複合体当たり8個存在する β -カロテンのうち6個分が半減期約1分で減少し、残り2個分が半減期約16分で減少したことから、驚くべきことに反応中心内部に存在する2個の β -カロテンに先だってアンテナクロロフィル結合蛋白質であるCP43、CP47中の6個の β -カロテンが損傷する可能性が高いと結論づけられた。このことから、 β -カロテンは反応中心の過剰な電子と正電荷を再結合させると同時に、過剰な正電荷を反応中心蛋白質

(D1, D2) を取り巻く CP43, CP47 蛋白質上の β -カロテンへ逃して反応中心を保護するという電荷の緩衝剂的機能を担っているということが示唆された。

一方、プラストキノンAは残りの β -カロテン数が 2~3 個になった時点で離脱を開始する場合が多い。ただし、無酸素条件下の場合は PQ_A の数はほとんど減少しなかった。

このことは、CP43, CP47 蛋白質上の β -カロテンが破壊され、反応中心複合体内部の β -カロテンまで損傷する状況になれば、それが引き金となって酸素を必要とする何らかの反応が生じ、 Q_A が放出されるという可能性を示している。

従来のモデルでは、D1 蛋白質分解の引き金として Q_A が 2 電子還元及び H^+ 化されてプラストキノールAとしてPSIIから放出されると報告されているが、本研究では pH 6.0 における光阻害の結果は pH 7.5 における光阻害の結果と大きな変化はなく、 H^+ 化モデルとは異なる Q_A 放出過程が存在することが示唆された。

以上の事実から、水分解系が損傷した状態では β -カロテンは電荷の緩衝剂的機能を持つことで反応中心を保護するとともに、D1 蛋白質分解の引き金にもなる可能性が示された。すなわち、光阻害反応初期過程において中心的な役割を果たしているのは β -カロテンであると考えられる。

序論

高等植物の光合成の場は、かつて藍藻から進化した細胞内小器官の一つである葉緑体である。葉緑体中には 2 種類の光化学系と呼ばれる蛋白質複合体があり、光エネルギーを化学エネルギーに変換している。それらは、それぞれ光化学系 I (以下 P S I と省略する)、光化学系 II (以下 P S II と省略する) と呼ばれ、チラコイド膜と呼ばれる閉じた膜系に膜蛋白質として存在している。P S II は、光励起によって水から電子を奪う、光合成の初発反応の場である。P S II から放出された電子はチトクロム b6-f 複合体、プラストシアニン (P C)、P S I の順に受け渡される。さらに電子は P S I によって光エネルギーを利用してフェレドキシン (F d)、N A D P 還元酵素 (F N R) の順に受け渡され、最終的には還元力を持つ N A D P H が生成される。また、電子を受け渡す過程で P S II、チトクロム b6-f 複合体、N A D P 還元酵素は電子の流れに共役して、H⁺ をストロマ側から奪うか、またはチラコイド内腔側 (ルーメン側) へ放出するため、チラコイド膜をはさんで H⁺ 濃度勾配が生じる。A T P 合成酵素は H⁺ 濃度勾配によって生じた電気化学ポテンシャルを利用して A T P を生成する。以上が光エネルギーを化学エネルギー (N A D P H, A T P) に変換する過程である。このエネルギーが二酸化炭素と水から糖を作るときの動力源となっている (図 1, p10)。

2 種の光化学系のうち、P S II は、先に述べたように水分子を最終的な電子供与体としている興味深い系であるが、膜蛋白質であるうえに、P S II コア蛋白質の周りに反応中心近傍アンテナクロロフィル結合蛋白質、膜表在性の水分分解系蛋白質、集光性蛋白質複合体、さらに機能のよく分かっていない多くの低分子量蛋白質など、20 種類以上の蛋白質からなる複合体であるため結晶化による X 線構造解析は非常に困難である。ところが、1984 年、Michel らにより紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas viridis* (以下 *Rps. viridis* と略す) の光化学反応中心の単結晶 X 線構造解析が成功し (1, 2)、続いて *Rhodobacter sphaeroides* (以下 *Rb. sphaeroides* と略す) でも成功したことによって (3, 4)、状況は一変した。*Rps. viridis* と *Rb. sphaeroides* は電子供与体として水ではなく乳酸などの低分子有機化合物や分子状水素を使うが、その光化学反応中心は P S II の反応中心と類似点が指摘されていた。その類似点を挙げると、

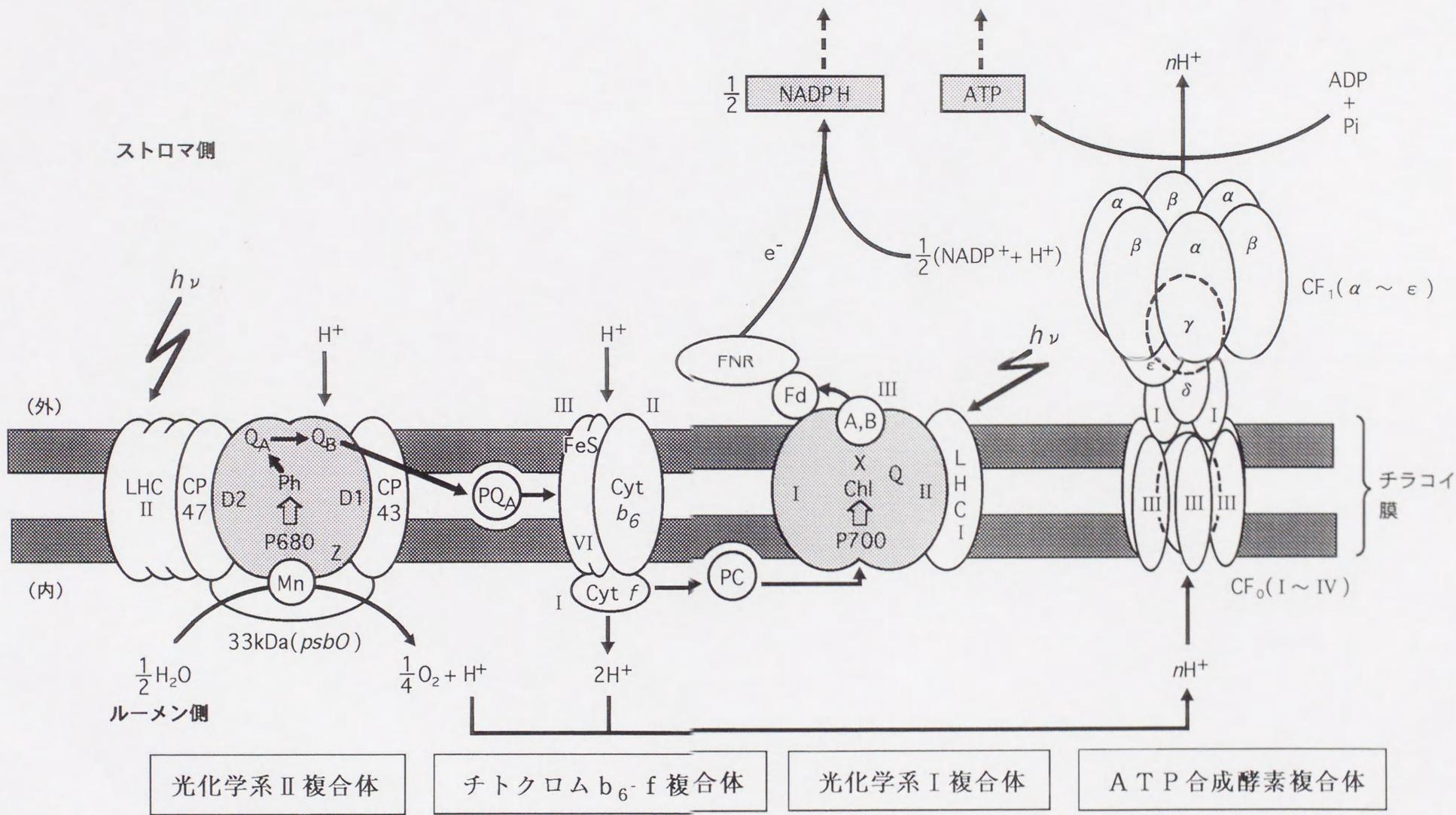


図1 チラコイド膜上で光エネルギーを化学エネルギーに変換する過程
 (佐藤公行 1990, 細胞 22, 290-295 より引用)

- 1) どちらも最初の安定な電子受容体はキノンであり、これらのキノンはそれぞれもう一つのキノンに電子を伝達する。
- 2) どちらも2分子のバクテリオフェオフィチンb (*Rps. viridis* の場合) またはフェオフィチンa (PS II の場合) を含み、それぞれ中間的な電子受容体として働く。

さらに、紅色光合成細菌の光化学反応中心蛋白質(L, Mサブユニット)と、PS II蛋白質複合体中の各蛋白質のアミノ酸配列が比較された。このとき、紅色光合成細菌において、タンパク質の構造、および補欠分子族との配位結合、水素結合、 π 電子系相互作用などに関し重要と思われるアミノ酸残基(例えば、バクテリオクロフィルの Mg^{2+} に配位結合する窒素原子を持つヒスチジン残基など)に注目して比較された。その結果、重要なアミノ酸配列が非常によく保存されており、進化的つながりがあると考えられた蛋白質は、分子量がともに32kDaであるD1, D2蛋白質であった(5)。1987年NanbaとSatohは、ホウレンソウよりPS IIの反応中心結合蛋白質複合体を単離し、PS IIの光化学反応中心P680とフェオフィチンa (Pheo a)はD1, D2蛋白質に結合していることを明らかにし、これらがPS II反応中心蛋白質であることを決定した(6)。このうち除草剤結合蛋白質として良く知られるD1蛋白質は、 Q_B (第2キノン電子受容体)の結合部位を持つことがSatohらによって、すでに報告されていた(7)。このような経緯で、*Rps. viridis*と*Rb. sphaeroides*の反応中心で得られた知見を基にして、PS II反応中心の構造および電子伝達機構がより詳細に推定された。

図2(p12)に*Rps. viridis*における電子伝達経路の模式図とPS IIにおける電子伝達経路の想像図を示す。簡単のため、PS IIの集光性蛋白質複合体と低分子量蛋白質の多くは省略した。

PS IIの光化学反応中心はP680と呼ばれる、特殊な状態のクロロフィルa (Chl a)の2量体であり、その光励起によって、Pheo aとの間に最初の電荷分離が起こる。Pheo aに移った電子はプラストキノンA (PQ_A)を本体とする Q_A (第1キノン電子受容体)へ移動し、 Q_B (第2キノン電子受容体)へ伝達される。 Q_B サイトの PQ_A は、2個の電子を受け取った後、2個の H^+ を得てから、 PQ_AH_2 となりキノンプールへ放出され、新しい PQ_A と入れ替わる。一方、電荷分離した $P680^+$ はZと呼ばれる第1電子供与体から電子を引き抜いて還元され、生じ

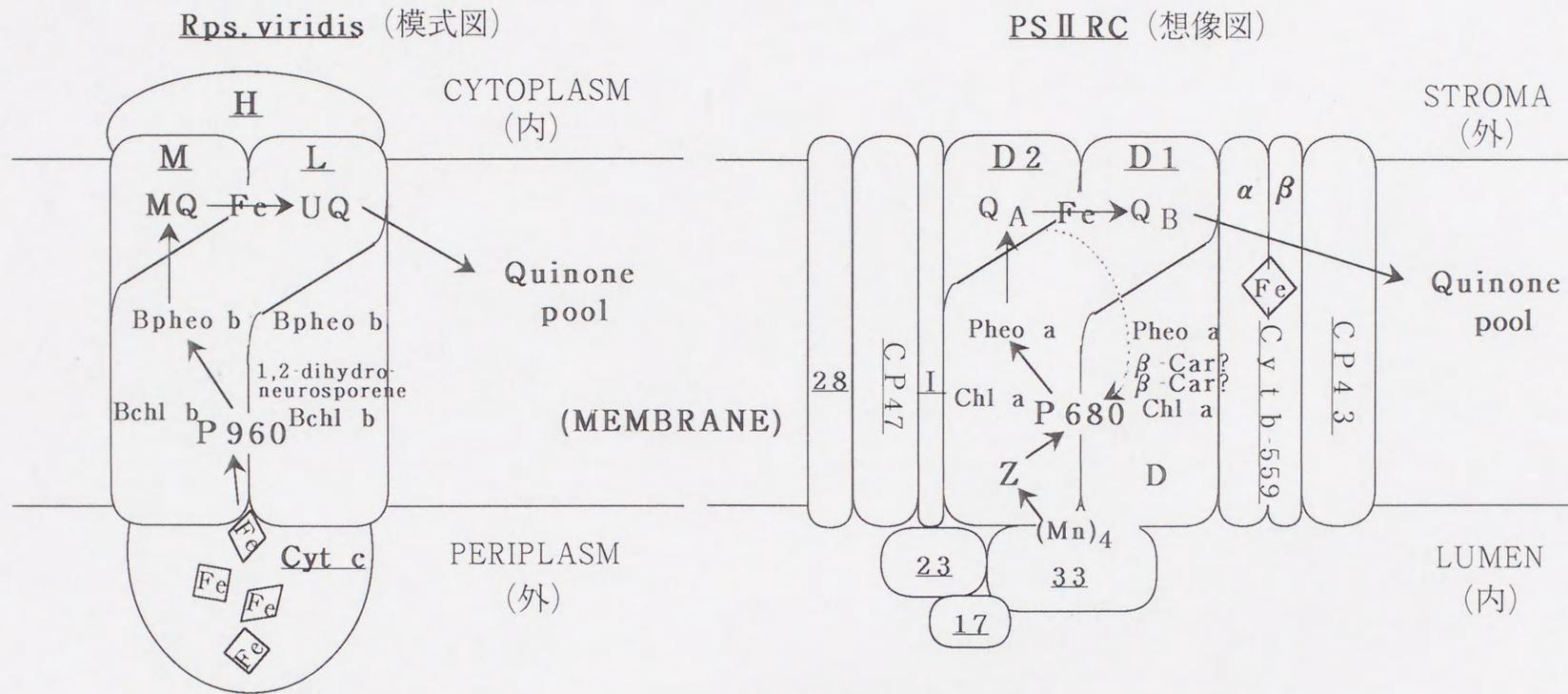


図2 光合成細菌(*Rps. viridis*)と高等植物光化学系 II (PS II) の電子伝達経路

*Rps. viridis*ではP960 (Bchl bの2量体) が光励起されて電荷分離し、電子がBpheo b, MQ (メナキノン), UQ (ユビキノン) の順に移動し、UQは2電子還元された時点で H^+ 化され、Quinone pool 中のUQと交換される。一方、生じた $P960^+$ はCyt cから電子を与えられる。PS II RCではP680 (Chl aの2量体) が光励起されて電荷分離し、電子がPheo a, Q_A , Q_B の順に移動し、 Q_B は2電子還元された時点で H^+ 化され、Quinone pool 中のプラストキノンと交換される。一方、生じた $P680^+$ はZ, Mnクラスターを通して、水から電子を受け取る。また、点線で示したのは環状電子移動である。なお、膜面に対する反応中心の向きは、光合成細菌での向きに対してPS IIは進化の過程で逆に見えるようになったと推測されている。また、それぞれカロテノイド {1,2-dihydroneurosporene, β -caroten (β -Car)} を含んでいる。

た Z^+ はMnクラスターを活性中心とする水分解系複合体を介して水分子から電子を奪って還元される。この酸化側には、Z以外にDという電子供与体が存在するが、通常の電子伝達反応ではZが機能する。水分解系活性中心Mnクラスターは4個のMnイオンからなり、Kok's cycleと呼ばれる反応経路で2分子の水を4電子酸化し、1個の酸素分子と4個の H^+ を生じる(8)。

図3(p14)に *Rps. viridis* の構造をもとにして書いたPS II反応中心のD1, D2サブユニットにおけるヘリックス構造の想像図を示す。D1, D2サブユニットはそれぞれ、A~Eの5本の膜を貫通する α ヘリックス以外に、ヘリックスCとヘリックスDの間に小ヘリックスCD、ヘリックスDとヘリックスEの間に小ヘリックスDEを持つと予測されている。上記の電子伝達機能分子のうち、P680の2つのChl aはそれぞれD1, D2サブユニットのヒスチジン残基と配位結合していると考えられている。Pheo aはそれぞれ1分子ずつD1, D2サブユニットに結合しているが、実際に電子伝達に寄与しているのはD1サブユニットに結合しているものだけであると考えられている。また、 Q_A はD2サブユニットに、 Q_B はD1サブユニットに結合している。

このように *Rps. viridis* と *Rb. sphaeroides* のX線結晶構造解析によって、PS IIの機能と構造に関する研究は大いに進んできたが、*Rps. viridis* などには見られない特徴も注目されてきた。P680⁺への電子供与体であるZとDの機能分子に関しては、Babcockらが、葉緑体と同じ光合成系を持つ藍藻 (*Synechocystis* 6803) に対して突然変異誘発物質を用いて、特定のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した結果、Signal II_o と呼ばれるD⁺ラジカルに起因するEPRスペクトルが消失することから、DがD2サブユニットの160番目のチロシン残基(ホウレンソウのチロシン-161に対応)であり、さらにZはD1サブユニットの161番目のチロシン残基(ホウレンソウでも同じ)であることを明らかにした(9)。また、*Rps. viridis* には、反応中心バクテリオクロフィル2量体のほかに、電子伝達への関与が不明な2分子の“アクセサリークロロフィル”と呼ばれるクロロフィル分子が、反応中心とバクテリオフェオフィチンの近傍に存在する(1,2)。PS IIではそれに対応するものとして、D1, D2複合体中にChl aが4分子含まれ(10)、*Rps. viridis* より2分子多い。さらに、*Rps. viridis* の反応中心にはカロテノイドが1分子あるが(11)、PS IIでは β -カロテン

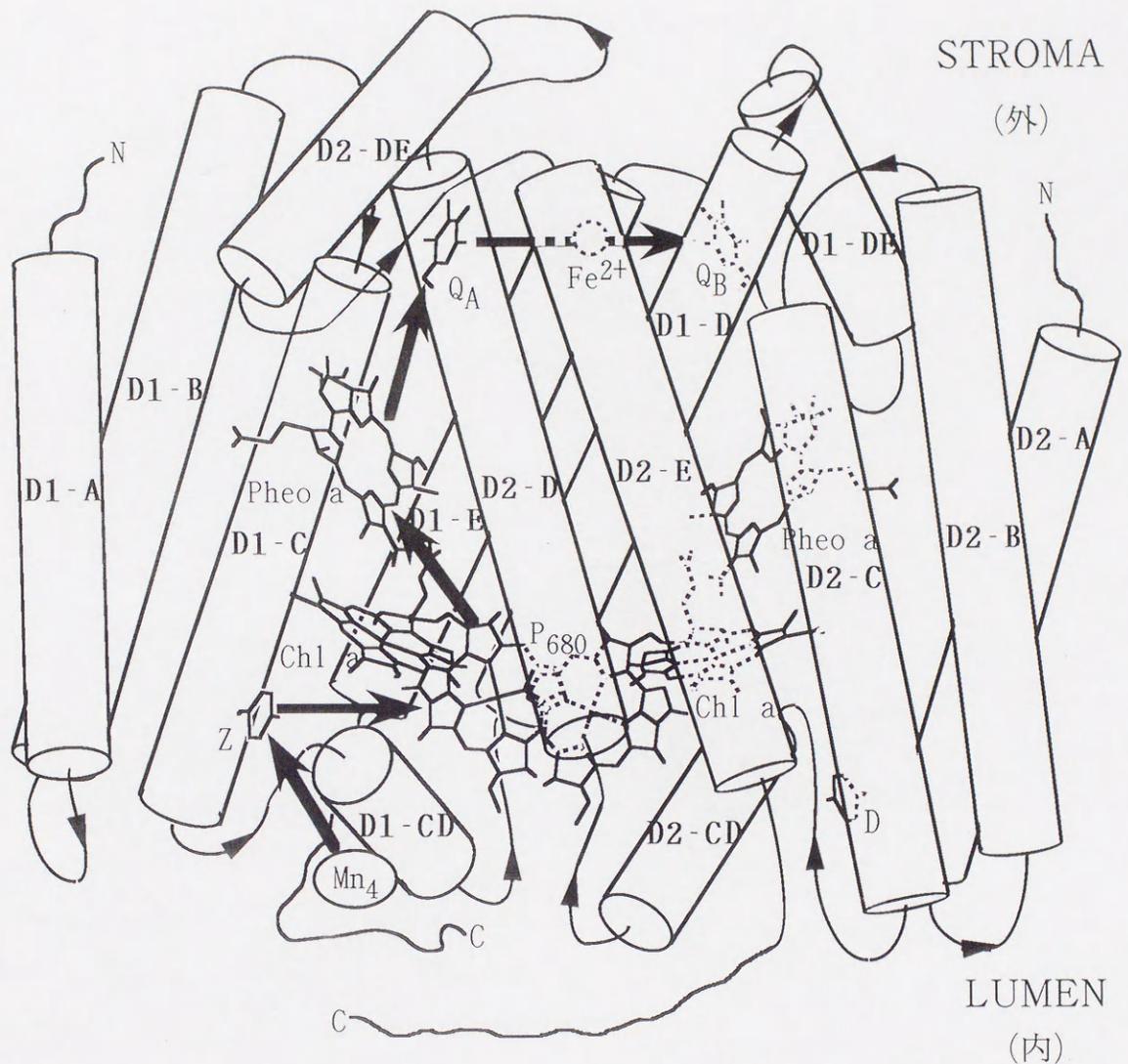


図3 PS II 反応中心D1,D2サブユニットにおける α -ヘリックス構造の想像図

この図は *Rps. viridis* の構造を元にして描いた、膜面に平行に見た場合の想像図である。上がストロマ側で下がルーメン側である。D1-A~E, D2-A~Eは膜貫通 α -ヘリックスであり、それ以外にD1-CD, DE, D2-CD, DEという小 α -ヘリックスが存在する。反応中心P680はD1, D2蛋白質のD, E α -ヘリックス同志が向かい合う面に存在し、電子移動に関わるpheo aはD1-C α -ヘリックスの近くに存在し、 Q_A , Q_B はそれぞれ、D2, D1蛋白質のD, DE α -ヘリックス間に存在すると考えられる。また、ZはD1-C α -ヘリックス上のチロシン残基である。

(Michel, H. and Deisenhofer, J. (1988) *Biochemistry* 27, 1-7 を参考にして書いたもの)

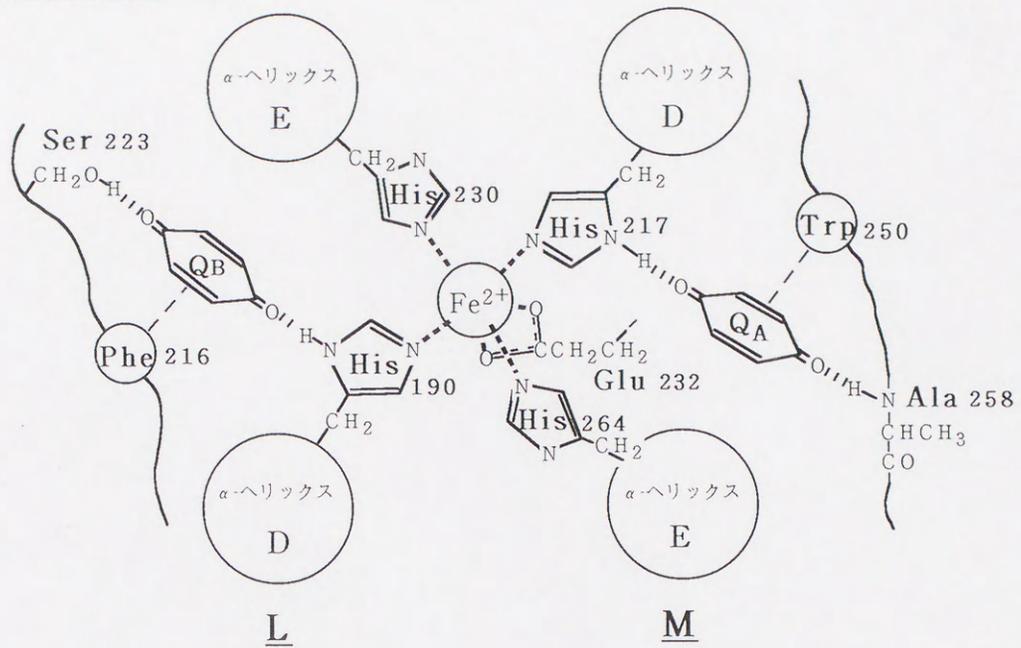
(β -Car) 2 分子が存在する (10)。

β -Car はクロロフィルと同様に光エネルギーを捕らえるアンテナ色素の一つとしての役割と、周辺のアンテナ色素の励起エネルギーを共鳴によって受け取り P 680 へと受け渡す、エネルギー伝達の役割を持つと言われている (12)。最近では、 β -Car が一重項酸素分子を効果的に消去することから、反応中心を保護する機能を持つことが注目されてきた (13, 14)。さらに、反応中心上の β -Car は P 680⁺ によって酸化され (15-17)、損傷することも知られている (17)。

また、P S II と *Rps. viridis* の酸化側 (反応中心に電子を供与する反応中心周辺) では構造的、化学的類似性は低く、例えば、P S II にのみ水分分解系があり、P S II の P 680 の酸化還元電位 E_m は細菌に比べて数百 mV も高く、約 1.1V と見積もられている (18-20)。一方、還元側 (電子を受け取る Q_A , Q_B 周辺) では電子伝達機能分子の結合部位の環境の類似性が集中して見られる。しかし、興味深いことに両者の還元側においても、明らかに異なる特徴がいくつか報告されている。それは、おもに Q_A , Q_B 間に存在する非ヘム鉄への配位様式と化学的性質の違いである (図 4, p16)。紅色細菌の反応中心の非ヘム鉄は 4 つのヒスチジン残基の窒素原子と、グルタミン酸残基の 2 つの酸素原子が配位子として働く 6 配位 8 面体構造を取っているが、P S II 反応中心では、その配位子のうちヒスチジン残基 4 つは保存されているものの、グルタミン酸残基は保存されていない (5, 21, 22)。そのかわり、P S II でのみ、 Q_A から Q_B への電子伝達過程に $HC0_3^-$ の存在が必要であること (23)、 $HC0_3^-$ を除去すると非ヘム鉄の EPR スペクトルが変化し、さらに、メスバウアースペクトルを測定すると、6 配位 8 面体構造を示すスペクトルが消失することなどの報告から (24)、この非ヘム鉄に $HC0_3^-$ の 2 つの酸素原子が配位していると考えられている。この構造の違いのためか、P S II と *Rps. viridis* の非ヘム鉄は共に 2 価であるが、P S II の非ヘム鉄のみフェリシアナイドなどの酸化剤で酸化される (25)。さらに、P S II の非ヘム鉄の酸化還元電位は pH 依存性 ($-60\text{mV} / \text{pH unit}$) を持つことも報告されている (26)。しかし、光合成細菌と P S II のどちらにおいても非ヘム鉄の役割は不明のままである。

P S II には、もう一つ機能不明の鉄イオンを持つチトクロム b-559 (Cyt b-559) が結合している。Cyt b-559 は分子量約 9 kDa の α -サブユニットと、分子量約 4.5kDa の β -サブユニットからなる b 型のヘムを含む膜蛋白質であり、

Rps. viridis (模式図)



PSII (想像図)

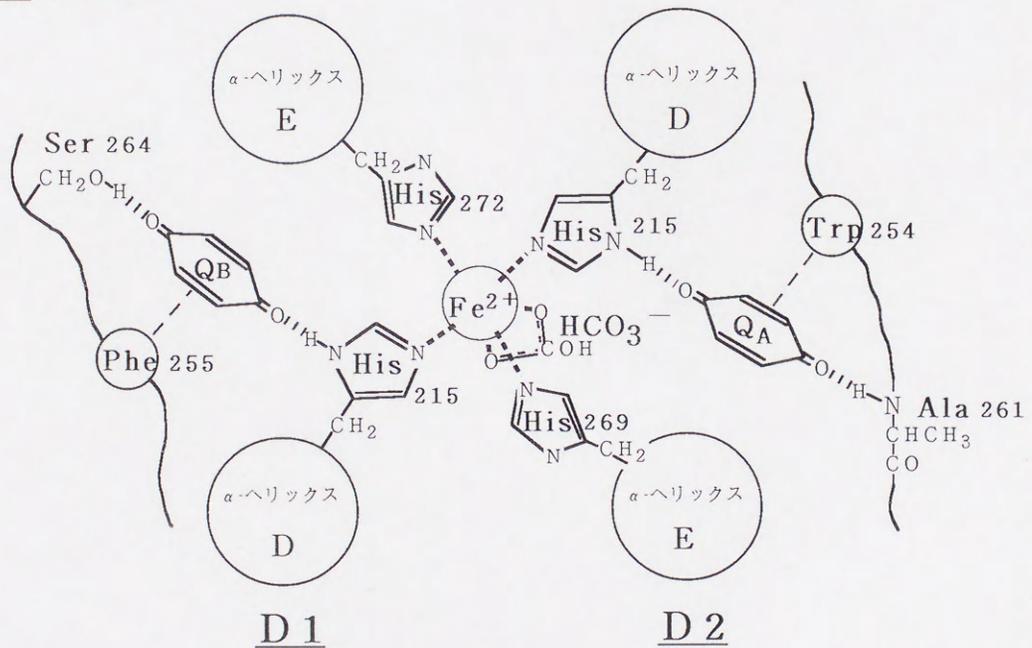


図4 光合成細菌(*R. viridis*)と高等植物光化学系 II (PS II)の Q_A , Q_B , 非ヘム鉄周辺の結合状態

DとE : *Rps. viridis* のL, MサブユニットとPS II RCのD1, D2サブユニットの α -ヘリックス

(|||||)水素結合、(.....)配位結合、(---) π 電子系相互作用

どちらの非ヘム鉄にも4つのヒスチジン残基が配位しているが、*Rps. viridis*ではグルタミン酸のカルボキシル基が2座配位しているのに対し、PS IIでは重炭酸イオンが2座配位していると考えられている。

(高橋裕一郎、佐藤公行 (1989) 蛋白質核酸酵素 34, 741-754 を参考にして書いたもの)

PS II 反応中心の極めて近傍に強固に 1 分子結合している (27)。2 つのサブユニットはそれぞれ 1 つずつのヒスチジン残基を持ち、Babcock らによる EPR 測定の結果から、bis-histidine 結合によってヘムを結合していることが明らかになった (28) (図 5, p18)。Cyt b-559 は標準酸化還元電位の違う 2 つの状態があり、それぞれ高電位型 (HP) と低電位型 (LP) と呼ばれている。E_m の値はそれぞれ、320~435mV (29-37), 20~150mV と報告されている (35-40)。さらに、180~240mV の中間電位型 (IP) もあるという報告もある (36, 37, 41)。報告ごとに電位がかなり違う理由として、試料に加える可溶化剤の濃度が高いときや、熱を加えたり、試料が古くなった場合や、測定にかかる時間が長いと高電位型から中間電位型や低電位型への変化が生じるためであると考えられる (36, 42)。このように Cyt b-559 は条件によっては各電位型は相互に変換するという特徴がある (43-45)。また、その機能に関して、Cyt b-559 は光酸化されるが (30, 46, 47)、特に水分分解系の機能が停止したとき、よく光酸化され (47, 48)、また、光還元も受けるという報告がある (49, 50)。これらの報告から、Cyt b-559 は水からキノンプールへの通常の電子移動の経路には含まれず、PS II 内で電子を一周させる環状電子移動 (p21で詳しく述べる) の経路の一部ではないかと、多くの研究者によって予想されてきた (45, 51-53)。

高等植物の PS II と *Rps. viridis* などの反応中心にこれらのような違いが生じたのは、太古の光合成細菌が硫化水素や有機酸のような限られた電子供与体を利用して光合成を行ってきたのに対し、新たに出現した PS II を有する藍藻類は、電子供与体として無尽蔵にあるに等しい水を用いて光合成を行って爆発的に生活圏を広げ、光合成細菌よりも強い光にさらされて光合成を行うようになった結果、光ストレスに適応してきたためであると考えられる (54, 55)。

PS II がさらされる光ストレスとしては、まず、PS II 内部で生じる、水をも分解する高酸化状態のカチオンラジカルや、アニオンラジカルの蓄積が挙げられる。光は、本来反応系の状態などに関係なく入射するものであるため、過剰に光が入射した場合、水分分解系の機能が低下することで P680 周辺が高酸化状態になり、また、キノンプールの P Q_A の還元型が増加することで、PS II の還元側が高還元状態になって系が損傷を受けると考えられる。さらに、水分分解反応によって生じる酸素分子は、色素分子が励起状態のときや還元反応を受けるときに危険な活性

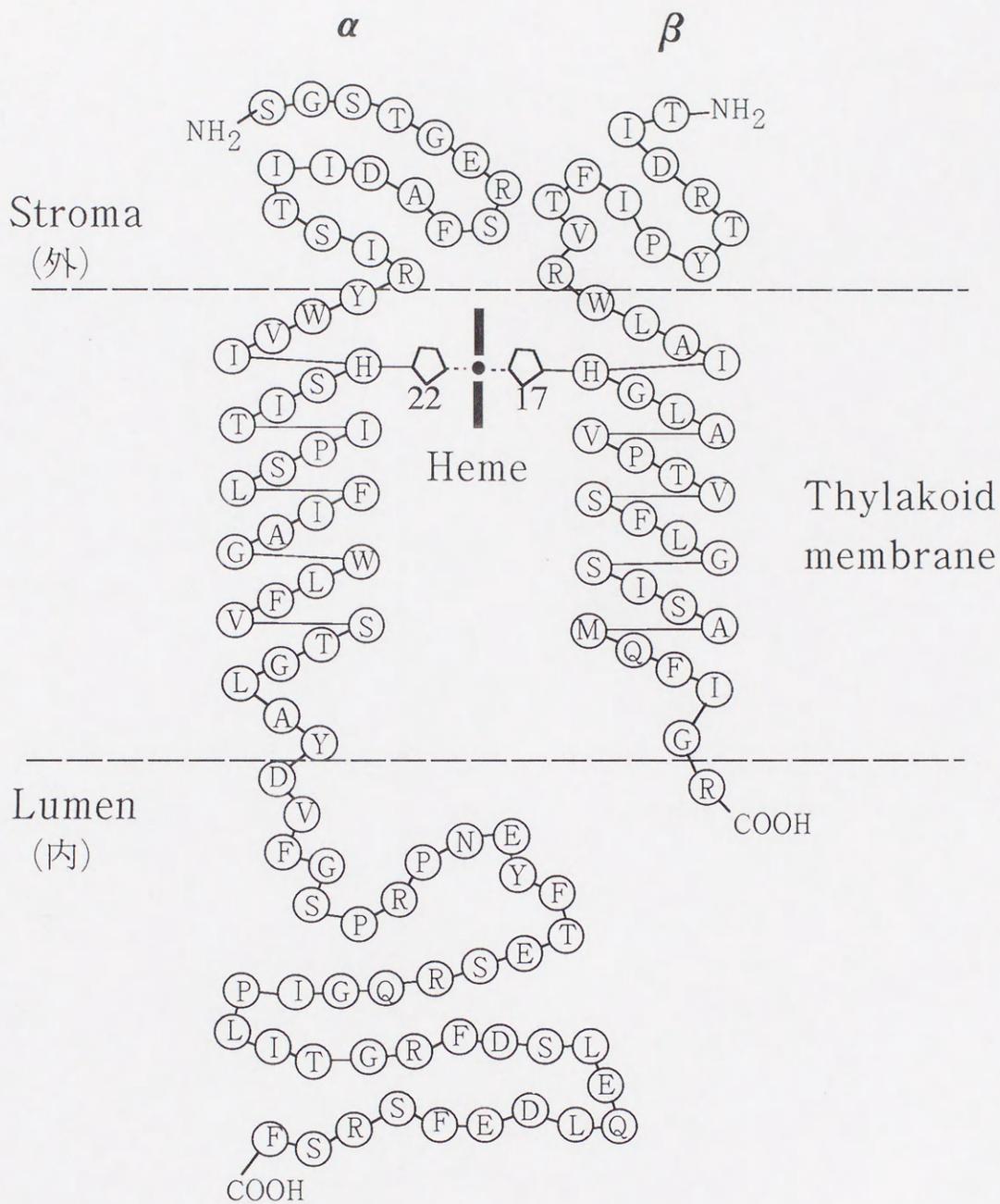


図5 Cyt b559 の α , β サブユニットの予想される構造

アミノ酸配列とそのhydropathy解析から α , β サブユニットはそれぞれ1本の α ヘリックスが膜を貫通した形になっていると考えられる。 α サブユニットの His-22 と β サブユニットの His-17 は、両者とも α ヘリックスの中でストロマ側に近い膜内に位置している。この2つの His 残基がヘムを結合していると考えられる。

(Babcock, G.T., Widger, W., Cramer, W.A., Oertling, W.A. and Metz, J.G. (1985) Biochemistry 24, 3638-3645 を参考にして書いたもの)

酸素を容易に作る (56)。P S II 複合体は光損傷を受けると、水分解能などの電子伝達活性は減少し、葉緑体全体の光合成能が低下する。強光照射により光合成能が落ちるといった状態は光阻害と呼ばれているが (54, 55)、高等植物が生命を維持するためには、壊れた P S II を交換または修復する必要がある。ところで、P S II 中、 Q_A を除くすべての電子伝達機能分子は D 1 蛋白質上に結合している。そのため、D 1 蛋白質は過剰な光によるダメージを集中して受けやすいと思われるが、その場合、壊れた D 1 蛋白質だけを交換するのが、合理的と想像出来る。事実、D 1 蛋白質は約 60 分の短いターンオーバー時間を示すが、D 2 蛋白質はその約 10 倍の時間を要するとの報告がある (57-59)。また葉緑体ストロマ中には、D 1 蛋白質をコードする *psbA* 遺伝子をもとに作られる mRNA が、他のどの葉緑体遺伝子に由来する mRNA よりも多量に存在することが報告されている (60)。傷ついた D 1 蛋白質は、 Q_A が 2 電子還元されて P S II から放出されたことが引き金となって (61)、セリンタイプの蛋白質分解酵素によって分解され (62)、新たな D 1 蛋白質と交換され、再び P S II として機能すると考えられている。

D 1 蛋白質の分解が開始するよりも前に、過剰に入射する光への P S II の対策としては大きく分けて 2 通りの方法が挙げられている。

1. 電子伝達系への光エネルギーの入力を抑える。即ち P S II 反応中心複合体に結合していた集光性蛋白質複合体 (LHC II) をリン酸化を伴って複合体から離脱させるなどして、集光性アンテナの大きさを調節することが知られている (63)。
2. 水から得た電子をキノンプールへ放出する通常 (正常) の電子移動と異なり、生成した高酸化状態の中間体を打ち消すように P S II 内で電荷を再結合させる。例えば反応中心近傍に存在する H 蛋白質などの低分子量蛋白質がリン酸化を受け、 $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 電子伝達能を低下させることにより、P S II 内で新たな電子移動経路が生じる可能性があるという報告がある (64)。

後者の P S II 内で生じる電荷の再結合という現象は、光阻害条件下で高酸化状態になった P 680 周辺の正電荷と、高還元状態になった還元側の電子を再結合させることで、光阻害に対する防御機構として D 1 蛋白質分解にいたる前に機能しうると考えられる。

本論文は、光阻害に対し防御的な役割が予想される P S II 内で電荷を再結合させ

る過程に注目し、その過程と光阻害反応の初期過程との関連性について、主に分光学的な測定法で行った研究をまとめたものである。

第I章では、P S II内の電荷再結合過程のうち、最も顕著に見られる半減期100~200 μ sの電子移動成分に対して、酸化還元電位およびpHなど、各種の摂動を加えて電子移動経路に関する解析を行い、この成分が従来言われてきたような、直接的な $Q_A^- \rightarrow P680^+$ 過程ではなく、実は非ヘム鉄およびCyt b-559を経由した環状電子移動(p21で詳しく述べる)である可能性を示した。

第II章では、エネルギー伝達機能分子(周辺のアンテナ色素の励起エネルギーを共鳴によって受け取りP680へと受け渡す分子)、および電子伝達機能分子の損傷過程に注目して、光阻害反応初期過程の解析を行った。このとき、 β -Carが、100~200 μ s成分の電子移動に強い関連性を持つことが示された。また、従来D1蛋白質分解の引き金は Q_A の離脱であるといわれてきたが、実は β -Carの損傷が引き金である可能性が示されるなど、 β -Carは光阻害に対する防御機構の中心的な位置を占めることが示唆された。

なお、以下に述べるP S IIの電荷再結合過程に対する摂動や光照射処理は、pH依存性を測定するもの以外はpH 7.5のもとで行った。これは、葉緑体のチラコイド膜において、ルーメン側はpH 5、ストロマ側はpH 8と報告されているが(65)、このpHの領域の中で、pH 7.5のとき100~200 μ s成分の電子移動が顕著に観測されるためである。

第 I 章 P S II 内環状電子移動の解析

緒言

P S II 内で生じる電荷の再結合という現象は、1976年、Renger と Wolff および Haveman と Mathis によって発見された。彼らは、レーザーフラッシュフォトリス法を用いて、半減期 $100\sim 200\ \mu\text{s}$ の成分の緩和過程が Q_A^- 再酸化過程と $P680^+$ 再還元過程にそれぞれ観測されることを見だし、これは電荷分離によって生じた正電荷と電子の直接的な再結合、すなわち“逆反応” (back reaction) か、または電荷分離によって生じた電子が何かを経由して $P680^+$ へ戻る“環状電子移動”であろうと考察した(66, 67)。その後、この過程の電子移動経路は明確にされることなく、その他の $P680^+$ へ戻る電子移動過程と共に取りあえず“逆反応”と呼ばれるようになった。なお、“環状電子移動”に対して水から得た電子をキノンプールへ放出する通常の電子移動は、“直線状電子移動”とも呼ばれる。

“逆反応”と呼ばれてきた過程は、水分分解系を除去した P S II で、レーザーフラッシュフォトリス法によって観測され、先ほどの半減期 $100\sim 200\ \mu\text{s}$ 成分のほか(66-71)、 $700\sim 900\ \mu\text{s}$ (71) および $2\sim 10\text{ms}$ (71) の電子移動過程の存在が報告されている。これらの報告では、 Q_A^- の再酸化過程と $P680^+$ の再還元過程によく似た速度定数の成分があることから、 Q_A^- から $P680^+$ へ直接電子が戻る過程とされてきたものである。これらの成分のうち、 $100\sim 200\ \mu\text{s}$ および $700\sim 900\ \mu\text{s}$ 成分の電子移動速度は $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ および $Q_A^- Q_B^- \rightarrow Q_A Q_B H_2$ の正常な電子移動速度(それぞれ半減期 $100\sim 200\ \mu\text{s}$, $300\sim 500\ \mu\text{s}$) にほぼ匹敵し(72-74)、高酸化状態になった $P680$ 周辺の正電荷と、高還元状態になった還元側の電子を再結合させる機能を十分に果たすことが予想される。

一方、還元側から電子を $P680$ へ再び戻す“環状電子移動”の経路の一部として考えられているものに Cyt b-559 がある。図 6 (p22) に過去の報告で予想された Cyt b-559 を介した“環状電子移動”を含む、P S II の電子伝達経路を示す。かつて報告された Cyt b-559 の電子伝達速度は連続光照射開始に伴う 559nm での吸光度の増加速度と、連続光照射終了に伴う 559nm での吸光度の減少速度から、それぞれ、Cyt b-559 の還元速度と酸化速度を見積もったものである。連続光を

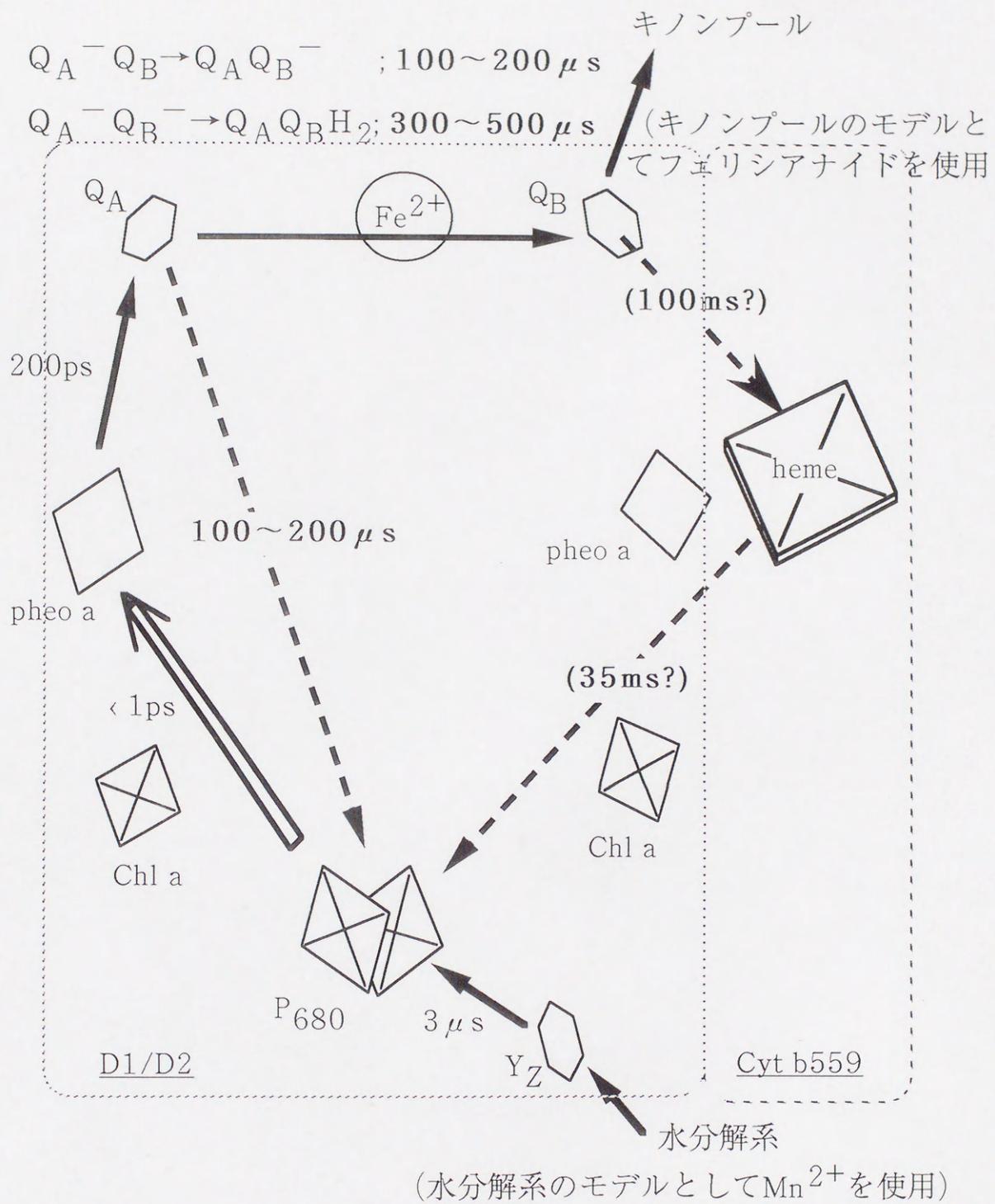


図6 Cyt b559を介した環状電子移動を含む
 P S II の電子伝達経路

- 光励起に伴う電荷分離反応
- 電子伝達の主経路 (直線状電子移動)
- 過去の報告の中で予想されてきた逆反応 ($100 \sim 200 \mu s$) と環状電子移動経路(35ms, 100ms)

使用した場合、Cyt b-559 の酸化と還元が同時に生じているため正確に電子移動速度を見積もるのは困難であり、シャッターによって機械的に光照射の開始と終了を行うため、レーザーパルスのように早い時間領域の測定は困難である。

そのうえ、レーザーフラッシュフォトリシス法によって単一光量子による励起を行った場合、早い時間領域の測定は可能だが、Cyt b-559は連続光照射時では観測にかからなかった Q_A^- または $P680^+$ などの早い時間領域の酸化還元状態の変化の影響を受ける。すなわち、 Q_A^- または $P680^+$ による電場の効果によって、反応中心複合体中の色素分子（主に 550nm に吸収を持つ Pheo a）または Cyt b-559 自体の吸収ピークが移動するという、いわゆる electrochromism の影響のために、Cyt b-559 の酸化還元のみに関係する 559nm の吸光度の時間変化の測定は困難である。このように酸化還元状態の時間変化の観測が困難であるために、Cyt b-559 が実際どのように機能しているかは不明であった。

図6 (p22) に示すように Cyt b-559 の還元速度は半減期 100ms (75)、酸化速度は半減期 35ms (16)の電子移動が存在すると報告されており、“環状電子移動”は“逆反応”と呼ばれてきた過程と違い、 $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 電子移動速度よりはるかに遅く生理的に意味を持つのか疑問である。しかし、先に述べたように Cyt b-559 の酸化還元状態の時間変化を測定するには非常に困難があり、これらの速度が真の速度であるとは確信は出来ない。

また、“逆反応”と呼ばれてきた過程のうち半減期 100~200 μ s 成分の電子移動量は pH 6.5 を中心として pH 変化を示し、pH が高いと成分量は増加する。さらに励起フラッシュ間隔をせばめると量が増加するという特徴を持っている(68)。そのため、この電子移動成分は中間に何かが介在する環状電子移動である可能性も存在する。

このように、真の意味での“逆反応”と“環状電子移動”の区別は困難である。本論文では、“環状電子移動”と明確に区別して表現するために、以降は“逆反応”を $Q_A^- \rightarrow P680^+$ の直接的な電荷再結合反応として便宜的に定義する。

“逆反応”および“環状電子移動”のような電荷の再結合反応と、D1蛋白質分解にいたる前の光阻害に対する防御機構との関係を理解するには、基本的には電子移動経路をそれぞれ明確にすることが必要である。

そこで本章では、半減期 100~200 μ s 成分の過程が“環状電子移動”であるか

どうか検討することを試みた。レーザーフラッシュフォトリス法によって、 Q_A^- 再酸化過程及び $P680^+$ 再還元過程を測定し、それらの解析を行った。研究を行うにあたり、紅色光合成細菌 (*Rps. viridis* など) と P S II との明確な違いが見られ、いまだに生理的機能の不明な Cyt b-559 と非ヘム鉄の役割に注目し、以下の手順で研究を進めた。

1. P S II 内の電荷の再結合過程を分光学的に観測するのに適した P S II 試料を得るために、直線状電子移動における電子の出口であるキノンプールを除き、その入り口である水分解系を T r i s 処理で除去した試料を調製する。

以降、水分解系が機能している状態のモデルとして、人工的電子供与体 Mn^{2+} を添加した系を用い、キノンプールが機能しているモデルとして、人工電子受容体フェリシアナイドを添加した系を用いる。

さらに、 Q_A 光還元活性を減少させずに、非ヘム鉄を除去した試料および非ヘム鉄を他の金属イオン (Zn^{2+}) で置換した試料の調製法を確立する。

2. 調製した各試料における逆反応または環状電子移動と考えられる半減期 100~200 μs の電子移動成分に対して摂動を加えて、逆反応か環状電子移動か区別する。環状電子移動である場合、それらの影響の解析からその経路に関する情報を得る。

摂動は以下のようにして加えた。

- ①フェリシアナイドと共に Mn^{2+} を添加する。 Mn^{2+} は Z を介して $P680^+$ を半減期 18~35 μs で還元する過程であると報告されている (76)。これによって、18~35 μs より遅い電荷の再結合過程は消去され、直線状電子移動のみが観測されることが予想される。
- ② $Q_A - Q_B$ 間の電子伝達阻害剤を添加する。これによって、半減期 100~200 μs 成分が $Q_A^- \rightarrow P680^+$ の逆反応であればその成分は増加することが予想される。
- ③酸化還元電位依存性を測定する。環状電子移動であれば、 $P680$ および Q_A 自体の酸化還元電位と関係のない領域で酸化還元電位依存性を示す可能性がある。
- ④pH 依存性を測定する。環状電子移動であれば、 $P680$ および Q_A 自体の pKa と関係のない領域で pH 依存性を示す可能性がある。

