

## 光合成初期反応 — 光化学系 I など

### Primary Reactions of Photosynthesis: a Personal View

理学部分子生物学科 檜山 哲夫

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saitama University

Tetsuo HIYAMA

Photosystem I of oxygenic photosynthesis is reviewed. The article describes historical as well as personal accounts on P700, P430 and chlorophyll a' besides other topics. The 1971 discovery of P430 was rather accidental in the course of a P700 investigation, which also yielded extinction coefficients of P430 and P700, together with their difference spectra. The author later conducted EPR experiments to prove that P430 is A2 (FeSx: Component X), which has, unfortunately, not been accepted well yet. The author's reconstitution experiment of P700 with PsaA/B apoprotein and chlorophyll a' in 1986 has only recently been realized when a three dimensional structure of Photosystem I complex was presented in 2001.

#### はじめに

「光化学系 I の初期反応」を中心に私の研究歴を振り返って独断と偏見だらけの解説をさせて頂く。光合成は植物が太陽光のエネルギーを使って水と二酸化炭素(炭酸ガス)からデンプンや砂糖のような炭水化物を作る複雑な化学反応で、葉緑体(クロロプラスト: 緑葉の細胞の中にいくつもある小さい緑の袋)で行われる。明反応は光で駆動される光化学反応の一種で、多数の反応が連続し絡み合った系である。そのなかで純粋に光化学といえる素反応は初期反応とよばれ、植物のクロロプラストでは2種(光化学系 I と II)がある。この2つは密接に連携してエネルギーに富んだ分子(ATP と NADPH)を作る。

光化学系とは光化学反応が起こる場で、光化学反応中心色素とよばれる分子が光量子のエネルギーを使って化学反応を起こす系(システム)である。このシステムは反応中心色素など多くの分子種で構成されそれら低分子はタンパク質(サブユニット)に巧妙に配置され機能している。ここで起こる化学反応は酸化

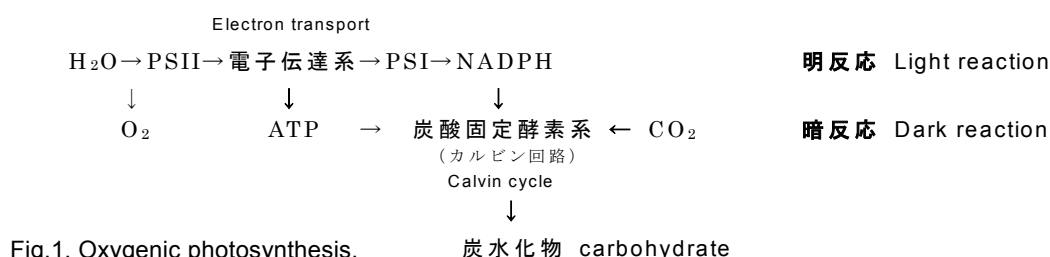


Fig.1. Oxygenic photosynthesis.

炭水化物 carbohydrate

還元である。ひとつは強い還元力を生成して NADP(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸)を還元して NADPH(還元型 NADP)にする光化学系 I, もう一つは水( $H_2O$ )から電子を引き抜き(酸化し), 副産物として酸素を発生する光化学系 II である。光化学系 II で引き抜かれた電子はいくつかの分子の酸化還元をくりかえし光化学系 I の NADP 還元に使われた電子を補う。この流れが電子伝達である。電子伝達の際のエネルギー差を利用して生体のエネルギー分子 ATP を作る(光リン酸化)。ここまでが明反応で、葉緑体の内部に一杯詰まった小さな袋の集合体(チラコイド)の膜部分に埋め込まれたタンパク質複合体

が担い手となる。暗反応はこうして明反応で出来た NADPH の還元力と ATP のエネルギーを使って単純な炭素化合物 CO<sub>2</sub> から複雑な炭水化物を合成する反応系のことで、葉緑体のチラコイドの外側に広がる液状部(ストロマ)にある多数の酵素がこの複雑な代謝系(カルビン回路)を触媒する。これが「酸素を発生して二酸化炭素を固定しデンプンを作る」という植物の光合成のしくみである(Fig.1)。

