

氏 名 熊 崎 茂 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大乙第21号

学位授与の日付 平成8年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 Studies on primary energy and electron transfer  
in isolated reaction centers of photosystem I  
and II

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 北川 禎三  
教 授 吉原 經太郎  
教 授 田中 晃二  
助 教 授 田原 太平  
教 授 大須賀 篤弘（京都大学）

要旨

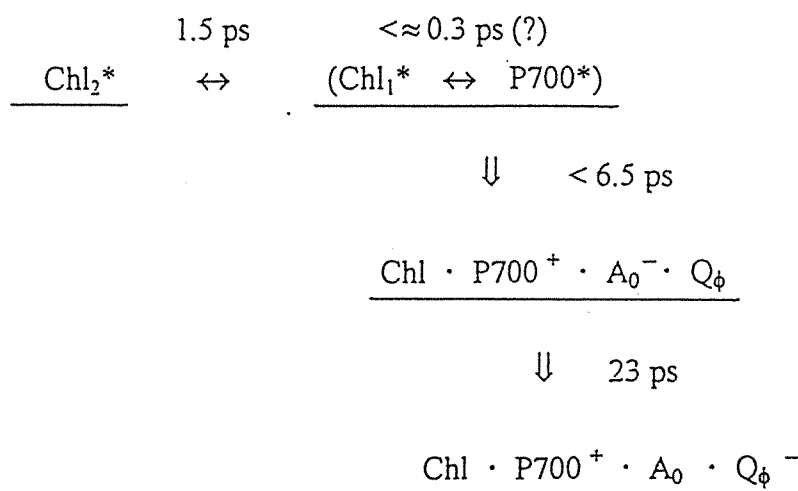
光合成反応中心色素タンパク複合体（以下では反応中心と略する）は光エネルギーを高量子効率（>90%）で電荷分離のエネルギーに変換する。その光誘起初期過程に対する理解は、1980年代から、紅色光合成細菌の反応中心の結晶化、そのX線構造解析、さらにピコ秒、フェムト秒の時間分解分光法の適用により飛躍的に進歩した。しかしながら、高等植物と紅色光合成細菌とでは、反応中心を構成するタンパク質や色素分子が異なっており、その結果として機能も異なっている。また、高等植物では二種類の異なる反応中心（光合成光化学系1と系2）が協同して酸化還元反応を駆動している。これらの異なる反応中心における初期過程を解明し、比較することで、光合成反応中心を構成する基礎原理を統一的に研究した。

光合成光化学系1と系2の反応中心を単離し、水溶液中に表面活性剤で可溶化して試料とした。実験手法としては、サブピコ秒の時間分解能を有する過渡吸収スペクトル法と和周波生成蛍光検出法を用いた。試料温度は5-20℃にして測定を行った。

系1の反応中心の初期過程

系1の反応中心を水とジエチルエーテルの混合溶媒で抽出すると、反応中心1単位あたり100分子以上含まれている光捕獲のためのアンテナクロロフィルを約10分子にまで減らすことができる。また、第二の電子アクセプター（ $Q_A$ ）であるフィロキノンも取り除かれる。本試料では、電子キャリアの吸収変化の、アンテナクロロフィルの吸収変化に対する割合が大きく、電子移動の観測が比較的容易である。電子供与体クロロフィルP700を選択励起した後、クロロフィル間の電子一重項励起エネルギーの分配比率は、見かけ上の平衡に達するのに1.5ps程度の時間を要し、そのエネルギーはP700のみならず、近傍に存在するいくつかのクロロフィル(Chl)と可逆的に交換されていることが明らかになった。

P700の励起状態( $P700^*$ )から電子受容体クロロフィル( $A_0$ )に電子移動する見かけの時定数として6.5psという値を得た。本試料に $Q_A$ としてフィロキノンや、フィロキノンと酸化還元電位や分子構造が類似のキノンを再構成し、 $A_0^-$ から $Q_A$ への電子移動の時定数として23psを得た。この時定数は紅色光合成細菌での対応する電子移動の時定数(≈200 ps)より一桁短い。これらの結果より次の反応スキームを提案した。