I-1. 実験材料及び実験方法

I-1-1 クロロフィル濃度の決定

試料調製時に試料濃度を見積もるためのChl a, クロロフィルb (Chl b) の濃度決定は Arnon の方法により行った(77)。試料に 80% (v/v) アセトン水溶液を加えてピグメント類を抽出し、15k x g, 10 分の遠心により、蛋白質、などを沈澱として除き、抽出液の 700, 664, 646nm の各吸光度を分光光度計 (日立、自記分光光度計、320S) により測定した。クロロフィル濃度は次の式により求めた。

$$\text{総Chl量 } (\mu\text{g/ml}) = 8.05 (A_{664} - A_{700}) + 20.29 (A_{646} - A_{700})$$

I-1-2 PS II 粒子の調製

新鮮なホウレンソウの葉から、Kuwabara と Murata の方法に基づいて(78)、可溶化剤 Triton X-100 を用いて、PS II に富んだおよそ $400 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{hr}$ の酸素発生能を有するチラコイド膜断片を調製し、PS II 粒子と名付けた。これを 70% glycerol を含む溶液に懸濁し、液体窒素中で凍結保存した。

試料調製のための一連の操作は、特に記載のない限り暗所氷中で行い、遠心操作は 4°C で行った (付録1 参照, p129)。

この操作の段階で、PS II はほとんどキノンプールを含んでいないものとなる。

I-1-3 集光性蛋白質の除去

PS II 粒子はクロロフィル (Chl) に富む集光性蛋白質複合体 (LHC II) を含み、複合体当たりの吸光度が大きく分光学的測定に不利である。分光学的な測定を容易にするために、Ghanotakis らの方法に基づいて(79)、以下の方法で LHC II を除去した。

PS II 粒子を Chl 濃度が 1.25 mg/ml になるように、可溶化剤 35mM n-Octyl- β -D-glucopyranoside に懸濁し、水中で15分間攪拌することで LHC II を PS II 粒子から解離させた。この処理試料を遠心分離後、上清を透析して可溶化剤を除くことでおよそ $900 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{hr}$ の酸素発生能を有する PS II 反応中心複合体 (PS II RC と名付ける) を得た。これを 70% glycerol を含む溶液に懸濁し、液体窒素中で凍結保存した (付録2 参照, p131)。

この操作の段階で、キノンプール由来の PQ_A は完全に除去される。

I-1-4 水分解系の除去

PS II 中の水分解系の活性中心 Mn クラスタは、Kok's cycle と呼ばれる複雑な電子伝達速度の周期性を示す (80)。また、逆反応または環状電子移動は水分解系が阻害された状態でよく観測されることが報告されている (67-71)。そこで光化学系をより単純化し、環状電子移動を明確に観測する目的で、Tris 処理と呼ばれる方法により水分解系を除去した。

PS II 反応中心複合体を 0.1mg Chl/ml になるように 0.8M Tris (pH 8.8) を含む溶液で分散して、30分間攪拌し、遠心分離することにより水分解と関係のある膜表面性蛋白質 (18 kDa, 23 kDa, 33 kDa) を除去した (81)。こうして得られた沈澱を TrisPS II RC と名付け、一部を 70% glycerol を含む溶液に懸濁し、液体窒素中で凍結保存し、残りはそのまま次の非ヘム鉄の除去の操作で使用した (付録3 参照, p132)。

I-1-5 非ヘム鉄の除去

非ヘム鉄を有する試料との比較のために、Klimov らの方法 (82) を一部改良して、以下の方法で非ヘム鉄を除去した試料を調製した。

反応中心複合体中の非ヘム鉄 (Fe^{2+}) と安定な錯体を形成するキレート剤である 1,10-Phenanthroline, 2.5 mM と、蛋白質と水との相互作用を弱め蛋白質の構

造をゆるめるカオトロピック試薬である LiClO_4 , 0.6M を 0.25mgChl/ml の濃度の TrisPS II RC に作用させ、2時間攪拌することで、非ヘム鉄をその結合部位から離脱させた。この試料からリチウム塩とキレート剤および Tris (1, 10-Phenanthroline) Fe (II) 錯体を除くために処理液を透析チューブに入れて12時間透析した。この攪拌と透析の操作の間、D1蛋白質分解を特異的に防ぐためのセリタイプ蛋白質分解酵素阻害剤として(62)、Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を $100\mu\text{M}$ になるように添加した。透析後、遠心分離して得られた沈澱を $-\text{Fe}^{2+}$ -TrisPS II RC と名付け、試料を二分し一部を 70% glycerol を含む溶液に懸濁し、液体窒素中で凍結保存し、残りはそのまま次の Zn^{2+} 置換の操作に供した。この処理で Q_A 光還元活性 (I-1-10-1 参照, p35) が TrisPS II RC のそれと同等である $-\text{Fe}^{2+}$ -TrisPS II RC が得られた (付録4 参照, p133)。

I-1-6 非ヘム鉄の Zn^{2+} への置換

非ヘム鉄を失うことによって、 Q_A 活性には影響はなくても系の構造を不安定化して予想外の影響を反応中心複合体に与えることも考えられる。そのため Fe^{2+} に等しいイオン半径を持ち、かつ不対電子を持たず、また酸化還元を受けにくい金属イオン Zn^{2+} と置換することで、蛋白質複合体の構造の安定化以外の非ヘム鉄の役割が現れることが期待される。以下の方法で非ヘム鉄を Zn^{2+} イオンで置換した。

0.4mM ZnSO_4 とカオトロピック試薬である LiClO_4 を 0.2M 含む溶液に 0.125mgChl/ml になるように $-\text{Fe}^{2+}$ -TrisPS II RC を分散し、12時間攪拌した。処理液から塩を除くために試料を透析チューブに入れ、キレート剤である EDTA を含まない pH 5.5 の溶液中で 6 時間透析した。これによってカオトロピック試薬であるリチウム塩を除いて、構造的にゆるんでいた蛋白質を元に戻した後で、 $10\mu\text{M}$ EDTA を含む pH 5.5 の溶液中で 6 時間透析し、余分な Zn^{2+} イオンを除いた。透析後、遠心分離により得られた沈澱を Zn^{2+} -TrisPS II RC と名付け、70% glycerol を含む溶液に懸濁して液体窒素中に凍結保存した。この処理で Q_A 光還元活性 (I-1-10-1 参照, p35) が TrisPS II RC の 97% 以上ある Zn^{2+} -TrisPS II RC が得られた (付録5 参照, p134)。

I-1-7 チトクロムb-559 による反応中心濃度の定量

C h l 濃度による測定試料濃度決定法は試料の処理によって反応中心当たりの C h l 数が変動するため、反応中心濃度を定量的に扱う必要のある分光学的測定には適していない。そこで各試料中の光化学反応中心の濃度は、P S II 反応中心複合体中に1分子存在する Cyt b-559 (27)のヘムをピリジン・ヘモクロモーゲン法により定量した(83)。

試料をアルカリピリジン溶液 (0.1M NaOH, 33% (V/V) ピリジン) に分散し、最終濃度が 0.8mM になるようにフェリシアン化カリウムを加え、試料中の Cyt b-559 を完全に酸化した。それを卓上小型遠心機 (8,060 x g) で 10 分遠心し、上清をとり分光光度計により吸収スペクトル (520~600nm) を測定した。次に Sodium dithionite (D T N) を粉末のまま極微量を加えて還元型にし、スペクトルを測定することによって、還元-酸化差スペクトルを求めた。 $\Delta A_{556\text{nm}-539\text{nm}}$ のモル吸光度係数を $23,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (83)、 $\Delta A_{556\text{nm}-600\text{nm}}$ のモル吸光度係数を $34,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として(84)、これらの平均値から Cyt b-559 濃度を決定した。

以下反応中心濃度は全て、 μM Cyt b-559 (μMCyt と省略する) と表現する。

I-1-8 極低温 E P R 測定による非ヘム鉄 (F e^{3+}) の定量

$-\text{F e}^{2+}$ -TrisPS II RC , Zn^{2+} -TrisPS II RC で鉄の除去が完全に行われているかを確認するとともに、さらに TrisPS II RC で酸化還元電位や pH を変えたときの非ヘム鉄の F e^{3+} の割合を知る必要があるため、各試料の非ヘム鉄の定量を行った。

定量には、非ヘム鉄の F e^{3+} に起因する $g = 8.1, 6.4, 5.5$ のシグナルを極低温 (8.5K) による E P R (Electron Paramagnetic Resonance) 測定を行い、そのシグナルの強度を634~1310Gの磁場の範囲で積分した値を用いた(24) (図7, p29)。

通常、P S II の非ヘム鉄は F e^{2+} の状態であるので、試料を、フェリシアナイドを 0.2mM になるように加えた緩衝液で洗った後、5mM フェリシアナイドを含む 70% glycerol 緩衝液に分散して E P R チューブに充填し、酸化した状態で E P R 測定

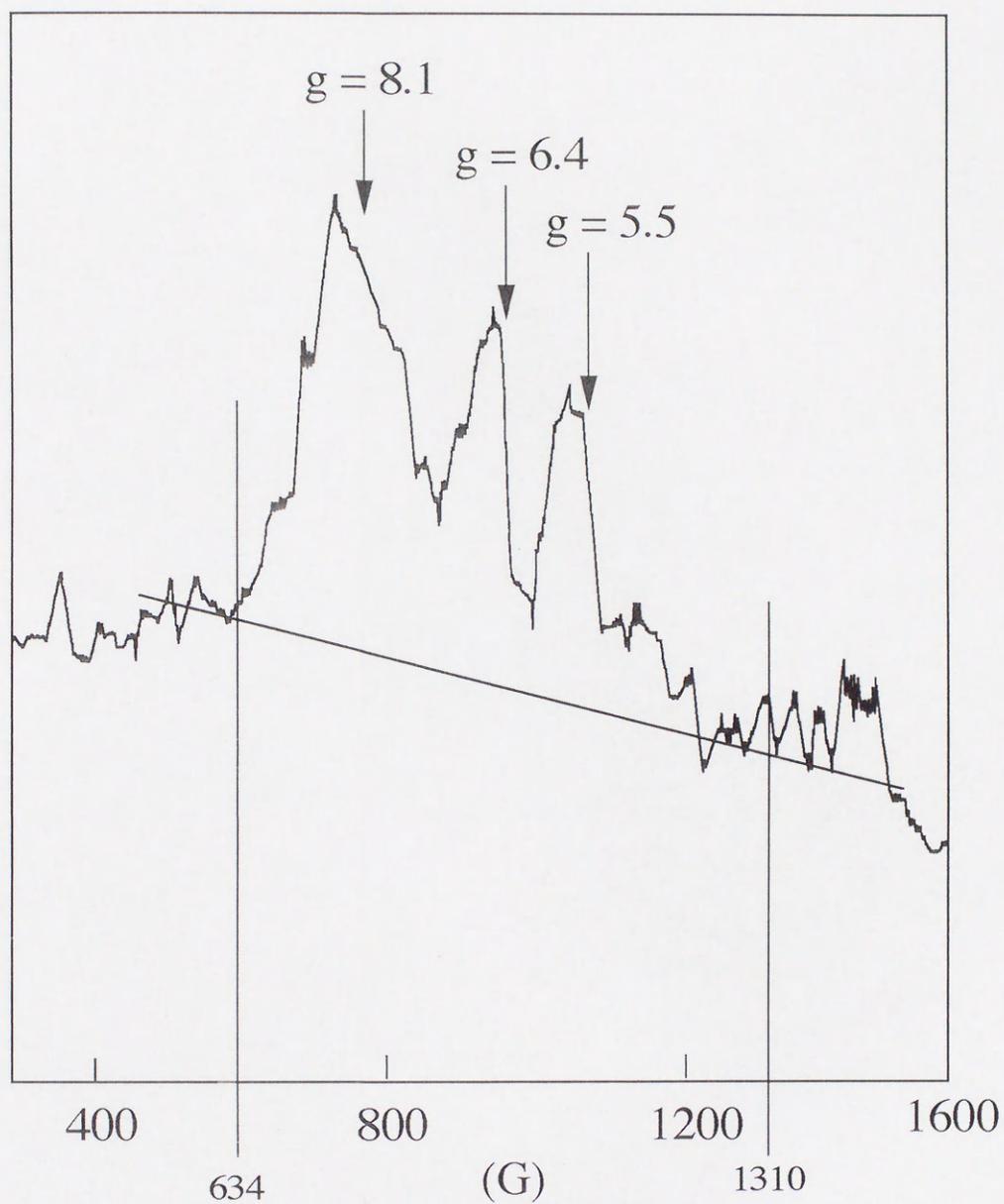


図7 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) の定量

例として、TrisPS II RCにおけるEPR測定結果を示す。酸化型非ヘム鉄に起因するEPRシグナルは、 $g = 8.1, 6.4, 5.5$ の3つがあり、それらをすべて含む磁場領域 (634~1310G) でこれらのシグナルを積分した。反応中心濃度 $40 \mu\text{M}$ Cyt b559, pH 7.5, 1.5mM フェリシアナイドを用い、マイクロ波出力 5mW, 周波数 9.285GHz, 変調 20G, 5Kで測定した。

を行った。また、酸化還元電位依存性は、TrisPS II RC を 0.2mM フェリシアナイドを含み、それぞれフェロシアナイドを 0mM, 0.02mM, 0.2mM, 2mM 含む緩衝液で洗った後、5mM フェリシアナイドを含み、それぞれフェロシアナイドを 0mM, 0.5mM, 5mM, 50mM 含んだ 70% glycerol 緩衝液に分散し、8.5K で測定した。酸化還元電位は、70% glycerol 中で測定するのは困難であるため、0.2mM フェリシアナイドに対し、フェロシアナイドを 0mM, 0.02mM, 0.2mM, 2mM 含んだ溶液の酸化還元電位で代用した。緩衝液は 40mM HEPS-NaOH (pH7.5), 0.34M Sorbitol, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM NaHCO₃ を用いた。EPR装置は Varian, E109を、Flow Cryostat は Oxford, ESR900 を用いた。

I-1-9 ICP-AES (ICP多元素同時原子発光分光装置) による試料中の鉄及び亜鉛の定量

ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy) を用いて、試料の反応中心当たりの鉄及び亜鉛の定量を行った。ICP発光分光装置は Perkin Elmer, OPTIMA 3000 を用いた。

まず、試料を 0.2M Sucrose, 20mM MOPS (pH 7.0), 20mM NaCl溶液に分散し、透析チューブ (Spectrum Medical Industries, Spectra/Por No.2 Mw. cut off: 12,000-14,000) に入れ、10mM Tris-HCl (pH 7.5), 50mM NaCl, 10 μ M EDTA, 100 μ M PMSF 中で 24 時間透析し、遠心分離 (35 k x g, 4°C, 15 分) した。

外部からの鉄および亜鉛の混入を防ぐために、キレート樹脂 (Sigma, Chelating Resion No. C-7901) を通した 4% Triton X-100, 40mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 1M Sorbitol, 10mM NaCl 溶液を用いて試料を分散し測定に用いた。反応中心濃度は、前もって同じ試料で Cyt b-559 濃度 (I-1-7 参照, p28) と Chl 濃度 (I-1-1 参照, p25) の比を決めておき、Chl 濃度を利用して決定した。このことは、可溶化剤 Triton X-100 によって反応中心が破壊された場合でも、反応中心濃度を決定出来るからである。

試料は、約 5000K の高周波アルゴンプラズマ (40MHz, 1~2kW) 中に吹き込まれ、そのとき生じた亜鉛 (202.548nm, 213.856nm) および鉄 (238.204nm,

259.940nm) の原子発光を測定した。このとき、粘性による噴射効率の変化を補正する目的でイットリウムを $50\mu\text{M}$ になるように前もって試料に加えておき、371.030nm の原子発光も同時に測定した。鉄および亜鉛の標準濃度溶液を用いて $10^{-6}\sim 10^{-4}\text{M}$ の領域で検量線をそれぞれ作製し、原子の濃度を決定し反応中心当たりの原子の個数を計算した。

I-1-10 レーザーフラッシュフォトリシス法

本研究におけるレーザーフラッシュフォトリシス法は、パルス光照射による光化学反応に伴うある波長の吸光度変化または蛍光を測定することにより、光化学反応に関わる電子伝達機能分子類の酸化還元状態に関する情報を得る方法である。このとき、電子受容体が還元されているときは蛍光が大きく、酸化されているときは蛍光が小さいことを利用して、蛍光の減衰過程を観測することで電子伝達に関する情報を得る方法もある。しかし、本研究では、直接標的となる分子の吸光度変化から、 Q_A^- 再酸化過程及び $\text{P}680^+$ 再還元過程を観測する目的で、主に 325nm, 680nm, 820nm の各波長における測定を行った。

図8 (p32) は測定装置の概要を示したものである。モニター光の光源は、325nm はキセノンランプ (ウシオ電機 (株), UXL-159, 150W)、他はハロゲンランプ (日本分光 (株), S0-H150, 150W) を使用した。光源から発せられたモニター光をミラーによって集光し、測定波長の干渉フィルターで単色化して、スリットを通して $500\mu\text{l}$ の試料を入れた試料石英セル (光路長 5mm) の約 5mm 前方に焦点を結ばせた。325nm 測定に使用したモニター光用フィルターは、1cm の厚さの 0.1% CuSO_4 水溶液、赤外カットフィルター (東芝硝子 (株), IRA-20S) 2枚、紫外カットフィルター (東芝硝子 (株), UV-25)、干渉フィルター (日本真空光学 (株), 323nm) を用い、680nm 測定には、0.1% CuSO_4 水溶液、赤外カットフィルター (東芝硝子 (株), IRA-20S) 2枚、紫外カットフィルター (東芝硝子 (株), UV-25)、干渉フィルター (光伸光学 (有), 680nm)、820nm には紫外カットフィルター (東芝硝子 (株), UV-25)、干渉フィルター (光伸光学 (有), 820nm) を使用した。なお干渉フィルター以外のフィルターは基本的には干渉フィルター自体

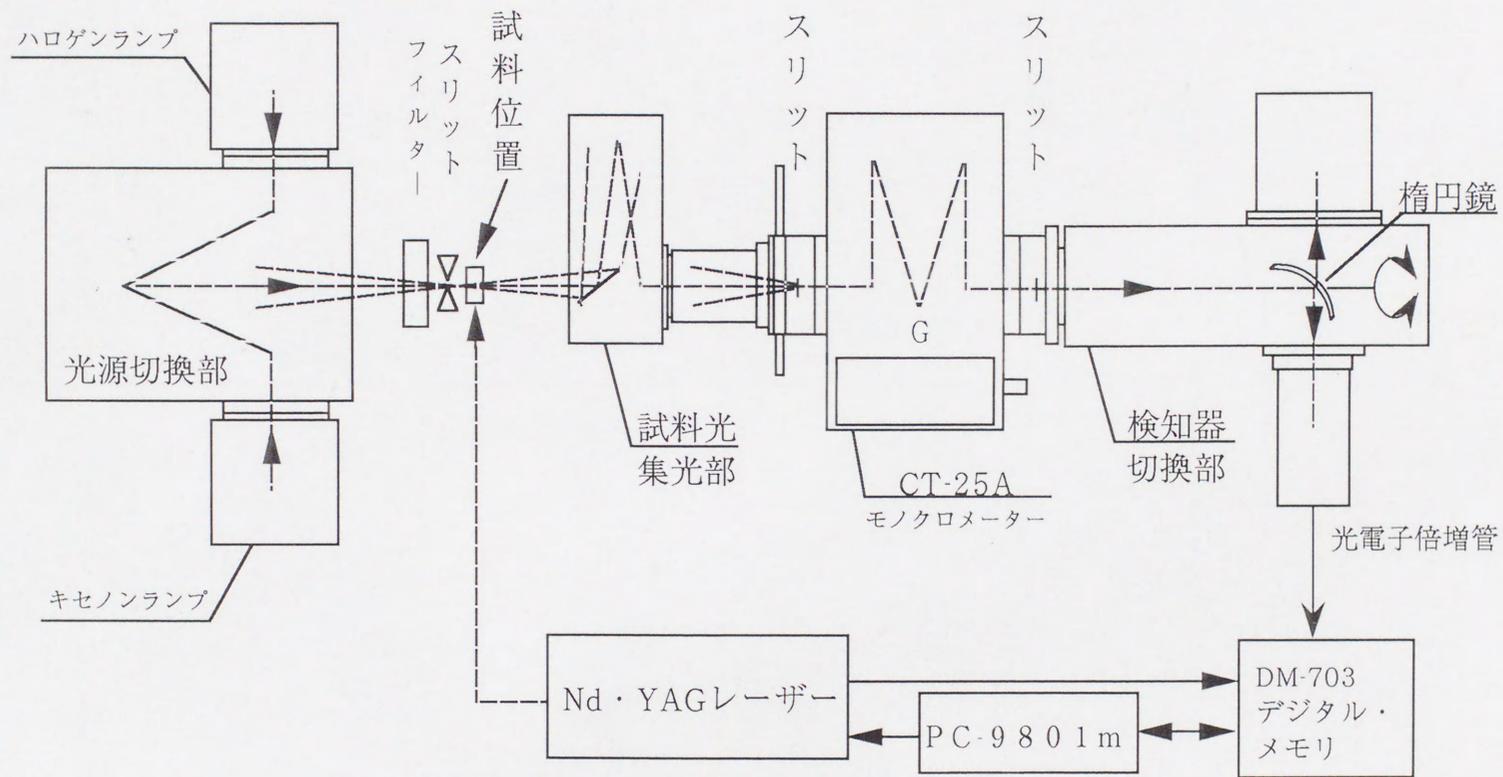


図8 レーザーフラッシュフォトリシス装置の概要

を保護するために使用した。

試料溶液を透過した単色光は、再びミラーで集光して、モノクロメーター（日本分光（株），CT-25A）を通して光電子倍增管（浜松ホトニクス（株），R712；820nm，R1104；その他の波長）で検出した。これをデジタルメモリ（岩通電子（株），DM703）で吸光度の時間変化を記録し、パーソナルコンピュータ（日本電気（株），PC9801M）を用い、集積及び演算を行った。励起光にはQスイッチを装着したNd：YAGレーザー（日本電気（株），SL120D）を使用し、モニター光に対して垂直の方向（光路長10mm）から照射した。励起波長は532nm、パルス幅7ns、出力は1フラッシュ当たり30mJである。フラッシュ間隔は2.5秒とした。

試料はフラッシュごとに異なった吸光度変化を示す場合もあるため（I-2-7参照）、本来なら第1フラッシュのみの吸光度変化を測定するべきだが、測定を容易にし、かつ各試料における結果を比較可能にするためにフラッシュの積算回数は常に40回に固定した。さらにフラッシュ40回分の測定を各試料で3,4回繰り返し、外部からノイズが重なったものなどを除いた再現性の高いものをそれぞれ足し合わせて平均し、最終的には120~160回積算の平均とした。

測定時間領域は0~2msであるが、0~10 μ s領域には、パルス光そのものの影響または試料による蛍光が重なる。問題としているのはモニター光の波長の吸光度変化であるため、同一の試料でモニター光を当てずにパルス光だけ照射したものをバックグラウンドとして、モニター光を当てて測定したデータから差し引いた。測定はすべて20°Cで、人工電子受容体として0.2mMフェリシアナイドを用いて測定した。人工電子受容体を用いるのは、本研究で用いたキノプールを除去した系では、40回連続してフラッシュを当てる間に還元側に電子が蓄積して、 Q_A 光還元活性（I-1-10-1参照，p35）が減少してしまうため（I-2-7-1参照，p65）、還元側の電子を除く必要があるからである。

また、本来ならば分光学的測定を容易にするために、可溶化剤を使うべきところであるが、後で示すように可溶化剤存在下では目的の環状電子移動量が減少するため（I-2-4参照，p48）、可溶化剤は使用しなかった。

通常のレーザーフラッシュフォトリシス測定では複数回のフラッシュによって生じた光励起反応を積算して測定することによって、S/N比が高い測定結果を得るが、全フラッシュの平均を観測する事になるため、前回のフラッシュによって生じ

た電子および正電荷が次のフラッシュの照射時まで消失せずに残り、そのフラッシュで生じた電子および正電荷の反応過程に影響を与える可能性は常にある。この場合、一回毎の独立した反応を観測することは出来ない。そのため、フラッシュ一つずつの反応の測定、すなわち、フラッシュ依存性の観測も行った。

各緩和過程の解析はパーソナルコンピュータ（日本電気（株），PC-9801DA）上で行った。

各 pH で使用した緩衝液

pH 5.0 ~ 5.5 ...20mM 酢酸ナトリウム/酢酸, 1M Sorbitol, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM NaHCO₃

pH 5.75 ~ 6.63 ...40mM MES-NaOH, 1M Sorbitol, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM NaHCO₃

pH 6.75 ~ 7.0 ...40mM MOPS-NaOH, 1M Sorbitol, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM NaHCO₃

pH 7.25 ~ 8.0 ...40mM HEPES-NaOH, 1M Sorbitol, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM NaHCO₃

I-1-10-1 Q_A⁻ 再酸化過程

各 TrisPS II RC の Q_A⁻ 再酸化過程を観測する目的で、レーザーフラッシュフォトリス法を用い、波長 325nm をモニター光として、吸光度変化 ΔA を観測した。

吸光度変化を測定することによる Q_A の電子伝達過程に関する研究には、325nm 測定の外に C550 と呼ばれる測定方法もあるが、これは、550nm に吸収のピークを持つ Pheo a の Q_A⁻ によって生じた電場による吸収ピークシフトを利用した測定であり (85, 86)、間接的な測定である上に Q_A⁻ 以外の電場の影響も受けることが予想されるため参考程度にしか利用しなかった。

325nm に見られる光誘起吸光度変化は、1968 年、Stiehl と Witt によって発見され、X320 と命名された (87, 88)。これは Q_A (機能分子; P Q_A) とそのアニオンラジカル (Q_A⁻) との間の吸光度差によって生じることが明らかになった (85)。325nm では、Q_A が電子を受け取って Q_A⁻ が生じたことが直接的に観測されるが、同

じく PQ_A を機能分子とする Q_B^- も同時に観測され、蛍光測定によって観測された半減期 $100\sim 200\mu s$ の $Q^- \rightarrow Q_B$ 過程 (72-74) は容易に分離は出来ず、 $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 過程と $Q_B^- \rightarrow$ フェリシアナイド過程が重なって測定される (付録6 参照, p135)。試料濃度は $0.8\mu M$ Cyt で測定を行った。また、以下、 Q_A 活性 (Q_A 光還元活性) としては、 $325nm$ の波長の吸光度の緩和過程解析結果を外挿し、フラッシュ照射後 $1ns$ での吸光度変化の強度として決定した (図9, p36)。本研究の $325nm$ 測定におけるモル吸光度変化の係数 $\Delta \epsilon$ は $9.13mM^{-1}cm^{-1}$ であった。 $325nm$ 測定では明らかに、速い緩和成分と遅い緩和成分が観測されたので、最小二乗法により2成分の指数関数の和として解析した。酸化還元電位、pH、人工電子供与体などの諸条件を変化させて吸光度変化を観測し、それらの解析を行った。

また、 Q_A^- 再酸化過程には $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 過程、 $Q_B^- \rightarrow$ フェリシアナイド過程だけでなく $Q_A^- \rightarrow$ 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 過程が観測される。 $Q_A^- \rightarrow$ 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 過程に関しては、蛍光測定、C550 測定が行われており、この電子伝達速度は半減期 $5\sim 25\mu s$ と報告されている (24, 26, 73, 89, 90)。しかし、蛍光測定も、C550 測定も間接的に Q_A を観測しているにすぎず、他の過程を観測している可能性も存在するため、 $325nm$ 測定による直接的な観測が必要である。この場合、報告されている速度は本研究で使用している装置による正確な測定がやや困難であり、 Q_A^- の生成にともなう吸光度変化が $\sim 10\mu s$ の時間領域で減少したかのように観測される可能性もある。そこで、 $325nm$ における Q_A^- を直接測定し、 $Q_A^- \rightarrow Fe^{3+}$ 電子伝達過程の成分の大きさを見積もることを試みた。ところが、フェリシアナイドを酸化剤として用いた場合、非ヘム鉄の再酸化速度は $1\sim 4$ 分であるという報告があり (25, 91)、本実験ではフラッシュ間隔を 2.5 秒間としているため第2フラッシュ以降は還元された非ヘム鉄が蓄積する可能性が高い。そのため、フェリシアナイドによる酸化を十分に受け、光還元された非ヘム鉄の量が最も少ないと思われる、パルス光照射での第1フラッシュだけで議論すべきである。そこで、40回分のパルスの影響が全て平均化される方法は取らず、第1～第10フラッシュまでを、フラッシュ別に複数のサンプルでそれぞれ積算した。試料としては TrisPS II RC と、 $Q_A^- \rightarrow Fe^{3+}$ 電子伝達過程の存在しない $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC を用い、この第1フラッシュによる結果同士を比較した。

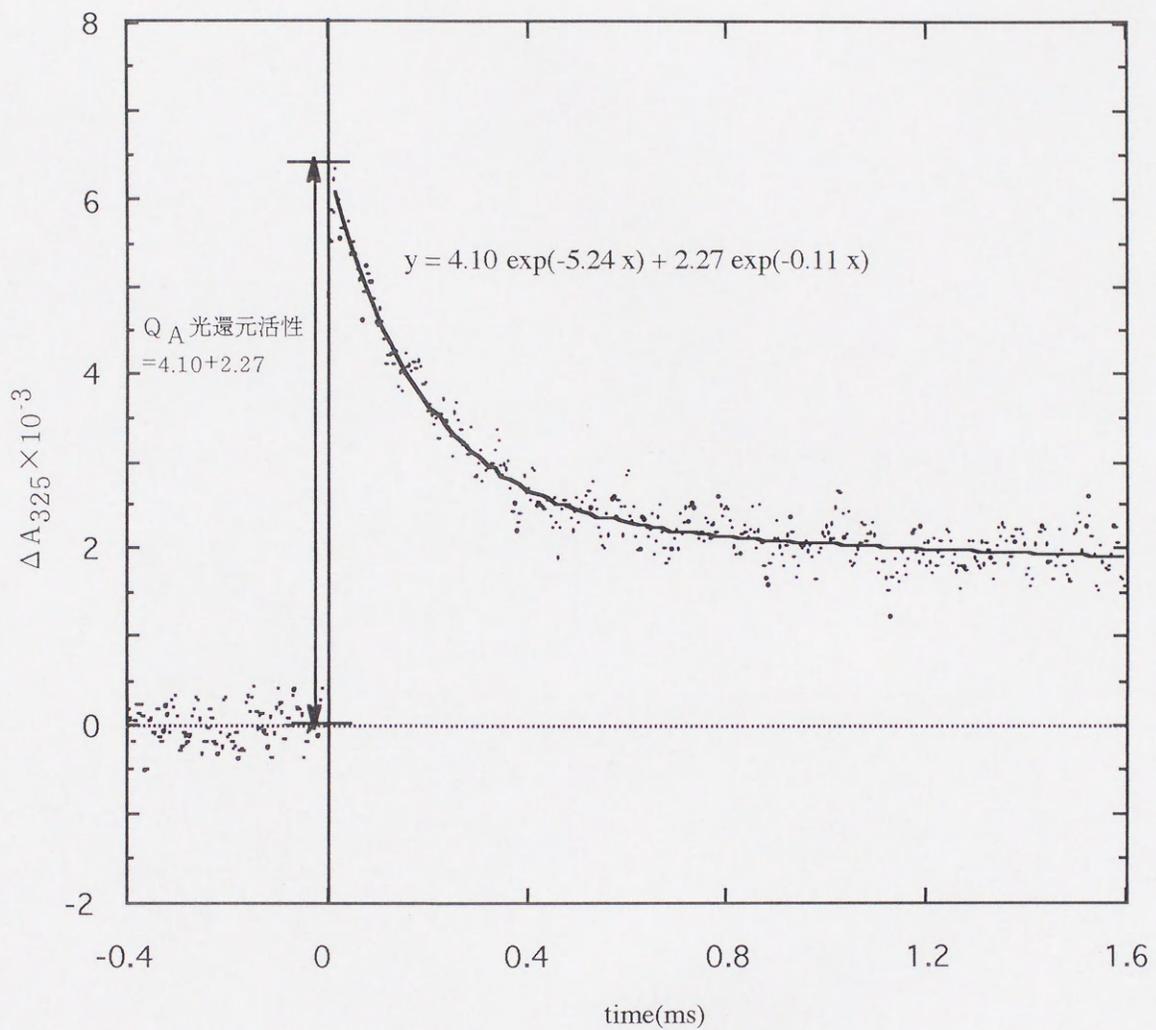


図9 Q_A 光還元活性の測定の一例

325nm で測定された Q_A^- ラジカルに起因する吸収変化の緩和過程を 2 成分の指数関数の和として曲線に当てはめ、 $t = 0$ における成分の大きさの和を Q_A 光還元活性とした。この例は試料としてTrisPS II RCを用いたものである。

I-1-10-2 P680⁺再還元過程

各TrisPSⅡRCのP680⁺再還元過程を観測する目的で、レーザーフラッシュフォトリス法を用いて、モニター光680nm, 820nmの波長の吸光度変化を観測した。

680nmにおいては反応中心P680の吸収が観測され、P680の光励起によってP680⁺が生じることで吸収の減少が起こり、続いてその緩和過程が見られる。しかし、Q_A⁻の電場効果によるPheo aの吸収シフトの影響も観察される可能性も存在する(85)。さらに、反応中心は680nmの波長の光で励起されるので、モニター光によって反応中心を励起してしまう影響を完全になくすことは出来ない。本研究での680nmにおける吸光度変化係数 $\Delta \epsilon$ は $-37.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、325nmにおける吸光度変化の数倍であるため、測定試料濃度は $0.2 \mu \text{ MCyt}$ とした。

820nmにおいてはP680⁺の吸収極大値が見られ、P680の光励起によってP680⁺が生じることで吸収の増加が起こり、続いてその緩和過程が見られる。この波長には、680nm測定のように他の色素の電場効果による影響は現れず、P680⁺の生成消滅過程のみを観測できる。そのうえ、820nmは反応中心が励起される680nmよりも長波長であるため、モニター光として使う光によって反応中心が励起されることは物理的にあり得ず、系をほとんど乱すことなくP680の酸化還元状態を知ることが出来る。従って、820nm以下の波長を使う他の測定よりも信頼性が高いと考えられる。ただし、本研究での820nmにおける吸光度変化係数 $\Delta \epsilon$ は $1.36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、325nm測定における吸光度変化より小さいため、試料濃度は $1.6 \mu \text{ MCyt}$ で測定した。

P680⁺再還元過程には、主にZ→P680⁺電子伝達過程(半減期3~16 $\mu \text{ s}$)と(92)、光励起によりP680からQ_Aへ移動した電子が再びP680へ返る電子伝達過程である、主に2つの成分(半減期150~170 $\mu \text{ s}$, 半減期700~800 $\mu \text{ s}$)が観測されることが報告されている(71)。そこで、最小二乗法により3成分の指数関数の和として測定結果を解析した。ただし、Z→P680⁺電子伝達過程は、報告されている速度は、本研究で使用している装置による観測がやや困難である。そのため、真の“P680光励起活性”の大きさを本研究で測定することは出来ず、Z→P680⁺電子伝達過程と2つの電荷再結合過程の全体に対する割合を見積もることは出来なかった。

P680⁺再還元過程の測定に際し、酸化還元電位、pH、人工電子供与体の有無などの諸条件を変化させて得たデータの解析を行った。また、P680⁺再還元過程測定においてもQ_A⁻再酸化過程と同様にして、フラッシュ依存性を測定した。これによって、全フラッシュの平均の緩和過程と各フラッシュの緩和過程を比較することにより、PS II 内環状電子移動解明の手がかりとした。

I-1-1 1 酸化還元電位依存性の測定

P680⁺再還元過程とQ_A⁻再酸化過程に見られる緩和過程の酸化還元電位依存性と、各 TrisPS II RC における、Cyt b-559 の高電位型 (HP) と低電位型 (LP) の電位決定とそれらの存在比を求めた。

2つの緩和過程の酸化還元電位依存性の測定では、試料溶液には、酸化剤として 0.8mM フェリシアナイド、メディエーターとして、20 μM 2,3,5,6-tetramethylphenylenediamine ($E_{m7.0} = 260\text{mV}$)、20 μM N-methylphenazonium methosulfate ($E_{m7.0} = 80\text{mV}$) を加え、新鮮な 50mM DTN 水溶液 (50mM Tricine-NaOH (pH 9.0 at 4°C)) を少量加えることで、還元した。DTN は水溶液にすると不安定であるので特に速やかに測定することを心がけた。レーザーフラッシュフォトリシス法によって測定したものと同一の試料を用いて、酸化還元電位を測定した。

また、Cyt b-559 の HP と LP の電位 (E_m) とそれらの存在比を求めるために、まず、520nm~600nm 領域でフェリシアナイドを 0.8mM になるように加えた試料における Cyt b-559 の酸化型の吸収スペクトルを分光光度計に記憶させ、バックグラウンドとした。バックグラウンドを測定した試料にメディエーターとして、2,3,5,6-tetramethylphenylenediamine と N-methylphenazonium methosulfate をどちらも 20 μM になるように加え、先に用いたものと同様の新鮮な 50mM DTN 水溶液を少量加えてパスツールピペットで混合して還元し、還元-酸化差スペクトルを測定した。さらに同一の試料に、続けて DTN 水溶液を少量ずつ加えて還元-酸化差スペクトルを測定していき、最後に DTN を粉末のまま極微量を加えて完全に還元型にした。同時に、0.1M KCl を加えた、全く同じ条件の試料を用意し、酸化還元電位を測定した。それによって Cyt b-559 の還元型の量の酸化還元電位依存

性を求めた。この測定では、レーザーフラッシュフォトリス法に用いた条件に合わせて可溶化剤を用いずに行った結果、ベースラインが大きく傾くため、559nmのピークと539nmの部分の吸収の肩の吸光度の差 ($\Delta A_{559\text{nm}-539\text{nm}}$) を用いた (図10, p40)。

緩和過程の酸化還元電位依存性の測定では、酸化還元電位1点の測定ごとに試料を使い捨てにするが、Cyt b-559のHPとLPの電位とそれらの存在比の測定では、同じ試料溶液に次々とDTNを添加していく方法をとったため、試料溶液が酸素にさらされて酸化され、酸化還元電位が動くことを抑える必要が生じた。そこで、Crystallらの方法を基にして(93)、以下に示すように無酸素状態で測定した。まず、40mM HEPES-NaOH, 1M Sorbitol, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂を含む水溶液にglucoseを2mMになるように加え、脱気した後アルゴンガスを約1時間吹き込み、glucose oxidase (ナガセ生化学工業(株), catalase含有グレードI)を0.2mg/mlになるように加えたものに、さらにQ_A, Q_B間の電子伝達に必要なNaHCO₃の濃厚溶液を10mMになるように加えた溶液を作り、試料を分散し、遠心して再び分散するという操作を2回行った。酸素はglucose oxidaseとcatalaseによってglucoseを酸化するために消費されて除かれる。分光光度計による還元型Cyt b-559の量の測定と酸化還元電位の測定は、アルゴンガス雰囲気中で行った。なおpH6.0における測定は先に示した溶液の40mM HEPES-NaOHを40mM MES-NaOHに換えたものを用いた。

酸化還元電位は、支持電解質としてKClを0.1Mを系に加え、白金電極と参照電極としての銀/塩化銀電極を小型電位差計(Takeda Riken, TR-6355)に接続して測定した。測定はスターラーで攪拌した状態で20°Cで行い、銀/塩化銀電極の内極電位204mVで補正して酸化還元電位とした。

これらの結果を解析するためにNernstの式

$$\epsilon = \epsilon^0 - \frac{0.05816}{n} \log \frac{C}{1-C} \quad (20^\circ\text{C}, C \text{ は還元型の割合})$$

をCについて解いた。緩和過程の酸化還元電位依存性の場合レーザー1フラッシュあたり平均して1個の電子を受け渡すこと、およびCyt b-559の場合1電子還元されることは明らかであるから、 $n = 1$ として

$$C = \frac{1}{\exp \{0.03958(\epsilon - \epsilon^0)\} + 1} \quad (\text{電位の単位を mV にした})$$

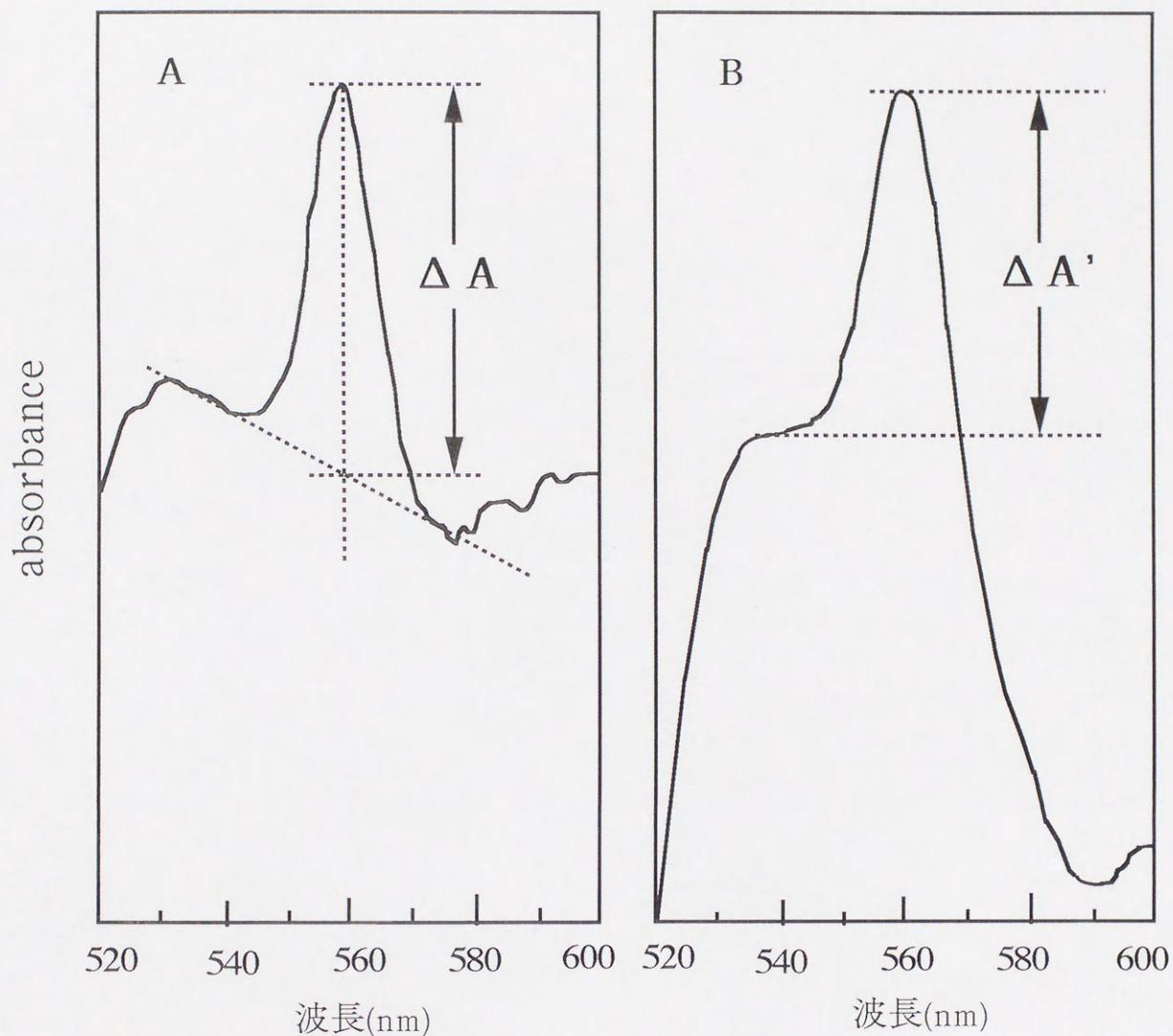


図10 $\Delta A_{559\text{nm}-539\text{nm}}$ を用いた Cyt b-559 の還元型の相対量の測定

A. 通常、Cyt b-559の還元型の定量には、可溶化剤 0.05% n-dodecyl- β -D-maltoside を用いてCyt b-559の還元-酸化差スペクトルのベースラインからの559nmの吸光度変化を測定する。

B. レーザーフラッシュフォトリシス法と同じ条件で測定するために可溶化剤を用いずに還元-酸化差スペクトルを測定した。そのため大きく傾いたベースラインの上に559nmの吸収が見られ、傾きを差し引きすることも困難になった。そこで、539nmの吸収の肩との差を測定したところ、この値 ($\Delta A'$) は、可溶化剤を用いたときの結果 (ΔA) とよく一致したこの値を用いて還元型 Cyt b-559の相対量とした。

と変形した。

実際は吸光度係数がかかっており、また、他の成分が重なっていることもあるので、測定された吸光度差を $f(\epsilon)$ として

$$f(\epsilon) = \frac{a}{\exp\{0.03958(\epsilon - \epsilon^0)\} + 1} + b \quad (a, b, \epsilon^0 \text{ はフィッティングによって求めた})$$

の式を用い、パーソナルコンピュータ (Apple, Macintosh LC520) 上で、Abelbeck, Kaleida Graph を利用して曲線にフィットさせて解析を行った。ただし、Cyt b-559 の場合、HP と LP の 2 成分が主に存在するため、上の式を 2 つ足し合わせたものを作ってフィットさせ、それぞれの成分の比を求めた。

I-1-12 試薬類

n-dodecyl- β -D-maltoside, HEPES, MES は同仁化学研究所 (株) より、MOPS は第一化学 (株) より、Tris はナカライテスク (株) より購入した。その他の試薬は片山化学工業 (株) より購入した特級試薬を使用した。

I-2. 実験結果

I-2-1 非ヘム鉄の除去とZn²⁺置換の確認

-Fe²⁺-TrisPSⅡRC および Zn²⁺-TrisPSⅡRC 試料で非ヘム鉄除去がされているか確認する目的で、極低温EPR測定での $g = 8.1, 6.4, 5.5$ の値を示す Fe³⁺シグナルが消失しているか否かを確認した。図11 (p43) に -Fe²⁺-TrisPSⅡRC の結果を示した。比較のために TrisPSⅡRC の結果も図示した。このように同じ Cyt 濃度で対応する g 値のシグナルが消失したことを確認した。また、ここには示さないが、-Fe²⁺-TrisPSⅡRC では $g = 2.0045$ の Q_A⁻ラジカルの EPRシグナルを観測することができ(94)、Q_A⁻-Fe²⁺相互作用による EPRシグナルも消失していた(82)。

さらに、表1 (p44) に ICP-AESの結果を示した。Cyt b-559 には1個のヘム鉄が存在することを考慮に入れると -Fe²⁺-TrisPSⅡRC, Zn²⁺-TrisPSⅡRC には Cyt b-559 以外の鉄原子が、それぞれ 0.92 個, 0.97 個残留していることになり、鉄原子数は TrisPSⅡRC と同等で減少していなかった。

しかし、Zn²⁺-TrisPSⅡRC には 0.83 個の亜鉛原子が入っており、亜鉛置換はほぼ予測通り行われていることが示された。EPR測定の結果から、-Fe²⁺-TrisPSⅡRC, Zn²⁺-TrisPSⅡRC の鉄イオンは、非ヘム鉄の通常部位から解離していることは明らかなので、鉄除去の際出来る錯体 [Fe(1,10-Phenanthroline)₃]²⁺ の形のまま系外に完全には出ていないと考えられる。さらに、参考論文 (p.123) 中に述べているように、上記の方法で調製した Zn²⁺-TrisPSⅡRC では TrisPSⅡRC の Fe²⁺結合部位に Zn²⁺が置換しているとの間接的データも得ている。

I-2-2 Q_A⁻再酸化過程と P680⁺再還元過程の比較

電荷再結合反応が真の意味での“逆反応”であるか“環状電子移動”であるか検討する前に、Q_A⁻再酸化過程と P680⁺再還元過程の比較を行い、本研究で用いた試料における電荷再結合反応成分と正常な電子移動である“直線状電子移動”との

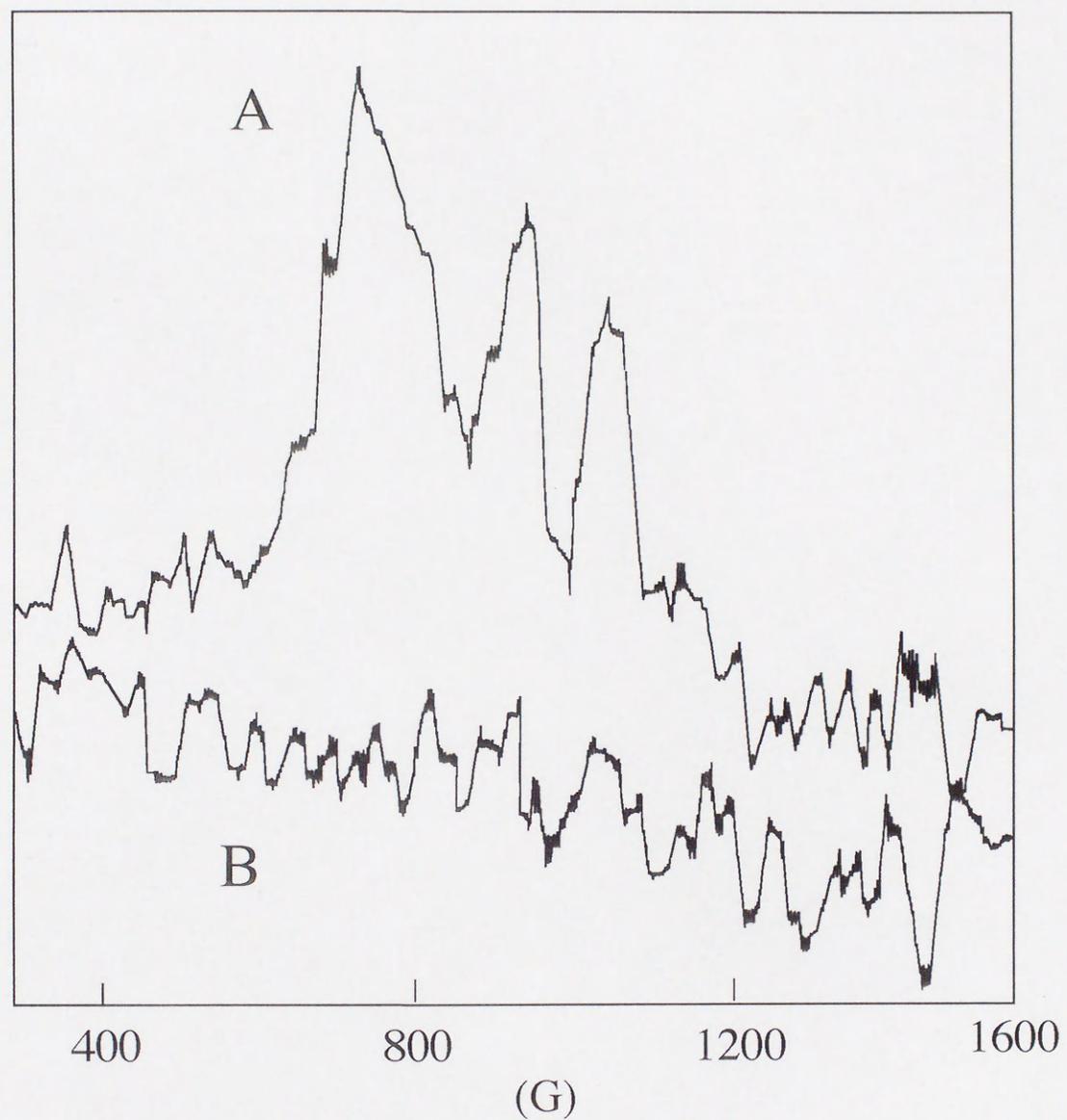


図11 EPRによる非ヘム鉄除去の確認

図7と同じ条件でEPR測定を行い、比較のために非ヘム鉄を持つTrisPSⅡRCで観測されたシグナルを図示した(A)。(B)は Fe^{2+} -TrisPSⅡRCのスペクトル。非ヘム鉄(Fe^{3+})に起因するとみられるシグナルは消失していた。従って、非ヘム鉄は少なくともその結合部位には存在しないことがわかった。