## 光化学系 I のこと

2 つの光化学系という概念は 1960 年代初めイギリスの Hill と Bendall やオランダの Duysens らが提唱した。Calvin が暗反応でノーベル化学賞をもらった頃のことである。これより前(1956)に巧妙な実験によって、光量子が最初にひきおこす反応はある種の色素(P700 と命名)の光酸化であるという光化学反応中心色素の概念を最初に提唱したのはオランダの Kok である(1)。2 つの光化学系説が提唱されたとき、Kok の色素 P700 は光化学系 I に帰属された。以後光化学系 I (Photosystem I) を PSI と省略して書くことにする。ちなみに Hill-Bendall が最初に出した模式(Z-Scheme)では Photochemical system 1 となっていた。まもなく省略した Photosystem という語が作られ、数字もいつのまにかローマ数字に変わっていった経緯を知る人は少ない。私が光合成の世界に入り込んだのは 1967 年秋だからもうこうした概念はすっかり定着していた頃だ。この当時盛んに PSI の反応中心活性をもつ複合体を葉緑体のチラコイド膜から単離調製することが試みられていた。材料は高等植物(主にホウレンソウ)の葉緑体やシアノバクテリア(ランソウ)で、膜を可溶化するため TritonX-100 のようなおだやかな非イオン系界面活性剤が使われるようになった。これらは今日ではクロロフィルなどの色素と多くの機能性低分子がタンパク質(サブユニット)に結合したもので構成される複合体であることが分かっているが、当時はもっぱら明反応(部分反応)の測定に使われていた。

私が 1969 年に移ったオハイオの研究所はこうした研究の中心のひとつであった。電子供与体としてアスコルビン酸などをプラストシアニン(銅を含む酸化還元タンパク質)または適当な人工電子伝達物質(インドフェノール類、メチレンジアミン類等)と共に与えると、鉄イオウタンパク質であるフェレドキシンおよび FNR (Ferredoxin-NADP reductase: フェレドキシン NADP 還元酵素) の存在下で、NADP を光還元する能力があることまで当時分かっていた。またメチルビオローゲン(methylviologen もともと除草剤パラコートとして開発された)がフェレドキシンの代わりに電子を受け取る人工電子受容体として働くことも当時知られていた。現在、PSI 複合体の結晶解析で立体構造が解明されつつあり、大小様々の 10 数種のタンパク質サブユニットで構成され集光用の大量のクロロフィル分子の他、P700、ビタミン K1、と 3 種鉄イオウクラスタをもつことが分かっている。詳しくは総説を読みたい(2-4)。

## 研究歴その I — 光化学系 I を知るまで

私は大学院を出てアメリカにポストドクとして渡るまで、光合成についてほとんど何も知らなかった。大学院では指導教官の北原覚雄先生(当時乳酸菌の世界的権威)が 1930 年代に発見されたラセミアーゼ(現在では乳酸ラセマーゼ Lactate racemase)の精製というテーマで乳酸菌を培養しては破碎して抽出、硫安分画、カラムクロマトなどを来る日も来る日も繰り返す、体力だけが勝負で、学部時代勉強しないで山歩きばかりしていた私にはよく向いた仕事だった。それでも世界で初めて乳酸ラセマーゼを精製したり(5)、論文を 3 つほど書いて福井作蔵・柳田友道両先生のお世話で何とか学位を頂いた。そのうち隣の研究室で柳田先生が酸素電極を組み立てて居られたり、当時名古屋大学から早大理工学部に移って来たばかりの若き大西 劉教授の研究室では手作りの光度計など見せられ、もともと小学生の頃から好きだった電気や機械いじりの虫がうごめき始め、生化学に電子工学を取り入れた分野を勉強したくなった。当時、こうした研究者としてアメリカの Britton Chance という人が最も有名であった。この人は学部では電気工学を専攻し大学院で物理化学をやった、その後はミトコンドリアの酸化還元・リン酸化反応を独自に開発したユニ