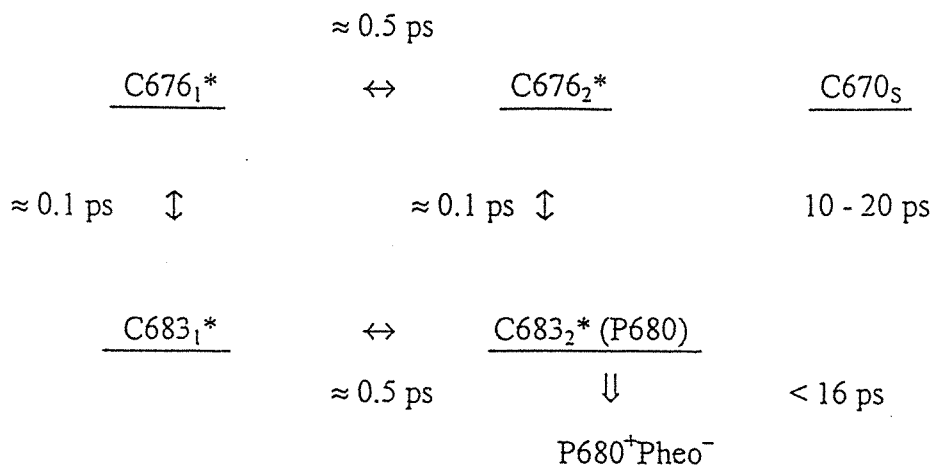


↔はエネルギー交換、↓は電子移動を示す。各過程の時間スケールも併記してある。

Chl<sub>1</sub>\*は時間分解能以下の時間でP700とエネルギーを交換するクロロフィルを示す。さらに、第二の電子移動の時定数が、Q<sub>+</sub>として再構成されるキノンの酸化還元電位に依存する仕方を調べた。その結果、電子移動に伴って(溶媒、タンパク質、電子キャリアー分子等すべての)核座標が再配向するためのエネルギー(λ)が0.3eV程度であり、フィロキノンがQ<sub>+</sub>として働く時の反応前後の自由エネルギー差(ΔG<sup>0</sup>=-0.34eV)で、反応速度が最速になる(ΔG<sup>0</sup>+λ≈0)ことがわかった。

### 系2の反応中心の初期過程

単離された系2の反応中心は、1単位あたりに、クロロフィル分子を6-7分子、フェオフィチン分子(Pheo)を2分子を含み、光励起後、電子供与体クロロフィルP680と片方のフェオフィチンの間で電荷分離状態を形成する。しかし、第二の電子アクセプターであるキノンは含まれていない。クロロフィルとフェオフィチン(クロリンと総称)の基底状態から最低一重項励起状態への遷移(Q<sub>y</sub>band)の低エネルギー側を選択励起すると、およそ500fsの時定数でクロリン間の励起エネルギーの分配比率が見かけ上の平衡に達する。また100fs程度の時定数で進行するエネルギー移動も観測された。それらのエネルギー移動を説明するために最低4つの励起状態を考慮すべきことが示唆された。同じ励起条件下で、クロリンの励起状態全体の減衰には、16ps(70%)(さらに3ps(25%)と21ps(45%)に分離される可能性がある)と100ps(15%)の時定数が観測された。これらは、P680<sup>+</sup>Pheo<sup>-</sup>が増加する時定数とよい定量的一致を示した。複数の時定数が現れる原因は明確には説明しがたいが、他の研究報告も考慮に入れて、以下の反応モデルが一つの可能性として考えられた。



ここで、C676<sub>1</sub>\*、C676<sub>2</sub>\*、C683<sub>1</sub>\*とC683<sub>2</sub>\*はサブピコ秒のエネルギー移動に関わるクロリンの励起状態であり、C670<sub>s</sub>はP680と比較的ゆっくりとエネルギーを交換するクロロフィルである。

### 異なる反応中心の比較

P680やP700の励起状態(P680\*やP700\*)と、近傍のその他のクロリンの励起状態との間には、常温の熱が与えるエネルギー(k<sub>B</sub>T=200cm<sup>-1</sup>)と同程度のエネルギー差しかない。P680\*やP700\*からは、電子移動と同程度またはそれ以上の確率で、他のクロリンに励起エネルギーが移動する。これは、紅色光合成細菌の反応中心において、special pairの低エネルギー励起状態へエネルギーがほぼ完全に局在した後、電子移動を起こすのとは異なる。系1

と系2では、励起状態の持つ高い還元力を保持するために、エネルギー局在が避けられていると考えられる。一方、詳細なレート方程式によれば、系1、系2ともに最初の電子移動の時定数は、上限が $\approx 4\text{ps}$ であり、紅色光合成細菌の反応中心での対応する時定数( $\approx 3\text{ps}$ )と同程度に短い。このような高速の最初の電子移動は、どの反応中心でも必須の条件と考えられる。