表1 各 TrisPS II RC の反応中心当たりの鉄および亜鉛の数

Sample	<u>F e</u>	<u>Z n</u>
TrisPS II RC	1.91	0.09
-Fe ²⁺ -TrisPS II RC	1.92	0.10
Zn ²⁺ -TrisPS II RC	1.97	0.83

分離を行わなければならない。そのために、水分解系とキノンプールのモデル系として、それぞれ人工的電子供与体の Mn^{2+} および人工的電子受容体のフェリシアナイドを添加した直線状電子移動を生じやすい系と、フェリシアナイドのみを添加した系の電子移動過程をそれぞれ比較した。このとき、 Mn^{2+} が存在している方の系では、 Mn^{2+} が $P680^+$ へ電子を渡す速度より遅い電荷再結合反応は観測できなくなることが予想される。

図12 (p46) に TrisPS II RC を用いたときの 0.2mM フェリシアナイド存在下、または、0.2mM フェリシアナイドおよび 0.2mM $MnCl_2$ 存在下の Q_A^- 再酸化過程 (325nm) と $P680^+$ 再還元過程 (680nm, 820nm) のそれぞれの緩和過程での吸光度変化の例を示した。

Q_A^- 再酸化過程では人工電子受容体フェリシアナイドのみを作用させた場合、半減期 100~200 μs と 2~5ms の 2 成分が見られた。このうち半減期 100~200 μs の成分は全体の 62% 観測された。さらに人工電子供与体 Mn^{2+} を 0.2mM 作用させて電荷再結合反応を阻害した場合、半減期 100~200 μs の成分は全体の 10~20% にまで減少し、代わりに 2~5ms の成分が増加した。

一方、 $P680^+$ 再還元過程ではフェリシアナイドのみを作用させた場合、680nm 測定、820nm 測定ともに、半減期 100~200 μs の成分と半減期 700 μs ~1ms の成分が見られた。このうち半減期 100~200 μs の成分は、680nm 測定、820nm 測定ともに、全体の 79% 観測された。さらに Mn^{2+} で電荷再結合反応を阻害した場合、100~200 μs と 700 μs ~1ms の成分はともにほぼ消失し、代わりに、 Mn^{2+} がZを介して $P680^+$ を還元する過程であると報告されている半減期 18~35 μs の速い電子移動過程が観測された (76)。

以上の結果から、 Q_A^- 再酸化過程の 100~200 μs の成分と、 $P680^+$ 再還元過程の 100~200 μs 成分と 700 μs ~1ms 成分は、ある種の電荷再結合反応過程を示していることが明らかになった。また、図13 (p47) には $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC、 Zn^{2+} -TrisPS II RC の 100~200 μs の成分の量も示したが、観測された 100~200 μs 成分は、 $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC、 Zn^{2+} -TrisPS II RC では TrisPS II RCに対して、46~74% であったことから、100~200 μs 成分は非ヘム鉄とも関係があることが示唆された。

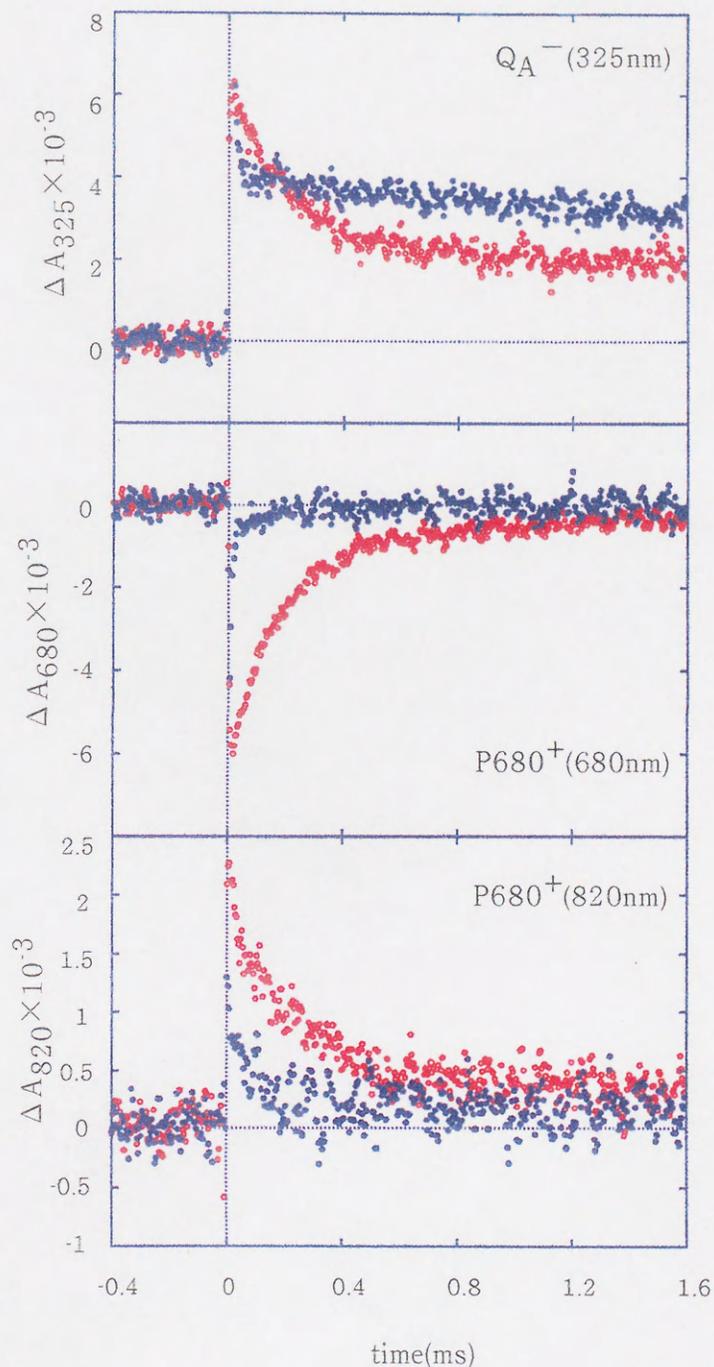
この 100~200 μs 成分および 700 μs ~1ms 成分が、 Q_A^- から直接 $P680^+$ に電子

図12 レーザーフラッシュフォトリス法によって各波長で観測された吸光度変化の例 (TrisPS II RC)

測定条件：pH 7.5, 20°C, 酸化還元電位 498mVで測定を行い、第1～第40フラッシュに伴う吸光度変化の積算を3回行い、120回分のフラッシュの平均を求めた。

(●) 0.2mM フェリシアナイド存在下。Q_A⁻再酸化過程が観測される325nmでの測定では100～200 μs および2msの成分が観測され、P 680⁺再還元過程が見られる680 nm および 820nmでの測定では100～200 μs および 700 μs～1msの成分が観測された。

(○) 0.2mM フェリシアナイドおよび0.2mM MnCl₂存在下。Q_A⁻再酸化過程の100～200 μsが消失し、P 680⁺再還元過程の100～200 μs および 700 μs～1msの成分がそれぞれ消失した。



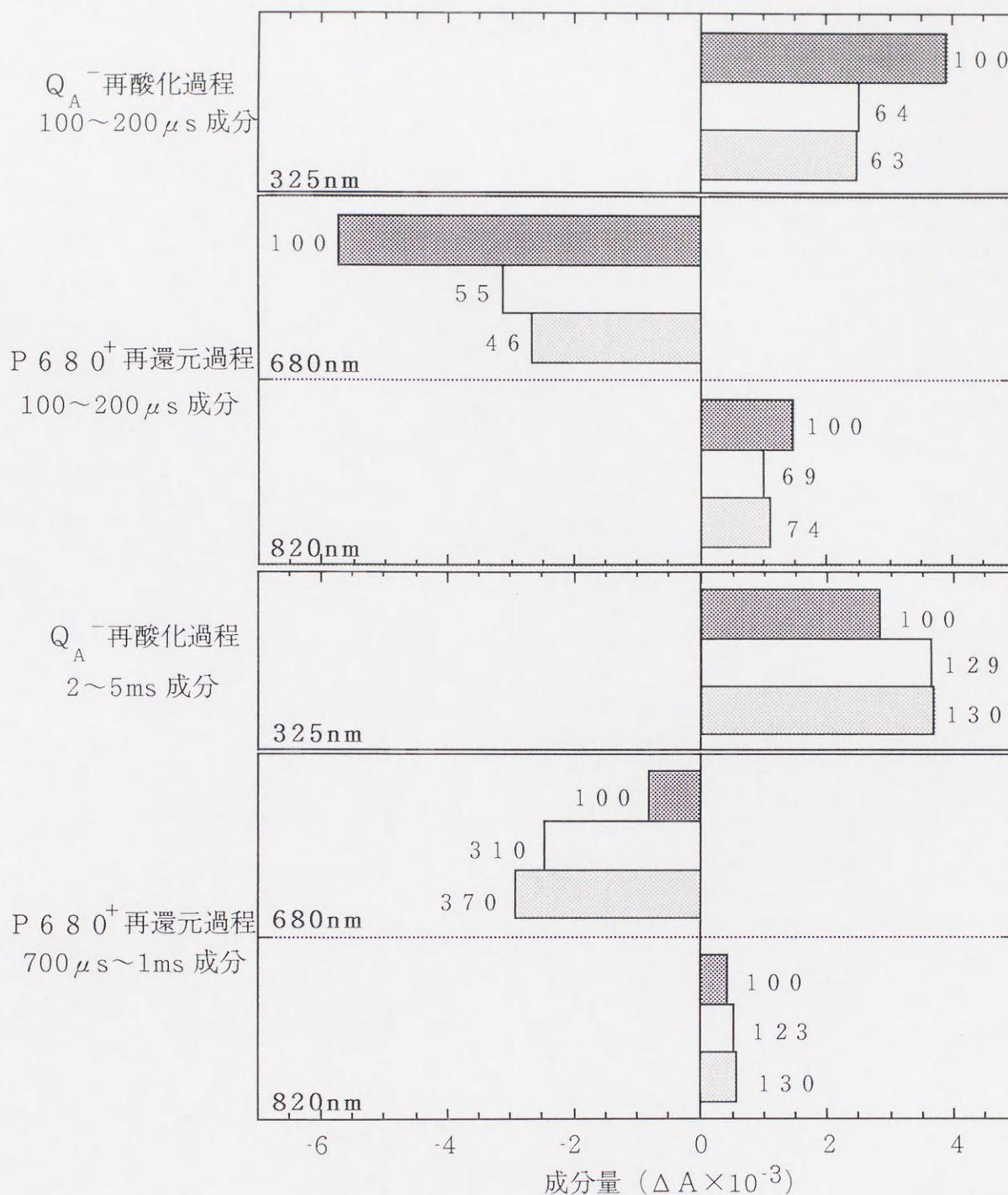


図13 各波長での測定結果における成分量と割合

各TrisPS II RCにおけるQ_A⁻再酸化過程とP680⁺再還元過程の緩和過程成分の量 (ΔA × 10⁻³) をグラフにした。また、TrisPS II RCに対する割合 (%) をそれぞれ数字で示した。

測定条件は pH 7.5, 20°C, 0.2mM フェリシアナイド (酸化還元電位 498mV)

- (■) TrisPSII RC
- (□) -Fe²⁺-TrisPS II RC
- (□) Zn²⁺-TrisPS II RC

を逆流させる逆反応であるか、何かを経由する環状電子移動であるかを区別するために、さらに、これらの成分の挙動を調べた。

I-2-3 Q_A , Q_B 間電子移動阻害剤の効果

直線状電子移動の経路である $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 電子移動の阻害剤として知られる 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) を添加する事によって (95)、 $Q_A^- \rightarrow P680^+$ 逆反応を増加させることを試みた。ところが図14 (p49) に示すように、DCMUを添加すると Q_A^- 再酸化過程では半減期 100~200 μs の成分が消去され、2~5ms の成分が残った。P680⁺再還元過程においても同様に 100~200 μs の成分が消去され、700 μs ~1ms の成分が残った。

図15 (p50) は、DCMU, Mn^{2+} とも存在する条件で、 Q_A^- 再酸化過程のフラッシュ依存性を観測したものである。このとき、DCMUによって $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 電子移動を阻害しても、 Mn^{2+} によって電荷再結合反応を阻害しても第1フラッシュでは正常な Q_A 活性を示していた。このことから、本研究で用いた測定系でも、DCMUおよび Mn^{2+} はP680から Q_A までの電子伝達は阻害しないことが確認された。さらに、DCMUは Q_A , Q_B 間の電子移動のうち、 $Q_A^- \rightarrow$ 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 電子移動までは阻害しないこと(26)、またDCMUは Q_B の近傍の部位に結合すると考えられていることから(95)、DCMUによって Q_A^- からの電子の放出が阻害されるとは考えにくい。

従って、 Q_A^- 再酸化過程とP680⁺再還元過程で 100~200 μs の成分がDCMUによって阻害されることは、この成分が従来言われてきたような Q_A^- からP680⁺への逆反応ではなく、非ヘム鉄、 Q_B の近傍を通る環状電子移動であるという可能性が示唆された。

I-2-4 Q_A^- 再酸化過程とP680⁺再還元過程の酸化還元電位依存性

Q_A^- 再酸化過程とP680⁺再還元過程に見られる電荷再結合反応の酸化還元電位依存性を比較した。図16 (p51) には、 Q_A^- 再酸化過程とP680⁺再還元過程の半減

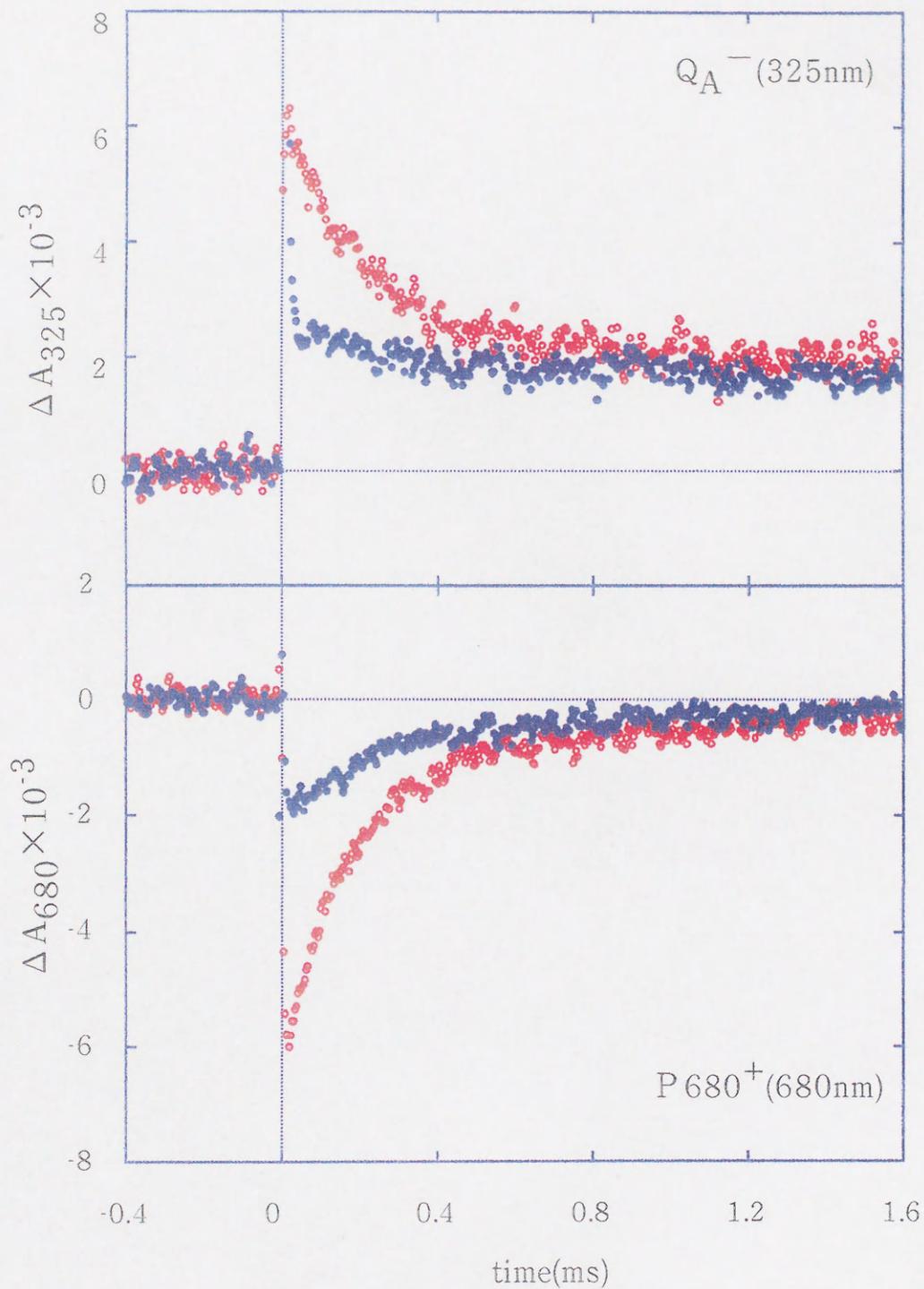


図14 Q_A^- 再酸化過程および $P680^+$ 再還元過程に対する DCMUの効果 (TrisPS II RC)

(○) DCMU非存在下。

(●) Q_A^- 再酸化過程(325nm)では $1 \mu\text{M}$ DCMU存在下、 $P680^+$ 再還元過程では $0.25 \mu\text{M}$ DCMU存在下(それぞれの測定条件の反応中心濃度に対し、同じ比になるように加えた)。その他の測定条件は図12と同じ。

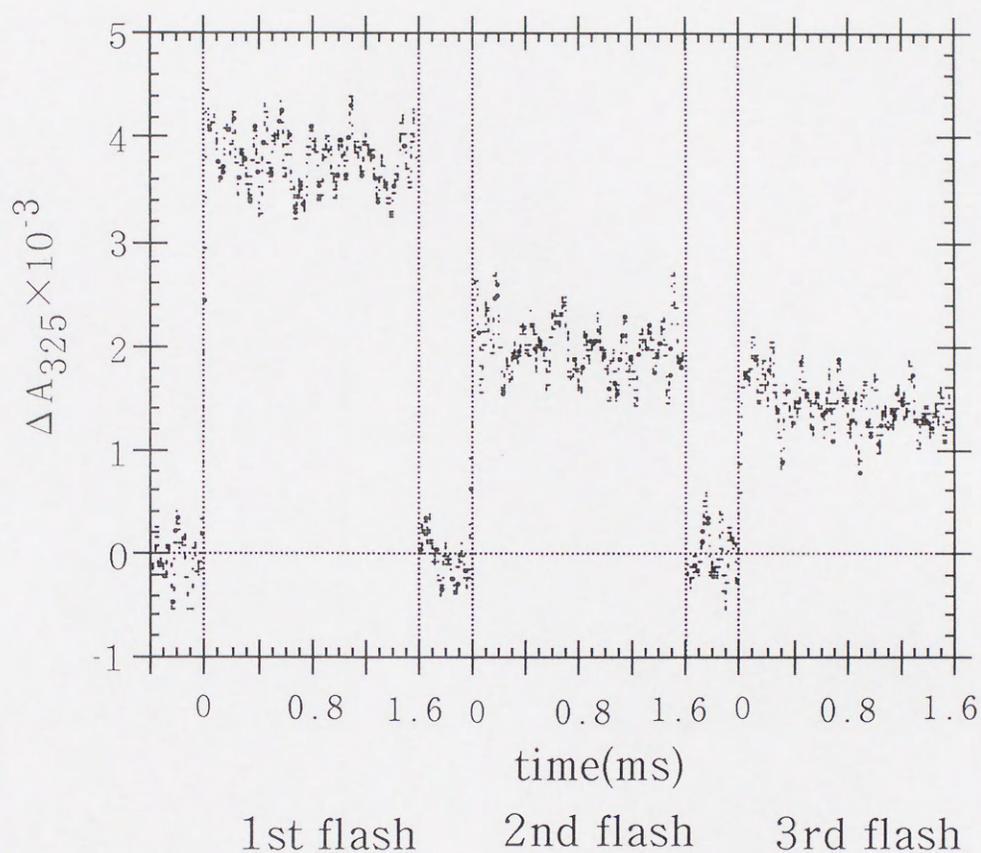


図15 DCMUおよび Mn^{2+} 存在下の325nm測定におけるフラッシュ依存性(TrisPS II RC)

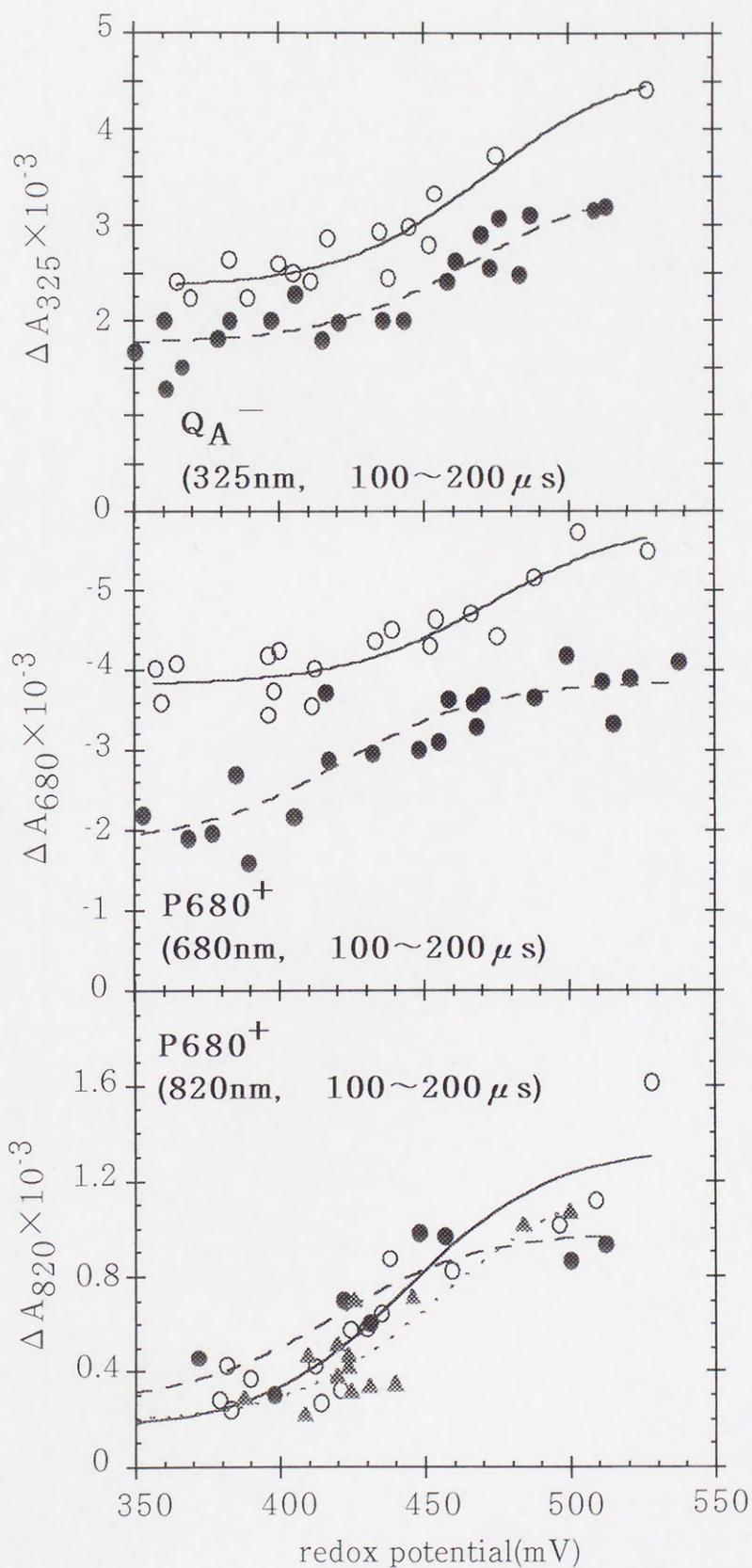
測定条件：50回の測定を行った。第1～第10フラッシュの各々の吸光度変化の結果同士の平均をそれぞれ求めた。図には第1～第3フラッシュまでの結果を示す。反応中心 $0.8 \mu M$ に対して $1 \mu M$ DCMU, $0.2 mM$ フェリシアナイド, $0.2 mM$ $MnCl_2$ を添加して、酸化還元電位は $498 mV$, $pH 7.5$, $20^\circ C$ で測定を行った。

DCMUによって Q_A , Q_B 間の電子移動を阻害し、 Mn^{2+} によって系に電子を供給した。最初のフラッシュでは、ほぼ正常な Q_A 活性を示した。

図16 Q_A^- 再酸化過程および $P680^+$ 再還元過程の100~200 μs 成分の酸化還元電位依存性

酸化還元電位を変化させ、pH 7.5, 20°Cで測定した各波長における吸光度変化を指数関数の和として解析し、100~200 μs の成分に対応する吸光度変化量を表わした。

- (○) TrisPSIIRC
- (●) $-Fe^{2+}$ -TrisPSIIRC
- (▲) Zn^{2+} -TrisPSIIRC



期 100~200 μ s 成分量の酸化還元電位依存性を示し、図 17 (p53)) には Nernst の式に基づく $n=1$ の曲線にフィッティングさせた場合の 'Em 値' を示した。また、図 18 (p55) には Q_A^- 再酸化過程の半減期 2~5ms 成分量と P680⁺再還元過程の半減期 700 μ s~1ms 成分量の酸化還元電位依存性を示した。

Q_A^- 再酸化過程では、半減期 100~200 μ s 成分量は TrisPS II RC, $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC とともに酸化還元電位の上昇に伴って増加し、pH 7.5 のとき 'Em 値' はそれぞれ 472mV, 466mV を示した (図 16, p51, 図 17, p53) 。このとき半減期 2~5ms 成分量は、半減期 100~200 μ s 成分量と逆の傾向を示した (図 18, p55) 。

一方、P680⁺再還元過程でも、半減期 100~200 μ s 成分量は各 TrisPS II RC で酸化還元電位の低下に伴って減少し、pH 7.5 のとき 'Em 値' は 419~473mV を示した (図 16, p51, 図 17, p53) 。このとき半減期 700 μ s~1ms 成分量は、酸化還元電位変化に対して明確な変化は示さなかった (図 18, p55) 。また、 Q_A^- 再酸化過程と P680⁺再還元過程における半減期 100~200 μ s 成分量の酸化還元電位変化に伴う変化量は、どれも各 TrisPS II RC で違いは見られず、この点に関しては非ヘム鉄の影響はなかった。

それぞれの電子移動過程で観測された、半減期 100~200 μ s 成分量の 'Em 値' は、平均して 450mV であった。この酸化還元電位の領域は、P680の酸化還元電位 ($E_m = 1.1V(18-20)$) および Q_A^- の酸化還元電位 ($E_m = -130mV(33)$) と大きく離れている。そのため、P680, Q_A^- の酸化還元状態が 450mV 付近で大きく変動して、100~200 μ s 成分量を増減させているとは考えにくい。この事実を説明するには、100~200 μ s 成分が Q_A^- から P680⁺へ直接電子が戻る逆反応であると考えより、何らかの電子伝達を行う介在物が存在すると考えた方が合理的である。

PS II内の機能分子類の中で、450mV に近いEm値を持つものは Cyt b-559 の高電位型 (HP) だけである。Iwasaki らは、Cyt b-559 にはHP (435mV) が 54% 存在すると報告している (37) 。そこで、本研究で用いた各 TrisPS II RC における、HP とLPの電位とそれらの成分比を知るために、Cyt b-559 の還元型の量の酸化還元電位依存性を調べた (図 19, p55, 図 20, p56) 。Cyt b-559 のHP は非ヘム鉄の有無に関わらず、427~454mV であり、50~60% 存在していた。これは、半減期 100~200 μ s 成分量の 'Em 値' とほぼ一致した。さらに、 Q_A^- 再酸

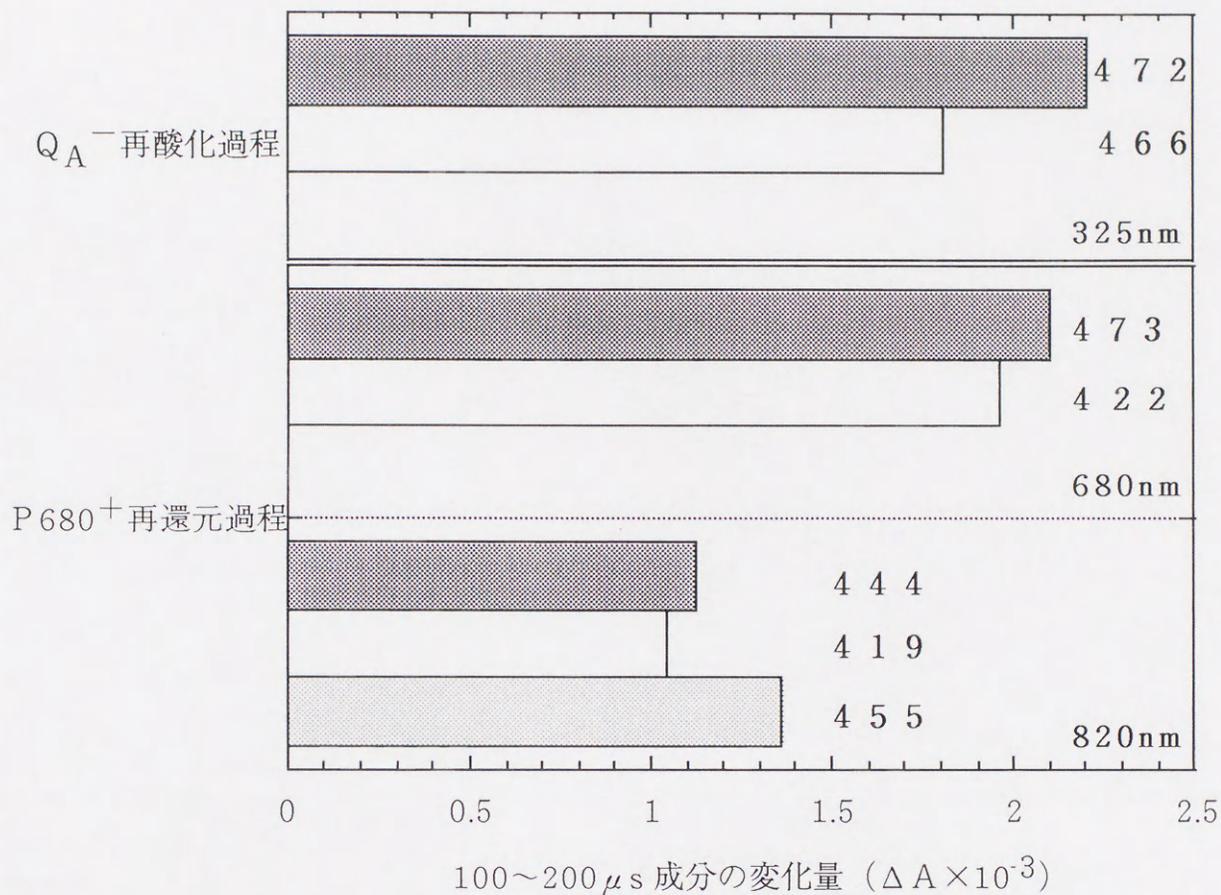


図17 酸化還元電位変化に伴う各TrisPSII RCの100~200 μ s成分の変化量と 'Em'

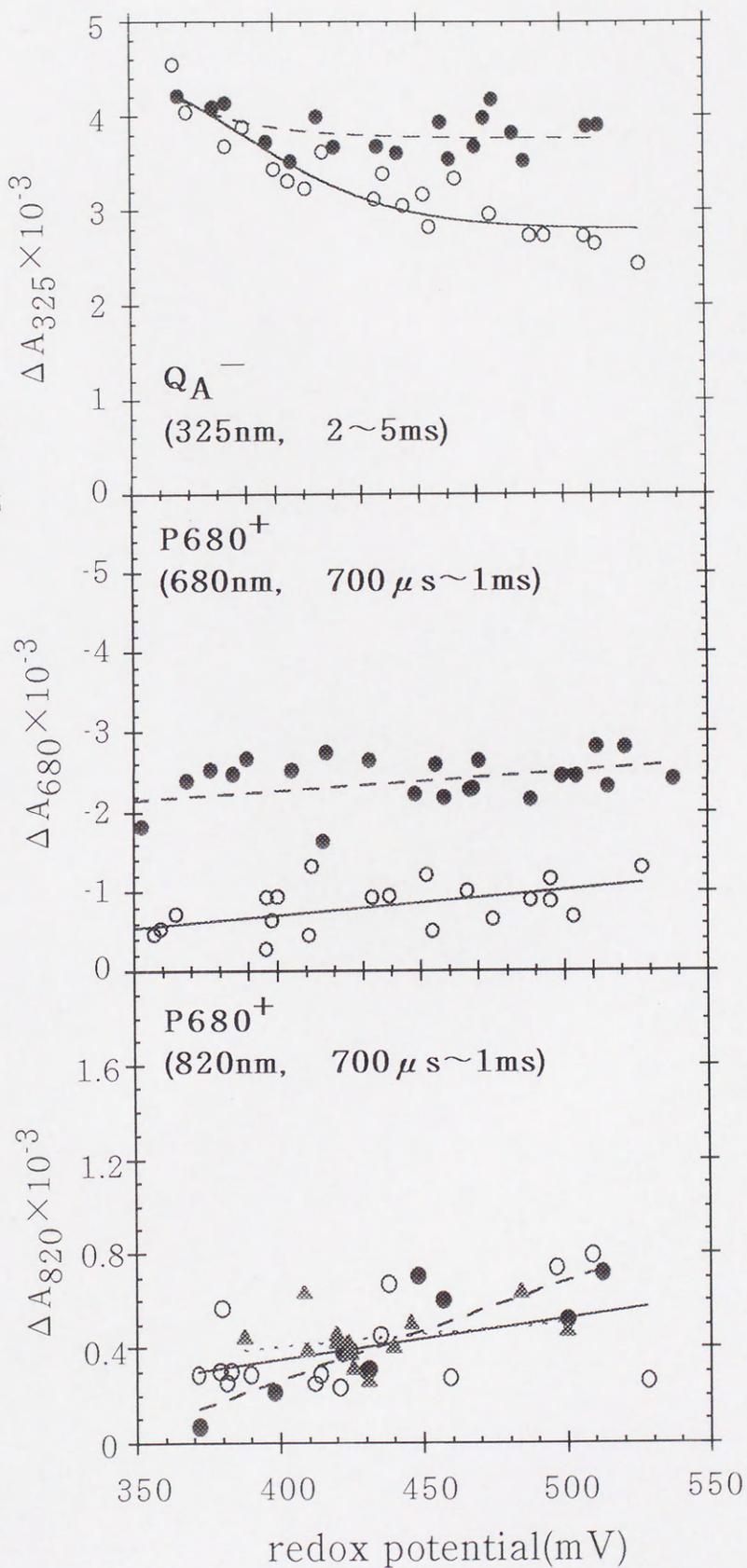
各TrisPSII RCのQ_A⁻再酸化過程とP680⁺再還元過程の100~200 μ s成分における酸化還元電位依存性の結果を、Nernstの式 (n=1) に基づく曲線にフィットさせた。このときの酸化還元電位変化に伴う変化幅 ($\Delta A \times 10^{-3}$) をグラフに示し、'Em' (mV) の値を数字でそれぞれ表した。測定条件は、pH 7.5, 20°C。

- (▨) TrisPSII RC
- (□) -Fe²⁺-TrisPSII RC
- (□) Zn²⁺-TrisPSII RC

図18 Q_A^- 再酸化過程の2~5 ms成分および $P680^+$ 再還元過程の700 μs ~1ms成分の酸化還元電位依存性

酸化還元電位を変化させ、pH 7.5, 20°Cで測定した各波長における吸光度変化を指数関数の和として解析し、それぞれの半減期の成分に対応する吸光度変化量を表わした。

- (○) TrisPSIIRC
- (●) $-Fe^{2+}$ -TrisPSIIRC
- (▲) $-Zn^{2+}$ -TrisPSIIRC



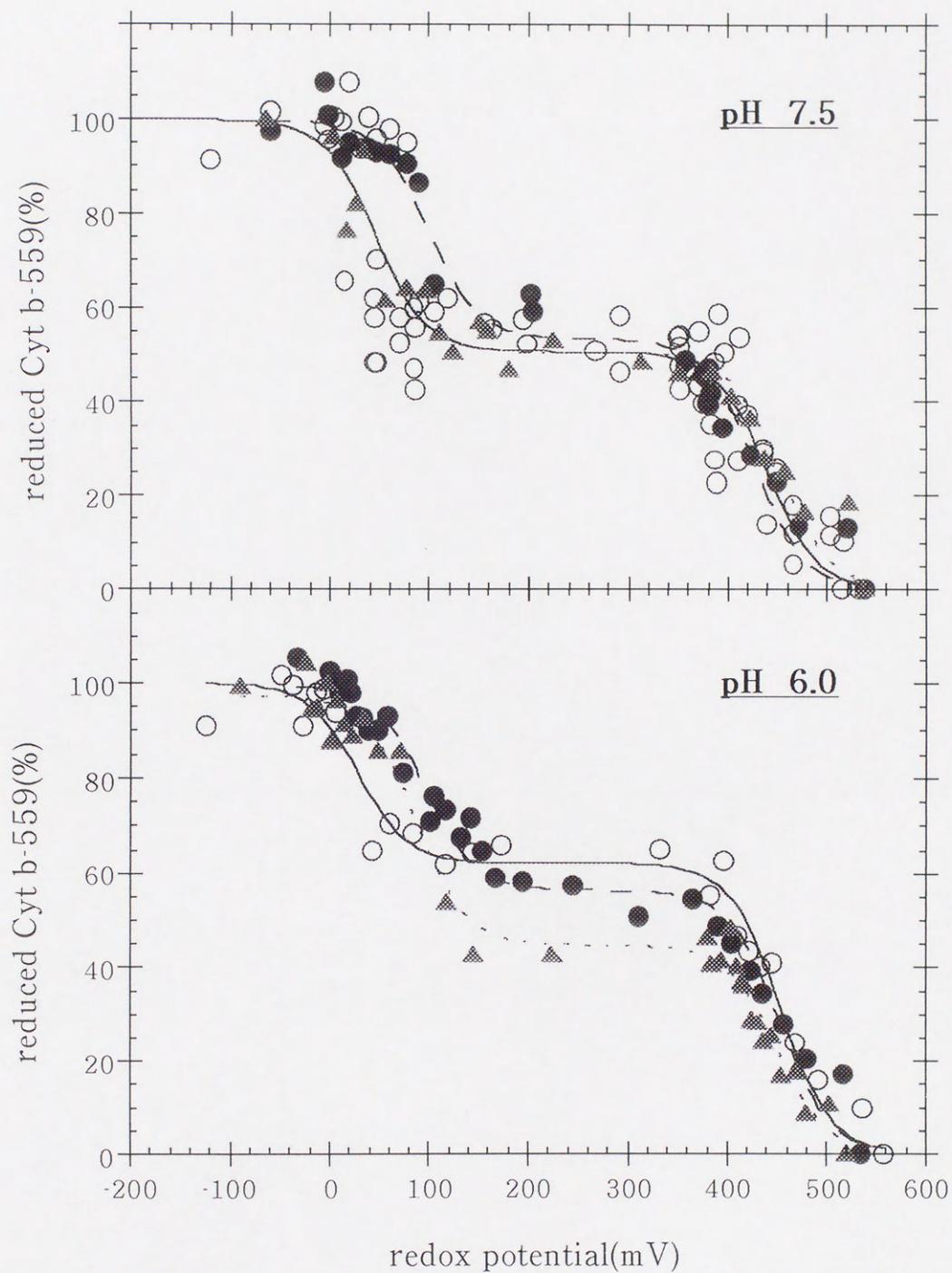


図19 Cyt b-559 の還元型の割合の酸化還元電位依存性
(pH 7.5 および pH 6.0)

$n = 1$ としたときの Nernst の式に基づいた曲線にフィットさせた結果から、Cyt b-559 の高電位型と低電位型の電位とそれらの成分比を求めた。

(○) TrisPSIIRC, (●) Fe^{2+} -TrisPSIIRC,

(▲) Zn^{2+} -TrisPSIIRC

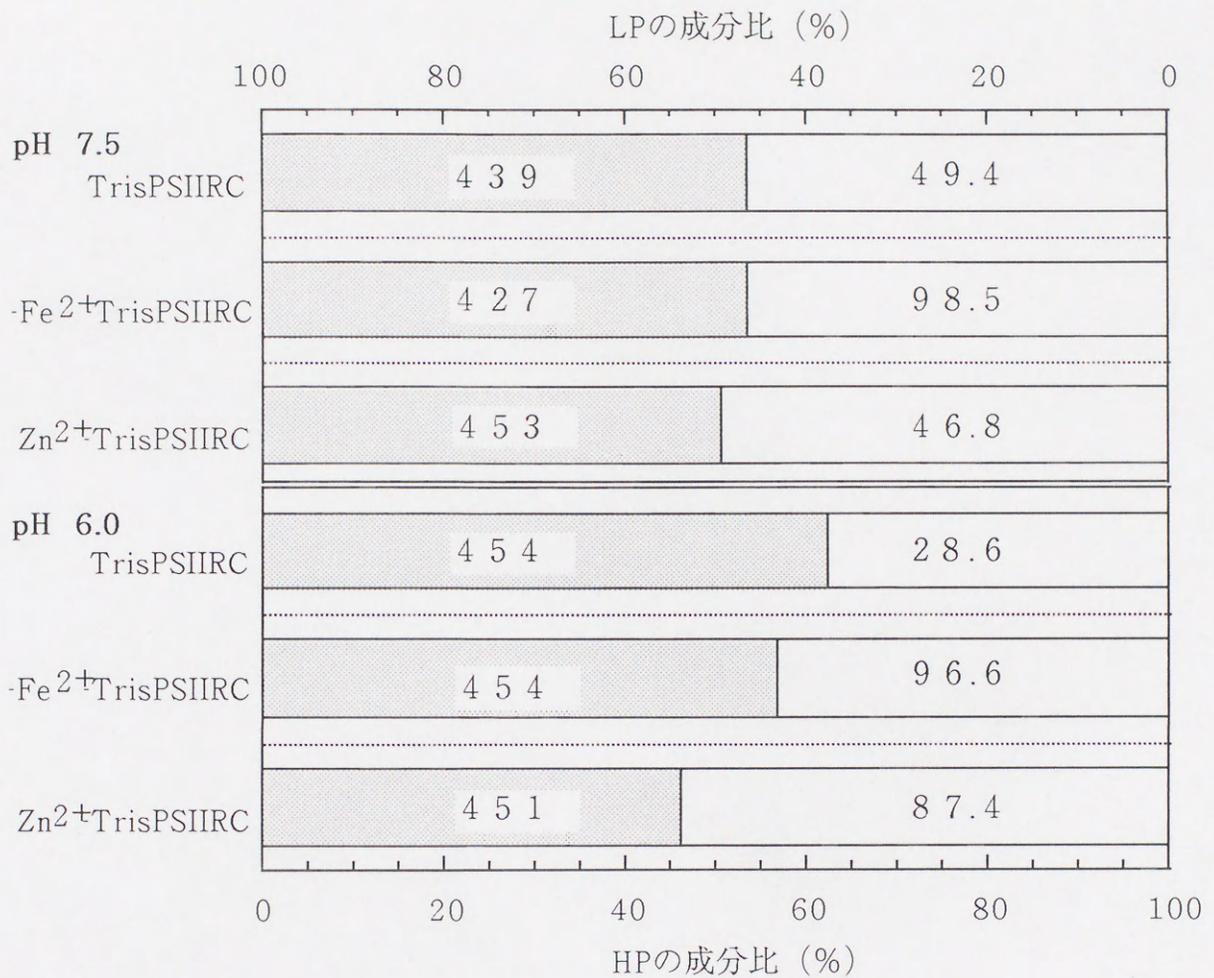


図20 各TrisPS II RC の Cyt b-559 の高電位型、低電位型の成分比と酸化還元電位

559nmの吸光度変化を用いて、各TrisPS II RC の Cyt b-559 の還元型の酸化還元滴定を行った。その結果をNernstの式を応用した曲線にフィットさせ、求めた高電位型と低電位型の成分比 (%) をグラフにした。また、それぞれの酸化還元電位 (mV) を数字で表した。測定は20℃で行った。

- (□) 高電位型 (HP)
- (□) 低電位型 (LP)

化過程におけるTrisPS II RCの 100~200 μ s 成分は、pH 7.5 で Q_A 活性の約60%であり、それぞれの割合の上でもほぼ一致した。また、HPは pH 7.5 のとき平均して 440mV (52.4%) , pH 6.0 のときのとき平均して 453mV (54.9%) であり、pH による酸化還元電位と成分比の大きな変化を示さなかった。これは、Cyt b-559 の酸化還元電位は pH 変化しないという報告と一致する (35)。

これらの結果から、環状電子移動と考えられる 100~200 μ s 成分は、Cyt b-559 を経由することが示唆された。

また、Ahmad らの報告によれば、高濃度の可溶化剤 n-dodecyl- β -D-maltoside (以下 DMと略す) 存在下では Cyt b-559 の高電位型は減少する (36)。そこで 325nm 測定に関してTrisPS II RC を用いてDM濃度依存性を調べた結果、臨界ミセル濃度 165 μ M (96)付近の濃度で急激に 100~200 μ s 成分が減少していることが分かった (図 2 1, p58)。このことは、100~200 μ s 成分に Cyt b-559 が関与しているという予測と矛盾していない。

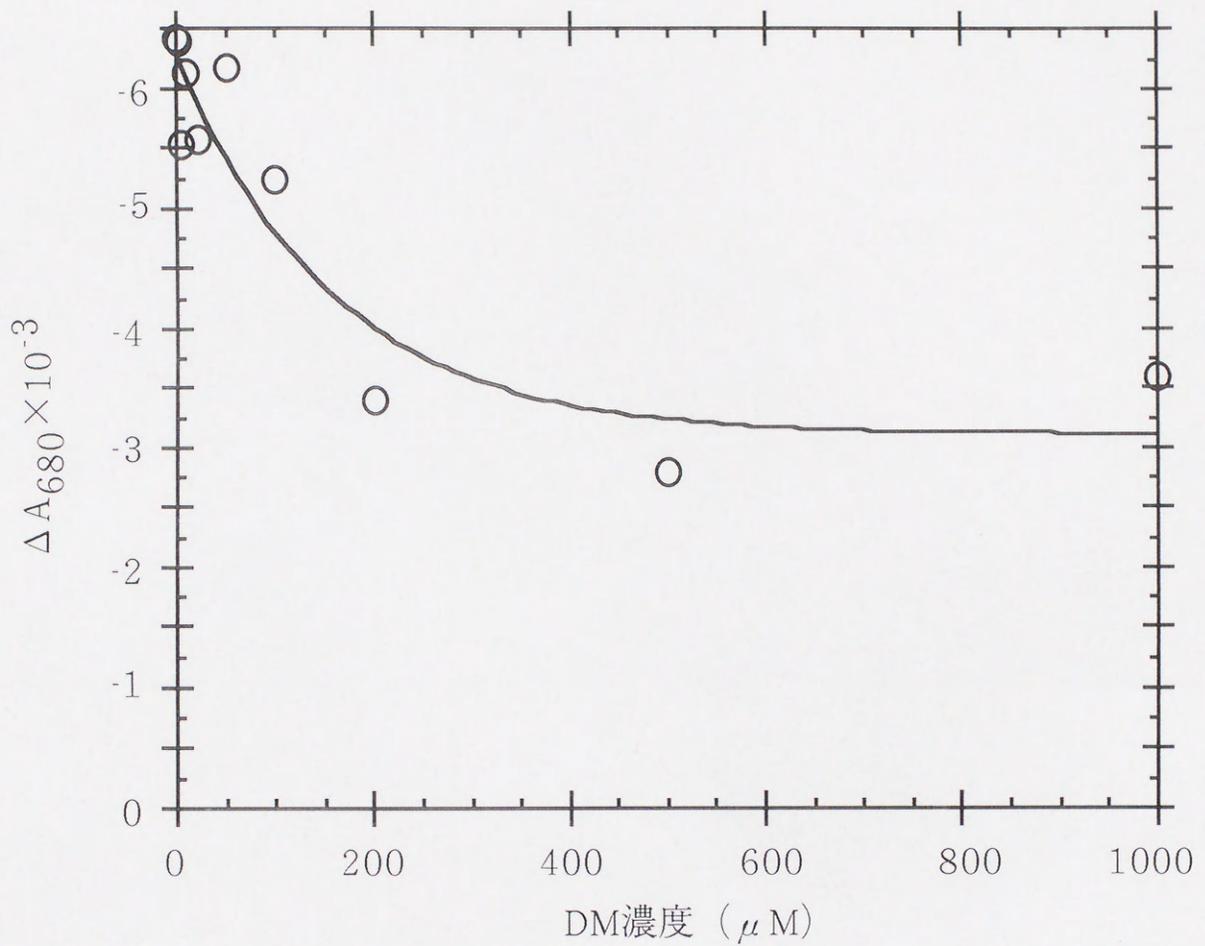


図21 P680⁺再還元過程 (680nm) で観測される100~200 μs 成分の量の可溶化剤 (DM) 濃度依存性 (TrisPS II RC)

pH 7.5, 20°Cで 0.2mM フェリシアナイド存在下、反応中心濃度 0.2 μM で測定した。

I-2-5 Q_A^- 再酸化過程とP680⁺再還元過程のpH依存性

(I-2-4)で示したように、Cyt b-559のHPはpHによる酸化還元電位と成分比の大きな変化を示さなかったにも関わらず、各TrisPSⅡRCにおける Q_A^- 再酸化過程とP680⁺再還元過程に見られる100~200 μ s成分の電荷再結合反応はpH 6.4を中心としてpH依存性を示し、pHが高いと成分量は増加した(図22, p60, 図23, p61)。これらの結果はRengerの報告した半減期100~200 μ sの“逆反応”のpH依存性と一致する(68)。

また、半減期100~200 μ s成分量のpH依存性として観測された変化量は、非ヘム鉄を持つTrisPSⅡRCが、非ヘム鉄を持たない $-Fe^{2+}$ -TrisPSⅡRCおよび Zn^{2+} -TrisPSⅡRCの約2倍であった。これは、(I-2-4)で述べた酸化還元電位依存性では見られなかった現象である(図23, p61)。

これらの事実は、環状電子移動と考えられる、 Q_A^- 再酸化過程とP680⁺再還元過程の半減期100~200 μ s成分にはCyt b-559以外に別の因子が関わることを示唆している。

一方、 Q_A^- 再酸化過程の半減期2~5ms成分量は、半減期100~200 μ s成分量と逆の変化を示した。P680⁺再還元過程の半減期700 μ s~1ms成分量は、明確なpH依存性は示さなかった(図24, p62)。