ークな分光装置で測定し次々に成果を発表していて、ほぼこの分野では彼の独壇場であった。「蛇に怖じず」やら若気の至りやらで課程修了前年(1966)の夏に手紙を出すと何とすぐ返事をもらい、曲折はあったが翌年の秋には Philadelphia の彼の研究室に入ってしまった。研究室といっても実際は Johnson Research Foundation というペンシルバニア大学の医学部附属の研究所である。7階建ての建物の 5階と 6階を占めているだけで大して広くなく、そこに何と 150 人もの人がひしめいていた。

さて曲折の一つは行く直前(その年の夏)東京で開催された国際生化学会議に Chance 教授がやってきてついでに「面接」されてしまったことである。彼の宿舎だった日本橋の旅館にはもう一人の日本人の志望者が来ていて一緒に面接を受けた。この人が文法も発音もひどいものなのに良く英語をしゃべり気弱な私はかすんでしまった。結局 2 人とも採用されたのだが、私のこの英語ではと気をきかせてくれたようで、現地へ行ってみると私は日本人ばかり居る研究室へまわされた。そこは助教授と 2 人のテクニシャンだけでこじんまりしていて良いのだが、全員日本から来た方々でなにしろ朝から晩まで日本語ばかり。廊下からときどき英語が聞こえてくると「あっそうか私はアメリカにいるのだ！」なんて感じ。なかなか英語が上達しない。この助教授が光合成の権威(といってもまだ 30 代だから新進気鋭というべき)として既に当時から世界的に著名だった西村光雄先生である。もともと光合成には興味があったので良かったのだが、話はそう単純ではなかった。机とイスは西村研究室にあったがすぐ隣の John Williamson 教授の研究室に「派遣」されてしまった。

私の大学院での研究は前述のようにラセママーゼだが初めは研究室の助手だった水島昭二氏の当時日本では評判だった「解糖系の定量的解析」という研究シリーズの一部をお手伝いした。これは当時世界的によく始まりかけていた代謝調節研究のはしりともいえる。水島さんはまもなくこれを止めてしまいもっと先端の生体膜研究に移行してゆくのだが、私の行った Chance の研究所の 1 部門が動物の肝臓を使って代謝調節の研究をやっていた。これを主宰している Williamson 氏はイギリス人だが小柄で研究所の当時非常に沢山居た日本人たちはチビジョンとか陰で呼んでなぜか嫌っていた。最初私はこの研究室へつれていかれ測定に使う大腸菌の酵素(何であったか全く記憶にない)の精製を手伝った。日本人たちに同情されたが、私はそれこそ初めて英語を使って研究を手伝う快い緊張感で結構楽しかった。同じ頃雇われた日系人のポストドクが化学屋で酵素は全く分からないということで実際は「指導」した。どうも Williamson 氏は日系人ということで英語のできない私に「配慮」したつもりもあったかもしれない。幸いこの人は 3 世で全く日本語は話せなかったので待望の英語の勉強には大いに役だった。私の指導が良かったせいか 1 月くらいで目的を達して多少の信用を得、西村研に戻った。