系1の第二の電子移動は、紅色光合成細菌における対応する電子移動よりも一桁短い時間で進行する。これは、電子供与体と受容体間の電子カップリングの大きさの違い(約4倍)に帰せられた。系1での自由エネルギー差と再配向エネルギー( $\Delta G^0, \lambda$ )= $(-0.34\text{eV}, 0.3\text{eV})$ は、紅色光合成細菌での対応するパラメーター( $\Delta G^0, \lambda$ )= $(-0.65\text{eV}, 0.8\text{eV})$ とは大きく異なる。すなわち、系1の反応中心ではより小さな発熱エネルギーで電子移動の時定数が最短化されており、高い還元力を高い量子効率で得ていると考えられる。

## 審査結果の要旨

本論文は4章から成り、第1章が研究の背景、第2章が光合成系Ⅰのエネルギー移動と電子移動、第3章が光合成系Ⅱのエネルギー移動と電子移動、第4章が総括で、英文170ページの長さである。

第1章では、植物及びバクテリアの光合成反応中心蛋白質複合体について現在どこまで明らかになり、今何が問題であるかについて説明されている。特に、植物のものについて研究がそれほど進んでない理由と、それを克服して本研究に取組む手立てが述べられている。つまり、植物の反応中心に特有の多数のアンテナクロロフィルを約90%取り除いて、しかも残った部分の機能が自然のものとはほとんど変わらないという、エーテル/水混合溶媒抽出光合成反応中心蛋白質複合体試料を用いることの意義と有効性が説明されている。

第2章では、光合成系Ⅰのサブピコ秒の時間分解過渡吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定し、スペシャルダイマー(P700)から次のアクセプタークロロフィル( $A_0$ )への電子移動及び $A_0$ からキノン(Q)への電子移動についての研究成果を説明している。(P700<sup>+</sup>・ $A_0^-$ )状態に特有の近赤外吸収の立上りから、その電子移動が6.5psで起こることを決める一方、P700と約15個残っているアンテナクロロフィルとの間のエネルギー移動が1.5psで起こることを明らかにした。また $A_0$ からQへの電子移動が23psで起こり、これがバクテリアの場合より約10倍早いことを見つけた。自然の葉緑素で電子受容体として働くフィロキノンを、11種のキノン誘導体に置き換えた人工的な反応中心蛋白質複合体について、 $A_0$ からQへの電子移動速度とQの酸化還元電位との関係を調べ、Marcusの電子移動理論のパラメーターを決めた。特に再配向エネルギー( $\lambda c$ )が、バクテリアの場合に比べて植物で小さくなることを初めて指摘したことは、今後このパラメーターの持つ物理的意義に関する議論を呼び起こすであろうと思われる。申請者はそれをそのタンパクの誘電率が小さいことに帰している。

第3章では、光合成系Ⅱの蛋白質複合体に対して、同様の測定及び時間分解和周波発生蛍光検出法を導入して、100フェムト秒の時定数を持つエネルギー移動をも観測し、エネルギー移動ダイナミクスを説明するためには最低4つの励起状態を考慮すべきことを指摘した。

第4章では、光合成系ⅠとⅡの比較、及びバクテリアと植物の蛋白質複合体の比較を<sup>1</sup>している。いずれも最初の電子移動反応の速度はほとんど変わらないが、その後に違いが現れそれは移動する電子の使い方(機能)とも関係していることを指摘した。このように本論文はこの分野の国際的最先端の研究内容を含んでおり、それがわかりやすく書かれていてレベルの高いものであるので、理学博士の学位論文として十分であることに審査員の意見は一致した。

試験結果については、申請者は博士論文の内容に関係した論文5報、それ以外に本研究に用いる超短パルスレーザー光の発生に関して4報、そしてそれを用いた他の研究の共著者論文を3報、全て国際誌に発表している。口述試験の場においては本学位論文の第2章、すなわち植物光合成反応中心蛋白質複合体Ⅰの光化学反応初期過程に対する超高速時間分解分光の研究成果について約1時間かけて報告し、それに対して約2時間の質疑応答を行った。本蛋白質におけるエネルギー移動や電子移動の詳細について十分広い知識をもち、

その基礎の上に国際的最先端の研究をしていることが明らかとなった。また、レーザー技術や蛋白質試料の取扱いなどの知識も十分持っていることがわかった。したがって、口述試験に対して審査委員全員が「余裕をもって合格である」と判断した。学位論文はわかりやすい英語で書かれており、英語力も標準以上であった。公開発表会における発表もわかりやすいもので質問にも正しく返答したので、その後の最終審査委員会で合格と最終判定した。