なお、pH依存性を解析するためにI-1-11(p38)で利用した式を応用して

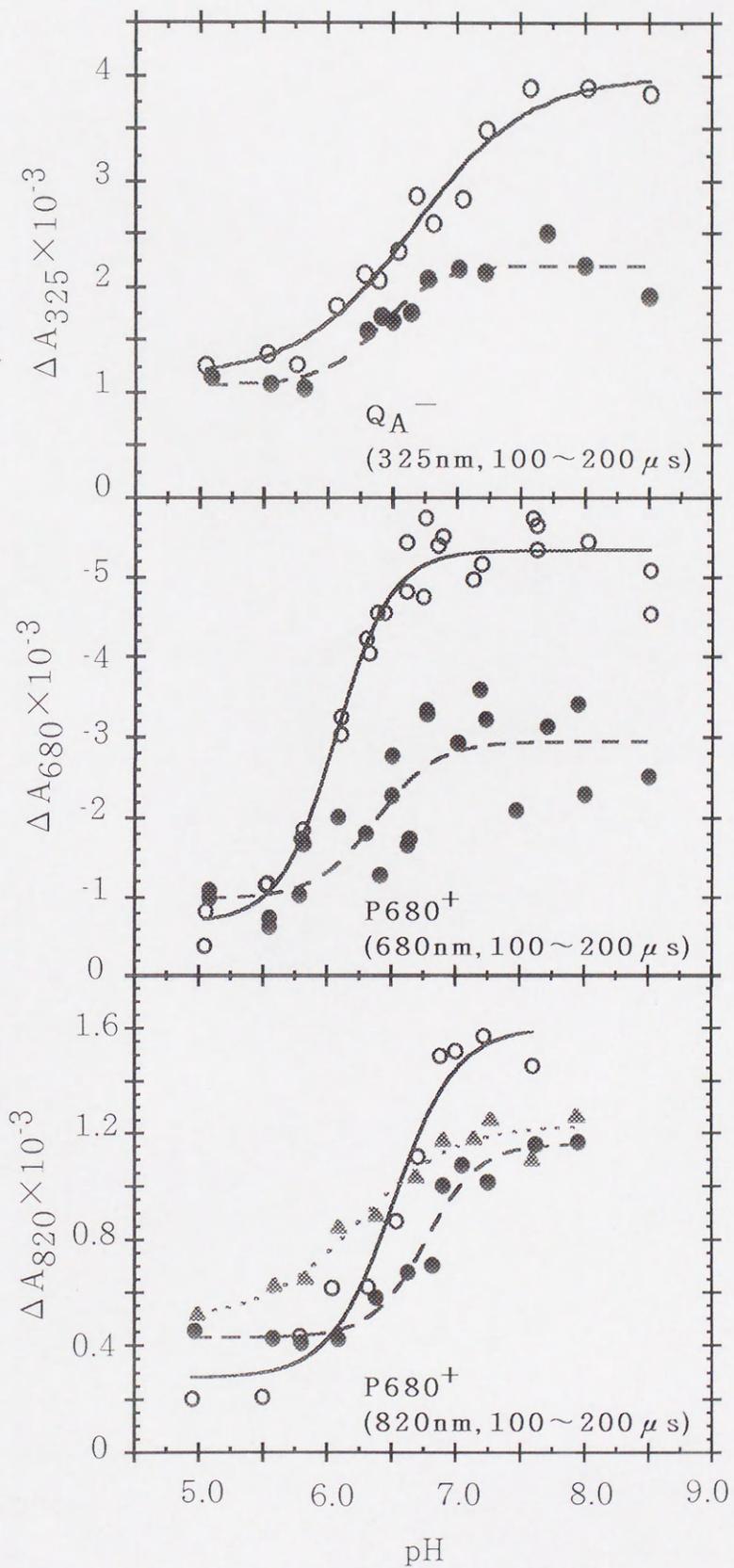
$$f = \frac{a}{\exp\{0.03958 \cdot c \cdot (pH - pH^0)\} + 1} + b \quad (pH^0 \text{ は pH 変化の中心})$$

という式を作って曲線にフィットさせた。この場合のcには、この反応に関わる H^+ 数に関する情報が含まれ、1個の H^+ が関わる酸化還元反応のEm値は、20°Cにおいて-58.1mV / pH unitで変化することが知られているので、フィッティングによって求めたcを58.1で割った値を、反応に関わった見かけの H^+ 数とした。

図22 Q_A^- 再酸化過程および
 $P680^+$ 再還元過程の100~
 200 μs 成分のpH依存性

pHを変化させ、0.2mM フェリ
 シアナイド存在下（酸化還元
 電位 498mV）、20℃で測定し
 た各波長における吸光度変化を
 指数関数の和として解析し、
 半減期 100~200 μs の成分に
 対応する吸光度変化量を表わし
 た。

- (○) TrisPSIIRC
- (●) $-Fe^{2+}$ -TrisPSIIRC
- (▲) Zn^{2+} -TrisPSIIRC



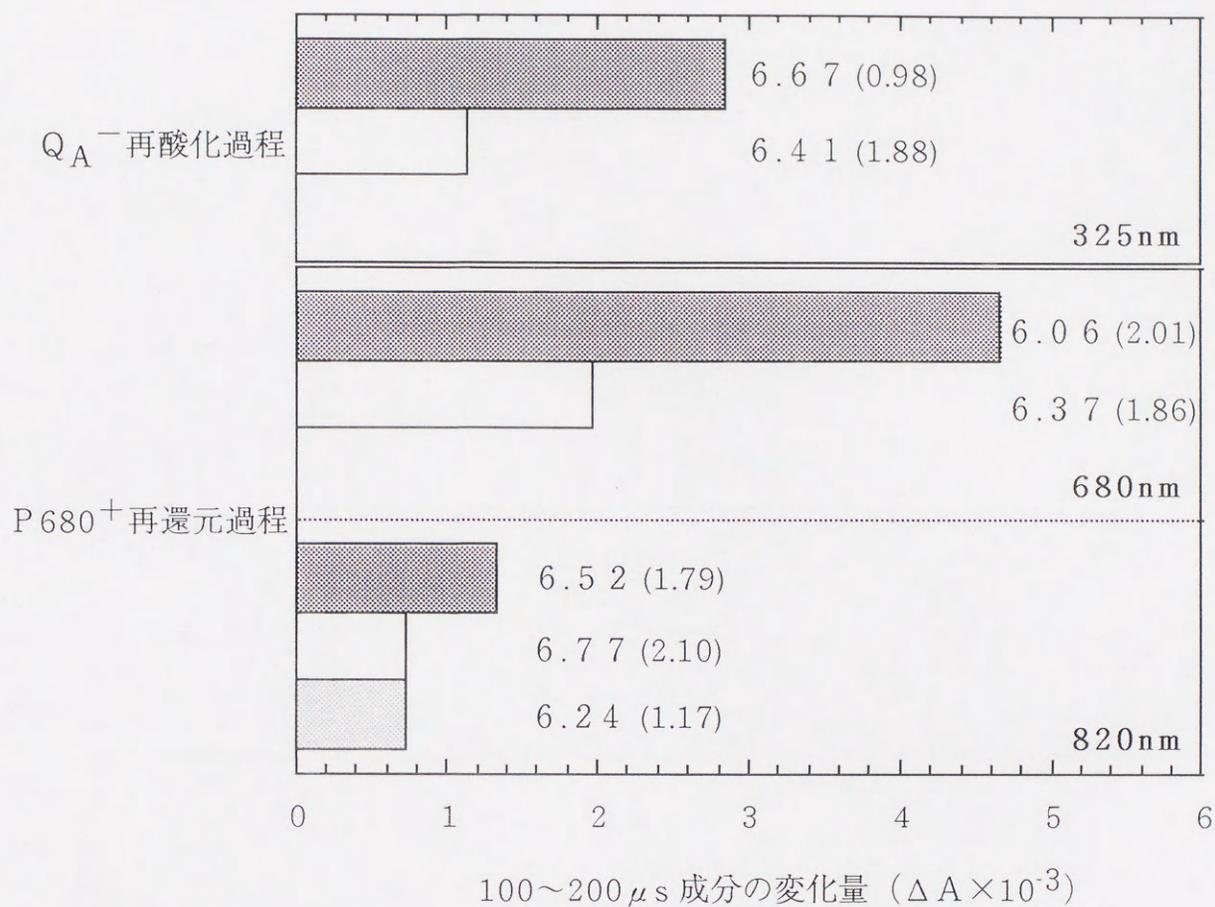


図23 pH 変化に伴う各TrisPS II RCにおける100~200 μs 成分の変化量、pH 変化の midpoint の pH および H⁺ 数

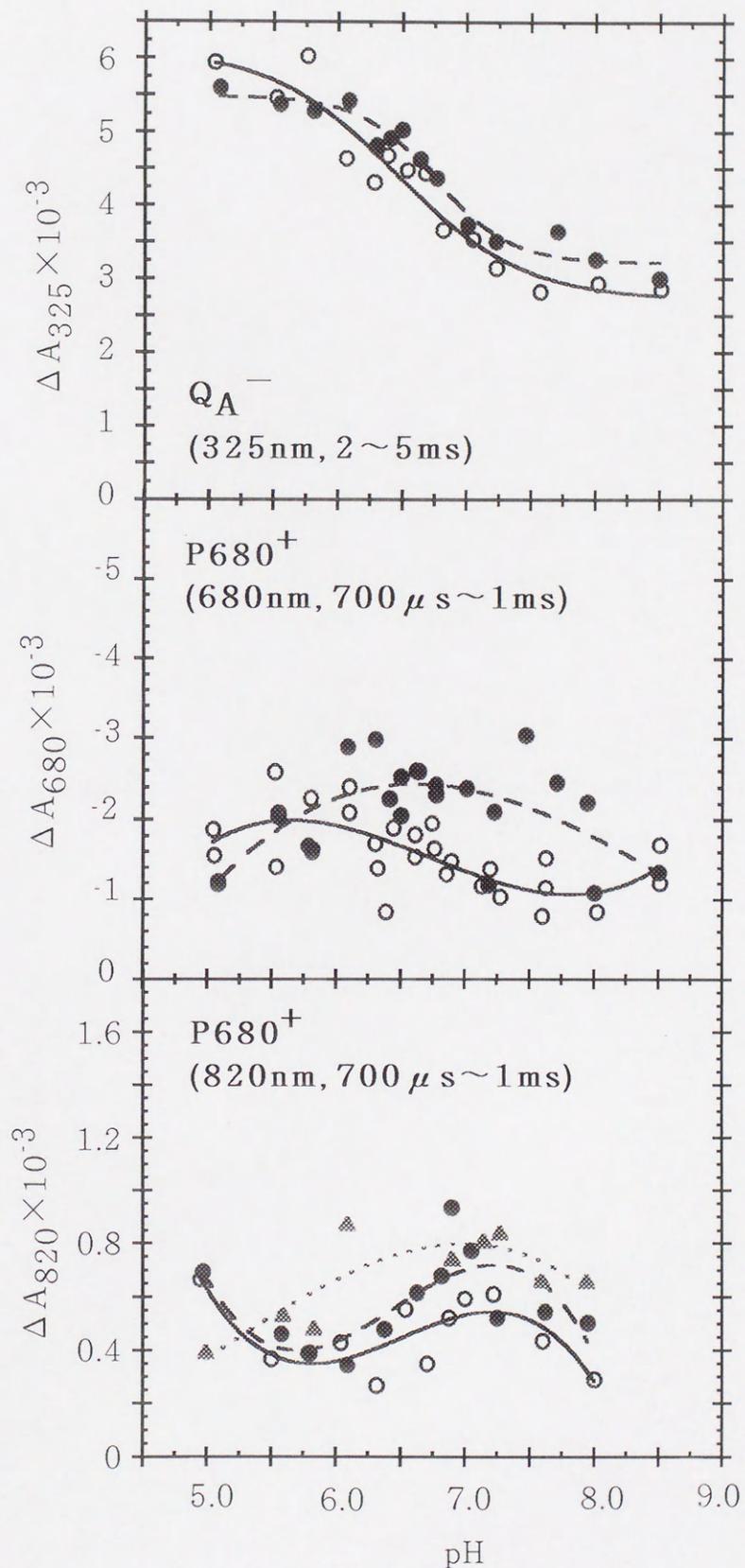
各TrisPS II RCのQA⁻再酸化過程とP680⁺再還元過程の100~200 μs成分におけるpH依存性の結果を、Nernstの式 (n=1) を応用した曲線にフィットさせた。このときのpH変化に伴う変化幅 (ΔA × 10⁻³) をグラフに示した。また、変化の midpoint の pH と、その変化に関して推定されたH⁺数を [pH (H⁺数)] の形でそれぞれ数字で表した。測定条件は、酸化還元電位 498mV, 20°C。

- (■) TrisPS II RC
- (□) -Fe²⁺-TrisPS II RC
- (□) Zn²⁺-TrisPS II RC

図24 Q_A^- 再酸化過程の2
 ~ 5 ms成分および $P680^+$
 再還元過程の $700 \mu s \sim 1$
 ms成分のpH依存性

pH を変化させ、0.2mM フェ
 リシアナイド存在下（酸化還
 元電位 498mV）， $20^\circ C$ で測
 定した各波長における吸光度
 変化を指数関数の和として解
 析し、それぞれの成分に対応
 する吸光度変化量を表わし
 た。

- (○) TrisPSIIRC
- (●) $-Fe^{2+}$ -TrisPSIIRC
- (▲) $-Zn^{2+}$ -TrisPSIIRC



I-2-6 環状電子移動と非ヘム鉄との関連性

pH 7.5、フェリシアナイド存在下、Cyt b-559 が酸化される条件では、 $-\text{Fe}^{2+}$ -TrisPS II RC または Zn^{2+} -TrisPS II RC の P 680^+ 再還元過程と Q_A^- 再酸化過程の 100~200 μs 成分の量は、TrisPS II RC の 46~74% であった (I-2-2 参照, p42)。この条件下では、TrisPS II RC のほとんどの非ヘム鉄が F e^{3+} の状態にあり (97)、 $-\text{Fe}^{2+}$ -TrisPS II RC, Zn^{2+} -TrisPS II RC には存在しない、非ヘム鉄 (F e^{3+}) の効果が現れていることが予測される。

そこで、極低温 (8.5K) で観測された $g = 8.1$, $g = 6.4$, $g = 5.5$ の F e^{3+} に関する EPR シグナルの面積 (634~1310G) から得られた酸化型非ヘム鉄の相対量の酸化還元電位依存性を図 25 (A) (p64) に示した。さらに酸化還元電位の増加に伴う非ヘム鉄の F e^{3+} の増加と、100~200 μs 成分電子移動量の増加の相関性を調べるために、非ヘム鉄 (F e^{3+}) のシグナルの強度を横軸にとり、同一の酸化還元電位の TrisPS II RC の 100~200 μs 成分の量 (820nm) を縦軸にとったものを図 25 (B) (p64) に示した。その結果、非ヘム鉄 (F e^{3+}) 量と 100~200 μs 成分電子移動量は強い一次の相関を示した。これらのことから、酸化型非ヘム鉄 (F e^{3+}) は、100~200 μs 成分量を増加させていることが示された。

I-2-7 フラッシュ依存性の測定による環状電子移動の解析

P 680^+ 再還元過程と Q_A^- 再酸化過程で同時に観測された、環状電子移動と考えられる 100~200 μs 成分は、先に述べたようにフラッシュ間隔を短くすると量が増えるという性質を持つという報告がある (68)。この報告は、前回 (一つ前) のフラッシュによって生じた電子および正電荷が次のフラッシュの照射時まで PS II 内に残り、次のフラッシュで生じた電子および正電荷の反応過程に影響を与え得ることを示唆している。そこで、フラッシュ依存性の観測結果から環状電子移動と考えられる 100~200 μs 成分のより詳細な解析を試みた。

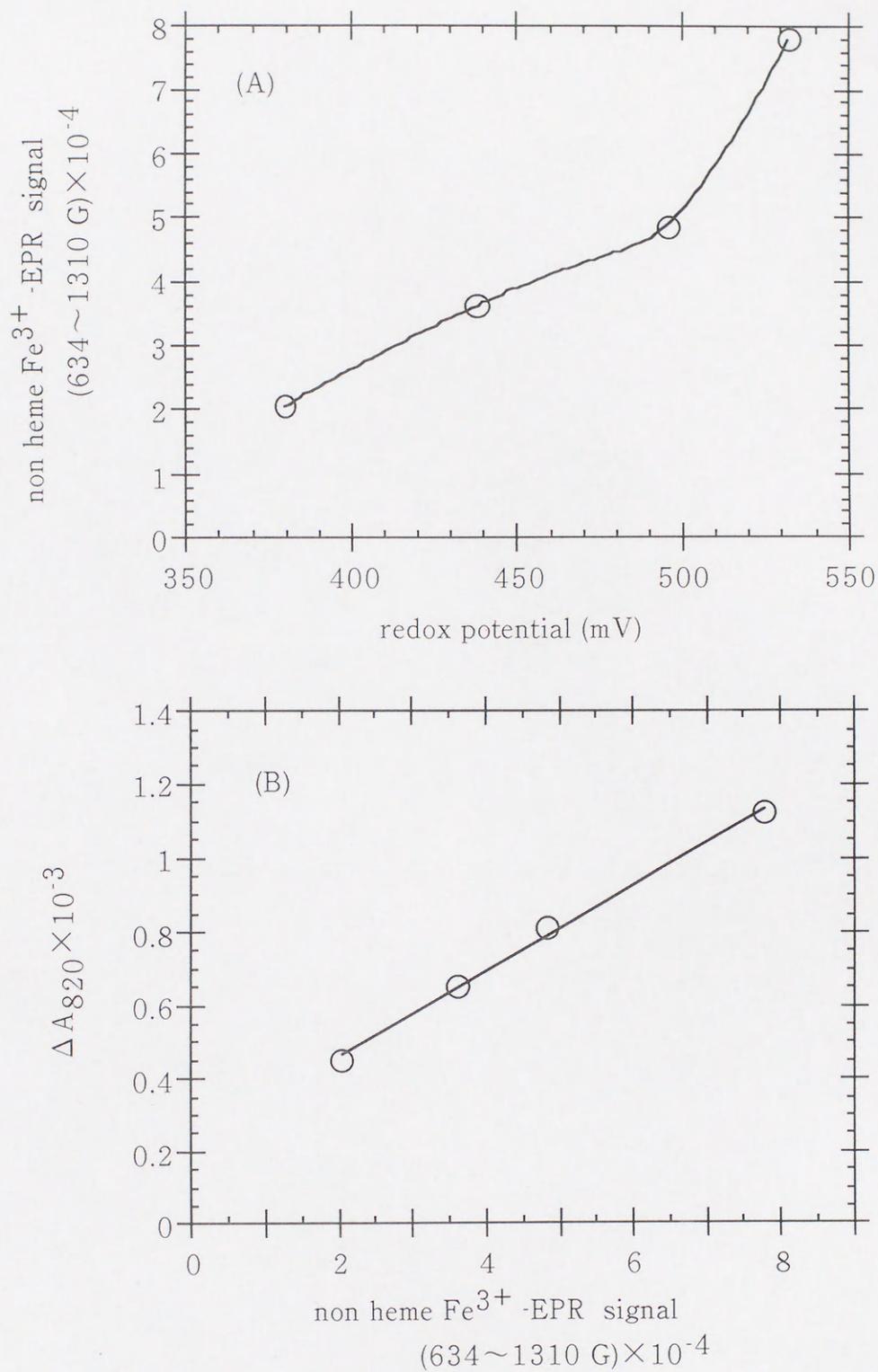


図25 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) EPRシグナル強度の酸化還元電位依存性と、
100~200 μs 成分との関係

- (A) TrisPS II RC 40 μM Cyt で観測された、非ヘム鉄 (Fe^{3+}) EPRシグナル強度の酸化還元電位依存性
- (B) 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) EPRシグナル強度 (A) と TrisPS II RC 1.6 μM Cyt で観測された、100~200 μs 成分 (820nm) との相関性

I-2-7-1 Q_A^- 再酸化過程のフラッシュ依存性

モニター光である 325nm の光の影響を減光フィルター（日本真空光学, 10%ND フィルター）で弱めて測定した、 Q_A^- 再酸化過程におけるフラッシュ依存性（第 1 ~3 フラッシュ）を図 26（p66）に示した。

フェリシアナイド存在下 TrisPS II RC の第 1 フラッシュによる Q_A^- 再酸化過程は、フェリシアナイドを添加せず非ヘム鉄を酸化していない TrisPS II RC や、非ヘム鉄を持たない $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC の結果と比較して、 Q_A^- の生成にともなう吸光度変化は少なく観測され（I-1-10-1 参照, p35）、 $Q_A^- \rightarrow$ 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 過程（半減期 5~25 μs (24, 26, 73, 89, 90)）のすそ野と考えられる部分が観測された。この成分の大きさは、フェリシアナイドを添加せず測定した TrisPS II RC の Q_A 活性の約 50% であった。

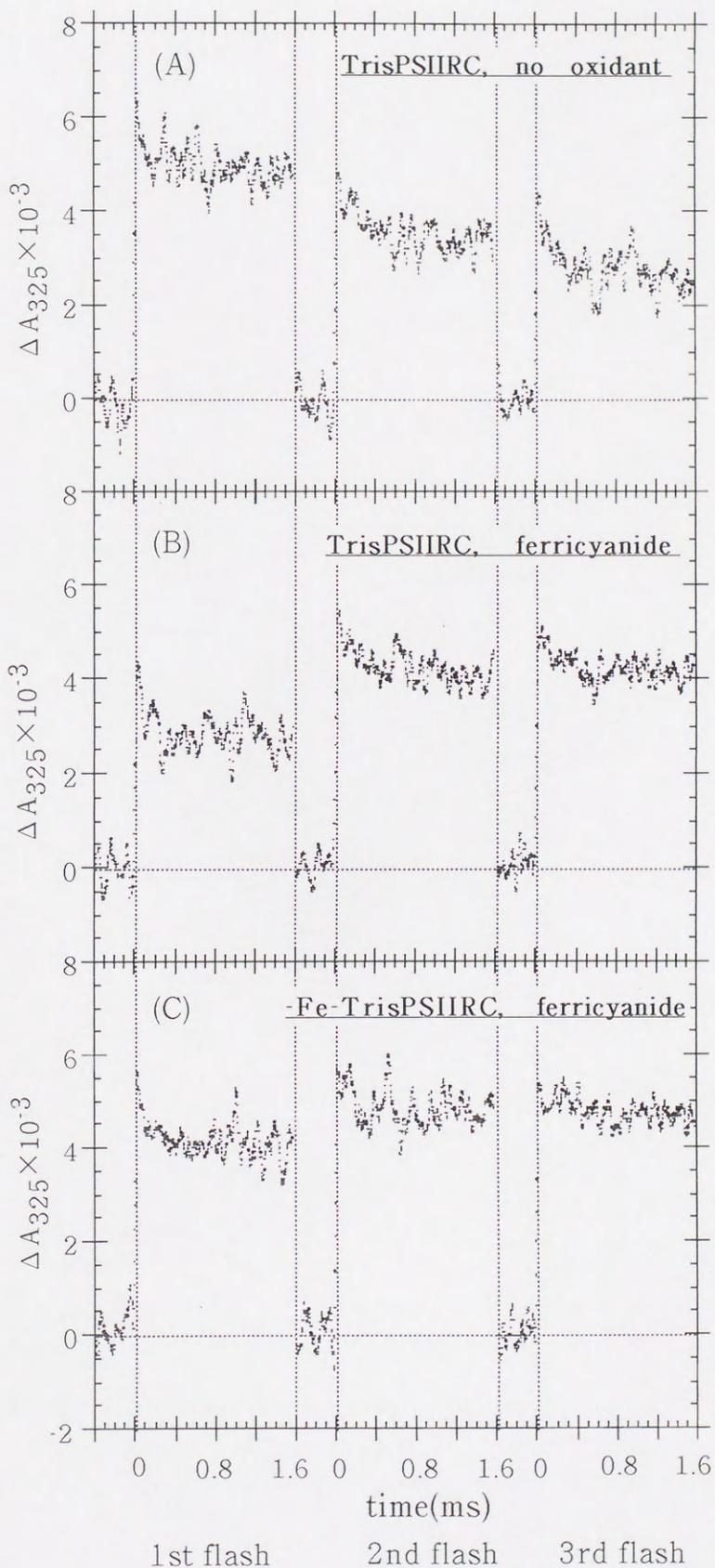
また、 $Q_A^- \rightarrow$ 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 過程と考えられる成分は以降のフラッシュでは出現しないことから、反応中心が励起されて生じた電子を一度受け取った非ヘム鉄は、2.5 秒間のフラッシュ間隔の間、ほとんど 2 価の状態で保持されることが示された。この状態になった以降で初めて、 $Q_A^- \rightarrow$ 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 過程（半減期 5~25 μs ）より遅い、半減期 100~200 μs の電子移動が観測可能になると考えられる。

この $Q_A^- \rightarrow$ 非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 過程は、モニター光 325nm の光強度を減光フィルターで弱めたとき初めて観測された。

なお、フェリシアナイドを添加せず非ヘム鉄を酸化していない TrisPS II RC で、フラッシュと共に Q_A 活性が減少していくのは、逐次フラッシュを当てる間に還元側に電子が蓄積して電子の流れが滞るためであると考えられる。

図26 各条件下における Q_A^- 再酸化過程のフラッシュ依存性

上から、(A): TrisPS II RCにおける酸化剤非存在下の結果、(B): 0.2mM フェリシアナイド存在下の結果、(C): Fe^{2+} -TrisPS II RCにおける 0.2mM フェリシアナイド存在下における結果である。測定は、10%NDフィルターを用いてモニター光を弱めて行い、第1～第3フラッシュまでの結果を示した。特に第1フラッシュの挙動に注目すべきである。なお、TrisPS II RCの酸化剤非存在下のものでは、電子受容体が少ないことによる Q_A^- 活性の減少過程と考えられる過程も観測された。



I-2-7-2 P 680⁺再還元過程のフラッシュ依存性

フェリシアナイド存在下、TrisPS II RC における P 680⁺再還元過程のフラッシュ依存性 (第 1~3 フラッシュ) を図 27 (p68) に示した。

680nm 測定では第 1 フラッシュの結果は、それ以降のフラッシュの結果と目立った違いはなかった。しかし、820nm 測定では、第 1 フラッシュ照射時には Z → P 680⁺電子移動過程と報告されている数 μ s の成分のみが見られ、その後のフラッシュ照射と共に 100~200 μ s 成分が生じ、増加していった。この現象は Conjeaud らによって報告されたものと一致する (69)。Z → P 680⁺電子移動過程と考えられる成分は以降のフラッシュでは出現しないことから、第 1 フラッシュによって生じた P 680⁺に電子を与えた Z は次のフラッシュまでの 2.5 秒間に還元されることなく第 2 フラッシュ以降 Z⁺として残ると考えられる。この状態になることによって初めて、Z → P 680⁺過程 (半減期 3~16 μ s) より遅い、半減期 100~200 μ s 成分電子移動が出現することが明らかになった。このとき 680nm での測定に同様の変化が表れなかったのはモニター光によってすでに反応中心 P 680 が一部励起された可能性が考えられる。

これらの結果から、Q_A⁻再酸化過程も P 680⁺再還元過程も前回のフラッシュによって生じた電子と正電荷が残留し、それらの影響によって系を乱されていることが示された。このとき、Q_A⁻再酸化過程の場合、生じた電子は 2 価の非ヘム鉄上の電子として捕らえられ、P 680⁺再還元過程では、正電荷は Z⁺上に捕らえられ、次のフラッシュまでの 2.5 秒間に再結合せず蓄積されていることが示唆された。これによって、半減期 100~200 μ s よりはるかに速い、Q_A⁻ → 非ヘム鉄 (Fe³⁺) と Z → P 680⁺過程が同時に失われ、半減期 100~200 μ s 成分電子移動が、はじめて観測可能となると考えられる。

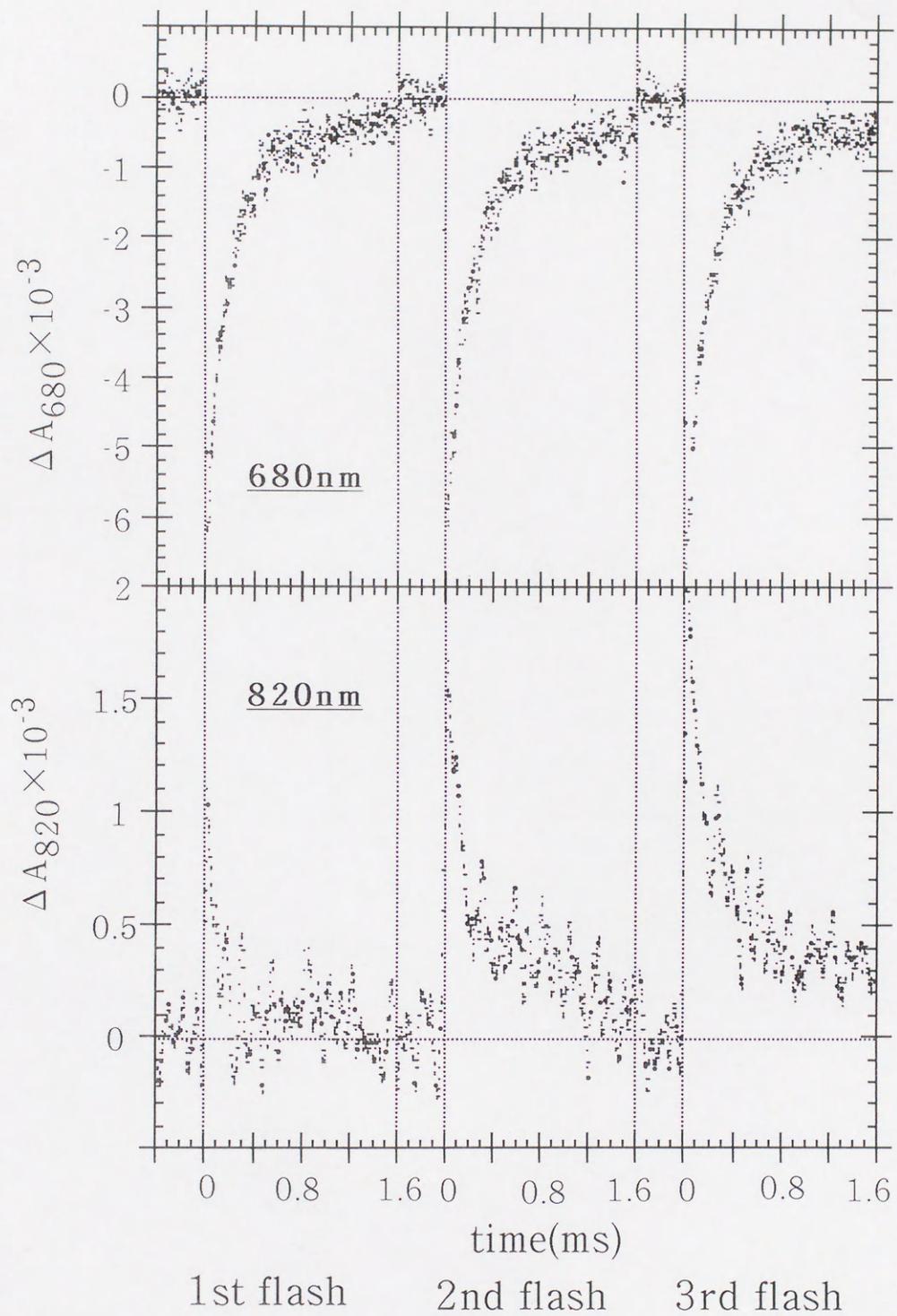


図27 フェリシアナイド存在下における $P680^+$ 再還元過程のフラッシュ依存性

どちらも TrisPS II RC を用いて測定を行った。820nm の第1フラッシュにのみ Z から $P680^+$ への数 μs の半減期の成分が見られる。

I-3. 考察

本研究で用いた水分解系とキノンプールを除去した測定系 (TrisPS II RC) と類似した、即ち、LHC IIを含むTris処理されたPS IIでは、レーザーフラッシュフォトリシス法による325nmでの測定で Q_A^- 再酸化過程を観測した場合、 Q_A^- 上の電子が移動して生成した Q_B^- が、半減期2~5msで酸化されるという報告がある(98)。第2のフラッシュまでの2.5秒間に Q_B^- は Q_B の状態に戻り、そのため、全フラッシュで同じ $Q_A^- \rightarrow Q_B^-$ 、および $Q_B^- \rightarrow$ フェリシアナイド過程が観測されることが予想される。ただし、 Q_A^- 、 Q_B^- の機能分子はともに PQ_A であるため吸光度差がほとんどなく、325nm測定の場合、直線状電子移動である $Q_A^- \rightarrow Q_B^-$ 過程(半減期100~200 μ s (72-74))は高々10%ほどの吸光度変化としてしか観測されず(付録6参照, p135)、 $Q_B^- \rightarrow$ フェリシアナイド過程が半減期2~5msで観測されるのみであると予想される。しかしながら、325nm測定におけるTrisPS II RCでは2成分解析により、半減期100~200 μ sの成分が62%、2~5msの成分が38%と観測されたことから、予想よりかなり大きく観測される半減期100~200 μ sの成分の大半は、 $Q_A^- \rightarrow Q_B^-$ 過程であるはずはなく、 Q_A^- または Q_B^- から電子を放出している過程であることは明らかである。

半減期100~200 μ sの成分は、各TrisPS II RCを用いたレーザーフラッシュフォトリシス法による測定において、 Q_A^- 再酸化過程と $P680^+$ 再還元過程の双方に観測された。この成分は従来、多くの研究者により直接的な $Q_A^- \rightarrow P680^+$ 電子移動過程、すなわち“逆反応”であると報告されてきた成分と同一のものであると考えられる(67-71)。

Mn^{2+} はZを介して18~35 μ sで $P680^+$ を還元するため(76)、この速度より遅い電荷再結合反応を抑えて、 $Mn^{2+} \rightarrow PS II \rightarrow$ フェリシアナイドの順に電子が移動する直線状電子移動を促進することが出来ると考えられる。半減期100~200 μ sの成分は人工的電子供与体 Mn^{2+} と人工的電子受容体フェリシアナイドを加えて測定すると消失した。これによって、この100~200 μ s成分は Q_A^- (または Q_B^-)から $P680^+$ への電荷再結合過程であることを確認した。

ところが、 $Q_A^- \rightarrow Q_B^-$ 電子移動阻害剤DCMUを添加して、直線状電子移動を阻害した場合、“逆反応”が増加することが予想されたにも関わらず、半減期100

~200 μ s 成分は逆に抑制された。DCMUが抑制する部位は主に非ヘム鉄, Q_B 間の電子移動であるとの報告がある(26)。実は、Renger と Wolff も著者と同様のDCMUの効果を報告している(66)。彼らは、DCMUは Q_A から電子を放出する過程を阻害する可能性があると考えていたが、DCMUの結合部位に関する現在の知見に従えば否定される。また、DCMUは高濃度では酸化側にも結合して阻害するようになり(99)、電荷再結合過程に影響を与える可能性があるが、本研究では、反応中心濃度の1.25倍のDCMUを添加しているため、反応中心に対してDCMUがほぼ1分子結合していることは明らかである。この場合、還元側のみ阻害されていると考えられる。

これらのことを考慮に入れて、100~200 μ s の成分の消滅過程は“逆反応”ではなく、非ヘム鉄, Q_B 周辺を経由する、環状電子移動であると考えられる。

環状電子移動量には酸化還元電位依存性があり、電位が上がると移動量は増加し、電位が下がると減少した。それらの E_m は平均して 450mV であった。電子の流れについて考えると、この酸化還元電位変化を説明できるものは Cyt b-559 のHPだけである。本研究で用いた試料では Cyt b-559 のHPは $E_m \approx 440$ mV であった。Cyt b-559 の酸化還元電位は図 20 (p56) に示したように目立ったpH 依存性を示さなかった。ところが、 Q_A^- 再酸化過程とP680⁺再還元過程の双方に観測される 100~200 μ s 成分は、pH 依存性があり、pH が上がると電子移動量は増加し pH が下がると減少した。この変化の中間点は pH 6.5 であった。 Q_A , Q_B の酸化還元電位は、それぞれ -130mV(33), 約 0mV であり(74)、pH を下げること、Cyt b-559 のHPの電位が 440mV から -130~0mV の近くまで、大きく低下するか Cyt b-559 のHPの成分比が pH で大きく変化しない限り環状電子移動量の変化を説明できない。しかし、本研究でCyt b-559 のHPの酸化還元電位は 427~454mV の範囲にあり、目立った変化はなかった。また、Cyt b-559 のHPの成分比に関しても目立った変化はなかった。

例として、TrisPS II RC の 325nm 測定で観測した Q_A^- 再酸化過程における 100~200 μ s 成分環状電子移動量と Cyt b-559 のHPの成分比を比較する。 Q_A 活性に対する電子移動量の割合は pH 7.5 のとき 57.9%、pH 6.0 のとき 22.3% であった。 Q_A^- 再酸化過程の成分量を扱う場合に注意しなければならない問題がある。付録 6 (p135) に示すように、 Q_A^- 再酸化過程の 100~200 μ s 成分電子移動量の中には、

$Q_A^- \rightarrow Q_B$ 電子移動由来の $100 \sim 200 \mu s$ 成分が重なり、この成分量と $Q_B^- \rightarrow$ フェリシアナイド電子移動過程と考えられる $2 \sim 5 ms$ 成分量の比は (98)、 $0.11:0.89$ である (100)。 Q_A^- 再酸化過程の $100 \sim 200 \mu s$ 成分が、それぞれ 57.9% (pH 7.5), 22.3% (pH 6.0) 存在するとき、 $2 \sim 5 ms$ 成分は、それぞれ 42.1% (pH 7.5), 77.7% (pH 6.0) 存在するため、 $0.11:0.89$ の比から、 $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 電子移動由来の $100 \sim 200 \mu s$ 成分は、それぞれ 5.2% (pH 7.5), 9.6% (pH 6.0) と予測される。従って、正味の $100 \sim 200 \mu s$ 成分環状電子移動量の Q_A 活性に対する割合は、それぞれ 52.7% (pH 7.5), 12.7% (pH 6.0) と予測される。TrisPS II RC の Cyt b-559 の HP の全 Cyt b-559 量に対する割合は、それぞれ 53.3% (pH 7.5), 62.2% (pH 6.0) であり、pH 7.5 の場合は Cyt b-559 の HP によって $100 \sim 200 \mu s$ 成分環状電子移動量を説明することは出来るが、pH 6.0 の場合は説明できない。なお、 $P680^+$ 電子伝達過程における pH 7.5 での $100 \sim 200 \mu s$ 成分の割合は、 88.7% (pH 7.5), 77.2% (pH 6.0) であるが、 $Z \rightarrow P680^+$ 電子伝達過程の電子移動量を正確に見積もることが出来ないため (I-1-10-2 参照, p37)、 Q_A^- 再酸化過程のように Cyt b-559 と正確な対応関係を示すのは困難である。

このように、Cyt b-559 自体では説明が付かない以上、他の因子の影響を考慮に入れなければならない。この因子として次に示す理由から、非ヘム鉄を挙げることが出来る。

- (1) この pH 変化を示す因子の影響は、非ヘム鉄を持つ TrisPS II RC の方が、非ヘム鉄を持たない $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC, Zn^{2+} -TrisPS II RC の約 2 倍ほど大きい。
- (2) 非ヘム鉄を除去または置換された $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC, Zn^{2+} -TrisPS II RC は、非ヘム鉄を持つ TrisPS II RC の $46 \sim 74\%$ まで $100 \sim 200 \mu s$ 成分の電子移動量が減少する。
- (3) 非ヘム鉄は、4 つのヒスチジンが配位し、1 つの HCO_3^- が 2 座配位するといわれるが、この環状電子移動に関与していると予想される H^+ について考えると、pH 6.4 の領域に関連する pKa を持つのはアミノ酸ではヒスチジン (pKa=6.0) であり、また Q_A , Q_B 間の電子移動に必須といわれる HCO_3^- (pKa=6.51, $CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$) である。なお、Knaff によって 77 K で

行われた Cyt b-559 の光酸化を基にした間接的な Q_A の pKa の測定では、8.9 であったと報告されている (33)。そのため Q_A または Q_B 上のプロトンがこの電子移動に関与しているとは考えにくい。また、P680 の Chl a の Mg^{2+} に配位結合しているヒスチジンが H^+ 化されるという報告はない。

- (4) 非ヘム鉄は、 $E_m = 400\text{mV}$ (pH 7.0) であり、 $-60\text{mV} / \text{pH unit}$ で電位が pH 変化する。
- (5) EPR 測定によって非ヘム鉄 (Fe^{3+}) 量と 820nm での $100\sim 200\mu\text{s}$ 成分の電子移動量は一次の相関関係を持つことが示された。

これらの事実を考慮に入れて、仮に非ヘム鉄から Cyt b-559 へ電子が移動すると考えると、pH 6.5 のとき非ヘム鉄は $E_m \doteq 430\text{mV}$ となって、ほぼ Cyt b-559 HP の酸化還元電位 ($E_m \doteq 440\text{mV}$) に等しくなる。このとき、pH 6.5 以下では Cyt b-559 より非ヘム鉄の電位の方が高くなることで電子の流れは抑えられ、pH 6.5 以上では Cyt b-559 より非ヘム鉄の電位の方が低くなることで電子の流れが生じると考えられる。これにより $100\sim 200\mu\text{s}$ 成分量の pH 変化に対する挙動をほぼ矛盾無く説明できる。

非ヘム鉄を持たない $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC と Zn^{2+} -TrisPS II RC も $100\sim 200\mu\text{s}$ 電子移動量の酸化還元電位依存性から、Cyt b-559 へ電子を渡していると考えられる。しかも、非ヘム鉄を持たない $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC と Zn^{2+} -TrisPS II RC も $100\sim 200\mu\text{s}$ 成分の電子移動があり、TrisPS II RC の $40\sim 55\%$ の pH 変化を示したことから、 Q_A 、 Q_B 間に存在するヒスチジン (または HCO_3^-) によって、 Q_A^- (または Q_B^-) から Cyt b-559 への電子移動は大きな影響を受けている可能性がある。

さらに、電子移動に関わる見かけの H^+ 数について議論すると、TrisPS II RC は、 Q_A^- 再酸化過程では約 1 個であったが、 $P680^+$ 再還元過程では約 2 個の H^+ が関わっていた。非ヘム鉄の酸化還元電位は、 H^+ 1 個分の pH 依存性 ($-60\text{mV} / \text{pH unit}$) を示すことから、1 個のみが電子移動に関わることが予想される。しかし、2 個電子移動に関わっているとすれば、酸化側にある別の因子、例えば Z^+ によって酸化されるヒスチジン (101) などが関わった複雑な機構が存在する可能性もある。また、 $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC は Q_A^- 再酸化過程、 $P680^+$ 再還元過程でともに約 2 個、

Zn²⁺-TrisPS II RC は P 680⁺再還元過程で約 1 個の H⁺が電子移動に関わっており、議論の余地を多く残している (図 2 3 参照, p61)。

環状電子移動過程で Cyt b-559 及び非ヘム鉄 (F e³⁺) が電子を中継していると考えると一つの矛盾が生じる。フェリシアナイド存在下の測定の場合、Cyt b-559 と非ヘム鉄はフェリシアナイドによって前もって酸化されている。そのため、フラッシュ照射によって P 680 が励起され、Q_A⁻が生じた直後の P 680⁺は Cyt b-559 から電子を受け取ることが出来ない。従って P 680⁺は Q_A⁻ (または Q_B⁻) にまで移動した 1 個の電子が 100~200 μs 程度で Cyt b-559 まで移動するのを待たなければならない。しかし、全フラッシュの平均 (40 フラッシュの積算) を観測している測定では、あたかも P 680⁺は電子をフラッシュ照射直後から 100~200 μs 程度で受け取っているように観測された。そこで、フラッシュごとの電子移動過程、特に第 1 フラッシュによる電子移動過程に注目して測定し、環状電子移動のより詳細な解析を行った。その結果、第 1 フラッシュで生じた電子 (2 価の非ヘム鉄) と正電荷 (Z⁺) が 2.5 秒間に再結合せずに蓄積されていることによって環状電子移動が起こることが明らかとなった。

Q_A⁻ (または Q_B⁻) から P 680⁺への電子移動において、Q_A⁻と Q_B⁻のどちらが起点になっているのかに関しては、Q_A⁻と Q_B⁻を明確に区別出来ないために情報を得ることは困難である (Q_Aと Q_Bの本体はいずれも P Q_Aである)。しかし、Q_A⁻→Q_B電子移動の阻害剤、DCMUによって 100~200 μs 成分環状電子移動量は消去されたこと、DCMUは Q_A, Q_B間の電子移動のうち、Q_A⁻→非ヘム鉄 (F e³⁺) 電子移動までは阻害しないこと、DCMUによって Cyt b-559 の光還元は抑えられるという報告 (102)、および非ヘム鉄を酸化すると DCMU の結合能が下がり、pH が高いときに DCMU を結合させると非ヘム鉄の酸化還元電位は大きく上昇するなど、非ヘム鉄の状態と DCMU の結合は相互に関係があるという報告があるため (91)、100~200 μs の成分は、非ヘム鉄、および Q_B を経由または起点としている可能性が高い。

一方、Cyt b-559 の光酸化には β-Car が必要であるという報告があり (44)、さらに β-Car は P 680⁺によって光酸化されることが報告されている (17)。また、第 II 章で詳しく論述するが、100~200 μs 成分環状電子移動量は β-Car と一次の相関性があり、この環状電子移動に β-Car が、深く関与しているとも考えられる。

ところで、P680⁺再還元過程で観測された 700 μs~1ms 電荷再結合成分は、図 14 (p49) に示したように DCMU による阻害も受けず、酸化還元電位依存性も pH 依存性もほとんど見られないことから、非ヘム鉄と Cyt b-559 の高電位型を通らず、P680⁺へ電子を戻す過程であると考えられ、Q_A⁻から直接電子を P680⁺へ戻す、真の逆反応である可能性がある。しかし、Q_A⁻再酸化過程で観測された 2~5ms 成分に重なっていたとしてもそれらの成分の分離は困難であり確証はない。

また、Q_A⁻再酸化過程で観測された 2~5ms 成分の大部分は Mn²⁺で消去されないことから電荷再結合反応ではなく、DCMU 存在下でも観察されることから Q_B⁻→フェリシアナイド過程であることに疑問が生じた。さらに 2~5ms 成分は、Q_A⁻再酸化過程の 100~200 μs の成分と逆の酸化還元電位依存性と pH 依存性を持っており、非ヘム鉄や Cyt b-559 の経路が使用できないときの電子移動であると考えられ、Q_A⁻→フェリシアナイド電子移動過程の可能性もある。

以上の事実から 100~200 μs 成分環状電子移動の経路について考察し、図 28 (p75) に環状電子移動の新しいモデルを示す。

- (A) フラッシュ照射前はフェリシアナイドによって非ヘム鉄が 3 価になっているため、第 1 フラッシュ直後は P680 から pheo a を経て電子を受け取った、Q_A⁻から非ヘム鉄 (Fe³⁺) へ電子が移動する過程が観測される。このときフェリシアナイドを加えていない場合は、この過程が観測されない (図 26, p66)。一方、酸化側では光励起によって生じた P680⁺がチロシン残基である Z から電子を奪って再還元される過程が観測される。
- (B) 次のフラッシュまでの 2.5 秒間、非ヘム鉄 (Fe²⁺) と Z⁺の状態では電荷分離がほぼ維持される。このモデルは、逆反応と呼ばれてきた 100~200 μs 環状電子移動はフラッシュ間隔をせばめると量が増加するという性質 (68) を説明できる。つまり、フラッシュ間隔をせばめることで、電荷の再結合 (Fe²⁺→Z⁺) が起こる割合が減少すると考えられる。
- (C) 第 2 フラッシュ照射によって再び P680⁺と Q_A⁻が生じる。
- (D) 酸化側で生じた 2 個の正電荷に向かって β-Car から電子が移動する。この半減期は 100 μs 程度でなければ、実験結果を説明できない。β-Car から P680⁺また Z⁺への電子移動経路に関しては、この後の研究課題である。また、この瞬間には Q_A⁻から Q_B (100~200 μs), Q_A⁻→P680⁺への電子移動

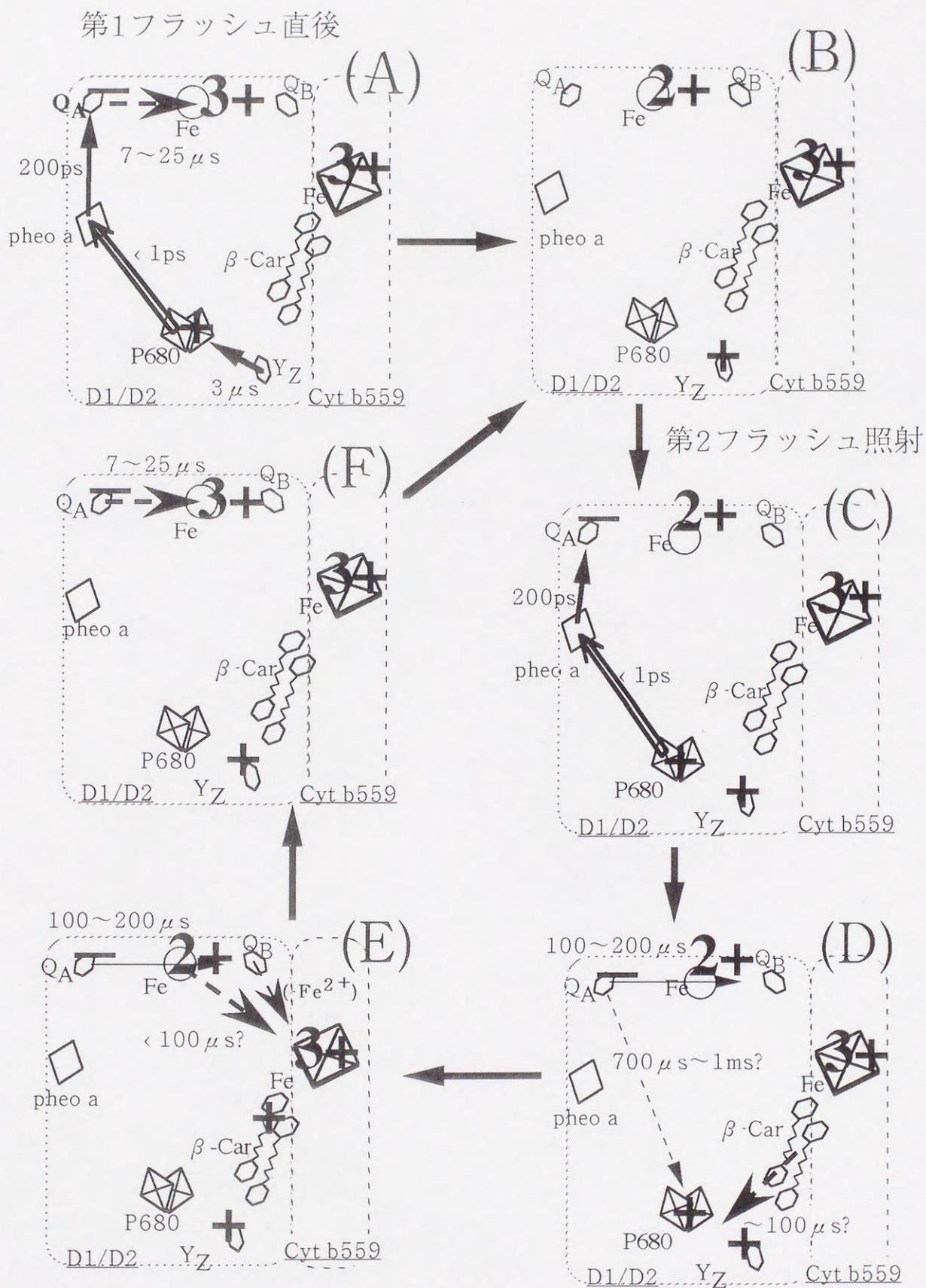


図28 環状電子移動経路のモデル

(700 μ s ~ 1ms?) も可能である。

- (E) しかし、100 μ s よりかなり速く、Cyt b-559 のHP (Fe^{3+}) と $\beta\text{-Car}^+$ に向かって電子が移動する。このモデルは Cyt b-559 のHPが酸化型であるとき 100~200 μ s 成分環状電子移動が生じることを説明する。また、この電子の起点は非ヘム鉄 (Fe^{2+}) であると考えられる。だが、既に Q_A^- から Q_B が電子を受け取った場合や非ヘム鉄を持たない試料では、 Q_B^- から電子が移動する可能性がある。
- (F) 半減期 100~200 μ s で非ヘム鉄 (Fe^{2+}) が減少するところへ、生じた非ヘム鉄 (Fe^{3+}) へ Q_A^- から電子が素早く移動する。これによって、あたかも $\text{Q}_A^- \rightarrow \text{P680}^+$ 電子移動が 100~200 μ s で生じているように見られる可能性がある。この後、状態 (B) に移り、第3フラッシュ以降も同じ過程を通ると考えられる。

第Ⅱ章 P S II 光阻害反応初期過程の解析

緒言

過去の研究報告に基づき、光阻害を受けてからD 1蛋白質を交換してP S II機能を回復するまでの過程をまとめた Barber と Andersson のモデル(54)を図29(p78)に示す。

P S IIが強光照射を受けた場合、その電子伝達に異常をきたす部分は酸化側、つまりP 680周辺と、還元側、つまり Q_A 、 Q_B 周辺の2ヶ所ある。このどちらが阻害されるかによってD 1蛋白質の分解の様式が異なることが報告されている(55)。

酸化側が阻害された場合、水分子からの電子の供給が停止する。そのため約1.1Vの酸化還元電位を持つ $P 680^+$ (18-20)が長寿命となる。その強い正電荷によって、P 680の近傍に存在すると考えられている第1電子供与体Z、Chl a、 β -Carが二次的な酸化を受けて損傷する。この損傷は酸素の存在の有無に関わらず起こる。その結果、D 1蛋白質の分解が開始すると考えられる。

一方、還元側が阻害された場合、プラストキノンプールへの電子の放出が停止する。酸素が存在しない場合、この時点での Q_A 機能の不活性化はある程度可逆的であると報告されている(103, 104)。しかし、酸化側からさらに過剰に供給される電子によって Q_A は2電子還元と H^+ 化を受けて放出されるらしい(104)。なお、正常系では Q_A は1電子還元しか受けない(19)。 Q_A を失うことによってP 680は電子のやり場を失い三重項状態となる。酸素が存在する場合、酸素分子が三重項状態になったP 680と反応して、活性酸素である一重項酸素が発生しD 1蛋白質を傷つける。こうして Q_A 離脱が引き金となってD 1蛋白質分解が開始すると考察されている(61, 104)。

このように、P S IIの光阻害では強光照射によってP S IIの電子伝達がどの段階で阻止されるかということと、酸素分子の存在が重要な因子となると考えられる。なお、どちらの阻害においても分解されたD 1蛋白質は最終的に新しいD 1蛋白質と交換されると考えられている。

近年、光阻害の機構に関する研究、特にD 1蛋白質の分解過程に関する研究が注目を集めた。その中でD 1蛋白質を分解する蛋白質分解酵素に関する論争が行われ

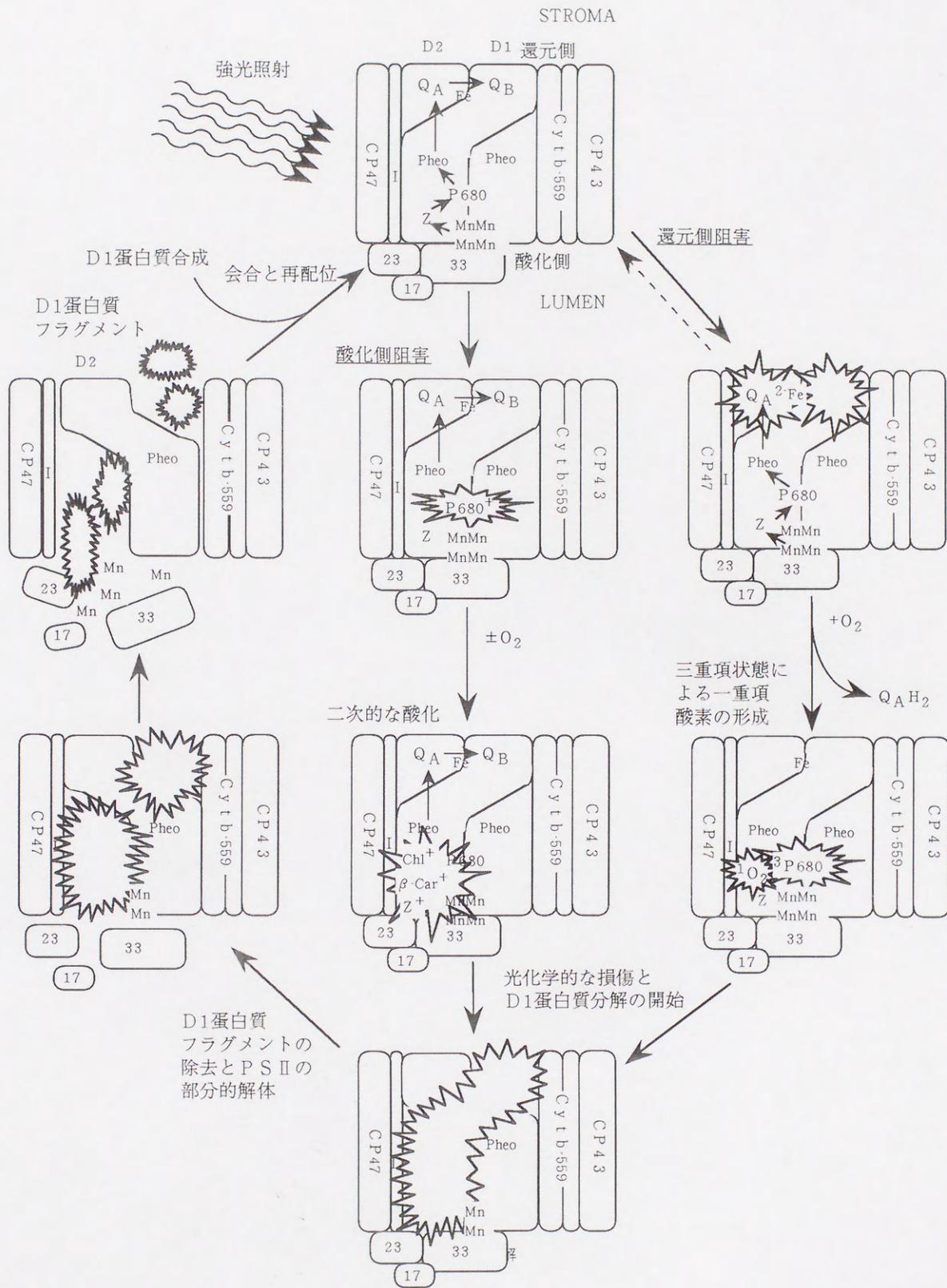


図29 光阻害によるD1蛋白質損傷と交換のモデル
 (Barber, J. and Andersson, B. (1992) Trends
 Biochem. Sci. 17, 61-66 をもとにして書いたもの)

てきた。まず、その蛋白質分解酵素はP S II 反応中心複合体中に含まれると報告された(105)。さらにD 1 / D 2 / Cyt b-559 / I 複合体レベルにまで解体してもD 1 蛋白質の分解が起こることから、D 1 蛋白質はそれ自身で自動的に分解するのではないかと報告された(106)。しかし、セリントイプ蛋白質分解酵素の阻害剤を放射性同位元素でラベルして反応中心複合体に添加したところ、アンテナクロロフィル結合蛋白質の一つであるC P 4 3 に結合したことから、C P 4 3 がセリントイプの蛋白質分解酵素として働くと報告され(107)、論争は今なお続いている。また、阻害条件とD 1 蛋白質の第1切断部位の関係などが議論を呼んできた(55)。

しかしながら、P S II ではP 680への光エネルギーの伝達は集光性蛋白質複合体などのような蛋白質中のC h l a, C h l b, 及びカロテノイド分子によって行われるものであって、蛋白質のアミノ酸残基が行うものではない。また、P S II 内の電子伝達もD 1 蛋白質上のチロシン残基であるZを除けば、C h l a, pheo a, 及びP Q_A分子上で行われている。従って、本章で解析を試みる光阻害反応初期過程における系の損傷はD 1 蛋白質のポリペプチド鎖の損傷よりも、これらのエネルギー伝達機能分子および電子伝達機能分子の損傷や離脱として観測される可能性が高い。

ところが、エネルギー伝達機能分子および電子伝達機能分子の損傷または離脱とD 1 蛋白質分解との関係には、2つの場合が考えられる。1つは何らかの機能分子が損傷または離脱したことが引き金になって、D 1 蛋白質分解が開始される場合である。2つ目はD 1 蛋白質分解の結果として各機能分子が失われている場合である。光阻害反応の初期過程は前者の場合であるが、一見、双方ほぼ同時に進行するため区別は難しい。だが、明確に両者の反応を分離して機能分子数の測定を行わない限り、因果関係を明らかにすることは出来ない。従って、光阻害反応の初期過程の研究を行うことは困難であり、D 1 蛋白質分解過程に関する研究に比べて研究例は少ない。現在のところ、D 1 蛋白質分解の引き金はQ_Aが2電子還元されて離脱することである(61)といわれているが確証はない。そのうえD 1 蛋白質の分解につながるD 1 蛋白質の構造変化に関しては全く不明である。また、光阻害反応を防ぐための機構に関する研究例も少なかった。

光阻害反応は基本的には強光照射によってP S II 内における電荷の偏りが生じることから始まる。第I章で述べた環状電子移動が生じた場合、還元側の電子と酸化

側の正電荷を再結合させることで、還元側に電子が蓄積されることと酸化側が高酸化状態になることを同時に防ぐことが可能となる。それによって、P S II内でラジカルが消去され、そのラジカルと酸素分子によって活性酸素が生ずることを未然に防ぎ、ラジカルや活性酸素による破壊的な反応を抑えることが予想される。これによって、環状電子移動は単なるエネルギーの損失ではなく光阻害に対する防御という生理的な意義を持つことが出来る。逆に言えば、D 1 蛋白質分解が起こる以前の光阻害反応初期過程は、防御機構としての環状電子移動能が失活していく過程でもあると予測される。よって環状電子移動の光阻害過程を観測することが光阻害反応の初期過程を理解するために重要であると考えられる。

しかし、第 I 章で述べたように通常分光学的測定で用いる程度の濃度の DM などの可溶化剤存在下でも、環状電子移動量は減少して観測が困難になる。そのため、クロロプラストの懸濁液を用いて可溶化剤を使用しなかった初期の報告では、100~200 μ s 成分に関する報告があるが、P S II 粒子を可溶化剤を使用して測定するようになってからは報告が少ない。

また、環状電子移動と密接な関係を持つ Cyt b-559 の H P は、可溶化剤処理に限らず何らかの処理によって壊れやすいため環状電子移動は失われやすい。さらに、Cyt b-559 を介する電子移動の解析は困難であり、その速度は 35~100ms 程度であると従来から見積もられてきた。そのため、ゆるやかな環状電子移動だけに Cyt b-559 が関わっていると理解されてきた(108)。これらのような悪条件が重なり、D 1 蛋白質の分解過程の研究に比べ環状電子移動の光阻害条件下での挙動に関する研究は注目されてこなかった。

本章では、D 1 蛋白質の分解が開始されるよりも“前”の各機能分子の損傷過程と環状電子移動の光阻害過程との関連性に注目して、光阻害反応初期過程を解析することを目的とした。そのために D 1 蛋白質分解を効果的に抑えるセリンタイプの蛋白質分解酵素阻害剤(62)を添加した光阻害条件を設定した。その光阻害条件下における Q_A 活性の時間変化を測定することで光阻害過程を観測した。また、環状電子移動量の挙動を測定した。

それと同時に、光照射処理を施した試料を陰イオン交換樹脂にかけ、可溶化剤を含む溶液で洗った。それによって、すでに D 1 蛋白質分解が開始した反応中心複合体や、離脱した機能分子などを洗い流し、反応中心複合体としての形をある

程度保った複合体を多く含む試料を得た。その試料を用いてHPLCによってPSIIを構成する各機能分子（Chl a, Chl b, pheo a, β -Car, PQ_A, キサントフィル類）の数の変化を測定することにより、Q_A機能およびPSII内環状電子移動と関連のある機能分子を見出し、さらにPSII光阻害反応初期過程での反応の引き金となる機能分子を明らかにすることを計画した。このとき特に、Q_A, Q_Bの本体であるPQ_Aの分子数の挙動と、第I章で述べたように過去の報告から環状電子移動の経路である可能性が示唆された β -Carの分子数の挙動に注目した。

光照射処理の条件としては、先に述べたようにPSIIの光阻害では酸素分子の存在が重要な因子となるため、酸素が存在する場合と無い場合の条件を設定した。また、PSIIの酸化側が阻害されるか、還元側が阻害されるかで光阻害反応過程が異なると考えられるため、それぞれの阻害のモデル系として以下の4種類の条件を設定した。

条件1 人工電子受容体フェリシアナイドも人工電子供与体Mn²⁺も添加しない条件
用いた試料は、PSIIへの電子の入り口である水分解系と出口であるキノンプールをともに除去している。そのため人工電子受容体も人工電子供与体も存在しない場合、酸化側と還元側に電荷が蓄積してそれぞれの側がある程度光阻害を受けることが予想される。

条件2 人工電子供与体Mn²⁺のみ添加した条件。

PSIIに対する人工電子供与体のうちでMn²⁺はもっとも効果的な電子供与体であり、Zを介して18~35 μ sでP680⁺を還元する(76)。従って、Mn²⁺から酸化側に十分な電子を供給することが可能であり、酸化側は正常に機能すると考えられる。ところが、強光照射を行えばキノンプールを除去しているため、還元側にとっては過剰な電子が供給される。従って還元側のみが条件1より強く光阻害を受けることが予測される。

条件3 人工電子受容体フェリシアナイドのみ添加した条件。

フェリシアナイドが還元側から電子を奪うことで還元側は比較的正常に働くと考えられる。ただし、フェリシアナイドは還元側から電子を奪う速度ではキノンタイプの人工電子受容体には劣るが、酸化還元電位はキノンタイプの人工電子受容体より高い。そのため系全体はより酸化的な状態になる。このようにすでに酸化側の電子が不足がちになっている条件で強光照射を行えば、酸化側に

正電荷が蓄積しやすくなる可能性がある。従って、酸化側が条件1より強く光阻害を受けることが予測される。

条件4 Mn^{2+} ，フェリシアナイドともに添加した条件。

Mn^{2+} によって酸化側に電子を供給しつつ、フェリシアナイドにより還元側から電子を奪うことによって、酸化側も還元側も光阻害を比較的受けにくいことが予想される。これは仮想的な正常系のモデルである。

II-1. 実験方法

II-1-1 光照射処理 (光阻害処理)

各 TrisPS II RC 中には多数のクロロフィル分子とカロテノイド分子のような色素分子があるが、白色光による光照射を行えば不特定の色素分子が直接励起されて損傷する可能性がある。しかし、本論文で問題にしているのはアンテナ色素分子の損傷過程ではなく、環状電子移動と光阻害反応初期過程との関連性である。つまり、光照射によって反応中心複合体内部の電子伝達に異常が生じ、電荷のバランスが崩れた結果として各機能分子が損傷または離脱する過程に注目している。

そこで白色光ではなく赤色光を照射することにした。この場合、P 680以外のクロロフィル分子も励起されるが、少なくともカロテノイドの励起と直接的な損傷は抑えられる。それでもカロテノイドが損傷した場合、反応中心複合体内部で生じた正電荷または電子が原因で損傷したことが特定できる。

光源としては、ハロゲンランプ (理科学精機 (株), スライドプロジェクター, 1000W) を用い、その光を色ガラスフィルター (東芝硝子 (株), R-60) に通し、600nm 以下の光を除いて反応中心の励起に適した赤色光のみとした。さらに 9cm の厚さの水の層を通して赤外線を弱め、減光フィルター (東芝硝子 (株), TND30%) によって強度を 30% に弱めた光をレンズで集光し、石英製反応容器中の試料に照射した。反応容器の中心に照射されている赤色光の強度はサーモパイル (The Eppley Laboratory, INC., Thermopile No. 17867) で測定した結果、 $960 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。反応容器中の試料は、常にスターラーで攪拌しサーキュレーターで高純水を循環させて温度 20°C に保った。

酸素存在下の条件で光照射処理する試料は、レーザーフラッシュフォトリス法で用いたものと同じ溶液 (40mM HEPES-NaOH, 1M Sorbitol, 10mM NaCl, 5mM MgCl_2 , 10mM NaHCO_3 , pH 7.5, 20°C) に分散させた。無酸素下で光照射する試料については、(I-1-11, p38) で行った方法で酸素を除去した後、反応容器にアルゴンガスを常に吹き込みながら光照射処理を行った。なお pH 6.0 における測定は先に示した溶液の 40mM HEPES-NaOH を 40mM MES-NaOH に換えたものを用いた。

試料の反応中心濃度は $0.8 \mu\text{M}$ Cyt とし、0~40 分間光照射処理したものをレーザー

フラッシュフォトリシス法を用いた 325nm での Q_A 活性の測定 (Q_A^- 再酸化過程) と、次に示すカラム処理および HPLC による各機能分子定量に供して、それぞれの時間変化を観測した。ただし、一部、680nm 測定と 820nm 測定 ($P680^+$ 再還元過程) をする試料は測定の都合上、反応中心濃度をそれぞれ $0.2 \mu\text{M Cyt}$, $1.6 \mu\text{M Cyt}$ とした。

第 II 章の緒言で述べた光照射処理条件を設定するために、人工電子受容体フェリシアナイド (0.2mM) を添加して酸化側の電子が不足しがちな状態を作り、人工的電子供与体 Mn^{2+} (0.2mM) を添加して還元側に電子が過剰に供給されがちな状態を作った。また、光障害と密接に関わっている酸素の有無の条件も設定し、その他の全ての条件 (温度、pH、光強度) を一定にすることによって、TrisPS II RC および $-\text{Fe}^{2+}$ -TrisPS II RC における種々の光障害過程を研究した。

ただし、第 I 章で示したように Mn^{2+} は環状電子移動を抑制するため、 0.2mM Mn^{2+} を添加して光照射処理を行った試料はそのままではレーザーフラッシュフォトリシス法による測定に適さない。そのため、その試料を 10mM EDTA を含む溶液で 2 倍希釈して Mn^{2+} の効果を抑制してからレーザーフラッシュフォトリシス法による測定を行った。

II-1-2 カラム処理

まず、陰イオン交換樹脂 (Pharmacia, Q-Sepharose FF) を 0.03% DM を含む溶液 A (20mM BisTris-HCl (pH 6.5), 20mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 1.5% Taurine) で平衡化した。光照射処理を施した試料溶液 10ml に対し、 0.5% DM を含む溶液 A を 2ml 加え、試料を可溶化剤に分散させておき、カラムにかけた。それを溶液 A の 0.03% DM 溶液 10ml で洗った。これによって、PS II から離脱した機能分子類および、すでに D1 蛋白質分解が開始した反応中心複合体などを除去した。さらに、 100mM 硫酸マグネシウムを加えた溶液 A の 0.03% DM 溶液 1ml で溶出させた。処理は全て暗所、 4°C で行った。

II-1-3 各機能分子 (Chl a, Chl b, β -Car, pheo a, P Q_A, キサントフィル類) の定量

Eskins らの方法 (109) に改良を加えて、各試料に含まれる機能分子の抽出を行った。この抽出処理の概要は図 3 0 (p86) に示した。逆相カラムカートリッジ (Waters, SEP-PAK C18) を 70% メタノール 4ml で洗ってカラムを活性化した後、カラムに処理後の試料を 200 μ l 吸着させた。そして、70% メタノール 2ml を用いて水分を除き、エタノール/ジエチルエーテル (1:1) 4ml で各機能分子を抽出した。

この抽出液をロータリーエバポレーターを用いて、暗所ですばやく常温乾固させた後、エタノール 400 μ l に溶かし、卓上遠心器で遠心しその上清液を採取し、HPLC (Merck, 逆相カラム, LiChrospher 100 RP-18) に供した。展開溶媒にはメタノール/水 (95:5) [retention time 0~40 分] とメタノール/エタノール (65:35) [retention time 40 分以降] を使用した。検出は β -Car 以外のカロテノイドの定量を行うときは 455nm の吸光度を用い、P Q_A の定量を行うときは 255nm の吸光度を用いて行った。一例として TrisPS II RC を用いて得られた溶出曲線を図 3 1 (p87) に示した。

分画した各機能分子のうち、Chl a, Chl b, pheo a, β -Car およびキサントフィル類 (ネオキササンチン、ヴィオラキササンチン、ルテイン) は分光法により定量した。分子吸光係数 ($M^{-1}cm^{-1}$) の値は、それぞれ表 2 (p88) の値を使った。なお、この実験条件では β -Car と pheo a とは完全には分離できなかったため、448nm に Pheo a の吸収も重なることを考慮に入れて次の式で補正した。

$$A_{448}' = A_{448} - A_{664} \times 0.06977$$

また、P Q_A については前もって精製した一定量の P Q_A の標準試料を HPLC に注入し、得られた P Q_A 画分の面積と各試料の P Q_A 画分の面積比によりその値を求めた。

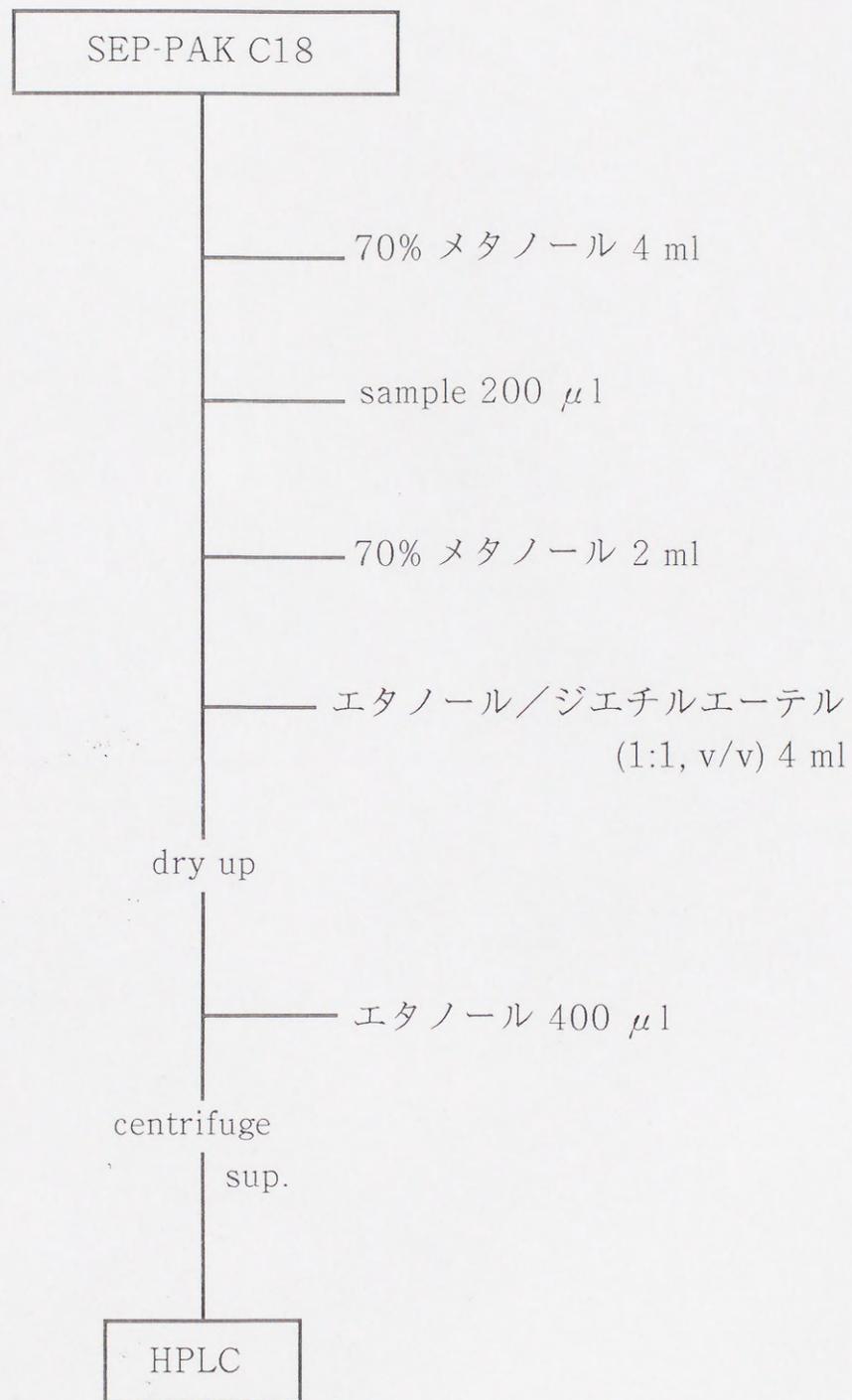


図30 補欠分子の定量法

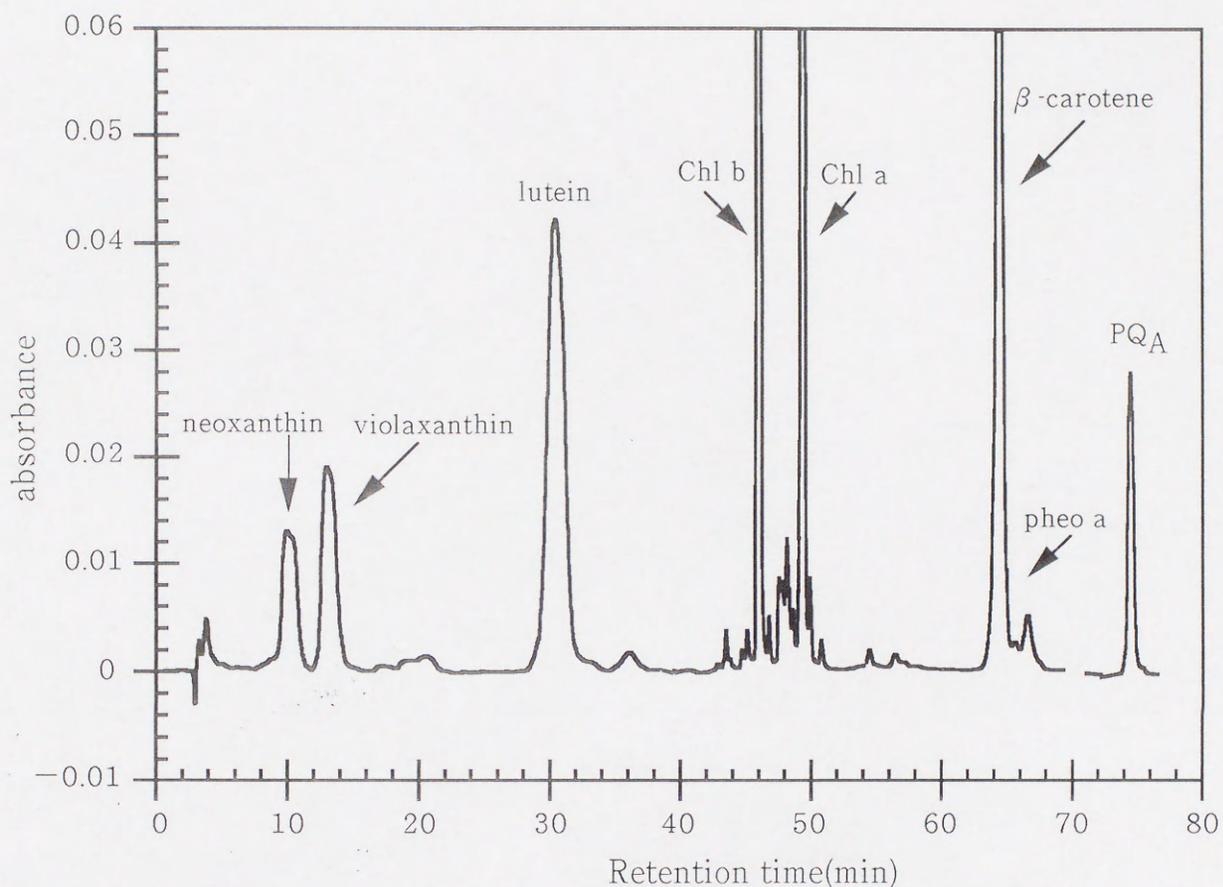


図31 HPLCによる溶出曲線の例 (TrisPS II RC, 光照射前)

試料を逆相カラムカートリッジを用いて処理後、逆相カラム LiChrospher 100 RP-18 を用いて各機能分子の定量を行った。検出器の波長は、 β -carotene 以外のカロテノイドの定量を行うときは455 nmを用い、PQAの定量を行うときは、255nmを用いた。

溶出の条件は Retention time 0~40分までは溶離液 (Methanol/H₂O=95/5, v/v) を用い、流速は 0.5ml/min とし、Retention time 40分以降は溶離液 (Methanol/Ethanol=65/35, v/v) を用い、流速は 1.0ml/min とした。

表2 各機能分子の吸光度係数

Methanol/Ethanol (65/35)中

pigment	(M ⁻¹ c m ⁻¹)
Chl a	86,300 (660nm)
Chl b	56,000 (642nm)
pheo a	51,100 (664nm)
β-Car	138,000 (448nm)

Methanol/H₂O (95/5)中

pigment	(M ⁻¹ c m ⁻¹)
neoxanthin	143,000 (437nm)
violaxanthin	152,000 (442nm)
lutein	175,000 (446nm)

文献(110,111)をもとに、本研究で用いた溶媒中の吸光度係数をそれぞれ求めた。

II-2. 実験結果

II-2-1 TrisPS II RC と $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC の機能分子組成

Chl a, Chl b, β -Car, pheo a, PQ_A , 及びキサントフィル類 (ネオキサンチン、ヴィオラキサンチン、ルテイン) の分析結果を TrisPS II RC と $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC について表 3 (p90) に示した。PS II の反応中心は pheo a 2 分子を保持しているため (6)、pheo a 2 分子に対する分子数比を反応中心あたりの数として示した。非ヘム鉄除去処理で Chl a と β -Car の解離がいくらか見られるが、 Q_A , Q_B の本体である PQ_A は各複合体で約 2 分子保持されていることが分かる。

II-2-2 Chl a, Chl b, Pheo a, 及びキサントフィル類の分子数の光照射処理による変化

光照射処理とカラム処理を行った試料の Cyt b-559 定量 (I-1-7 参照, p28) を行ったところ、光照射処理時間が増加しても Cyt b-559 1 分子当たり Pheo a は 2 分子のままであることが示された (図 3 2, p91)。このことから光照射処理とカラム処理によって得られた反応中心複合体は、少なくとも Pheo a の分子数に関しては正常であることが明らかになった。従って、以後は光照射処理後の試料の反応中心あたりの各機能分子の数は Pheo a 2 分子を反応中心数の指標として用いて示した。

光照射処理中の条件に関係なく、Chl a, Chl b, 及びキサントフィル類 (ネオキサンチン、ヴィオラキサンチン、ルテイン) の分子数はわずかに減少するものもあったが、明らかな量的変化は見せなかった。例として図 3 3 (p92) に酸素存在下での各分子数の挙動をいくつか示した。以後は、光照射により量的に目立った変化を示した β -Car と PQ_A の分子数、及び Q_A 活性と 100~200 μ s 環状電子移動量の光阻害過程に注目して実験を進めた。

表3 反応中心当たりの各機能分子数

機能分子	S a m p l e	
	TrisPS II RC	-Fe ²⁺ -TrisPS II RC
C h l a	4.2	3.7
C h l b	2.8	2.2
Pheo a	2	2
β -Car	8.3	6.3
P Q _A	2.0	2.0
neoxanthin	0.6	0.8
violaxanthin	0.6	0.7
lutein	1.2	1.3

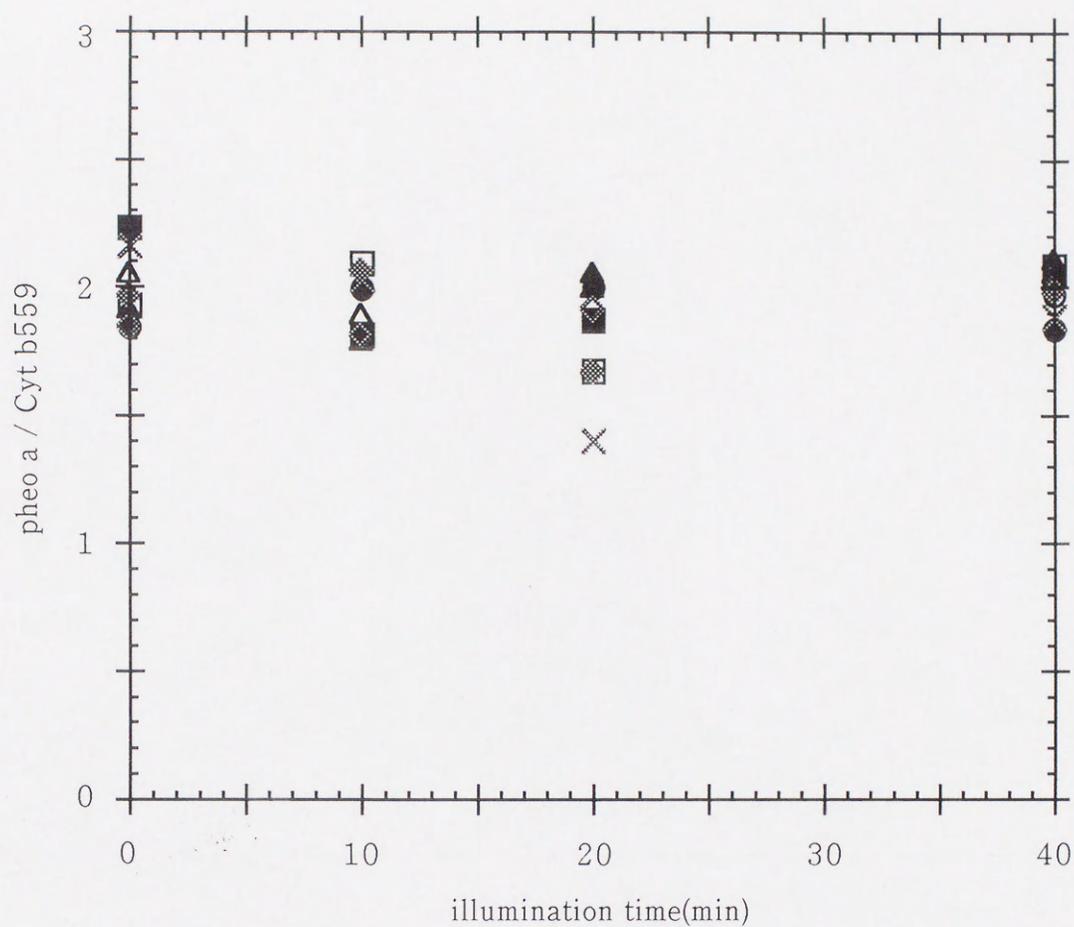


図32 光照射処理に伴うPheo aとCyt b559の数の比の時間変化
(フェリシアナイド、酸素、 Mn^{2+} の有無の各条件)

試料と光阻害条件	0.2mM $K_3Fe(CN)_6$	O_2	0.2mM $MnCl_2$
(○) TrisPS II RC	—	+	—
(▲) TrisPS II RC	+	—	—
(●) TrisPS II RC	+	+	—
(□) TrisPS II RC	+	—	+
(△) TrisPS II RC	+	+	+
(◆) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC	+	—	—
(■) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC	+	+	—
(◇) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC	+	—	+
(×) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC	+	+	+

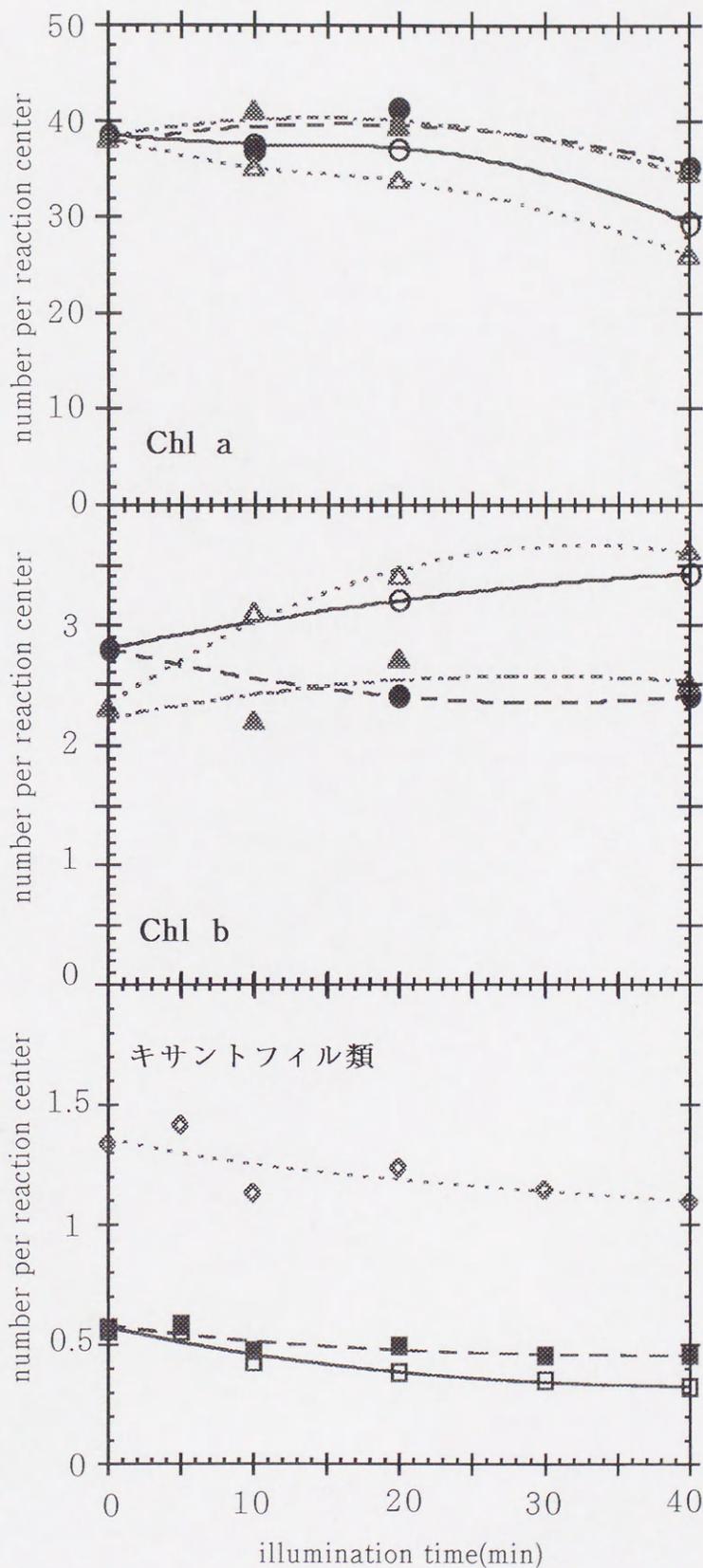
図33 光照射処理に伴う
Chl a, Chl b, およびキサ
ントフィル類の反応中心あ
たりの分子数の時間変化
(酸素存在下)

Chl a および Chl b の分子数の
光照射時間変化の例とし
て、以下の試料における結果
をそれぞれ示す。

- (○) TrisPS II RC,
Mn²⁺非存在下
- (●) TrisPS II RC,
0.2mM MnCl₂
- (△) -Fe²⁺-TrisPS II RC,
Mn²⁺非存在下
- (▲) -Fe²⁺-TrisPS II RC,
0.2mM MnCl₂

また、キサントフィル類の
分子数の光照射時間変化の例
として TrisPS II RC, Mn²⁺非
存在下における時間変化をそ
れぞれ示す。

- (□) ネオキササンチン
- (■) ビオラキササンチン
- (◇) ルテイン



II-2-3 酸化側、還元側ともに阻害される条件における光阻害過程 (Mn^{2+} , フェリシアナイドともに添加しない場合)

この系では、酸化側、還元側がともにある程度阻害されることが予想される。図 3 4 (p94) に酸素存在下でフェリシアナイドも Mn^{2+} も加えていない条件での光阻害過程を示した。表 4 (p95) には、このとき観測された各減少過程における半減期とその成分の割合を示した。

Q_A^- 再酸化過程における $100\sim 200\mu s$ 成分の環状電子移動量の変化には、 $1\sim 2$ 分という短い半減期で減少する成分が 60% ほど観測された。環状電子移動量の減少を反映して、 Q_A 活性でも半減期約 1 分で減少する成分が約 20% 見られた。

これに対して、 PQ_A の分子数の変化に関しては速い減少過程は見られなかったことから、この時間領域では Q_A , Q_B 本体は損傷していないことが分かった。このため、上に示した環状電子移動量の挙動は PQ_A の分子数では説明できない。驚くべきことに、特に TrisPS II RC では、最初の 10 分間ほど PQ_A の分子数が減少しないという状態が生じた。

一方、 β -Carの分子数の変化には、半減期 $1\sim 2$ 分という減少成分が TrisPS II RC と $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC ではともに約 60% 観測された。これは環状電子移動量の変化によく似ている。

観測している対象が環状電子移動であることを確認するため、 $P680^+$ 再還元過程における $100\sim 200\mu s$ 成分も 680nm 及び 820nm で測定を行ったところ、 Q_A^- 再酸化過程と同様の傾向を示した。このとき $700\mu s\sim 1ms$ 成分は目立った変化は示さなかった (図 3 5, p96)。また、 β -Carの分子数を横軸にとり $P680^+$ 再還元過程における $100\sim 200\mu s$ 成分環状電子移動量を縦軸にとると、一次の相関を示した (図 3 6, p97)。このことから環状電子移動量と β -Carの分子数の関連性が確かめられた。

図34 フェリシアナイド, Mn^{2+} とも存在しない場合における各光阻害過程 (酸素存在下)

上から Q_A 活性、100~200 μs 成分環状電子移動量、 β -Carおよび PQ_A の分子数の時間変化を示す。

(○) TrisPS II RC

(●) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC

光阻害条件およびレーザーフラッシュフォトリシス法による測定条件は、ともにpH 7.5, 20°Cとした。また、100~200 μs 成分環状電子移動量としては0.2mMフェリシアナイド存在下、325nmで測定した Q_A^- 再酸化過程の100~200 μs 成分を用いた。

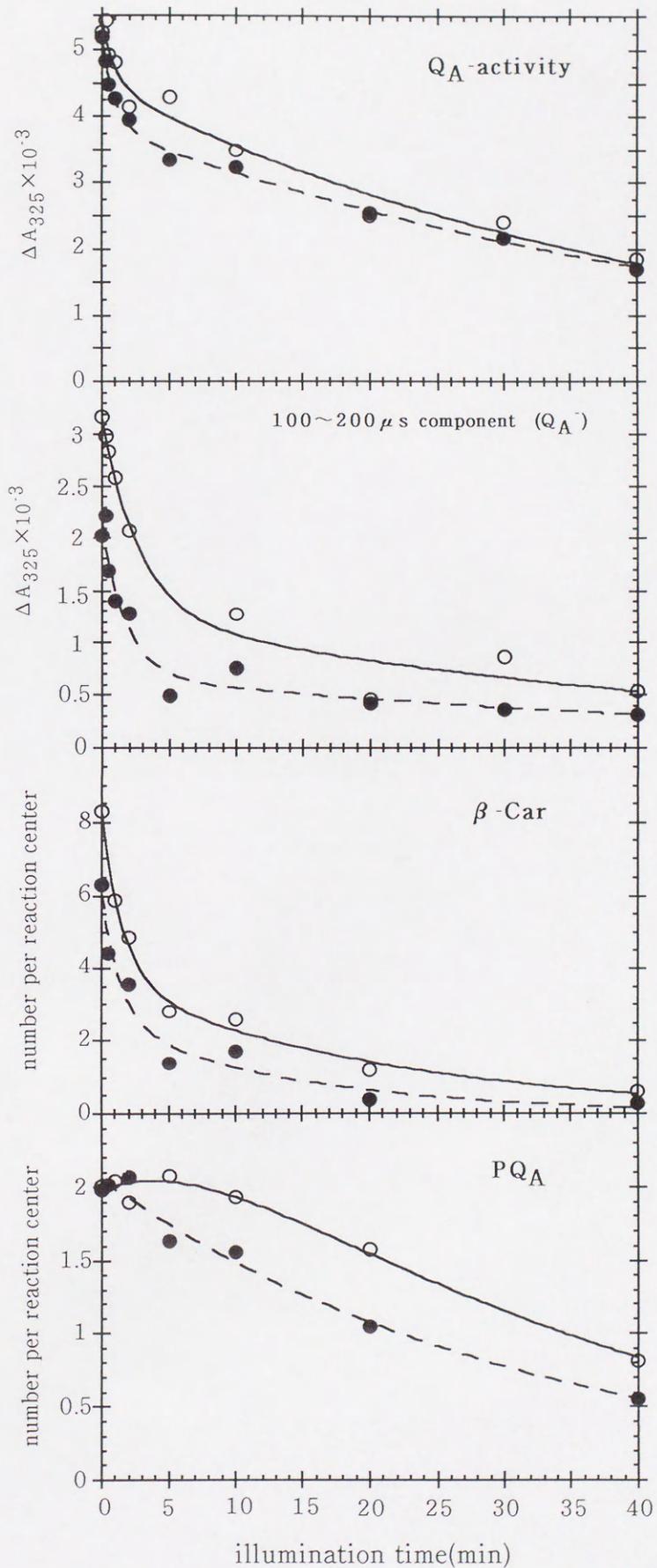


表4 光照射処理による各減少過程の半減期と割合
(酸化側、還元側ともに阻害される条件、酸素存在下)

減少過程	S a m p l e	
	TrisPS II RC min (%)	-Fe ²⁺ -TrisPS II RC min (%)
Q _A 活性	0.71 (17.5)	0.69 (25.4)
	30.1 (82.5)	34.7 (74.6)
100~200 μs 成分	1.94 (59.8)	1.24 (68.2)
	31.9 (40.2)	35.0 (31.8)
β-C a r	1.11 (55.8)	0.97 (57.8)
	14.5 (44.2)	9.98 (42.2)
P Q _A	10 分後から	21.2 (100)
	20.0 (100)	

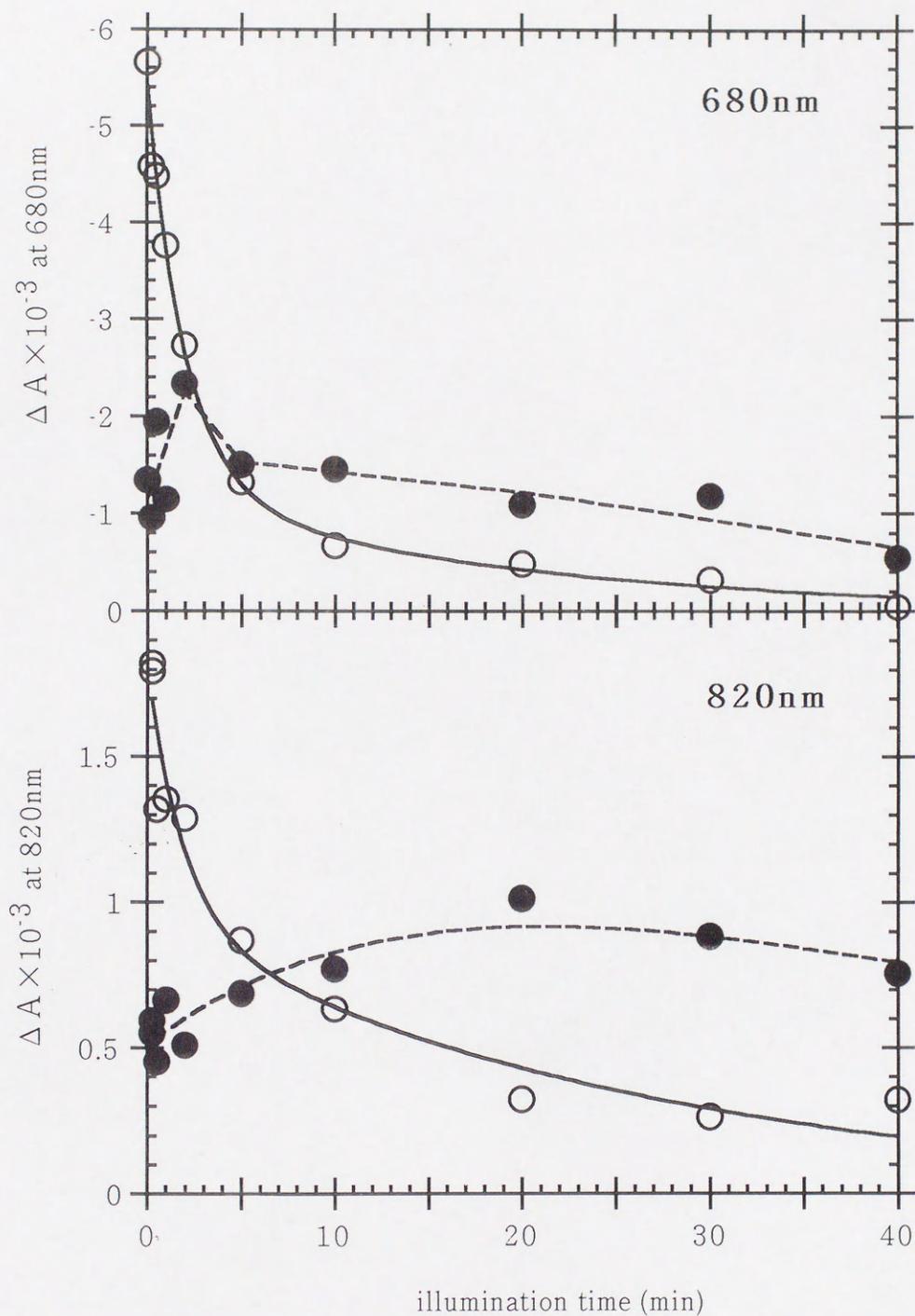


図35 フェリシアナイド, Mn^{2+} ともに非存在下、酸素存在下の、光照射処理に伴うP680⁺再還元過程の時間変化 (TrisPS II RC)

光阻害条件およびレーザーフラッシュフォトリシス法による測定条件は、ともに pH 7.5, 20℃とした。反応中心濃度は680 nm測定では0.2 μ M Cyt, 820nm測定では1.6 μ M Cytとした。

(○) 100~200 μ s成分

(●) 700 μ s~1ms成分

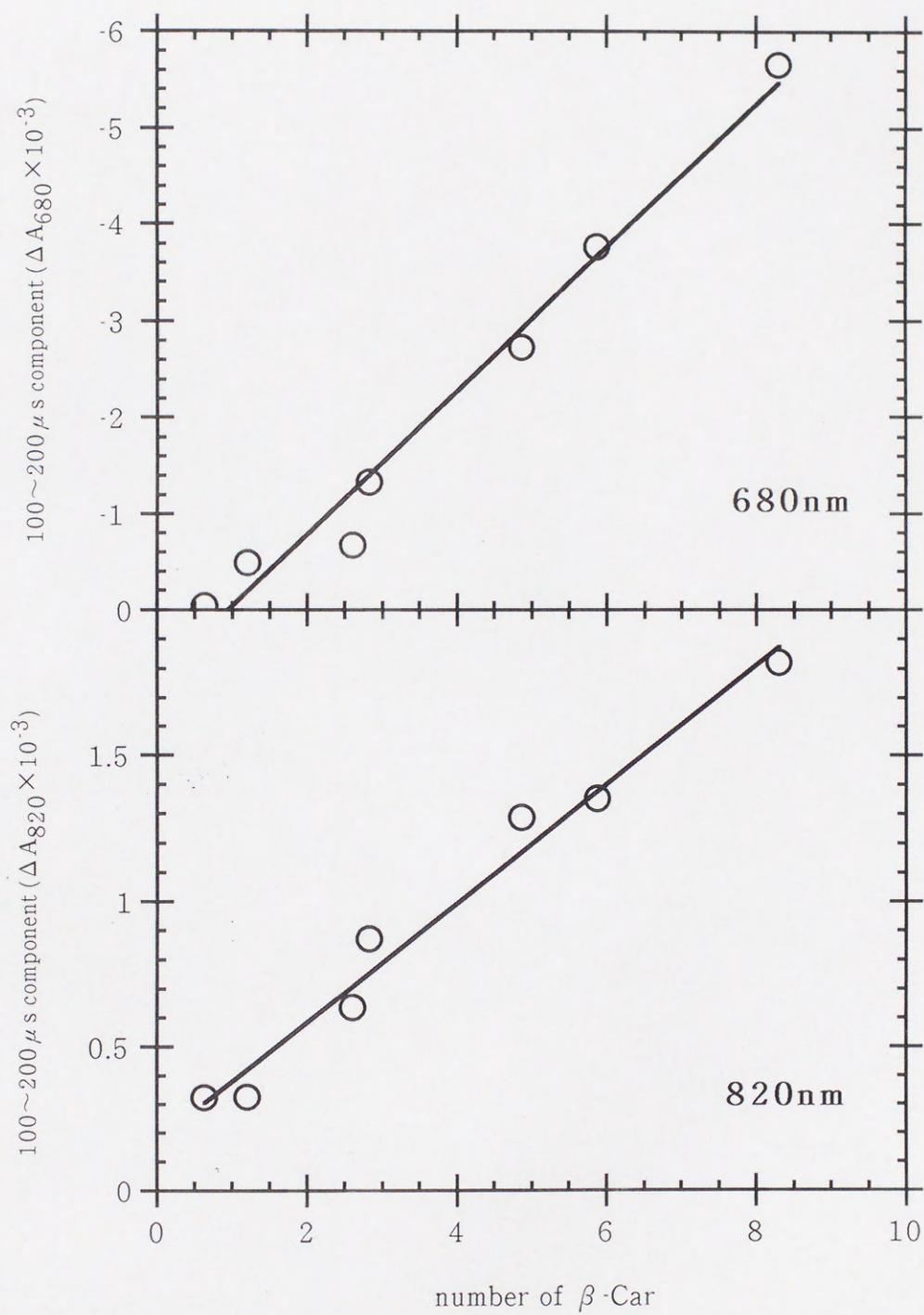


図36 100~200 μ s成分環状電子移動量(P680⁺)と β -Carの数の相関性(TrisPS II RC)

光阻害条件およびレーザーフラッシュフォトリス法による測定条件は、図35と同じ。

II-2-4 還元側阻害条件における光阻害過程 (Mn²⁺のみを添加した場合)

この系では、酸化側は正常に機能するが還元側のみが強く阻害されることが予想される。図37 (p99)に酸素存在下でMn²⁺のみを添加した条件での光阻害過程を示した。表5 (p100)には、このとき観測された各減少過程における半減期とその成分の割合を示した。

このときβ-Carの分子数の減少はほとんど抑えられた。これはMn²⁺によってP680⁺が速やかに還元されることにより、β-Carの酸化(17)による損傷が抑制されたと考えられる。また100~200μs成分環状電子移動量の短い半減期の減少もかなり抑えられた。逆にPQ_Aの減少がやや速まったことは、還元側阻害によって、Q_Aが2電子還元されて放出されるというBarberとAnderssonのモデル(図29, p78, (54))と矛盾はない。

II-2-5 酸化側阻害条件における光阻害過程 (フェリシアナイドのみを添加した場合)

この系では、酸化側のみが強く阻害されることが予想される。図38 (p101)に酸素存在下でフェリシアナイドのみを添加した条件での光阻害過程を示した。表6 (p102)には、このとき観測された各減少過程における半減期とその成分の割合を示した。

このとき100~200μs成分環状電子移動量とβ-Carの減少はフェリシアナイドもMn²⁺も加えていない場合に比べて速くなり、半減期約1~2分だった減少成分が半減期1分以下で減少した。Q_A活性においても速い減少過程の割合は表4 (p95)のほぼ2倍になった。

この場合、電子はP680⁺と再結合する前に還元側から引き抜かれるため、長寿命のP680⁺が生じβ-Carが直接酸化され損傷すると考えられる。

BarberとAnderssonのモデル(図29, p78, (54))に従えば、フェリシアナイドによって還元側が酸化されることでQ_Aの2電子還元は抑えられ、Q_Aの放出が減少することが予測される。しかし、PQ_Aの分子数は減少した。しかも、

図37 Mn^{2+} 存在下における各光阻害過程(酸素存在下)

上から Q_A 活性、100~200 μs 成分環状電子移動量、 β -Carおよび PQ_A の分子数の時間変化を示す。

光阻害処理およびレーザーフラッシュフォトリス法による測定は図34と同様に行った。

(○) TrisPS II RC

(●) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC

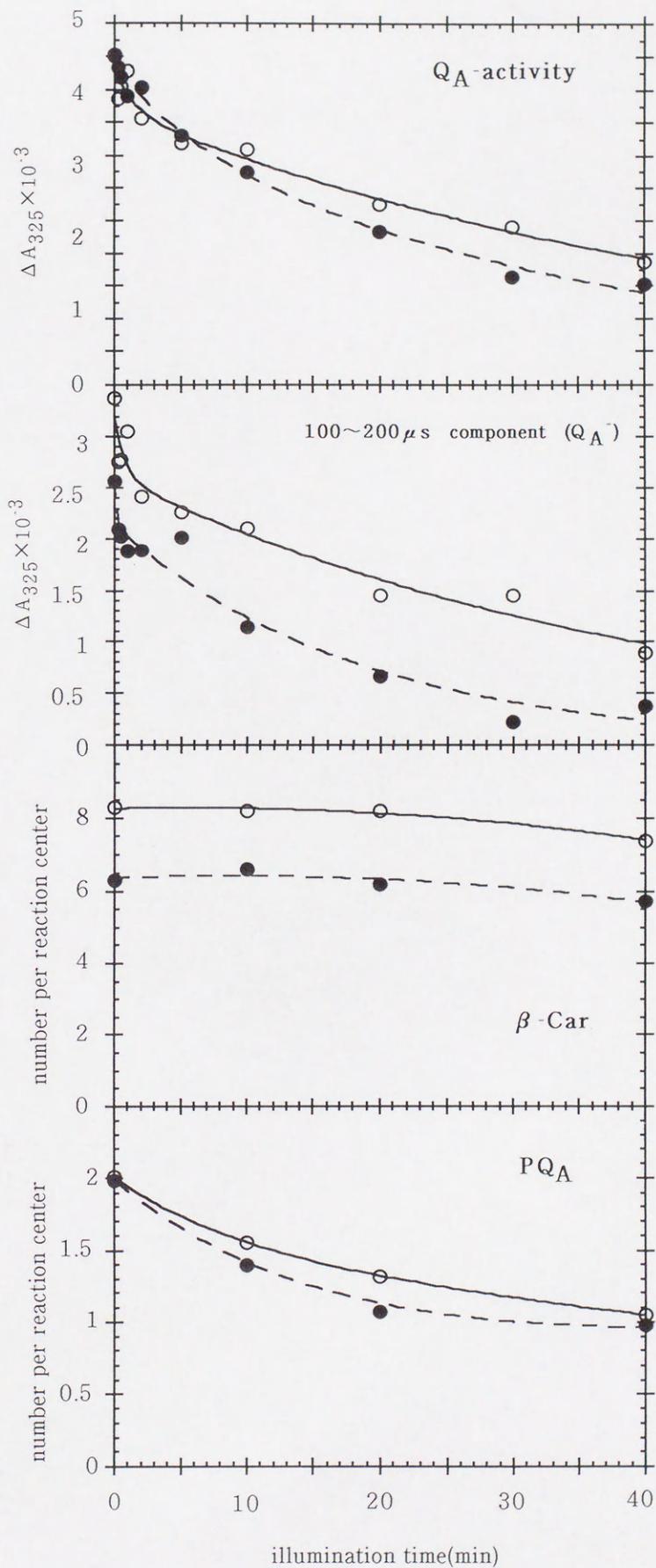


表5 光照射処理による各減少過程の半減期と割合 (還元側
阻害条件、酸素存在下)

減少過程	S a m p l e	
	TrisPS II RC min (%)	-Fe ²⁺ -TrisPS II RC min (%)
Q _A 活性	1.38 (13.8)	4.20 (20.2)
	35.6 (86.2)	26.9 (79.8)
100~200 μs 成分	0.56 (18.5)	12.5 (100)
	28.3 (81.5)	
β-Car	>200 (100)	>200 (100)
P Q _A	5.87 (22.4)	7.69 (53.0)
	69.3 (77.6)	>200 (47.0)

図38 フェリシアナイド存在下における各光阻害過程（酸素存在下）

上から Q_A 活性、100~200 μ s成分環状電子移動量、 β -Carおよび PQ_A の分子数の時間変化を示す。

光阻害処理およびレーザーフラッシュフォトリス法による測定は図34と同様に行った。

(○) TrisPS II RC

(●) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC

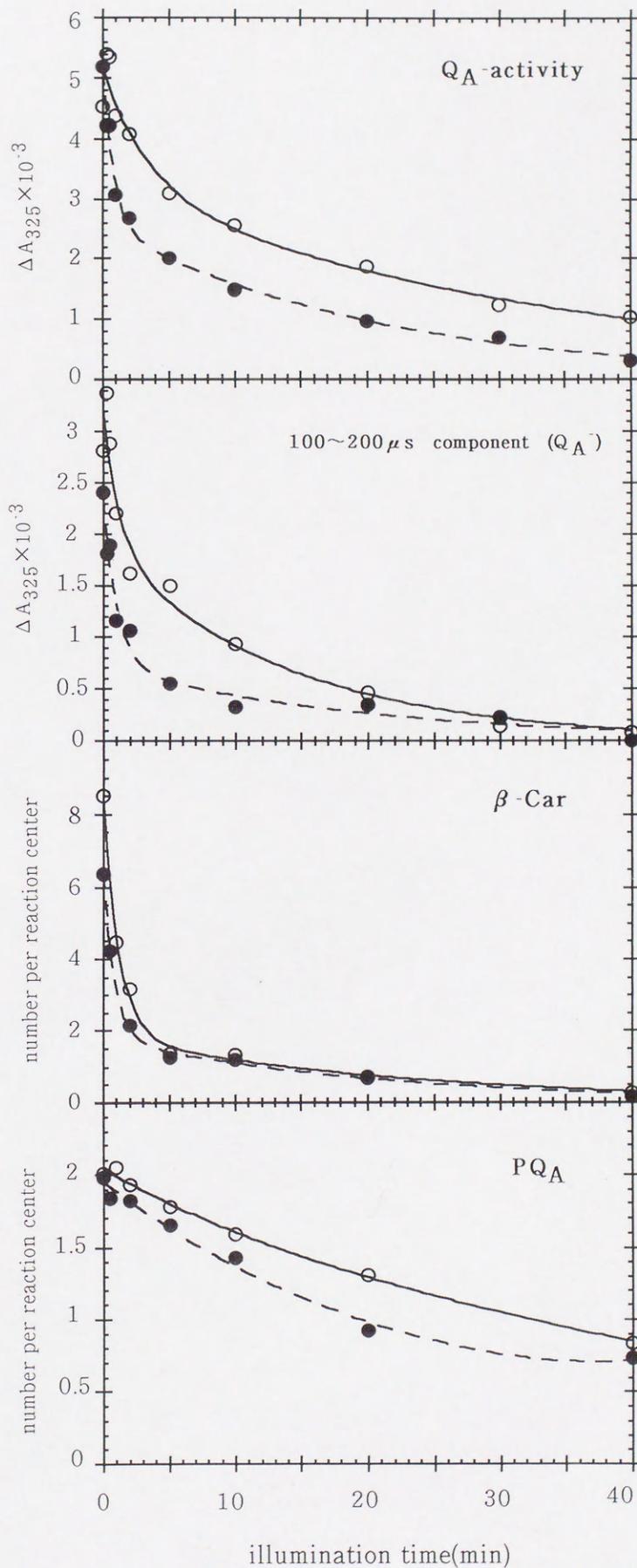


表6 光照射処理による各減少過程の半減期と割合（酸化側阻害条件、酸素存在下）

減少過程	S a m p l e	
	TrisPS II RC min (%)	-Fe ²⁺ -TrisPS II RC min (%)
Q _A 活性	2.47 (38.4)	0.62 (50.5)
	23.9 (61.6)	14.4 (49.5)
100~200 μs 成分	0.86 (41.4)	0.76 (69.1)
	9.66 (58.6)	13.6 (30.9)
β-C a r	0.83 (78.1)	0.60 (71.4)
	15.6 (21.9)	14.0 (28.6)
P Q _A	3.66 (4.3)	18.8 (94.4)
	33.1 (95.7)	>200 (3.6)

TrisPS II RC で PQ_A の分子数が最初の 10 分間減少しない過程 (II-2-3 参照, p93) は失われた。これは、フェリシアナイドが還元側から電子を受け取る効率が本来存在する PQ_A より低いとしても説明が困難であり、 β -Car の分子数の急激な減少と関連があると考えられる。

また、他の条件の場合もそうだが、 $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC では TrisPS II RC より速く Q_A 活性、環状電子移動量、 β -Car および PQ_A の分子数が減少した。特に酸化側阻害条件では、非ヘム鉄を持つ TrisPS II RC に比較して、 $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC では半減期 1~2 分の速い Q_A 活性の減少がより顕著に見られた。これは、非ヘム鉄が β -Car の損傷に伴うと考えられる Q_A 活性の減少に対して、防御的に機能していることを示唆する。

II-2-6 酸化側、還元側ともに機能している条件における光阻害過程 (フェリシアナイド及び Mn^{2+} を添加した場合)

これは仮想的な正常系のモデルである。図 3 9 (p104) に酸素存在下でフェリシアナイドと Mn^{2+} を両方添加した条件での光阻害過程を示した。表 7 (p105) には、このとき観測された各減少過程における半減期とその成分の割合を示した。この系では、酸化側も還元側も機能して阻害を比較的受けにくいことが予想される。

このとき、 $100\sim 200\mu s$ 成分環状電子移動量と β -Car の分子数の減少は還元側阻害条件と酸化側阻害条件の中間的な挙動を示した。また PQ_A の場合、 $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC においても最初の 10 分間ほど PQ_A の分子数が減少しない状態が生じた (II-2-3 参照, p93)。しかし、この 10 分間の間に Q_A の本体である PQ_A の減少がほとんどないのにも関わらず、 Q_A 活性と環状電子移動量の減少が見られる。この時間スケールで減少しているのは β -Car だけである。このことも Q_A 活性と環状電子移動量の減少に β -Car が関連していることを示唆している。

図39 フェリシアナイド、
および Mn^{2+} 存在下におけ
る各光阻害過程（酸素存在
下）

上から Q_A 活性、100~200
 μs 成分環状電子移動量、 β -
Carおよび PQ_A の分子数の時間
変化を示す。

光阻害処理およびレーザー
フラッシュフォトリシス法に
よる測定は図34と同様に行っ
た。

(○) TrisPS II RC

(●) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC

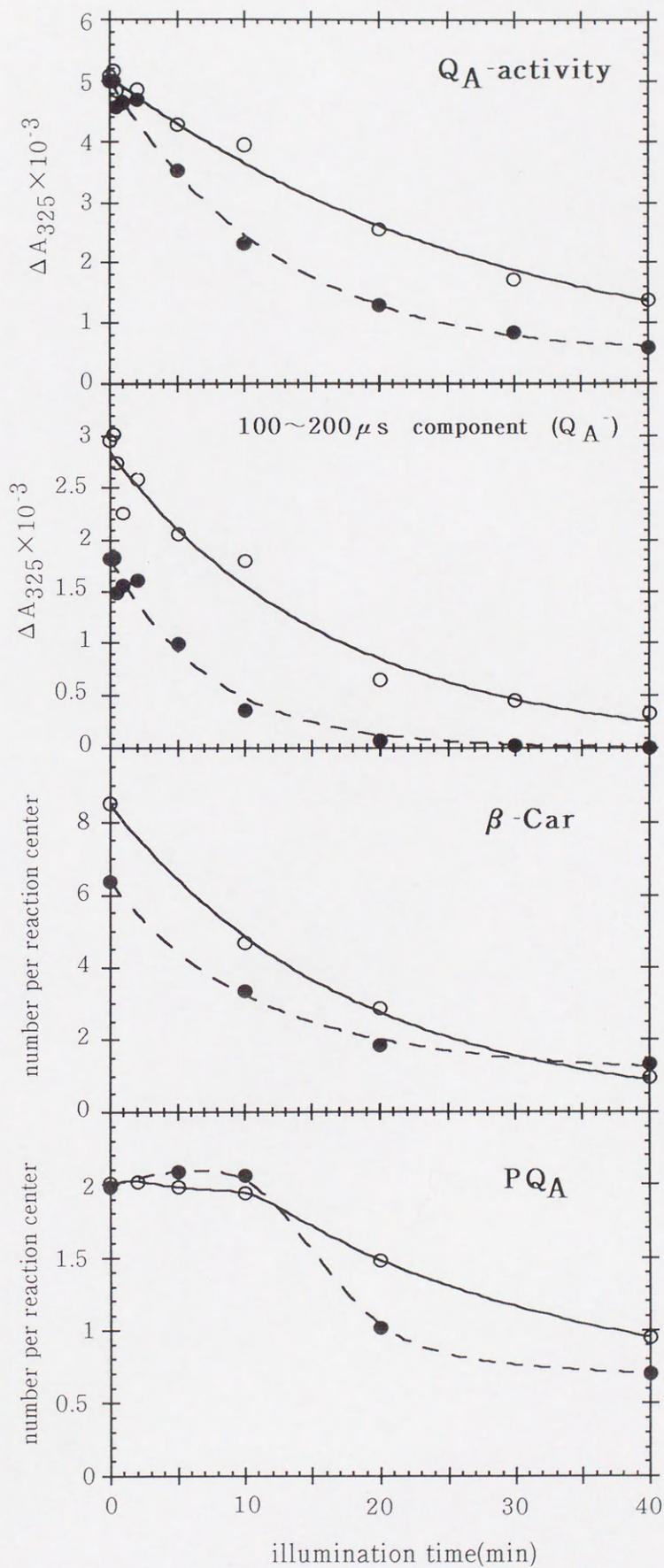


表7 光照射処理による各減少過程の半減期と割合（酸化側、還元側ともに機能している条件、酸素存在下）

減少過程	S a m p l e	
	TrisPS II RC min (%)	-Fe ²⁺ -TrisPS II RC min (%)
Q _A 活性	20.6 (100)	8.51 (100)
100~200 μs 成分	12.1 (100)	5.15 (100)
β-C a r	12.8 (100)	7.11 (76.4) 105 (23.6)
P Q _A	10 分後から 15.3 (54.9) 80.0 (45.1)	10 分後から 4.00 (59.8) 117 (40.2)

II-2-7 酸素の効果

図40 (p107) に酸化側阻害条件の酸素存在下と酸素非存在下における結果を対比して表す。酸素を除去した場合、 PQ_A の減少はほとんど抑えられ、40分光照射後でも反応中心当たり TrisPS II RC で、1.8個、 $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC で1.4個の PQ_A が残っていた。それに対し、 Q_A 活性、100~200 μ s成分環状電子移動量、 β -Carの減少はある程度抑えられるにとどまった。 β -Carの場合、無酸素条件下でも半減期1分以下の成分が約60%あり(表8, p108)、 β -Carを損傷させているものは活性酸素ではなく、専ら $P680^+$ によって酸化されることであることが明らかになった。

II-2-8 pHの効果

Q_A が2電子還元されて H^+ 化され PQ_AH_2 として離脱するという Barber と Andersson のモデルの正当性を検討するため、pH 6.0の溶液で光照射処理を行った。 H^+ 化される過程があれば、低pHの方がより H^+ 化を容易に受け、結果として阻害を受け易くなり、 PQ_A の減少も顕著に見られる可能性が高い。そこで無酸素条件で Mn^{2+} を用い還元側阻害条件にして、 Q_A が最も2電子還元されやすいと考えられる条件で、TrisPS II RCを用い、20分間光照射処理を行った。結果を図41 (p109)に示した。

pH 6.0で20分間光照射処理を施した TrisPS II RC と pH 7.5で同様に処理された TrisPS II RC とでは、 Q_A 活性と β -Carおよび PQ_A の分子数の減少過程には違いが見られなかった。なお、100~200 μ s成分環状電子移動量に関してはpH依存性があるため、比較は出来ない。

このように、少なくとも0~20分間の時間領域では H^+ 化の影響は観測されなかった。しかし、この時間領域でも Q_A 活性の減少と PQ_A の分子数の減少がともに生じている。このことから、Barber と Andersson の H^+ 化モデル(図29, p78, (54))に対して疑問が生じる結果となった。

図40 フェリシアナイド存在下における各光阻害過程に対する酸素の影響

上から Q_A 活性、 $100\sim 200\mu s$ 成分環状電子移動量、 β -Carおよび PQA の分子数の時間変化を示す。

光阻害処理およびレーザーフラッシュフォトリス法による測定は図34と同様に行った。

- (○) TrisPS II RC $-O_2$
- (●) TrisPS II RC $+O_2$
- (△) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC $-O_2$
- (▲) $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC $+O_2$

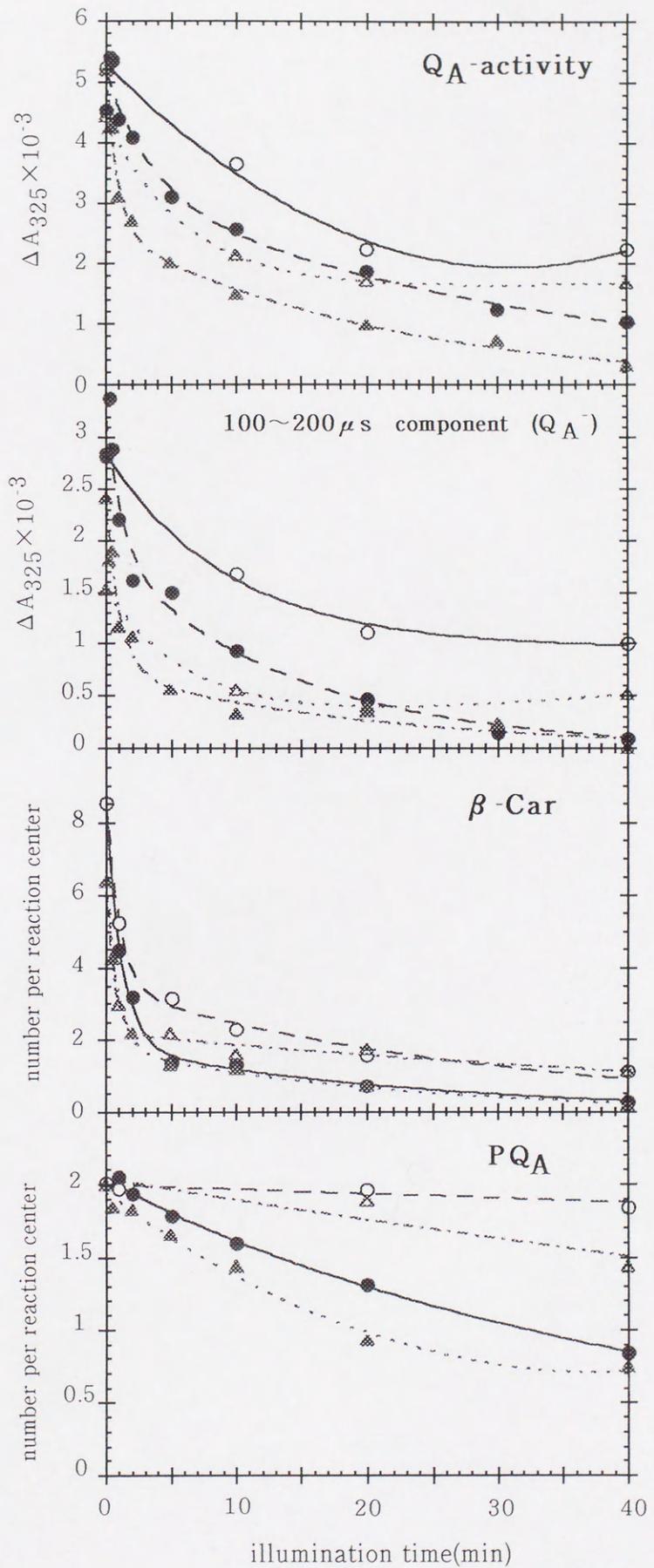


表8 無酸素条件下での光照射処理による各減少過程の半減期と割合（酸化側阻害条件）

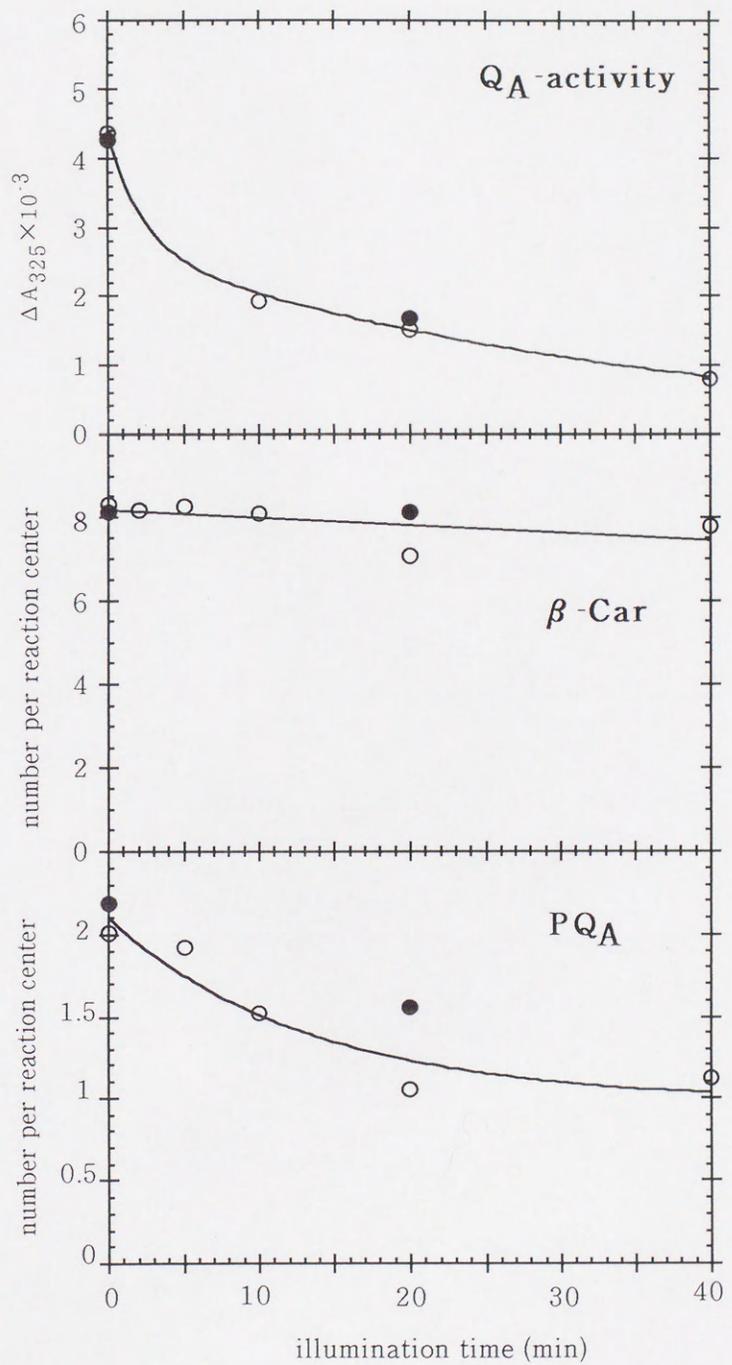
減少過程	S a m p l e	
	TrisPS II RC min (%)	-Fe ²⁺ -TrisPS II RC min (%)
QA活性	8.27 (62.6) >200 (37.4)	4.30 (65.8) >200 (34.2)
100~200 μ s 成分	6.50 (65.2) >200 (34.8)	4.50 (85.7) >200 (14.3)
β -C a r	0.72 (59.7) 21.0 (40.3)	0.42 (65.1) 41.6 (34.9)
P Q _A	167 (44.5) >200 (55.5)	91.1 (100)

図41 各光阻害過程に対する pHの影響 (TrisPS II RC)

上からQA 活性、 β -CarおよびPQAの分子数の時間変化を示す。

無酸素条件下で、0.2mM $MnCl_2$ を添加して、pH 6.0における20分間の光阻害処理を行い、pH 7.5の結果と比較した。

- (○) pH 7.5
- (●) pH 6.0



II-3. 考察

以上に示した、強い赤色光を用いた光照射処理実験では、フェリシアナイド、 Mn^{2+} 、及び酸素の有無の全ての条件下で、 Q_A 活性、 $100\sim 200\mu s$ 成分環状電子移動量、 β -Car および PQ_A の分子数が、 $-Fe^{2+}$ -TrisPSII RC では TrisPSII RC より速く減少した。この事実から、非ヘム鉄の生理的役割は光阻害反応を抑えることであると示唆された。このことは、非ヘム鉄は $100\sim 200\mu s$ 成分環状電子移動の経路であると第I章で考察したことの間接的な証拠になる。つまり、非ヘム鉄は環状電子移動の経路として、PS II内の電荷のバランスを保つことに役立っていると考えられる。

Mn^{2+} を添加しない酸化側が阻害された条件下では、光照射処理によって $100\sim 200\mu s$ 成分環状電子移動量は、約1分の半減期で減少を示した。環状電子移動は Q_A^- (または Q_B^-)からの電子が $P680^+$ に再結合する過程であるが、このとき環状電子移動量の減少に対応するような Q_A 、 Q_B の機能分子である PQ_A 減少は観測されなかった。例えば、酸化側、還元側ともに阻害された条件 (II-2-3参照, p93)の TrisPSII RC や、酸化側、還元側ともに機能している条件 (II-2-6参照, p103)の TrisPSII RC と $-Fe^{2+}$ -TrisPSII RC では、光照射開始約10分後まで Q_A 、 Q_B の本体である PQ_A の分子数が減少しないという状態が生じた。また、この時間領域では、 $P680$ も損傷していないと考えられる (反応中心が最初に損傷した場合、後に続く PQ_A の離脱などの光化学的な反応が起こり得なくなるため)。

このように電子移動の起点である Q_A 、 Q_B と終点である $P680$ がともに存在しているにも関わらず、この間の電子移動量は減少していた。この現象を説明する方法は2通りある。1つは光照射開始後約1分で Q_A 、 Q_B と $P680$ の距離が変化するような大きなコンフォメーション変化が生じた場合が考えられる。2つ目は Q_A^- (または Q_B^-)からの電子が $P680^+$ に再結合する間に何かが介在しており、それが約1分の半減期で損傷する場合が考えられる。前者よりは後者の方が考えやすい。後者が正しいとすれば、 Q_A^- 再酸化過程の $100\sim 200\mu s$ 成分は Q_A^- から $P680^+$ へ直接電子が流れるのではなく、間に何かが介在すると第I章で考察したことへの間接的な証拠になる。

この環状電子移動に介在し、環状電子移動量の減少を機能分子レベルで説明でき

る“何か”に当たると考えられるものは、唯一 β -Carだけであった。例えば、フェリシアナイド存在下の酸化側阻害条件では、TrisPS II RC の場合 0.8 分の半減期で 78%の β -Carが損傷し、22%が半減期 16 分で損傷を受けた。これは、環状電子移動量の時間変化によく似ている。このとき、 $P680^+$ 再還元過程における100~200 μ s 成分の環状電子移動量と β -Carの分子数とは一次の相関性を持つことが示された(図36, p97)。

第I章で示したように、環状電子移動と Cyt b-559 のHPは強い関連性を持つが、Iwasaki らの報告によれば(37)、ヒドロキシルアミン処理によって水分解系を破壊したPS II に対して、光照射処理 ($7000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 白色光, $22^\circ C$) を行うと、Cyt b-559 はHPが半減期 0.7 分で中間電位型 (350mV, IP') に変化し、さらに IP' は半減期 10 分で中間電位型 (237mV, IP) になり、最終的には、半減期 70 分でLPに変換する。そのとき、彼らの報告では人工電子供与体として Mn^{2+} を使い、人工電子受容体として 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) を使って、PS II によるDCIPの光還元活性を590nmで観測した場合、その活性は半減期 0.5分 (70%) および 16 分 (30%) で減少する。

このように、彼らの報告で示された半減期と減少成分の割合は本研究で示された β -Car 及び環状電子移動量の挙動とかなりよく一致しており、 β -Carが損傷することによって Cyt b-559 の電位がHP \rightarrow ... \rightarrow LPに変化することが予想される。

さらに、Cox と Bendall によれば Cyt b-559 の光酸化には β -Carが必要であり、 β -Carと PQ_A を抽出することで Cyt b-559 のHPはLPに変換すると報告しているが(44)、この報告は本研究と矛盾はない。ただし、Cyt b-559 の電位は PQ_A のみを再構成するだけで回復するという点は、光照射処理と抽出再構成実験の違いはあるにせよ、本研究と矛盾する。

また Blubaugh らによれば、水分解系を除去したPS II に $40 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ で光照射を行うと、Chl a, カロテノイドのラジカルが形成されるとともに $Z \rightarrow P680^+$ 電子伝達が半減期 0.8 分で遅くなり、人工電子供与体 (diphenylcarbazide および Mn^{2+}) の光酸化能が半減期 2~3 分で減少して、 Z^+ の形成も失われると報告している(113)。このように、 β -Car, Cyt b-559, 環状電子移動量, $Z \rightarrow P680^+$ 電子伝達が1分以下の半減期でともに減少している事実はこれらがともにあ

る一つの原因から生じていることを示唆する。しかもこの中で、明確にこの時間領域で物質的な損傷が確認されたのは、本研究における β -Car だけであり、このことから、Cyt b-559 の電位変化、環状電子移動量の減少、および $Z \rightarrow P680^+$ 電子伝達の低速化は全て β -Car の損傷が起点になっている可能性が強く示唆された。

PS II 粒子を用いて 990nm で β -Car⁺ の吸収を観測した過去の報告によれば、 β -Car は 20~77K では半減期 600 μ s で $P680^+$ に酸化され、21°C では 100 μ s 以下で電子を $P680^+$ に渡すとされており (15)、環状電子移動の経路として十分働きうると考えられる。なお、本研究では、現在用いている装置で測定可能な波長である、 β -Car⁺ の生成に伴う 485nm の吸光度の減少を (17) レーザーフラッシュフォトリス法によって観測し、 β -Car \rightarrow $P680^+$ 過程の解析を試みたが、Chl a による吸光度変化または吸収ピークのシフトの影響が重なり、解析は困難であった。

以上の結果と過去の報告から、第 I 章でも予測したように Cyt b-559 と $P680$ 間の環状電子移動の経路として β -Car が機能していることが示唆された。

ところで、本研究で用いた TrisPS II RC では β -Car は反応中心当たり約 8 個結合していた (表 3, p90)。反応中心を形成する D1, D2 蛋白質複合体には 2 個 β -Car があると報告されている (10)。そのため、残りの 6 個 ($-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC では 4 個) が反応中心蛋白質複合体に結合するアンテナクロロフィル結合蛋白質 (CP43, CP47) にあることになる (注)。

本研究でさらに得られた β -Car に関する新たな知見としては、損傷する β -Car は、反応中心を形成する D1, D2 蛋白質複合体上の 2 個だけでなく、その周辺の CP43, CP47 上の β -Car まで損傷するということである。この周辺の β -Car の損傷の原因は、赤色光を照射しているため光によって直接損傷していることはあり得ない。また、無酸素条件でも β -Car の損傷はくい止められないことから、活性酸素の攻撃によって損傷しているわけではない。さらに β -Car よりも速く損傷または離脱する機能分子も見い出せないため、他の機能分子の離脱に伴うコンフォメーション変化などの影響も考えられない。そのうえ、 β -Car の損傷はフェリシアナイド存在下の酸化条件では特に激しい。これらのことから、CP43, CP47 上の β -Car も明らかに $P680^+$ によって酸化された結果損傷して

(注) 当研究室の研究結果によると、TrisPS II RC 複合体中、 β -Car は D1, D2, CP43, CP47 蛋白質中にのみ含まれていることをすでに確認している。

いるという驚くべきことが示された。

このとき、P680⁺がD1, D2蛋白質複合体上の2個のβ-Carから先に破壊して、さらに離れた位置のCP43, CP47上のβ-Carを酸化していくと考えるより、P680⁺の正電荷が外部のβ-Carへ伝達していき外部のβ-Carから損傷すると考えた方が考えやすい。例えば、β-Carの減少がもっとも顕著に見られる、酸素及びフェリシアナイド存在下の酸化側阻害条件におけるβ-Carの分子数の減少過程では、TrisPSⅡRCの場合0.8分の半減期で78%、つまり8個中の約6個のβ-Carが損傷し、約2個が残って緩やかに(半減期16分)損傷を受けた。同様に-Fe²⁺-TrisPSⅡRCでは6個のうち半減期0.6分で約4個が損傷し、2個が残った(表6, p102)。このように、最初の速い損傷を一様に受ける部分はCP43, CP47中のβ-Carである可能性が高い。

なおCP43に関する報告によると、0.8 M Tris存在下、pH 7.5~10の条件で20 μE·m²·s⁻¹の弱い光を照射した場合に、CP43はD1蛋白質よりも顕著に分解されるが、還元剤存在下では分解が抑えられる(112)。このことから少なくともCP43に関してはP680⁺の正電荷によって、そのβ-Carが破壊されCP43の分解へと進む可能性が考えられる。

以上から、P680⁺の正電荷はCP43, CP47上のβ-Carへ伝達していき、D1, D2蛋白質複合体上の2個のβ-Carよりも先に、CP43, CP47上のβ-Carが酸化されて損傷する可能性が示唆された。

今まで報告されてきた、β-Carの役割は2つあり、第1は他のカロテノイドと同様、アンテナ色素として反応中心に向かってエネルギー伝達を行うという役割であり(12)、第2は一重項酸素の消去剤として反応中心を保護する役割である(13, 14)。本研究から、これ以外に第3の役割として、環状電子移動の経路として働くことによって、還元側の過剰な電子と酸化側の過剰な正電荷を再結合させるとともに、過剰な正電荷を反応中心複合体を取り巻くCP47, CP43中のβ-Carまで移動させて反応中心を守るといふ、電荷の緩衝剂的な機能があることが示唆された。

なお、反応中心複合体を取り巻く蛋白質中のβ-Carが損傷するとき、CP47, CP43の外側に結合している集光性蛋白質の一種と考えられるCP28に含まれる、他のカロテノイド(ネオキササンチン、ピオラキササンチン、

ルテイン)は損傷をほとんど受けなかった(II-2-2参照, p89) (注)
(114)。

一方、 PQ_A の減少は β -Carの損傷に遅れて観測されたが、このとき、先に述べたように PQ_A が光照射開始10分後から離脱開始する場合もあれば、ほぼ光照射開始直後から離脱する場合もあった。この PQ_A の分子数の減少には規則性があり、酸素が存在し Mn^{2+} が存在しないときは、図42(p115)に示すように、残りの β -Carの分子数が約2個になった時点で PQ_A の離脱が開始する場合が多い。 PQ_A は Q_A , Q_B 分子の本体であるため、 β -Carの分子数が2個になった時点で Q_A 再酸化過程に何らかの変化が見られることが予想される。

例えば、 Mn^{2+} が存在しない全ての条件で行った光照射処理の結果をもとに、 Q_A 再酸化過程における100~200 μs 成分環状電子移動量と β -Carの分子数の相関性を調べると、 $P680^+$ 再還元過程における100~200 μs 成分の環状電子移動量と β -Carの分子数との相関性(図36, p97)とは、やや異なる結果を得た(図43, p116)。このとき、各点は1本の直線よりも β -Carが2分子の点で折れた直線によく一致した。直線は β -Carの分子数が2個以下の場合、2個以上のときの3.5倍(TrisPS II RC)、または1.7倍($-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC)の傾きで100~200 μs 成分環状電子移動量が減少した。つまり、 Q_A 再酸化過程における環状電子移動量と β -Carの分子数の相関性も、残りの β -Carの分子数が約2個になった時点で Q_A または Q_B 分子が離脱することを示していると考えられる。

残りの2分子の β -CarはD1, D2蛋白質複合体中にあると考えられることから、これらの事実は、D1, D2蛋白質複合体中の β -Carが損傷を受け始めることによって Q_A 離脱のトリガーが入る可能性を示している。さらに、フェリシアナイド存在下の酸化側阻害条件では、還元側からフェリシアナイドが電子を奪うことによって Q_A の2電子還元を抑えることが予測されたにも関わらず、 PQ_A の離脱を抑えることは出来なかったという事実から、 Q_A の2電子還元とは異なる機構で Q_A が放出される可能性もある。

なお無酸素条件下の場合は例外で、 β -Carは減少するにも関わらず PQ_A の分子数はほとんど減少しない。水分解能および蛍光測定による光阻害の研究に関する報

(注) ネオキササンチン、ピオラキササンチン、およびルテインは、その共鳴しているイソプレニル鎖の分子軌道の基底状態のエネルギー準位が β -Carの準位より低く、 β -Car⁺によって電子を奪われないと考えられる。

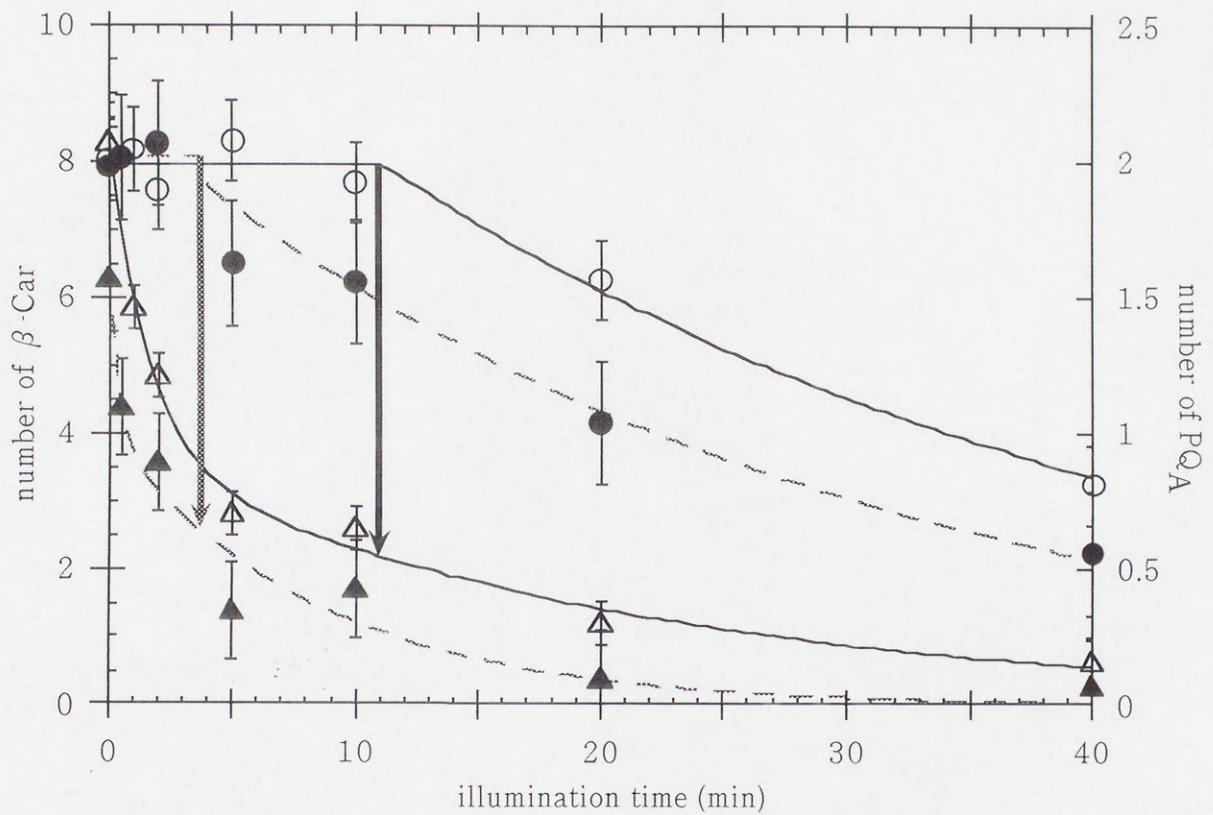


図42 β -Car数とPQ_A数の対応関係

β -Car数とPQ_A数の対応関係を示す一例として、Mn²⁺を添加せず、酸素存在下、0.2mM フェリシアナイドを添加した条件下で照射処理を行った TrisPS II RC と -Fe²⁺-TrisPS II RC における結果を示す。矢印で示すように、PQ_A数が減少を開始したと考えられる時間領域では、 β -Car数は残り約2個になっている。

(○) TrisPS II RCのPQ_A数

(●) -Fe²⁺-TrisPS II RCのPQ_A数

(△) TrisPS II RCの β -Car数

(▲) -Fe²⁺-TrisPS II RCの β -Car数

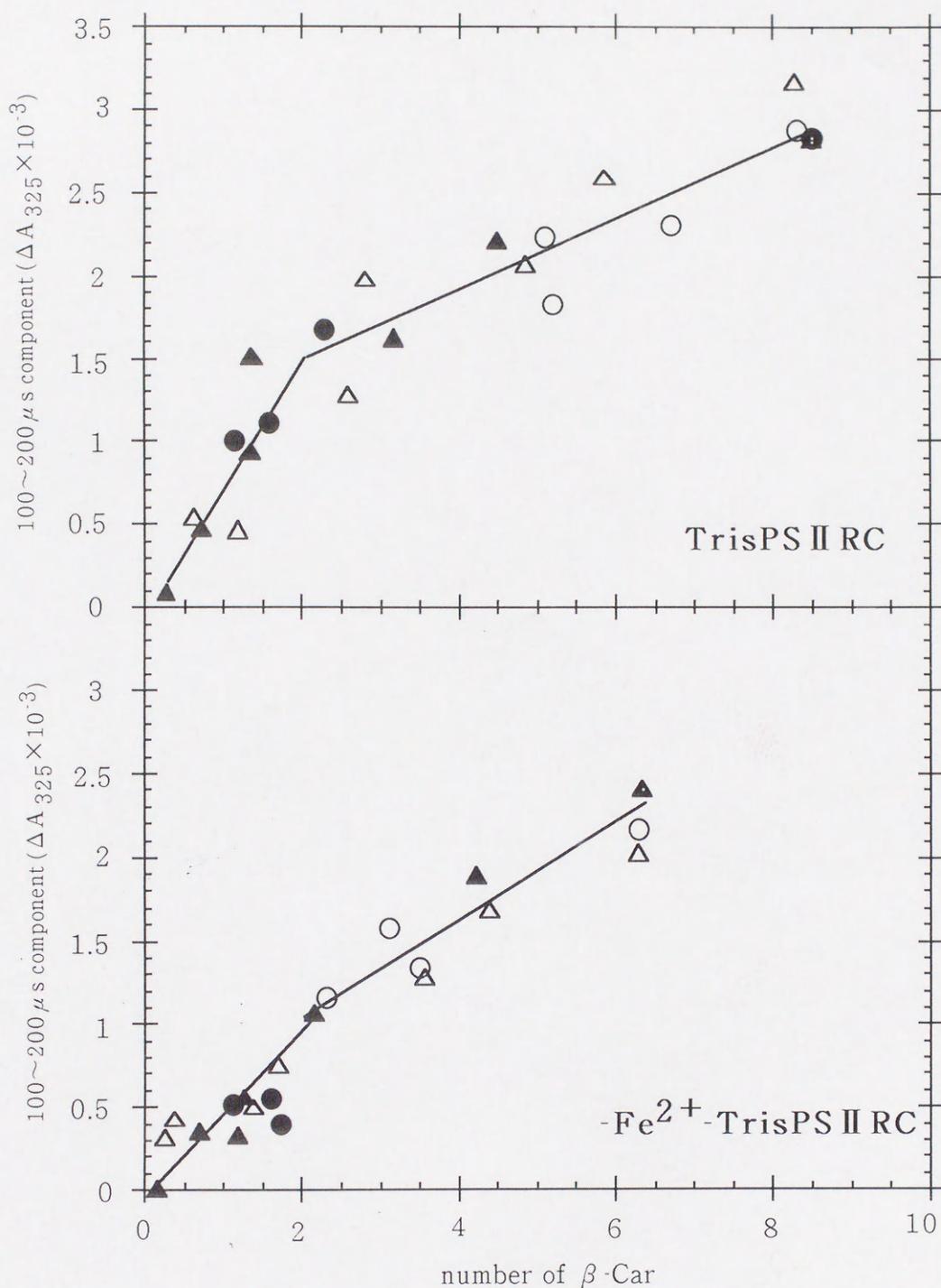


図43 100~200 μ s成分環状電子移動量(Q_A^-)と β -Carの数の
相関性(TrisPS II RC, $-\text{Fe}^{2+}$ -TrisPS II RC)

- (○) 無酸素条件下、フェリシアナイド、 Mn^{2+} ともに非存在下
- (●) 無酸素条件下、フェリシアナイドのみ存在下
- (△) 酸素存在下、フェリシアナイド、 Mn^{2+} ともに非存在下
- (▲) 酸素存在下、フェリシアナイドのみ存在下

光阻害条件およびレーザーフラッシュフォトリシス法による測定
条件は、ともに pH 7.5, 20°Cとした。

告でも無酸素条件下で受ける光阻害では、 Q_A の結合部位からの解離はある程度可逆的であるといわれているが(103, 104)、この結果から酸素の存在が PQ_A の離脱にはほぼ必須であることが確認された。ただし、これにも例外があり、 Mn^{2+} によって電子を外部から過剰に供給した還元側阻害条件の場合は酸素の有無に関わらず PQ_A は離脱した。

Q_A の離脱に際して起こると予測されている H^+ 化に関しては、Barber と Andersson のモデル (図 2 9, p78, (54)) とは矛盾した結果が出た (II-2-8 参照, p106)。しかし、Knaff によって 77 K で行われた Cyt b-559 の光酸化を基にした間接的な Q_A の pKa の測定では、8.9 であったと報告されている(33)。従って、pH 7.5 と 6.0 では変化が見られなかったに過ぎないという可能性も否定できない。

以上から、 β -Car の損傷が引き金となり酸素の助けを借りて Q_A の放出が開始すると考えられる。このことは β -Carの第4の役割として、D1, D2 蛋白質複合体上の2個の β -Carの損傷がD1蛋白質の分解の引き金として働くことを示唆している。

β -Car の損傷とD1蛋白質の分解過程の関連、および酸素の役割については今後の課題である。本研究において、PMSF存在下で酸素がある条件で光照射した TrisPS II RC は Cyt b-559 に関しては損傷は少なかった。そのため、反応中心自体の形は保っていると考えられる。同じ条件で光照射処理した試料の蛋白質の電気泳動結果では、光照射開始 20 分以内は各蛋白質の示すバンドに変化が見られず、 β -Car の損傷の方がD1蛋白質の分解より先に起こることが確認された。ただし、40分間光照射したものでは、D1蛋白質, CP43, CP28のバンドが薄くなった。このことからD1蛋白質分解の初期に起こる第一次切断部位(107, 115-117)の切断、またはD1蛋白質と他の蛋白質との架橋(118)が起こっている可能性が示唆された。これは活性酸素がD1蛋白質の切断または架橋を行うという報告(118)を支持する興味深い結果である。

以上から導き出された光阻害反応初期過程のモデルを図44 (p118)に示す。ここでは簡単のため pheo a, Zは省略した。

(0) 酸化側還元側ともに機能している状態。

(A1) 還元側が阻害される条件になると、まず、 Mn^{2+} によって外部から供給され

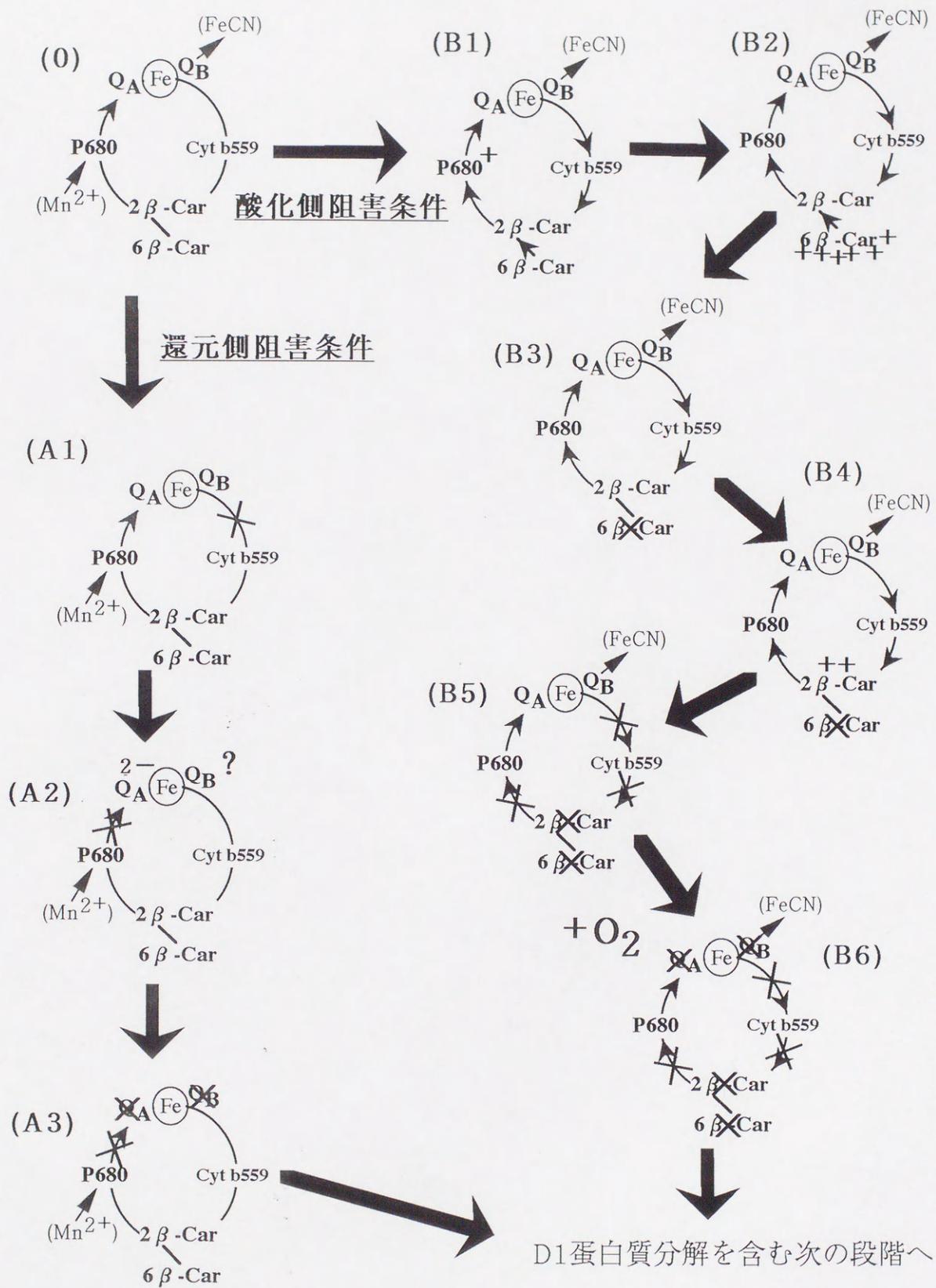


図44 光阻害反応初期過程のモデル

ただし、Fe; 非ヘム鉄, (FeCN); フェリシアナイド,
 2β-Car; 反応中心複体内に2個存在すると考えられているβ-Car,
 6β-Car; CP43, CP47中に含まれると考えられる6個のβ-Car
 をそれぞれ示す。

る電子のために、非ヘム鉄、Cyt b-559、 β -Car を介する環状電子移動は停止し、 Q_A (または Q_B) に電子が蓄積する。

- (A2) さらに Q_A は還元され 2 電子還元される。
- (A3) このとき本来ならば Q_B は Q_A よりも先に系から離脱することが考えられるが、ほとんどの条件で Q_A 活性の減少の割合は PQ_A の分子数の減少の割合より大きく、むしろ Q_A から離脱する可能性すら考えられる。ただし、 β -Car の減少に伴って、 PQ_A の分子数を維持したまま Q_A 活性が減少する状態も存在し (II-2-6 参照, p103)、 Q_A 活性の減少が Q_A 部位中の PQ_A の分子数の減少と必ずしも一致しているとは限らない。この問題を解決するには、第 1 フラッシュによって励起された Q_A 活性を測定することによって、 Q_A 以降の電子移動過程の損傷に影響されない真の Q_A 光還元活性を測定する以外に方法はなく、今後の課題となった。2 電子還元された Q_A は系から離脱し、D1 蛋白質分解のステップへと進むと考えられる。このとき 2 電子還元された Q_A が H^+ 化されることに関しては、むしろ否定的な結果が出た。また、無酸素条件下で Q_A の離脱が抑えられることが期待されたが、 Mn^{2+} 存在下では、酸素の有無の影響は少なかった。
- (B1) 一方、酸化側が阻害されると、 $P680^+$ の周辺に正電荷が蓄積する。
- (B2) 過剰な正電荷は反応中心に 2 個存在するといわれる β -Car を通り過ぎて CP43, CP47 中にあると考えられる 6 個の β -Car に伝達される。
- (B3) このとき当然環状電子移動が機能しているはずであるが、ある許容量以上の正電荷が生じれば反応中心複合体の外の β -Car は損傷する。
- (B4) その後、反応中心複合体中の β -Car に正電荷が蓄積する。
- (B5) 反応中心複合体中の β -Car が損傷することで環状電子移動が停止する。このとき酸素が存在すれば、 Q_A または Q_B の離脱が生じる。これは、環状電子移動が停止したことによって Q_A に電子が蓄積し、 Q_A が 2 電子還元された可能性を示すが、 β -Car の損傷が蛋白質のコンフォメーション変化を引き起こすとも考えられる。このとき酸素はいかなる役割を示すのかは不明であるが、活性酸素はヒスチジン残基をよく攻撃することがよく知られている。例えば、Chl a、非ヘム鉄、 Q_A 、 Q_B などに配位結合または水素結合するヒスチジン残基などが、これらのような状況のとき活性酸素で攻撃され、それによ

て Q_A , Q_B の離脱が開始するという可能性が考えられる。

一方、 $P680^+$ 再還元過程で観測された $700\mu s \sim 1ms$ 成分は光照射処理によって目立った変化を示さなかったことから、 β -Carを通らず、Cyt b-559 HPも経由しない過程であることが示され、第I章の考察が裏付けられた(図35, p96)。

最後に、果たして生理的条件下で、環状電子移動が機能しているかであるが、水分解系が存在する系による光阻害実験に関する過去の報告によれば、蛍光測定で観測された半減期約 $500\mu s$ 成分は、光照射に伴い半減期0.5分で減少し、この成分は通常DCMUを添加することで消滅する(104)。この減少速度は、本研究における β -Carの損傷速度にほぼ等しい。正常系の水分解系は、本研究で Mn^{2+} を用いたモデル系のように次々と電子を酸化側に供給するものではなく、 S_0 から S_4 までの状態があるKok's cycleと呼ばれる複雑な電子伝達速度の周期性を示す(80)。この状態の遷移速度は、半減期で表せば $S_0 \rightarrow S_1$ ($30\mu s$)、 $S_1 \rightarrow S_2$ ($110\mu s$)、 $S_2 \rightarrow S_3$ ($350\mu s$)、 $S_3 \rightarrow S_4$ ($1.3ms$)であり、確認はされていないが速度の上では環状電子移動が機能する可能性はある。さらに、葉緑体中ではPSIIは還元側がpH 8、酸化側がpH 5にさらされていることが知られている(65)。この条件では還元側の非ヘム鉄の酸化還元電位は340mVであり、Cyt b-559へ電子を渡しやすいとなり、また、酸化側のZから $P680^+$ への電子移動速度が低下することが知られている(pH 7.5のとき $5\mu s$, pH 5のとき $20\mu s$ (70))。そのため、環状電子移動が生じやすい環境であると考えられる。ただし、正常な葉緑体中で一時的に非ヘム鉄が酸化されたり、環状電子移動が生じていたとしても検出には困難をきわめることが予想され、光阻害をある程度受けて水分解系が損傷した葉緑体を用いた研究が必要であると考えられる。

本研究の総括

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

第 I 章 (p69, 70)

(1) 従来“逆反応”と呼ばれてきた $Q_A^- \rightarrow P680^+$ 電荷再結合のうち、半減期 100~200 μ s 成分は $Q_A^- \rightarrow P680^+$ へ直接電子を受け渡す反応ではなく、中間に電子を受け渡すものが存在する環状電子移動であった。

第 I 章 (p70)

(2) 100~200 μ s 成分環状電子移動の酸化還元電位依存性から、100~200 μ s 成分環状電子移動は Cyt b-559 の H P ($E_m = 440\text{mV}$) を介した電子移動である可能性が示された。

第 I 章 (p70-73)

(3) 100~200 μ s 成分環状電子移動の pH 依存性と、100~200 μ s 成分環状電子移動が非ヘム鉄 (Fe^{2+}) $\rightarrow Q_B$ 間の電子移動を阻害する阻害剤である DCMU 存在下で消失したことから、この環状電子移動は非ヘム鉄を介している可能性が示された。また、非ヘム鉄を持たない状態でも 5~7 割は環状電子移動を行うことから、この電子移動は Q_B を経由する可能性もある。

第 I 章 (p73)

(4) 100~200 μ s 成分環状電子移動のフラッシュ依存性から、100~200 μ s 成分環状電子移動は、最初のフラッシュによって Z^+ および還元型非ヘム鉄が蓄積することによって生じることが明らかになった。このことは、驚くべきことに半減期 100~200 μ s の電子移動の原因となる電子と正電荷が、2.5 秒間のフラッシュ間隔中に再結合しないということの意味する。

第 II 章 (p110)

(5) 強い赤色光照射による光照射処理 (600nm より長波長の光) を行った結果、フェリシアナイド、 Mn^{2+} 、酸素の有無の全ての条件下で、 $-Fe^{2+}$ -TrisPS II RC では、TrisPS II RC より速く、 Q_A 活性、100~200 μ s 成分環状電子移動量、 β -Car および PQ_A の分子数が減少した。このことから、非ヘム鉄の生理的役割として、環

状電子移動を促進してP S II内の電荷のバランスを保ち、光阻害反応を抑えるという機能が初めて示唆された。

第II章 (p110-112)

(6) 光照射処理によって 100~200 μ s 成分環状電子移動は、 β -Car とほぼ同じ挙動を示したことから、および Cyt b-559 の光酸化には β -Car が必要であるという報告があることなどから、100~200 μ s 成分環状電子移動の Cyt b-559 \rightarrow P680⁺間に β -Car が介在していることが予測された。さらに、光阻害初期過程で見られるCyt b-559 の酸化還元電位の変化、環状電子移動量の減少、およびZ \rightarrow P680⁺電子伝達の低速化は全て β -Car の損傷が起点になっている可能性が強く示唆された。

第II章 (p112, 113)

(7) 光照射処理によって、反応中心当たり 8 個存在する β -Car のうち 6 個が半減期約 1 分で減少し、2 個が約 16 分で減少し、この減少は人工電子受容体存在下では特に激しく、人工電子供与体存在下ではほとんど抑えられた。このことから、P680⁺の正電荷が反応中心外部の β -Car へ移動して、反応中心内部の 2 個の β -Car よりも先にアンテナクロロフィル結合蛋白質であるCP43, CP47中の 6 個の β -Car が酸化されて損傷する可能性が示された。この事実と(6)で述べたことは、 β -Carが反応中心を保護するための電荷の緩衝剂的な働きをすることを予想させる。

第II章 (p114-117)

(8) 光照射処理によって酸化側阻害条件では、PQ_Aは β -Car が残り約 2 個に減少するまで離脱しなかった。また離脱には、酸素が必要であった。このことから、Q_Aは反応中心の β -Car の損傷が開始することによって離脱が始まることになり、従来言われてきた、還元側が阻害された条件で 2 電子還元されてQ_Aが離脱するモデルとは違った機構で、酸化側阻害条件下でもQ_Aが放出される可能性が示唆された。これは、 β -Carの損傷がD1蛋白質分解の引き金になる可能性を示している。この事実と(6), (7)で述べたことも合わせて β -Carは光阻害に対する防御機構の中心的な位置を占めることが示唆された。

付録

1. P S II 粒子の調製方法

P S II 粒子の調製に用いた緩衝液

溶液 1a ... 0.35 M NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM K/NaH₂PO₄, pH 7.4

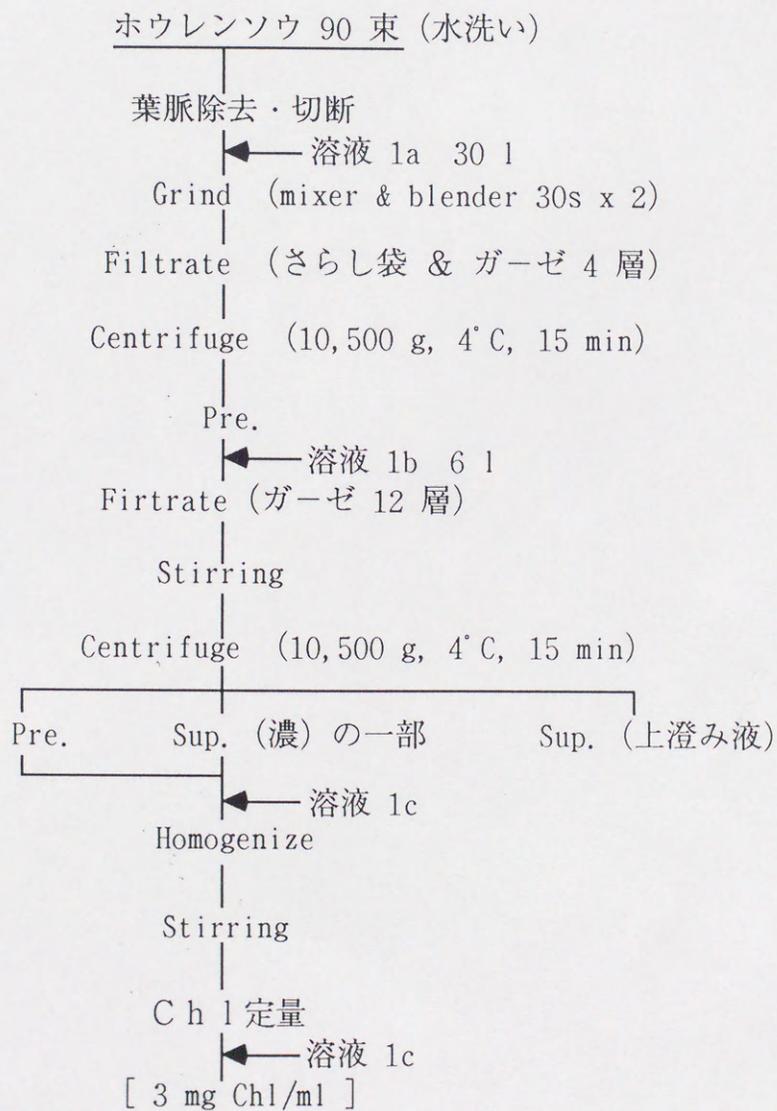
溶液 1b ... 0.4 M sucrose, 10 mM NaCl, 50 mM Tricine, pH 8.0

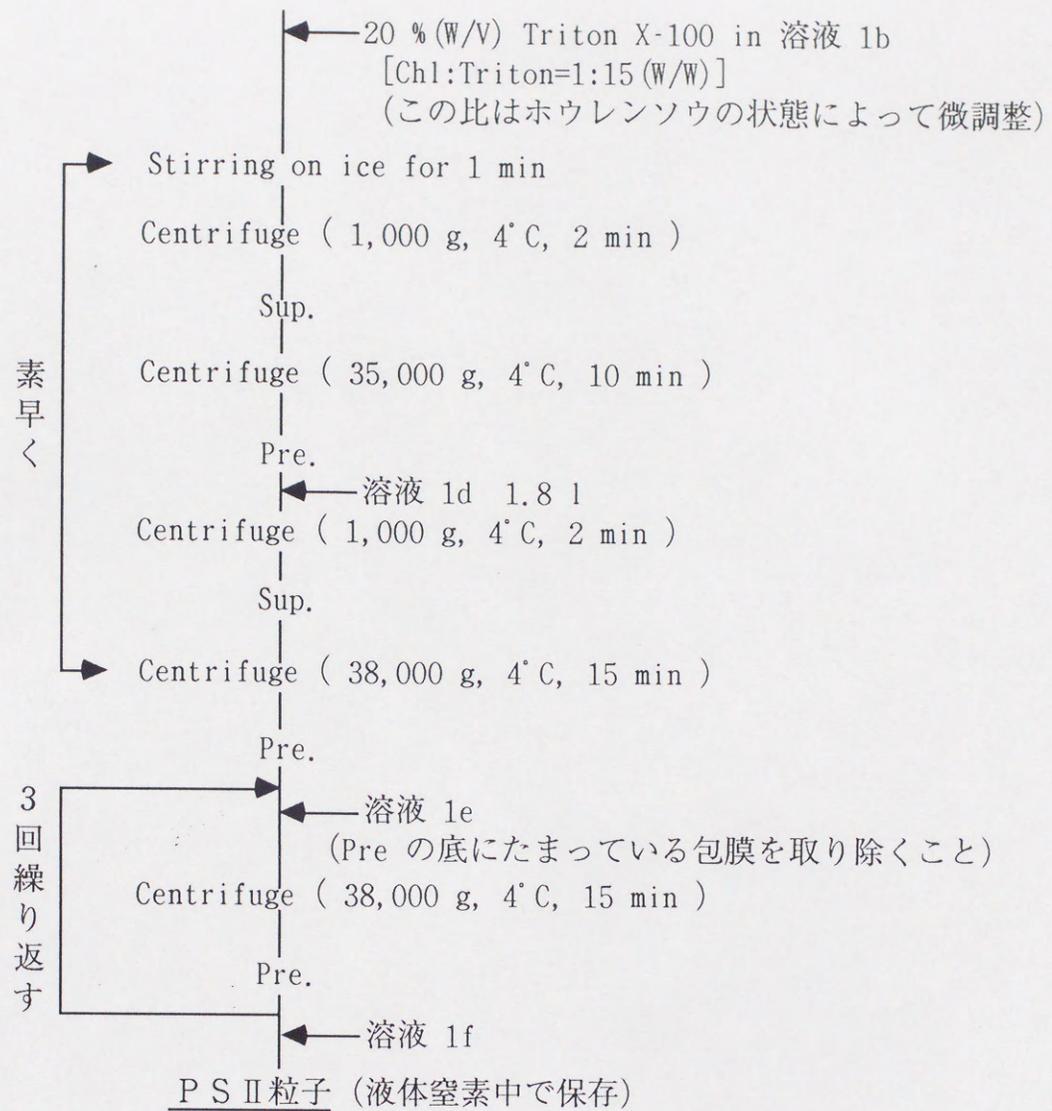
溶液 1c ... 0.3 M sucrose, 0.05 M NaCl, 50 mM K/NaH₂PO₄, pH 6.9

溶液 1d ... 40 mM K/NaH₂PO₄, pH 6.9

溶液 1e ... 0.2 M sucrose, 20 mM NaCl, 20 mM MOPS, pH 7.0

溶液 1f ... 70% glycerol を含む溶液 1e





2. 集光性蛋白質の除去法

PS II 反応中心複合体の調製に用いた緩衝液

溶液 2a...0.4M Sucrose, 50mM MES-NaOH (pH 6.0), 10mM NaCl

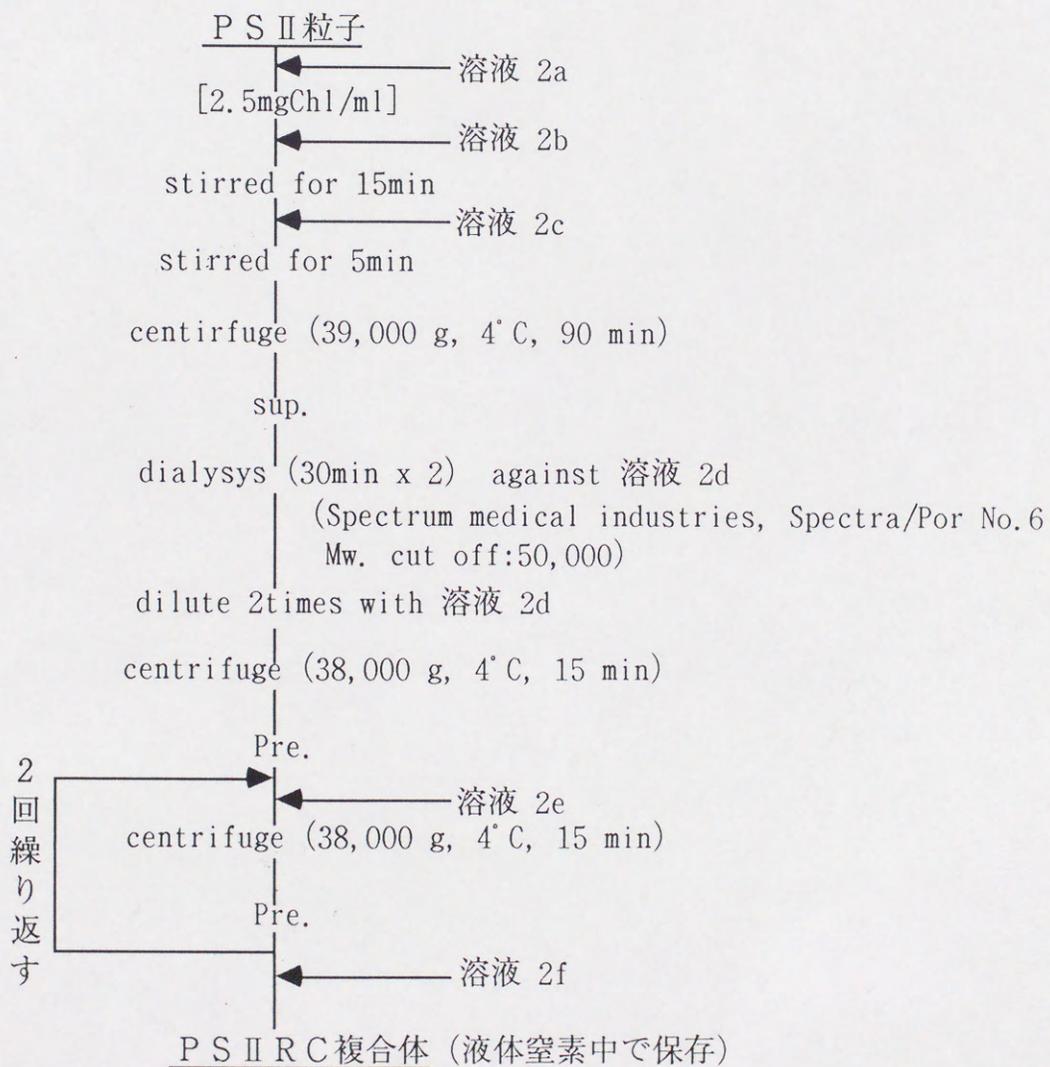
溶液 2b...1.0M Sucrose, 50mM MES-NaOH (pH 6.0), 0.8M NaCl, 10mM CaCl₂, 70mM
n-Octyl-β-D-glucopyranoside (OG)

溶液 2c...1.0M Sucrose, 50mM MES-NaOH (pH 6.0), 0.4M NaCl, 5mM CaCl₂,
6.125mM OG

溶液 2d...50mM MES-NaOH (pH 6.0), 10mM NaCl, 5mM CaCl₂

溶液 2e...0.4M Sucrose, 50mM MES-NaOH (pH 6.0), 10mM NaCl, 5mM CaCl₂

溶液 2f...70% glycerol を含む溶液 2e



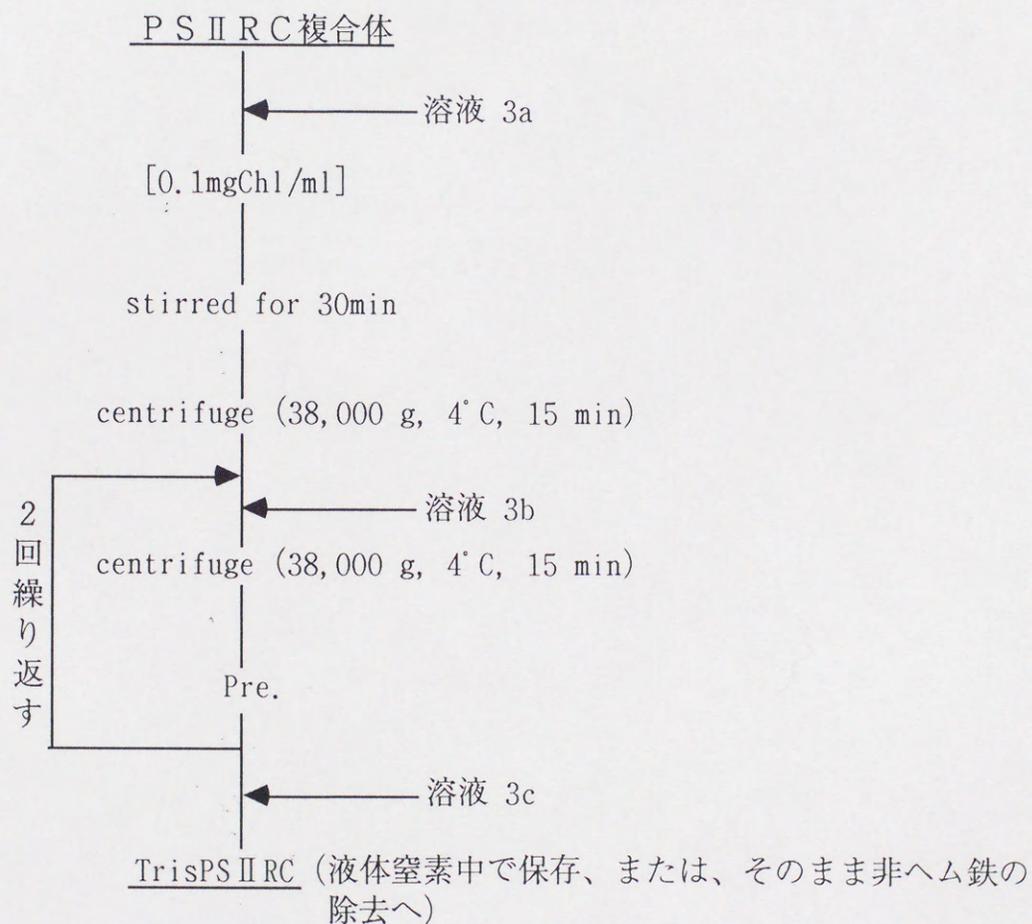
3. 水分解系の除去

TrisPS II RC の調製に用いた緩衝液

溶液 3a ... 0.8M Tris-HCl (pH 8.8 at 4°C), 0.4M Sucrose, 10mM NaCl, 10mM EDTA

溶液 3b ... 0.2M Sucrose, 20mM MOPS (pH 7.0), 20mM NaCl

溶液 3c ... 70% glycerol, 0.4M Sucrose, 50mM MES-NaOH (pH 6.0), 10mM NaCl, 5mM CaCl₂



4. 非ヘム鉄の除去

-Fe²⁺-TrisPS II RC の調製に用いた緩衝液

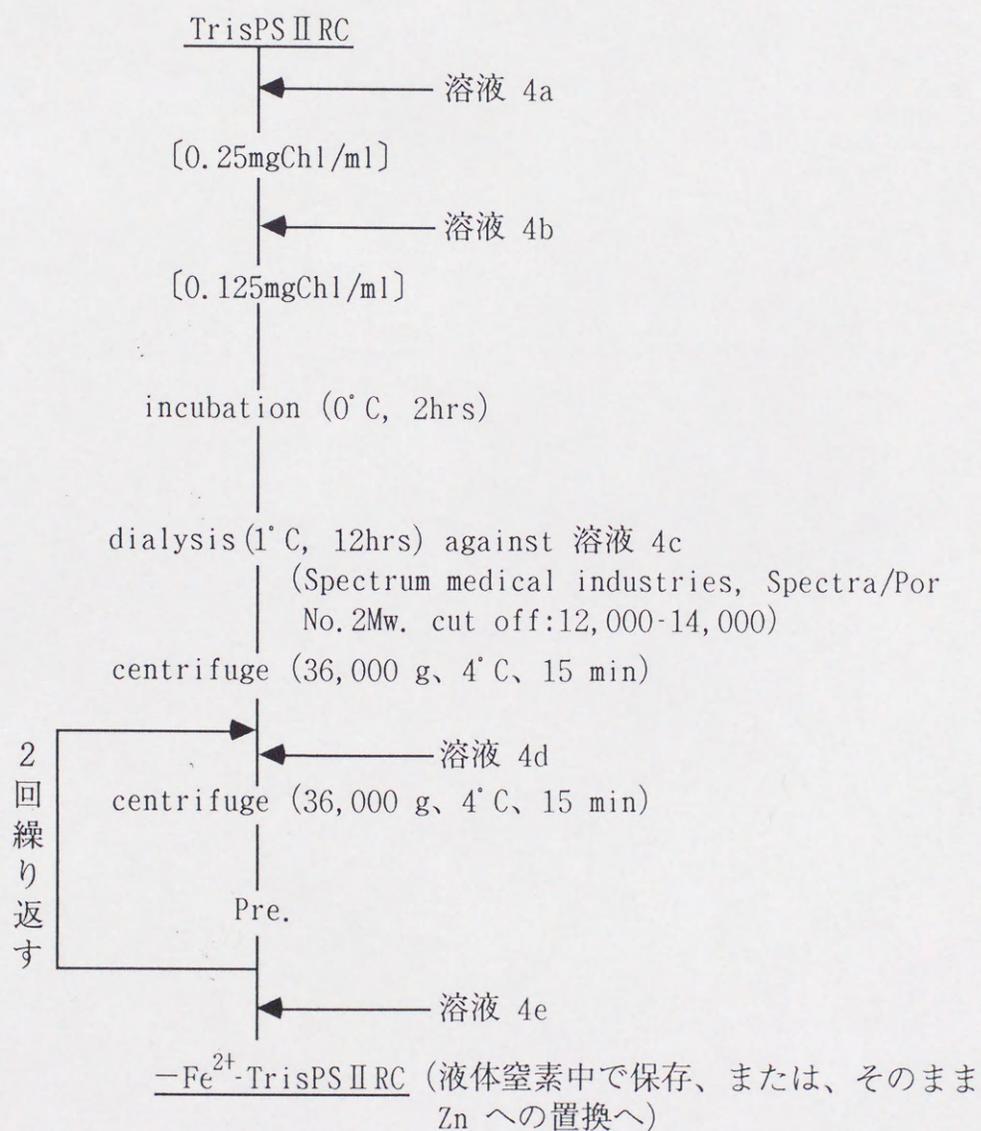
溶液 4a ... 5mM O-phen., 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 μM PMSF

溶液 4b ... 1.2M LiClO₄, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 μM PMSF

溶液 4c ... 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 50mM NaCl, 10 μM EDTA, 100 μM PMSF

溶液 4d ... 0.2M Sucrose, 20mM MOPS (pH 7.0), 20mM NaCl

溶液 4e ... 70% glycerol, 0.4M Sucrose, 50mM MES-NaOH (pH 6.0), 10mM NaCl, 5mM CaCl₂



5. 非ヘム鉄のZn²⁺への置換

Zn²⁺-TrisPS II RC の調製に用いた緩衝液

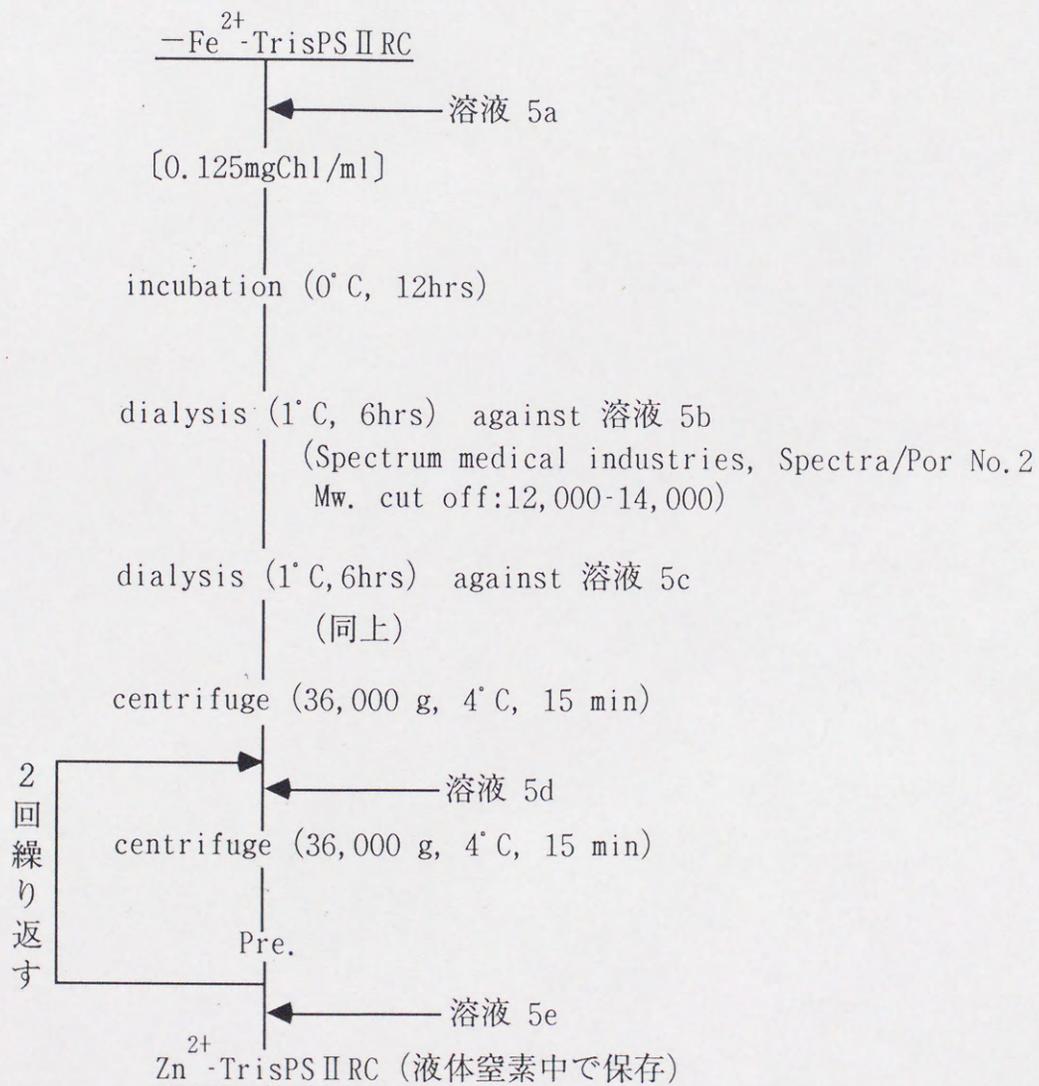
溶液 5a ... 0.4mM ZnSO₄, 10 mM Acetate (pH=5.5), 0.2 M LiClO₄, 1 μM EDTA, 100 μM PMSF

溶液 5b ... 10mM Acetate (pH=5.5), 50mM NaCl, 100 μM PMSF

溶液 5c ... 10mM Acetate (pH=5.5), 50mM NaCl, 10 μM EDTA, 100 μM PMSF

溶液 5d ... 0.2M Sucrose, 20mM MOPS (pH 7.0), 20mM NaCl

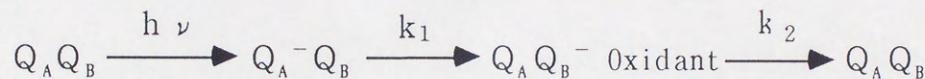
溶液 5e ... 70% glycerol, 0.4M Sucrose, 50mM MES-NaOH (pH 6.0), 10mM NaCl, 5mM CaCl₂



6. 325nm に見られる吸光度変化モデル

325nm では、P S II 内で生じた P Q_A アニオンラジカルの吸収が観測される。ともに P Q_A アニオンラジカルである Q_A⁻ と Q_B⁻ は 325nm に限らず、分光学的に区別するのは困難である。従って、P 680 が光励起によって電荷分離し、生じた Q_A⁻ の電子が Q_B へ移動し Q_B⁻ を生じる過程を観測することは非常に難しい。ただし、Q_A と Q_B の周囲の環境の違いから Schatz と Gorkom の報告に基づけば、Q_A⁻/Q_A と Q_B⁻/Q_B の吸光度変化の強度は、1:0.89 ほどの違いがある(100)。以下にそれをもとに単純なモデル計算により、100% 正常に Q_A⁻ → Q_B 電子伝達が行われたときの 325nm に観測されるであろう吸光度変化の挙動を予測してみた。

Q_A → Q_B 電子伝達のモデルは、次のように表される。



k_1 : Q_A⁻ → Q_B の反応速度定数

k_2 : Q_B⁻ → Oxidant の反応速度定数

このとき Q_A⁻ の消滅に関する微分方程式は

$$\frac{d [Q_A^-]}{d t} = -k_1 [Q_A^-]$$

Q_B⁻ の生成、消滅に関する微分方程式は

$$\frac{d [Q_B^-]}{d t} = -\frac{d [Q_A^-]}{d t} - k_1 [Q_B^-]$$

上式の解はそれぞれ

$$[Q_A^-] = C e^{-k_1 t}$$

$$[Q_B^-] = \frac{k_1 C}{k - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

Q_A⁻, Q_B⁻ が生じたときの吸光度変化の係数をそれぞれ、K_A, K_B とすると、実際観測される吸光度変化 ΔA (325) は

$$\Delta A (325) = K_A [Q_A^-] + K_B [Q_B^-]$$

先の解を代入して

$$\Delta A (325) = \left(K_A - \frac{k_1}{k_1 - k_2} K_B \right) C e^{-k_1 t} + \frac{k_1}{k_1 - k_2} K_B C e^{-k_2 t}$$

このときの速い緩和成分の割合は

$$\frac{K_A - \frac{k_1}{k_1 - k_2} K_B}{K_A} = 1 - \frac{k_1}{k_1 - k_2} \frac{K_B}{K_A}$$

$Q_A^- \rightarrow Q_B$ の電子伝達は $100 \sim 200 \mu s$ といわれ (72-74)、 $Q_B^- \rightarrow \text{Oxidant}$ は数 ms 以上はかかるであろうから (98)、 $k_1 \gg k_2$ とすれば

$$1 - \frac{k_1}{k_1 - k_2} \frac{K_B}{K_A} \doteq 1 - \frac{K_B}{K_A}$$

$\frac{K_B}{K_A}$ の値として Schatz と Gorkom による 0.89 を用いれば、 $100 \sim 200 \mu s$ 成分の割合の理想的な値は、0.11 ということになる。本研究においても、 Mn^{2+} イオン添加により環状電子移動を抑制した場合や、pH を下げ $HC00^-$ により $HC0_3^-$ を除いた場合などには、0.1~0.2 の値が得られた。このことから、モデルが妥当であることがいえた。

7. レーザーフラッシュフォトリシス法で測定された緩和過程の解析プログラム
(Quick Basic Ver.4.5 によるリスト)

```

'----- ALFLAP3      by S. Kuroiwa  -----
'$DYNAMIC
'$INCLUDE: 'qb.bi'      ' インクルードファイル
'$INCLUDE: 'gen.bi'
DEFINT A-Z
DECLARE SUB LD (a!(), n$, t!, U$, v!, d, l, m, z,
sng, se0!, ey!, pol, c!(), rslt)
DECLARE SUB LOGAL (a!(), d, ey!, pol, sel, am!)
DECLARE SUB FRAME (ACTP, DISP, n$, t!, U$,
v!, d, l, m, z)
DECLARE SUB STADER (y!(), c!(), d, t!, m, pol,
ey!, sng, exa, exb, sel)
DECLARE SUB NEWTON (p, s!())
'*****
main:
FOR i = 0 TO 1
  SCREEN 0, , i, 0: CLS
NEXT i
KEY OFF: COLOR 7
VIEW PRINT
DIM a!(1023), y!(1023), ex(6)
DIM c!(6), c0!(6), d!(7), s!(6, 7, 6)
DIM F$(300), lp!(7), cl!(6), ch!(6)
ofset = 80
sng = 0
In:
RANDOMIZE TIMER
of = 0: OD = 0: pol = 1
COLOR 2: LOCATE , , 0
ACTP = 0
DISP = 0
sel = 0
SCREEN 0, , 0, 0
CLS
OPEN "F:FILES.DIR" FOR INPUT AS #1: fcount =
0
L1:
IF EOF(1) THEN CLOSE #1: GOTO L2
INPUT #1, DAMY$: fcount = fcount + 1
GOTO L1
L2:
LOCATE 1, 1
OPEN "F:FILES.DIR" FOR INPUT AS #1
FOR i = 1 TO 4
  INPUT #1, DAMY$
NEXT
FOR i = 5 TO fcount - 2
  INPUT #1, F$(i)
  F$(i) = LEFT$(F$(i), INSTR(F$(i), " ") - 1)
NEXT
IF cs < 5 THEN cs = 5 ELSE cs = cs + 1
L3:
FOR i = 5 TO fcount - 2
  JC = INT((i - 5) / 20) * 12
  KC = (i - 5) MOD 20
  IF cs = i THEN COLOR 7
  LOCATE KC + 1, JC + 6
  PRINT F$(i)
  COLOR 2
NEXT
L4:
DO
  y$ = INKEY$
  LOOP WHILE y$ = ""
  IF y$ = CHR$(27) THEN END          '終わり
  IF y$ = CHR$(0, &H48) THEN        '上
    cs = cs - 1
    IF cs < 5 THEN
      cs = cs + 1
      BEEP
    END IF
    GOTO L3
  END IF
  IF y$ = CHR$(0, &H50) THEN        '下
    cs = cs + 1
    IF cs > fcount - 2 THEN
      cs = cs - 1
      BEEP
    END IF
    GOTO L3
  END IF
  IF y$ = CHR$(0, &H4D) THEN        '右
    cs = cs + 20
    IF cs > fcount - 2 THEN
      cs = cs - 20
      BEEP
    END IF
    GOTO L3
  END IF
  IF y$ = CHR$(0, &H4B) THEN        '左
    cs = cs - 20
    IF cs < 5 THEN
      cs = cs + 20
      BEEP
    END IF
    GOTO L3
  END IF
  IF y$ = CHR$(13) THEN            '決定
    n$ = F$(cs)
    CLS 1
    SCREEN , , ACTP, DISP
    CLOSE #1
    GOTO L5

```

```

END IF
GOTO L4
L5:
LOCATE 21, 1, 1: COLOR 7
PRINT "Are you sure?(y/n)"
DO
  y$ = INPUT$(1)
LOOP WHILE y$ = ""
IF y$ = "y" OR y$ = "Y" OR y$ = "0" THEN
  GOTO jmp076
ELSEIF y$ = CHR$(27) THEN END
END IF
LOCATE , , 0: COLOR 2: GOTO L4
jmp076:
pol = 1
IF of = 1 THEN
  GOTO jmp073
ELSE
  LD a!(), n$, t!, U$, v!, d, l, m, z, sng, se0!,
ey!, pol, c0!(), rslt
  se! = se0!
  sng! = sng
  GOSUB BACKUP
  of = 1
END IF
jmp073:
FOR i = 1 TO 6
  c!(i) = 0 '速度下限解除
  ch!(i) = 0 '速度上限解除
NEXT
count = 0
ACTP = 0
DISP = 0
GOSUB gra.prog
GOSUB bsline
IF rslt = 1 THEN
  GOSUB curv
  y$ = INPUT$(1)
  IF y$ = " " THEN
    rslt = 0
    LOGAL a!(), d, ey!, pol, se!, am!: GOSUB gra3
    GOSUB L8 '解析する範囲を決める。
    FOR i = 1 TO sng * 2
      c!(i) = c0!(i)
    NEXT
    LOCATE , , 0
    FOR i = 1 TO sng
      c!(i * 2) = -1E+15 '下限を設定
      ch!(i * 2) = 1E+15 '上限を設定
    NEXT
    GOTO jmp003
  END IF
  IF y$ = CHR$(13) THEN rslt = 0: se0! = 0:
  GOTO jmp073
  IF y$ = CHR$(27) THEN END
GOTO ln
ELSE
  sng0 = sng
  INPUT "How many components(1 - 3)"; sng
  IF sng = 0 THEN sng = -2 * (sng0 = 0) + sng0
  sng! = sng
  INPUT "速度固定するか"; y$
  IF y$ = "0" OR y$ = "y" OR y$ = "Y" THEN
    PRINT "0 : 固定しない"
    FOR i = 1 TO sng
      PRINT "第"; i; "成分の半減期の下限 ( $\mu$  s) は"; :
      INPUT c!(i * 2)
      PRINT "第"; i; "成分の半減期の上限 ( $\mu$  s) は"; :
      INPUT ch!(i * 2)
    NEXT
  END IF
  FOR i = 1 TO sng
    c0!(i * 2) = (c!(i * 2) + ch!(i * 2)) / (2! + (c!(i
    * 2) * ch!(i * 2) = 0))
    IF c!(i * 2) <> 0 THEN
      c!(i * 2) = -LOG(2) / c!(i * 2) '速度定数に変換
    ELSE
      c!(i * 2) = -1E+15 '下限を設定
    END IF
    IF ch!(i * 2) <> 0 THEN
      ch!(i * 2) = -LOG(2) / ch!(i * 2)
    ELSE
      ch!(i * 2) = 1E+15 '上限を設定
    END IF
    IF c0!(i * 2) <> 0 THEN c0!(i * 2) = -LOG(2) /
    c0!(i * 2)
  NEXT
END IF
'重みをつける準備
lp!(1) = 0
lp!(sng * 2 + 1) = 1
FOR i = 2 TO sng * 2
  lp!(i) = lp!(i - 1) + .5 / sng!
NEXT
LOGAL a!(), d, ey!, pol, se!, am!: GOSUB gra3
jmp079:
GOSUB lsm
LOCATE , , 0
jmp003:
  FOR i = 1 TO sng * 2
    FOR j = 1 TO sng * 2 + 1
      s!(i, j, 0) = 0 '行列初期化
    NEXT j
  NEXT i
  '*****行列をつくる*****
  SCALE! = m * pol
  FOR h = exa TO exb
    x! = h - d - 1
    FOR i = 1 TO sng

```

```

d!(i * 2 - 1) = EXP(c!(i * 2) * x! * t!) *
SCALE!
d!(i * 2) = x! * t! * c!(i * 2 - 1) * EXP(c!(i *
2) * x! * t!) * SCALE!
NEXT i
d!(sng * 2 + 1) = ey!
FOR i = 1 TO sng
d!(sng * 2 + 1) = d!(sng * 2 + 1) + (c!(i * 2 -
1) * EXP(c!(i * 2) * x! * t!)) * SCALE!
NEXT i
d!(sng * 2 + 1) = y!(h) - d!(sng * 2 + 1)
FOR i = 1 TO sng * 2
FOR j = i TO sng * 2 + 1
s!(i, j, 0) = s!(i, j, 0) + d!(i) * d!(j)
IF j > sng * 2 THEN GOTO jmp001
s!(j, i, 0) = s!(i, j, 0)
NEXT j
jmp001:
NEXT i
NEXT h
FOR i = 1 TO sng * 2
IF s!(i, i, 0) = 0 THEN s!(i, i, 0) = .0000001
NEXT i
NEWTON sng * 2, s!() '行列式をとく

L6: '*****誤差を補正する*****
FOR i = 1 TO sng * 2
IF count < 11 THEN c!(i) = c0!(i) + s!(i, sng * 2
+ 1, sng * 2) / sng! / 2!
IF i = INT(i / 2) * 2 THEN '速度定数
(c!(偶数))の補正
'速度定数がマイナスにはなるのを防ぐ。
IF c!(i) > 0 THEN c!(i) = -c!(i)
'計算する時間領域より早い時定数を排除。
IF -1 / c!(i) < (exa - d) / 4 THEN c!(i) = c!(i)
/ 2
'速度定数の上限
IF c!(i) > ch!(i) THEN c!(i) = ch!(i)
'速度定数の下限
IF c!(i) < cl!(i) THEN c!(i) = cl!(i)
END IF
NEXT i
NEXT i
'誤差を出す
STADER y!(), c!(), d, t!, m, pol, ey!, sng,
exa, exb, se!
GOSUB lsmd
y$ = INKEY$
IF y$ = " " THEN GOSUB RECOVER: GOSUB
curv
IF y$ = CHR$(13) THEN GOSUB RECOVER:
GOSUB curv: GOTO jmp005
IF y$ = CHR$(27) THEN GOTO ln
IF count < 11 THEN GOTO jmp003
'値を揺する。
r! = RND

```

```

FOR i = 1 TO sng * 2
IF r! >= lp!(i) AND r! < lp!(i + 1) THEN
c!(i) = c0!(i) + c0!(i) / 80! * (RND - .5)
mv = i
ELSE
c!(i) = c0!(i)
END IF
NEXT
GOTO L6
jmp005:
LOCATE , , 1
y$ = INPUT$(1)
IF y$ = " " THEN LOCATE , , 0: GOTO jmp003
IF y$ = "s" OR y$ = "S" THEN GOSUB sav
IF y$ = CHR$(13) THEN se0! = 0: GOTO jmp073
IF y$ = CHR$(27) THEN END
GOTO ln
' ***** GRAPHIC PROGRAM *****
gra.prog:
FRAME ACTP, DISP, n$, t!, U$, v!, d, l, m, z
COLOR 7
SCREEN 0, , ACTP, DISP
IF t0! = 0 THEN t0! = t!
PSET ((-d * t0! / t! + d) / 2 + 40, 200 - z * a!
(0) / 1.25 / m * 2 + ofset)
FOR i = 1 TO 999
LINE -(((i - d) * t0! / t! + d) / 2 + 40, 200 - z
* a!(i) / 1.25 / m * 2 + ofset), , &H9999
NEXT i
IF t0! >= t! THEN GOTO jmp018
FOR j = 0 TO (t! / t0! - 1) * 2 - 1
FOR i = 0 TO d / 2
PSET ((i + d / 2 * j) * t0! / t! / 2 + 40, 200 +
z * a!(d / 2 - i) / 1.25 / m * 2 + ofset)
NEXT i, j
FOR j = 0 TO (t! / t0! - 1) * 2 - 1
FOR i = (999 - d) / 2 + d TO 999
ll = (i + 999 / 2 - d * 3 / 2 + (999 - d) / 2 *
j) * t0! / t!
ON sng GOTO jmp019, jmp019, jmp020
jmp019:
ay! = (c!(1) * EXP(c!(2) * ll * t!) + c!(3) *
EXP(c!(4) * ll * t!)) * m * pol + ey!
s0! = y!(999 - i + (999 - d) / 2 + d) - (c!(1) *
EXP(c!(2) * (998 - i + (999 - d) / 2) * t0!) + c!
(3) * EXP(c!(4) * (998 - i + (999 - d) / 2) *
t0!)) * m * pol - ey!
GOTO jmp021
jmp020:
ay! = (c!(1) * EXP(c!(2) * t! * ll) + c!(3) *
EXP(c!(4) * t! * ll) + c!(5) * EXP(c!(6) * t! * ll))
* m * pol + ey!

```

```

    s0! = y!(999 - i + (999 - d) / 2 + d) - (c!(1)
* EXP(c!(2) * t0! * (998 - i + (999 - d) / 2)) +
c!(3) * EXP(c!(4) * t0! * (998 - i + (999 - d) /
2)) + c!(5) * EXP(c!(6) * t0! * (998 - i + (999
- d) / 2))) * m * pol - ey!
jmp021:
    PSET ((ll + d) / 2 + 40, 200 - z * (ay! - s0!)
/ 1.25 / m * 2 + offset)
    NEXT i, j
jmp018:
    SCREEN 0, , 0, 0
    RETURN
' ***** GRAPHIC PROGRAM 2 *****
gra2:
    atcp0 = ACTP: disp0 = DISP
    SCREEN 0, , 0, 0
    CLS 1
    FRAME ACTP, DISP, n$, t!, U$, v!, d, l, m, z
    LOCATE 1, 70: PRINT "No."; n$
    LOCATE 9, 76: PRINT z
    FOR i = 0 TO 999
        PSET (i / 2 + 40, 200 - z * y!(i) / 1.25 /
NUM * 2 + offset)
    NEXT i
    IF x0 = 0 THEN y$ = INPUT$(1)
    ACTP = atcp0: DISP = disp0
    SCREEN 0, , 0, 0
    RETURN
' ***** GRAPHIC PROGRAM 3 *****
gra3:
    actp0 = ACTP: disp0 = DISP
    ACTP = 0: DISP = 0
    SCREEN 0, , ACTP, DISP
    CLS 1
    FRAME ACTP, DISP, n$, t!, U$, v!, d, l, m, z
    LOCATE 9, 76: PRINT z
    FOR i = d + 1 TO 1023
jmp157:
        PSET (i / 2 + 40, 200 - 10 * (a!(i) - am!) /
120 / 1.25 * 2 + 80)
    NEXT i
    SCREEN 0, , 0, 0
    RETURN
' ***** DATA SAVING *****
sav:
    PRINT "Data Saving"
jmp032:
    PRINT "file name"; n$
    PRINT "Are you sure?(y/n)": y$ = INPUT$(1)
    IF y$ = CHR$(27) THEN GOTO jmp030
    IF y$ = "Y" OR y$ = "y" OR y$ = "0" THEN
GOTO jmp031
    INPUT "file name"; n$: GOTO jmp032
jmp031:
    OPEN "f:" + n$ FOR OUTPUT AS #1
    FOR i = 0 TO 1023
        PRINT #1, a!(i)
    NEXT i
    PRINT #1, n$
    PRINT #1, t!
    PRINT #1, U$
    PRINT #1, v!
    PRINT #1, d
    PRINT #1, l
    PRINT #1, m
    PRINT #1, z
    PRINT #1, sng; se0!; ey!; pol
    FOR i = 1 TO sng * 2
        PRINT #1, c0!(i)
    NEXT i
    CLOSE
    BEEP
jmp030:
    of = 0: RETURN
' ***** DATA LOAD *****
lod:
    ACTP = 1: DISP = 3: SCREEN 0, , 0, 0
jmp047:
    CLS : LOCATE 1, 1: PRINT "File Name "; n$: IF
n$ <> "" THEN GOTO jmp045
j15210:
    LOCATE 1, 11: LINE INPUT n$
jmp045:
    PRINT "Are you sure?(y/n)": y$ = INPUT$(1)
    IF y$ = "y" OR y$ = "Y" OR y$ = "0" THEN
        LD a!(i), n$, t!, U$, v!, d, l, m, z, sng, se0!,
ey!, pol, c!(i), rslt
        GOSUB BACKUP
        of = 1
    ELSE
        GOTO j15210
    END IF
    ACTP = 0
    DISP = 0
    GOSUB gra.prog
    y$ = INPUT$(1)
    IF y$ <> CHR$(13) THEN GOTO jmp046
    x = VAL(RIGHT$(n$, 2)): IF x = 0 THEN GOTO
jmp047
    x = x + 1: n$ = LEFT$(n$, LEN(n$) - 2) +
RIGHT$(STR$(x), 2): IF x < 10 THEN MID$(n$,
LEN(n$) - 1, 1) = "0": GOTO jmp047
jmp046:
    RETURN
' ***** BASE LINE FITTING *****
blf:
    bl = 0
    FOR i = 0 TO INT(d * 2 / 3)
        bl = bl + a!(i)
    NEXT i
    bl = bl / (INT(d * 2 / 3) + 1)

```

```

ey! = 200 - z * bl / 1.25 / m * 2 + ofset
RETURN

' ***** BASE LINE *****
bsline:
ACTP = 0
DISP = 0
SCREEN 0, , ACTP, ACTP
GOSUB ofset
IF y$ = CHR$(27) THEN GOTO jmp096
IF rslt = 1 THEN
RETURN
ELSE
ey! = 200 - z * a!(0) / 1.25 / m * 2 + ofset
END IF
GOSUB blf
ACTP = 1
DISP = 0
GOSUB gra.prog
jmp106:
SCREEN 0, , 1, 1
LINE (44, ey!)-(536, ey!), , , &H5555
LOCATE 24, 1
PRINT -(ey! - 200 - 80) * 1.25 * OD / z / 2
DO
SCREEN 0, , 1, 0
y$ = INKEY$
SCREEN 0, , 1, 1
LOOP WHILE y$ = ""
LINE (44, ey!)-(536, ey!), 0
ey! = ey! + (y$ = CHR$(0, &H48)) - (y$ =
CHR$(0, &H50)) * .5
IF y$ = "R" OR y$ = "r" THEN GOSUB rvs:
GOTO jmp105
IF y$ = CHR$(13) THEN GOTO jmp105
IF y$ = "F" OR y$ = "f" THEN GOSUB blf
GOTO jmp106
jmp105:
ey! = -(ey! - 200 - ofset) * 1.25 * m * OD / z
/ 2
jmp096:
SCREEN 0, , 0, 0
RETURN
ofset:
LINE (60, ofset + 200)-(39 + .5 * d, ofset +
200)
LINE (41 + .5 * d, ofset + 200)-(500, ofset +
200)
DO
y$ = INKEY$
LOOP WHILE y$ = ""
ofset1 = ofset + ((y$ = "8") - (y$ = "2")) *
20

LINE (60, ofset + 200)-(39 + .5 * d, ofset +
200), 0: LINE (41 + .5 * d, ofset + 200)-(500,
ofset + 200), 0
ofset = ofset1
IF y$ = CHR$(13) THEN
ACTP = 0
DISP = 0
GOSUB gra.prog
RETURN
END IF
IF y$ = CHR$(27) THEN RETURN
GOTO ofset
' ***** Reversing the data *****
rvs:
FOR i = d + 1 TO 1023
a!(i) = y!(i)
NEXT i
pol = -1'-POL
RETURN
' ***** Y!() <--- A!() *****
BACKUP:
NUM = m
FOR i = 0 TO 1023
y!(i) = a!(i)
NEXT i
RETURN
' ***** A!() <--- Y!() *****
RECOVER:
FOR i = 0 TO 1023
a!(i) = y!(i)
NEXT i
RETURN
' LOGを取ったものに最小二乗法によって直線を引き
'そのY切片と傾きから各成分の量と速度定数を出す。
lsm:
ACTP = 0
DISP = 0
SCREEN 0, , ACTP, DISP
FOR i = 1 TO sng * 2
ex(i) = 0
NEXT i
FOR io = 1 TO sng * 2
IF io > INT(io / 2) * 2 THEN
ex(io) = ex(1) - d * (ex(1) = 0) 'カーソル左側
(奇数)
ELSE
ex(io) = ex(io - 2) + 100 - d * (ex(io - 2) = 0)
'カーソル右側 (偶数)
ex(sng * 2) = 1023
END IF
spd = 10 'カーソルスピード
GOSUB lsma
IF io = INT(io / 2) * 2 THEN GOSUB lsmb '偶数の
とき、カーソル間で直線を引きY切片と傾きを求め、各
成分の見せかけの量と速度定数を出す。

```

```

NEXT io
IF sng > 1 THEN GOSUB lsmc '各成分の正しい
量と速度定数を計算する。
  exa = ex(1)
  exb = 1023 'ex(2)
  IF sng = 1 THEN GOTO jb
  FOR i = 2 TO sng 'fittingする範囲を決め
  る。
    IF exa > ex(i * 2 - 1) THEN exa = ex(i * 2 - 1)
    ' IF exb < ex(i * 2) THEN exb = ex(i * 2)
  NEXT i
jb:
  STADER y!(), c!(), d, t!, m, pol, ey!, sng, exa,
  exb, se! '標準誤差
  GOSUB lsmd '値入れ替え判定

RETURN

lsma:
  COLOR 7
  LINE (40 + .5 * ex(io), 9)-(40 + .5 * ex(io),
  395), , , &H5555
  LOCATE 24, 1
  PRINT ex(io)
  ay! = 200 - 10 * (a!(ex(io)) - am!) / 120 /
  1.25 * 2 + 80
  IF ay! < 0 OR ay! > 399 THEN ay! = -1
  LINE (40 + .5 * ex(io) - 20, ay!)-(40 + .5 * ex
  (io) + 20, ay!), , , &H5555
  DO
  y$ = INKEY$
  LOOP WHILE y$ = ""
  IF y$ = "0" THEN spd = spd + 150
  IF y$ = "8" OR y$ = "2" THEN
  LINE (50, ay!)-(530, ay!), 0
  am! = am! + ((y$ = "8") - (y$ = "2")) * spd *
  10
  GOSUB gra3
  END IF
  spd = spd - (y$ = CHR$(0, &H48)) + (y$ =
  CHR$(0, &H50)) + (y$ = CHR$(32)) * (spd - 1)
  LINE (40 + .5 * ex(io), 9)-(40 + .5 * ex(io),
  395), 0
  ay! = 200 - 10 * (a!(ex(io)) - am!) / 120 /
  1.25 * 2 + 80
  IF ay! < 0 OR ay! > 399 THEN ay! = -1
  LINE (50, ay!)-(530, ay!), 0
  PSET (40 + .5 * ex(io), ay!)
  IF y$ = "," THEN ex(io) = d
  ex(io) = ex(io) + ((y$ = CHR$(0, &H4B)) + (y$
  = CHR$(0, &H4D)) * (ex(io) < 1024 - spd)) *
  spd
  ex(io) = ex(io) - (1023 - ex(io)) * (y$ = ".")
  IF y$ = CHR$(13) THEN
  LINE (40 + .5 * ex(io), 6)-(40 + .5 * ex(io),
  8)
  LINE (40 + .5 * ex(io), 396)-(40 + .5 * ex(io),
  398)
  RETURN
  END IF
  GOTO lsma

lsmb:
  mx! = 0 'X座標平均
  my! = 0 'Y座標平均
  b0! = 0
  b1! = 0
  ex0& = ex(io - 1) 'カーソル左側 (奇数)
  ex1& = ex(io) 'カーソル右側 (偶数)
  a0 = 0
  i0& = 0
  d& = d
  FOR i = ex0& TO ex1&
  my! = my! + a!(i)
  IF a!(i) <= 0 THEN a0 = a0 + 1: i0& = i0& + i -
  d - 1
  NEXT i
  mx& = (ex0& - d& - 1& + ex1& - d& - 1&) *
  (ex1& - ex0& + 1&)
  mx! = mx& * .5 - i0&
  n = ex1& - ex0& + 1 - a0
  IF n = 0 THEN RETURN
  mx! = mx! / n: my! = my! / n
  FOR i = ex0& TO ex1&
  IF a!(i) = 0 THEN GOTO jmp114
  x! = i - d - 1
  b0! = b0! + x! * x!
  b1! = b1! + x! * a!(i)
jmp114:
  NEXT i
  b! = (b1! - n * mx! * my!) / (b0! - n * mx! *
  mx!)
  IF y$ <> CHR$(13) THEN GOTO ja
  COLOR 3 '水色
  FOR i = d TO 1023
  jmp158:
  yr! = my! + b! * (i - d - 1 - mx!)
  PSET (i / 2 + 40, 200 - 10 * (yr! - am!) /
  120 / 1.25 * 2 + 80)
  jmp159:
  NEXT i
  ja:
  IF n = 0 THEN RETURN
  c!(io - 1) = EXP((my! - b! * mx!) / 2400 - LOG
  (m)) '成分の量
  c!(io) = b! / t! / 2400 '成分の速度定数
  RETURN

lsmc:
  FOR i = sng TO 2 STEP -1
  c0!(i * 2 - 3) = c!(i * 2 - 3) - c!(i * 2 - 1)

```

```

IF c0!(i * 2 - 3) = 0 THEN c0!(i * 2 - 3) = c!(i
* 2 - 1) * .001
IF c0!(i * 2 - 2) = 0 THEN
  c0!(i * 2 - 2) = (c!(i * 2 - 3) * c!(i * 2 - 2) -
c!(i * 2 - 1) * c!(i * 2)) / c0!(i * 2 - 3) * 1.2
  IF ABS(c!(i * 2 - 3)) < ABS(c!(i * 2 - 1))
THEN c0!(i * 2 - 2) = c0!(i * 2 - 2) * 3
  END IF
NEXT i
FOR i = 1 TO sng * 2 - 2
  c!(i) = c0!(i)
NEXT i
IF c0!(sng * 2) <> 0 THEN c!(sng * 2) = c0!(sng
* 2)
RETURN
' **** 値入れ替え判定 ****
lsmd:
IF se0! = 0 THEN se0! = se!
IF se! > se0! THEN
  count = count + 1
  IF count > 20 THEN SOUND 1000, 18.2
  RETURN
END IF
'重みをつける
IF count > 11 THEN
  a! = lp!(mv + 1) - lp!(mv)
  a! = (1 - a! * 1.1) / (1 - a!)
  IF a! < 0 THEN GOTO L7
  FOR i = 2 TO mv
    lp!(i) = lp!(1) + (lp!(i) - lp!(1)) * a!
  NEXT
  FOR i = mv + 1 TO sng * 2
    lp!(i) = lp!(sng * 2 + 1) - (lp!(sng * 2 + 1) -
lp!(i)) * a!
  NEXT
END IF
L7:
se0! = se!: count = count * .8
FOR i = 1 TO sng * 2
  c0!(i) = c!(i)
NEXT i
COLOR 3 '水色
GOSUB result0
GOSUB result
SOUND 100, 1
SOUND 150, 1
RETURN
' *****
result0:
LOCATE 1, 1
  PRINT "全体"
LOCATE 2, 10
  PRINT "±"
LOCATE 3, 1
  PRINT "成分 1 "
  LOCATE 4, 10
  PRINT "±"
  IF sng = 1 THEN RETURN
  LOCATE 6, 1
  PRINT "成分 2 "
  LOCATE 7, 10
  PRINT "±"
  IF sng = 2 THEN RETURN
  LOCATE 9, 1
  PRINT "成分 3 "
  LOCATE 10, 10
  PRINT "±"
  RETURN
result:
cm! = 0
SCALE! = 4 * v! / (2.30259 * 1.25 * 200)
FOR i = 1 TO sng
  cm! = cm! + c0!(i * 2 - 1)
NEXT i
LOCATE 24, 10
PRINT se0! / m
LOCATE 2, 1
PRINT USING "###.###^"; cm! * pol * SCALE!
'全体の量
LOCATE 2, 12
PRINT USING "###.###^"; se0! * 1.96 / m *
SCALE! '誤差
LOCATE 4, 1
PRINT USING "###.###^"; c0!(1) * pol * SCALE!
'第 1 成分の量
LOCATE 4, 12
PRINT USING "###.###^"; se0! * 1.96 * c0!(1)
/ cm! / m * SCALE! '誤差
LOCATE 5, 11
PRINT USING "###.###%"; c0!(1) / cm! * 100
'%
LOCATE 5, 1
IF -LOG(2) / c0!(2) / 1000! > 1 THEN
  PRINT USING "###.###m s"; -LOG(2) / c0!(2)
/ 1000! 'm s
ELSE
  PRINT USING "###.###μ s"; -LOG(2) / c0!(2)
'μ s
END IF
IF sng = 1 THEN RETURN
LOCATE 7, 1
PRINT USING "###.###^"; c0!(3) * pol * SCALE!
'第 2 成分の量
LOCATE 7, 12
PRINT USING "###.###^"; se0! * 1.96 * c0!(3)
/ cm! / m * SCALE! '誤差
LOCATE 8, 11
PRINT USING "###.###%"; c0!(3) / cm! * 100
'%

```

```

LOCATE 8, 1
IF -LOG(2) / c0!(4) / 1000! > 1 THEN
  PRINT USING "###.##m s"; -LOG(2) / c0!(4)
/ 1000! 'm s
ELSE
  PRINT USING "###.##μ s"; -LOG(2) / c0!(4)
' μ s
END IF
IF sng = 2 THEN RETURN

LOCATE 10, 1
PRINT USING "##.##^"; c0!(5) * pol *
SCALE! '第3成分の量
LOCATE 10, 12
PRINT USING "##.##^"; se0! * 1.96 * c0!(5)
/ cm! / m * SCALE!'誤差
LOCATE 11, 11
PRINT USING "###.##%"; c0!(5) / cm! * 100
'%
LOCATE 11, 1
IF -LOG(2) / c0!(6) / 1000! > 1 THEN
  PRINT USING "###.##m s"; -LOG(2) / c0!(6)
/ 1000! 'm s
ELSE
  PRINT USING "###.##μ s"; -LOG(2) / c0!(6)
' μ s
END IF
RETURN
' ***** Ideal Curve *****
curv:
ACTP = 0
DISP = 0
SCREEN 0, , ACTP, DISP
IF rslt <> 1 THEN CLS : GOSUB gra.prog
COLOR 7
GOSUB result0
GOSUB result
SELECT CASE sng
CASE 1
  FOR i = d + 1 TO 999
    y3! = c0!(1) * EXP(c0!(2) * (i - d - 1) * t!) *
pol + ey! / m
    PSET (i / 2 + 40, 200 - z * y3! / 1.25 * 2 +
offset)
  NEXT i
CASE 2
  FOR i = d + 1 TO 999
    y2! = c0!(3) * EXP(c0!(4) * (i - d - 1) * t!) *
pol + ey! / m
    y3! = c0!(1) * EXP(c0!(2) * (i - d - 1) * t!) *
pol + y2!
    PSET (i / 2 + 40, 200 - z * y2! / 1.25 * 2 +
offset)
    PSET (i / 2 + 40, 200 - z * y3! / 1.25 * 2 +
offset)
  NEXT i
CASE 3
  upper = 125 + offset * 1.25 / 2
  lower = -125 + offset * 1.25 / 2
  FOR i = d + 1 TO 999
    y1! = c0!(5) * EXP(c0!(6) * (i - d - 1) * t!)
* pol + ey! / m
    y2! = c0!(3) * EXP(c0!(4) * (i - d - 1) * t!)
* pol + y1!
    y3! = c0!(1) * EXP(c0!(2) * (i - d - 1) * t!)
* pol + y2!
    PSET (i / 2 + 40, 200 - z * y1! / 1.25 * 2
+ offset)
    IF z * y2! >= upper OR z * y2! <= lower
THEN GOTO JC
    PSET (i / 2 + 40, 200 - z * y2! / 1.25 * 2
+ offset)
    IF z * y3! >= upper OR z * y3! <= lower
THEN GOTO JC
    PSET (i / 2 + 40, 200 - z * y3! / 1.25 * 2
+ offset)
  JC:
  NEXT i
END SELECT
LINE (40, 200 - z * ey! / m / 1.25 * 2 +
offset)-(539, 200 - z * ey! / m / 1.25 * 2 +
offset)
SCREEN 0, , 0, 0
RETURN
L8: '解析する範囲だけ決める。
ACTP = 0
DISP = 0
SCREEN 0, , ACTP, DISP
ex(1) = d 'カーソル座標
spd = 10 'カーソルスピード
io = 1
GOSUB lsma
exa = ex(1)
exb = 1023
RETURN
'*****枠を書き直す*****
REM $STATIC
SUB FRAME (ACTP, DISP, n$, t!, U$, v!, d, l,
m, z)
SCREEN 0, , ACTP, DISP: CLS
COLOR 6
LOCATE 1, 70: PRINT "No.:"; n$
IF t! >= 1 THEN GOTO jmp012
LOCATE 2, 52: PRINT "T : "; : PRINT USING
"###.##"; t!; : PRINT USING " @"; U$
GOTO jmp013
jmp012:
LOCATE 2, 52: PRINT "T : "; : PRINT USING
"###.##"; t!; : PRINT USING " @"; U$
jmp013:

```

```

LOCATE 3, 52: PRINT "Y : "; : PRINT USING
"#.##"; v!; : PRINT " volt"
LOCATE 5, 70: PRINT "DELAY"
LOCATE 5, 76: PRINT d
LOCATE 7, 70: PRINT "FLASH"
LOCATE 7, 76: PRINT USING "##"; I
ON I GOTO jmp014, jmp015, jmp016
LOCATE 7, 78: PRINT "th": GOTO jmp017
jmp014:
LOCATE 7, 78: PRINT "st": GOTO jmp017
jmp015:
LOCATE 7, 78: PRINT "nd": GOTO jmp017
jmp016:
LOCATE 7, 78: PRINT "rd"
jmp017:
LOCATE 3, 70: PRINT "かゝる"
LOCATE 3, 75: PRINT m
LOCATE 9, 70: PRINT "ハ イツ": LOCATE 9, 76:
PRINT z
COLOR 7
LINE (40, 0)-(539, 0)
LINE (40, 399)-(539, 399)
LINE (40, 0)-(40, 399)
LINE (539, 0)-(539, 399)
LINE (40 + .5 * d, 0)-(40 + .5 * d, 399)
FOR i = 40 TO 360 STEP 40
LINE (41, i)-(43, i): LINE (537, i)-(539, i)
NEXT i
FOR i = 90 TO 490 STEP 50
LINE (i, 1)-(i, 5): LINE (i, 194)-(i, 198)
NEXT i
END SUB

*****ロードする*****
SUB LD (a!(), n$, t!, U$, v!, d, l, m, z, sng,
se0!, ey!, pol, c!(), rslt)
SCREEN 0, , 0, 0
PRINT "Data Load"
PRINT "file name"; n$
ldrc:
se0! = 0: rslt = 0: INPUT "OD="; OD!
IF OD! = 0 THEN OD! = 1
jmp050:
OPEN "c:" + n$ FOR INPUT AS #1: GOTO
jmp049
jmp049:
FOR i = 0 TO 1023
INPUT #1, a!(i)
a!(i) = a!(i) / OD!
NEXT i
INPUT #1, n$
INPUT #1, t!
INPUT #1, U$
INPUT #1, v!
INPUT #1, d
INPUT #1, l
INPUT #1, m
INPUT #1, z
IF EOF(1) THEN GOTO jmp178
INPUT #1, sng, se0!, ey!, pol

FOR i = 1 TO sng
INPUT #1, c!(i * 2 - 1), c!(i * 2)
NEXT i
IF EOF(1) OR sng <> 2 THEN GOTO jmp178
c!(1) = c!(3)
c!(2) = c!(4)
INPUT #1, c!(3), c!(4)
jmp178:
CLOSE
jmp182:
IF se0! = 0 THEN rslt = 0 ELSE rslt = 1
jmp184:
END SUB

*****LOGを計算*****
SUB LOGAL (a!(), d, ey!, pol, se!, am!)
IF se! > 0 THEN GOTO jmp085
i0! = 0
FOR i = d + 20 TO INT((1023 - d) / 2 + d)
i0! = i0! + a!(i) - ey!
NEXT i
IF i0! * pol < 0 THEN pol = -1
jmp085:
FOR i = d + 1 TO 1023
IF (a!(i) - ey!) * pol <= 0 THEN a!(i) = 0: GOTO
jmp086
a!(i) = LOG((a!(i) - ey!) * pol) * 2400
jmp086:
NEXT i
am! = a!(INT((d + 999) / 2))
END SUB

*****行列式をとく*****
SUB NEWTON (p, s!())
FOR k = 1 TO p
FOR h = k TO p + 1
IF s!(k, k, k - 1) = 0 THEN s!(k, k, k - 1) = .01
s!(k, h, k) = s!(k, h, k - 1) / s!(k, k, k - 1)
NEXT h
FOR i = 1 TO p
IF i = k THEN GOTO jmp002
FOR j = k TO p + 1
s!(i, j, k) = s!(i, j, k - 1) - s!(i, k, k - 1) * s!(k,
j, k)
NEXT j
jmp002:
NEXT i

```

```
    NEXT k
  END SUB
```

```
'*****標準偏差*****'
SUB STADER (y!(), c!(), d, t!, m, pol, ey!, sng,
  exa, exb, se!)
  se! = 0
  SCALE! = m * pol
  FOR i = exa TO exb
    s0! = y!(i) - ey!
    x! = i - d - 1
    FOR j = 1 TO sng
      s0! = s0! - c!(j * 2 - 1) * EXP(c!(j * 2) * x!
* t!) * SCALE!
    NEXT j
    se! = se! + s0! * s0!
  NEXT i
  se! = SQR(se! / (exb - exa - 1))
  LOCATE 24, 1
  PRINT se! / m
END SUB
```

謝辞

第Ⅱ章の研究は広島大学大学院生物圏科学研究科の博士課程前期2年生、勝原弘樹氏と広島大学総合科学部4年生、三浦哲氏との共同研究によるものです。ここに両氏に深く感謝いたします。

本研究を通じて長年にわたり、未熟な私を辛抱強く御指導して下さった広島大学総合科学部 赤堀興造先生、手島圭三先生に深く感謝致します。また、本論文の作成にあたり御助言、御指導を頂いた内山敬康先生および小南思郎先生に深く感謝の意を表します。

関西学院大学理学部物理学科 河盛阿佐子先生にはEPR装置を使用させていただき、測定にあたってはご指導とご協力をいただき、河盛研究室の皆様にも御迷惑をおかけしました。広島大学総合科学部 播磨裕先生には光強度測定のためにサーモパイルを使用させていただきました。広島大学総合科学部 竹田一彦先生には鉄、亜鉛定量のためにICP-AES (ICP多元素同時原子発光分光装置)を使用させていただき、測定にあたってはご指導とご協力をいただきました。ここに明記して厚くお礼申し上げます。

最後に、研究を行う背後で常に支援し理解を示してくれた母と兄に心から感謝します。

参考文献

- (1) Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. : X-ray structure analysis of a membrane protein complex: Electron density map at 3Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. (1984) *J. Mol. Biol.* 180, 385-398.
- (2) Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. : Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. (1985) *Nature* 318, 618-624.
- (3) Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiyama, H. and Rees, D.C. : Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The cofactors. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5730-5734.
- (4) Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiyama, H. and Rees, D.C. : Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The protein subunits. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6162-6166.
- (5) Michel, H. and Deisenhofer, J. : Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. (1988) *Biochemistry* 27, 1-7.
- (6) Nanba, O. and Satoh, K. : Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 109-112.
- (7) Satoh, K., Nakatani, H.Y., Steinback, K.E., Watson, J. and Arntzen, C.J. : Polypeptide composition of a photosystem II core complex: Presence of a herbicide-binding protein. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 724, 142-150.
- (8) Kok, B., Forbush, B. and McGloin, M. : Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-1. A linear four step mechanism. (1970) *Photochem. Photobiol.* 11, 457-475.
- (9) Barry, B.A. and Babcock, G.T. : Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7099-7103.

- (10) Eijkelhoff, C. and Dekker, J.P.: Determination of the pigment stoichiometry of the photochemical reaction center of photosystem II. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1231, 21-28.
- (11) Thornber, J.P., Cogdell, R.J., Seftor, R.E.B. and Webster, G.D.: Further studies on the composition and spectral properties of the photochemical reaction centers of bacteriochlorophyll b-containing bacteria. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 593, 60-75.
- (12) Owens, T.G.: Excitation energy transfer between chlorophylls and carotenoids. A proposed molecular mechanism for non-photochemical quenching. (1994) in *Environmental plant biology series: Photoinhibition of Photosynthesis* (Baker, N.R. and Bowyer, J.R., eds.) pp.95-109, BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- (13) Beddard, G., Davidson, R.S. and Trethewey, K.R.: Quenching of chlorophyll fluorescence by β -carotene. (1977) *Nature* 267, 373-374.
- (14) Telfer, A., Dhimi, S., Bishop, S.M., Phillips, D. and Barber, J.: β -carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. (1994) *Biochemistry* 33, 14469-14474.
- (15) Schenck, C.C., Diner, B., Mathis, P. and Satoh, K.: Flash-induced carotenoid radical cation formation in photosystem II. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 680, 216-227.
- (16) Hillmann, B. and Schlodder, E.: Electron transfer reactions in photosystem II core complexes from *Synechococcus* at low temperature - Difference spectrum of $P680^+ Q_A^-/P680 Q_A$ at 77K. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1231, 76-88.
- (17) Telfer, A., De Las Rivas, J. and Barber, J.: β -Carotene within the isolated photosystem II reaction centre: photooxidation and irreversible bleaching of this chromophore by oxidised P680. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 106-114.
- (18) Satoh, K.: Protein-pigments and photosystem II reaction center. (1985) *Photochem. Photobiol.* 42, 845-853.

- (19) Mathis, P., Rutherford, A.W.: The primary reactions of photosystems I and II of algae and higher plants. (1987) in *New comprehensive biochemistry* Vol. 15: Photosynthesis (Amesz, J., ed.), pp.63-96, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- (20) Van Gorkom, H.J.: Electron transfer in photosystem II. (1985) *Photosynth. Res.* 6, 97-112.
- (21) Trebst, A.: The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. (1986) *Z. Naturforsch.* 41c, 240-245.
- (22) Michel, H., Epp, O. and Deisenhofer, J.: Pigment-protein interactions in the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*. (1986) *EMBO J.* 5, 2445-2451.
- (23) Vermaas, W.F.J. and Govindjee: The acceptor side of photosystem II in photosynthesis. (1981) *Photochem. Photobiol.* 34, 775-793.
- (24) Diner, B.A. and Petrouleas, V.: Q_{400} , the non-heme iron of the photosystem II iron-quinone complex. A spectroscopic probe of quinone and inhibitor binding to the reaction center. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 895, 107-125.
- (25) Ikegami, I. and Katoh, S.: Studies of chlorophyll fluorescence in chloroplasts: II. Effect of ferricyanide on the induction of fluorescence in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. (1973) *Plant Cell Physiol.* 14, 829-836.
- (26) Bows, J.M., Crofts, A.R. and Itoh, S.: A high potential acceptor for photosystem II. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547, 320-335.
- (27) Miyazaki, A., Shiina, T., Toyoshima, Y., Gounaris, K. and Barber, J.: Stoichiometry of cytochrome b-559 in photosystem II. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 975, 142-147.
- (28) Babcock, G.T., Widger, W.R., Cramer, W.A., Oertling, W.A. and Metz, J.G.: Axial ligands of chloroplast cytochrome b-559: Identification and requirement for a heme-cross-linked polypeptide structure. (1985) *Biochemistry* 24, 3638-3645.

- (29) Bendall, D.S. : Oxidation-reduction potentials of cytochromes in chloroplasts from higher plants. (1968) *Biochem. J.* (Proceedings of the Biochemical Society) 109, 46-47.
- (30) Knaff, D.B. and Arnon, D.I. : A concept of three light reactions in photosynthesis by green plants. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 715-722.
- (31) Knaff, D.B. and Arnon, D.I. : On two photoreactions in system II of plant photosynthesis. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 226, 400-408.
- (32) Boardman, N.K., Anderson, J.M. and Hiller, R.G. : Photooxidation of cytochromes in leaves and chloroplasts at liquid-nitrogen temperature. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 234, 126-136.
- (33) Knaff, D.B. : The effect of pH on the midpoint oxidation-reduction potentials of components associated with plant photosystem II. (1975) *FEBS Lett.* 60, 331-335.
- (34) Horton, P., Whitmarsh, J. and Cramer, W.A. : On the specific site of Action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea in chloroplasts: Inhibition of a dark acid-induced decrease in midpoint potential of cytochrome b-559. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 519-524.
- (35) Rich, P.R. and Bendall, D.S. : The redox potentials of the b-type cytochromes of higher plant chloroplasts. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 591, 153-161.
- (36) Ahmad, I., Giorgi, L.B., Barber, J., Porter, G. and Klug, D.R. : Redox potentials of cytochrome b-559 in the D1/D2/cytochrome b-559 reaction centre of photosystem II. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 239-242.
- (37) Iwasaki, I., Tamura, N. and Okayama, S. : Effects of light stress on redox potential forms of Cyt b-559 in photosystem II membranes depleted of water-oxidizing complex. (1995) *Plant Cell Physiol.* 36, 583-589.
- (38) Shuvalov, V.A., Fiege, R., Schreiber, U., Lenzian, F., Lubitz, W. : EPR study of cytochrome in the D1 D2 Cyt b-559 complex. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1228, 175-180.

- (39) Fan, H.N. and Cramer, W.A.: The redox potential of cytochrome b-559 and b-563 in spinach chloroplasts. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 200-207.
- (40) Ortega, J.M., Hervas, M. and Losada, M.: Redox and acid-base characterization of cytochrome b-559 in photosystem II particles. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171, 449-455.
- (41) Horton, P. and Croze, E.: The relationship between the activity of chloroplast photosystem II and the midpoint oxidation-reduction potential of cytochrome b-559. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 462, 86-101.
- (42) Ortega, J.M., Hervas, M. and Losada, M.: Distinctive stability of the reduced and oxidized forms of high-potential cytochrome b-559 in photosystem II particles. (1990) *Plant Science* 68, 71-75.
- (43) Okayama, S. and Butler, W.L.: Extraction and reconstitution of photosystem II. (1972) *Plant Physiol.* 49, 769-774.
- (44) Cox, R.P. and Bendall, D.S.: The functions of plastoquinone and β -carotene in photosystem II of chloroplasts. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 347, 49-59.
- (45) Barber, J. and De Las Rivas, J.: A function model for the role of cytochrome b-559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10942-10946.
- (46) Wessels, J.S.C., Van Alphen-Van Waveren, O. and Voorn, G.: Isolation and properties of particles containing the reaction center complex of photosystem II from spinach chloroplasts. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 292, 741-752.
- (47) Lam, E., Baltimore, B., Ortiz, W., Chollar, S., Melis, A. and Malkin, R.: Characterization of a resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoids. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 724, 201-211.
- (48) Boardman, N. K.: Photochemical properties of a photosystem II subchloroplast fragment. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 283, 469-482.

- (49) Ke, B., Vernon, L. P. and Chaney, T.H.: Photoreduction of cytochrome b-559 in a photosystem-II subchloroplast particle. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 256, 345-357.
- (50) Tsujimoto, H.Y. and Arnon, D.I.: Differential inhibition by plastoquinone analogues of photoreduction of cytochrome b-559 in chloroplasts. (1985) *FEBS Lett.* 179, 51-54.
- (51) De Paula, J.C., Innes, J.B. and Brudvig, G.W.: Electron transfer in photosystem II at cyogenic temperatures. (1985) *Biochemistry* 24, 8114-8120.
- (52) De Paula, J.C., Li, P.M., Miller, A.-F., Wu, B.W. and Brudvig, G.W.: Effect of the 17- and 23-kilodalton polypeptides, calcium, and chloride on electron transfer in photosystem II. (1986) *Biochemistry* 25, 6487-6494.
- (53) Thompson, L.K. and Brudvig, G.W.: Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. (1988) *Biochemistry* 27, 6653-6658.
- (54) Barber, J. and Andersson B.: Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 61-66.
- (55) Aro, E.-M., Virgin, I. and Andersson, B.: Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 113-134.
- (56) Macpherson, A.N., Telfer, A., Barber, J. and Truscott, T.G.: Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centres. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 301-309.
- (57) Silverthornem, J. and Ellis, R.J.: Protein synthesis in chloroplasts. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 607, 319-330.
- (58) Mattoo, A.K., Hoffman-Falk, H., Marder, J.B. and Edelman, M.: Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1380-1384.

- (59) Ohad, I., Kyle, D.J. and Hirschberg, J.: Light-dependent degradation of the Q_B -protein in isolated pea thylakoids. (1985) *EMBO J.* 4, 1655-1659.
- (60) Eaglesham, A.R.J. and Ellis, R.J.: Protein synthesis in chloroplasts: II. Light-driven synthesis of membrane proteins by isolated pea chloroplasts. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 335, 396-407.
- (61) Setlik, I., Allakhverdiev, S.I., Nedball, L., Setlikova, E. and Klimov, V.V.: Three types of Photosystem II photoinactivation. (1990) *Photosynth. Res.* 23, 39-48.
- (62) Virgin, I., Salter, A.H., Ghanotakis, D.F. and Andersson, B.: Light-induced D1 protein degradation is catalyzed by a serine-type protease. (1991) *FEBS Lett.* 287, 125-128.
- (63) Andersson, J.M. and Andersson, B.: The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13, 351-355.
- (64) Kuhn, M., Thiel, A. and Böger, P.: The 9-kDa phosphoprotein involved in photoinhibition. (1988) *Z. Naturforsch.* 43c, 413-417.
- (65) Hinkle, P.C. and McCarty, R.E.: How cells make ATP. (1978) *Sci. Am.* 238, 104-123.
- (66) Renger, G. and Wolff, C.: The existence of a high photochemical turnover rate at the reaction centers of system II in Tris-washed chloroplasts. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 423, 610-614.
- (67) Haveman, J. and Mathis, P.: Flash-induced absorption changes of the primary donor of photosystem II at 820 nm in chloroplasts inhibited by low pH or Tris-treatment. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 440, 346-355.
- (68) Renger, G.: A rapid vectorial back reaction at the reaction centers of photosystem II in Tris-washed chloroplasts induced by repetitive flash excitation. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547, 103-116.
- (69) Conjeaud, H., Mathis, P. and Paillotin, G.: Primary and secondary electron donors in photosystem II of chloroplasts. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 546, 280-291.

- (70) Conjeaud, H. and Mathis, P.: The effect of pH on the reduction kinetics of P-680 in Tris-treated chloroplasts. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 590, 353-359.
- (71) Gerken, S., Dekker, J. P. Schlodder, E. and Witt, H. T.: Studies on the multiphasic charge recombination between chlorophyll aII⁺ (P-680⁺) and plastoquinone Q_A⁻ in photosystem II complexes. Ultraviolet difference spectrum of Chl-aII⁺/Chl-aII. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 52-61.
- (72) Bowes, J., Crofts, A.R. and Arntzen, C.J.: Redox reactions on the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 200, 303-308.
- (73) Bowes, J.M. and Crofts, A.R.: Binary oscillations in the rate of reoxidation of the primary acceptor of photosystem II. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 590, 373-384.
- (74) Robinson, H.H. and Crofts, A.R.: Kinetics of the oxidation-reduction reactions of the photosystem II quinone acceptor complex, and the pathway for deactivation. (1983) *FEBS Lett.* 153, 221-226.
- (75) Whitmarsh, J. and Cramer, W.A.: A pathway for the reduction of cytochrome b-559 by photosystem II in chloroplasts. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 501, 83-93.
- (76) Hoganson, C.W., Casey, P.A. and Hansson, O.: Flash photolysis studies of manganese-depleted photosystem II: evidence for binding of Mn²⁺ and other transition metal ions. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1057, 399-406.
- (77) Arnon, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- (78) Kuwabara, T., Murata, N.: Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. (1982) *Plant Cell Physiol.* 23, 533-539.

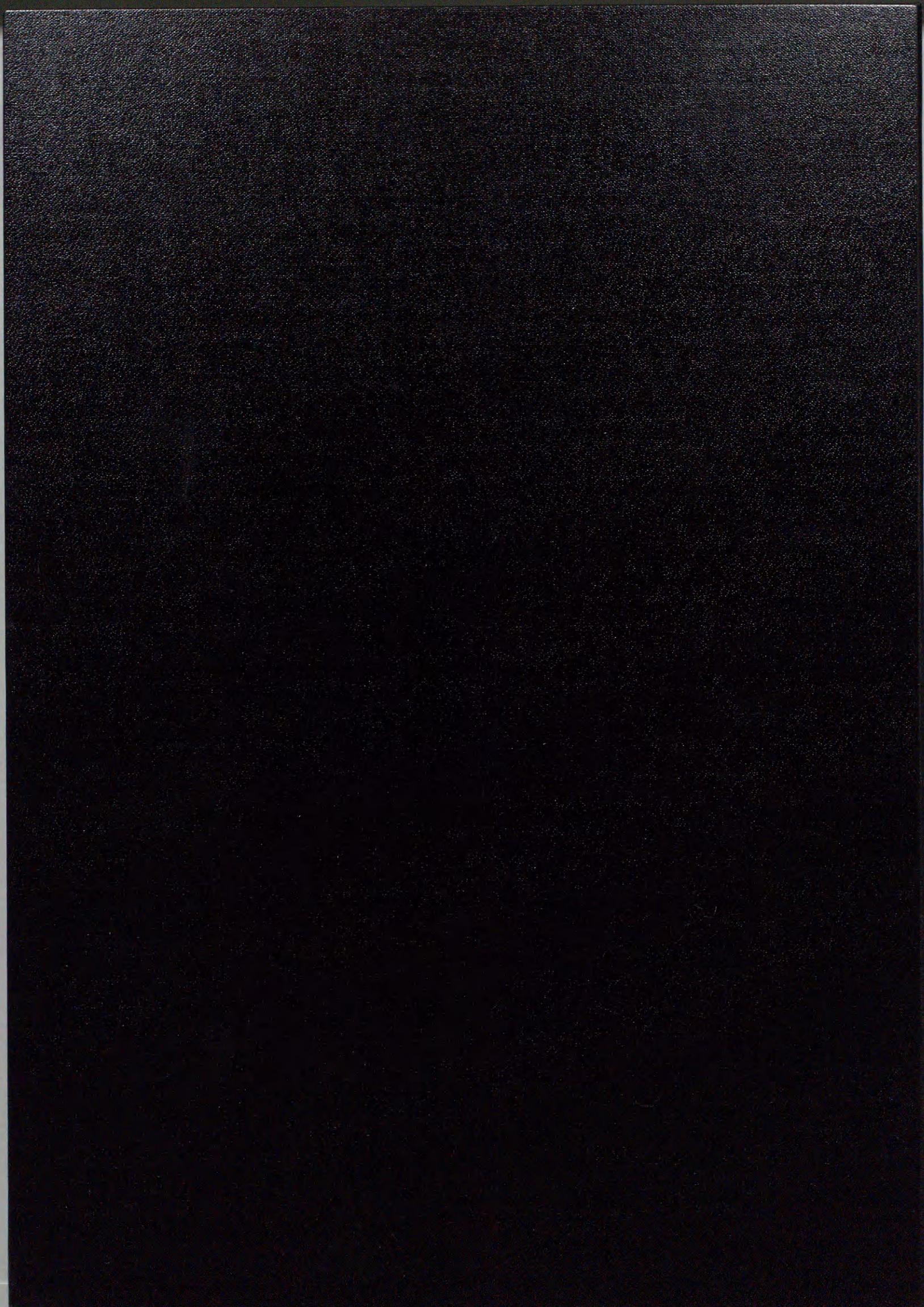
- (79) Ghanotakis, D.F., Demetris, D.M. and Yocum, C.F.: Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center core preparation and a 28 kDa Chl-a-binding protein. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 891, 15-21.
- (80) Babcock, G.T.: The photosynthetic oxygen-evolving process. (1987) in *New comprehensive biochemistry Vol. 15: Photosynthesis* (Amesz, J., ed.) pp.125-158, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- (81) Yamashita, T. and Butler, W.L.: Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts. (1968) *Plant Physiol.* 43, 1978.
- (82) Klimov, V.V., Dolan, E., Shaw, E.R. and Ke, B.: Interaction between the intermediary electron acceptor (pheophytin) and a possible plastoquinone-iron complex in photosystem II reaction centers. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7227-7231.
- (83) Appleby, C.A.: Electron transport systems of *Rhizobium japonicum* II. *Rhizobium* haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 172, 88-105.
- (84) Paul, K.G., Theorell, H. and Akeson, A.: The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen). (1953) *Acta Chem. Scand.* 7, 1284-1287.
- (85) Van Gorkom, H.J.: Identification of the reduced primary electron acceptor of photosystem II as a bound semiquinone anion. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 347, 439-442.
- (86) Klimov, V.V., Klevanik, V.A., Shuvalov, V.A. and Krasnovsky, A.A.: Reduction of pheophytin in the primary light reaction of photosystem II. (1977) *FEBS Lett.* 82, 183-186.
- (87) Stiehl, H.H. and Witt, H.T.: Die kurzzeitigen ultravioletten Differenzspektren bei der Photosynthese. (1968) *Z. Naturforsch.* 23b, 220-224.
- (88) Stiehl, H.H. and Witt, H.T.: Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis. (1969) *Z. Naturforsch.* 24b, 1588-1598.

- (89) Jursinic, P.: Investigation of double turnovers in photosystem II charge separation and oxygen evolution with excitation flashes of different duration. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 635, 38-52.
- (90) Diner, B.A. and Petrouleas, V.: Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of photosystem II by exogenous quinones acting through the Q_B binding site. II. Blockage by inhibitors and their effects on the Fe(III) EPR spectra. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 893, 138-148.
- (91) Wraight, C.A.: Modulation of herbicide-binding by the redox state of Q_{400} , an endogenous component of photosystem II. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 809, 320-330.
- (92) Buser, C.A., Thompson, L.K., Diner, B.A. and Brudvig, G.W.: Electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II. (1990) *Biochemistry* 29, 8977-8985.
- (93) Crystall, B., Booth, P.J., Klug, D.R., Barber, J. and Porter, G.: Resolution of a long lived fluorescence component from D1/D2/cytochrome b-559 reaction centres. (1989) *FEBS Lett.* 249, 75-78.
- (94) Miller, A.-F. and Brudvig, G.W.: A guide to electron paramagnetic resonance spectroscopy of Photosystem II membranes. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1056, 1-18.
- (95) Velthuys, B.R.: Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. (1981) *FEBS Lett.* 126, 277-281.
- (96) VanAken, T., Foxall-VanAken, S., Castleman, S. and Ferguson-Miller, S.: Alkyl glycoside detergents: Synthesis and applications to the study of membrane proteins. (1986) *Methods in enzymology* 125, 27-35.
- (97) Petrouleas, V. and Diner, B.A.: Identification of Q_{400} , a high-potential electron acceptor of photosystem II, with the iron of the quinone-iron acceptor complex. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 849, 264-275.

- (98) Hienerwadel, R., Berthomieu, C., Kreutz, W. and Mäntele, W.: Time-resolved infrared studies on photosystem II core particles depleted of oxygen evolution. (1992) in Research in Photosynthesis Vol. II (Murata, N., ed.) pp.49-52. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- (99) Kamachi, H., Tamura, N. and Inoue, H.: Putative second binding site of DCMU on the oxidizing side of photosystem II in photosystem II membranes depleted of functional Mn. (1992) Plant Cell Physiol. 33, 437-443.
- (100) Schatz, G.H. and Van Gorkom, H.J.: Absorbance difference spectra upon charge transfer to secondary donors and acceptor in photosystem II. (1985) Biochim. Biophys. Acta 810, 283-294.
- (101) Boussac, A., Zimmermann, J.-L., Rutherford, A.W. and Lavergne, J.: Histidine oxidation in the oxygen-evolving photosystem-II enzyme. (1990) Nature 347, 303-306.
- (102) Chapman, D.J., Gounaris, K. and Barber, J.: Electron-transport properties of the isolated D1-D2-cytochrome b-559 photosystem II reaction centre. (1988) Biochim. Biophys. Acta 933, 423-431.
- (103) Koivuniemi, A., Swiezewska, E., Aro, E.-M., Styring, S. and Andersson, B.: Reduced content of the quinone acceptor Q_A in photosystem II complexes isolated from thylakoid membranes after prolonged photoinhibition under anaerobic conditions. (1993) FEBS Lett. 327, 343-346.
- (104) Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E.-M. and Andersson, B.: Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1408-1412.
- (105) Virgin, I., Ghanotakis, D.F. and Andersson, B.: Light-induced D1-protein degradation in isolated photosystem II core complexes. (1990) FEBS Lett. 269, 45-48.

- (106) Shipton, C.A. and Barber, J.: Photoinduced degradation of the D1 polypeptide in isolated reaction centers of photosystem II: Evidence for an autoprolytic process triggered by the oxidizing side of the photosystem. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6691-6695.
- (107) Salter, A.H., Virgin, I., Hagman, A. and Andersson, B.: On the molecular mechanism of light-induced D1 protein degradation in photosystem II core particles. (1992) *Biochemistry* 31, 3990-3998.
- (108) Whitmarsh, J., Samson, G. and Poulson M.: Photoprotection in photosystem II — the role of cytochrome b559. (1994) in *Environmental plant biology series: Photoinhibition of Photosynthesis* (Baker, N.R. and Bowyer, J.R., eds.) pp.75-93, BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- (109) Eskins, K. and Dutton, H.J.: Sample preparation for high-performance liquid chromatography of higher plant pigments. (1979) *Anal. Chem.* 51, 1885-1886.
- (110) Lichtenthaler, H.K.: Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. (1987) *Methods Enzymol.* 148, 350-382.
- (111) Britton, G.: UV/Visible spectroscopy. (1995) in *Carotenoids Vol. 1B: Spectroscopy* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H., eds.) pp.13-62, Birkhauser Verlag, Basel.
- (112) Mori, H. and Yamamoto, Y.: Deletion of antenna chlorophyll-a-binding proteins CP43 and CP47 by Tris-treatment of PSII membranes in weak light: Evidence for a photo-degradative effect on the PSII components other than the reaction center-binding proteins. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1100, 293-298.
- (113) Blubaugh, D.J., Atamian, M., Babcock, G.T., Golbeck, J.H. and Cheniae, G.M.: Photoinhibition of hydroxylamine-extracted photosystem II membranes: Identification of the sites of photodamage. (1991) *Biochemistry* 30, 7586-7597.
- (114) Frank, H.A. and Cogdell, R.J.: Carotenoids in photosynthesis. (1996) *Photochem. Photobiol.* in press.

- (115) De Las Rivas, J., Andersson, B. and Barber, J.: Two sites of primary degradation of the D1-protein induced by acceptor or donor side photoinhibition in PSII core complex. (1992) FEBS Lett. 301, 246-252.
- (116) De Las Rivas, J., Shimplon C.A., Ponticos, M. and Barber, J.: Acceptor side mechanism of photoinduced proteolysis of the D1 protein in photosystem II reaction centers. (1993) Biochemistry 32, 6944-6950.
- (117) Barbato, R., Frizzo, A., Friso, G., Rigoni, F. and Giacometti, G.M.: photoinduced degradation of the D1 protein in isolated thylakoids and various photosystem II particles after donor-side inactivations. (1992) FEBS Lett. 304, 136-140.
- (118) Mishra, N.P., Francke, C., van Gorkom, H.J. and Ghanotakis, F.: Destructive role of singlet oxygen during aerobic illumination of the photosystem II core complex. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1186, 81-90.



inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