しかし、まだ直ぐには光合成に入れなかった。Chance 先生にとっては光合成は道楽で本業はミトコンドリアの電子伝達・酸化的リン酸化ということもあって最初は光合成とは直接関係ない別の仕事を与えられた。西村先生も相当迷惑だったろう。私は微生物屋(Microbiologist)ということになっていたのも、当時物理屋のポストドクが扱っていてあまりうまく行っていなかった単細胞緑藻 *Chlamydomonas* の変異株 (Pale green mutant) というのを与えられ、結構苦労した。光合成をやる緑藻だが色素がおかしくなった変異株で「光に弱く」なっていて、暗いところで炭素源を与えて育てる。それでも比較的短期間になんとか菌体がとれるようになった。Chance 先生の目的はミトコンドリアをとることでふつう藻類では葉緑体が多くミトコンドリアを分けてとることは至難だが、葉緑体が少ない変異株ならやりやすいだろうとの目論見である。当時研究所では様々な生物からミトコンドリアをとっている人たちが世界中から招かれてきていた。丁度阪大からきた大西智子博士は酵母のミトコンドリアをとろうしておられたので道具がそろっていて便利であった。結局どうしても緑色の画分しかとれず、結局粗膜破片標品(要するにつぶしただけ)の状態でいろいろな測定をやることになった。幸いなことに Chance 先生は忙しくて(その理由は後で述べるが)、あまりうるさく言われず西村先生の薦めで、先生の持っている 2 波長分光光度計(Chance 先生の考案になる機械でこの研究所の附属工場で作されたもの)でいろいろ測定をやってみた。西村先生はもっぱら紅

色光合成細菌を使って当時最先端のリン酸化の研究をされていたので、それに関係する試薬がいろいろあり、使ってみなさいと言われるままに、入れては起こる変化を次々に調べていった。結果が出るとはじめて勉強して、またやってみるということを繰り返しているうち、何とか PSI のまわりのサイクリック電子伝達系として話がまとまってきた(6,7)。結局この研究所にいた 2 年間で 3 回ほど学会発表もしたし、3,4 報の論文も出した。1969 年秋、西村先生は九大教授に赴任され帰国。私はまた紆余曲折を経て結局当時光合成研究のメッカの一つだったケタリング研究所(Charles F. Kettering Research Laboratory)に移った。

Kettering という人は数々の重要な発明をして自動車会社(GM)の幹部になった人だが、一面のトウモロコシに囲まれた片田舎に育ち引退後私財を投じて植物の光合成研究のための施設をつくったのがこの中西部オハイオ州の真中辺にある人口 5 千の小さな村 Yellow Springs にある研究所である。ここで私は初めて「PSI の初期反応」というテーマを与えられた。またまた紆余曲折(といっても研究室のお家騒動で私が行ったときは終わっていたのだが)のお陰でいきなり当時まだ珍しかったルビーレーザーの 20 ナノ秒パルス光で励起してマイクロ秒領域で吸光度の時間変化を測定する閃光分光法(Flash photolysis)装置をあてがわれた。当時生物試料用のこうした装置は世界中にほとんどなかった。ひとつは以前いた Chance の研究所、もう一つはベルリンの H. T. Witt のところにあったが、このオハイオの装置は全く世に知られていなかった。というのは私が行ったときようやく完成したばかりだったからだ。作った人が私の着く直前にボスとケンカして出ていってしまったので Chance 研からやって来た私が面倒を見るはめになったわけ。ボスの Bacon Ke という人は現在の中華人民共和国が成立する寸前にアメリカに逃れてきて苦学して物理化学で PhD をとった人だが、人格的に問題があったようで、私が行く直前に他にも 2 人ポストドクとスタッフなどが逃げ出していたことが来てみて初めてわかった。私もレーザー実験は Chance の所で人がやっているのをちょっと見ただけだったので一から始めた。結局、また後で述べるが、あれやこれややっているうちに半年ほどで Q スイッチルビーレーザーなるものをひとりで分解掃除組み立てまで出来るようになった。これを使った仕事をなんとかまとめて翌年春にシンポジウムで発表、論文にもしたが(8)、なにしろレーザーはお守りが大変。マイクロ秒領域の測定もしんどいので、何となくミリ秒のところばかり見るようになってしまった。幸い論文も一つ出したし、レーザー技術者(?)としてもボスの信用を得てあまりうるさく言ってくるようになったのを幸いに、扱いやすいキセノン閃光を使って、のんびりとミリ秒領域を見ていた。

## 研究歴その II — 光化学系 I にのめりこむ

ボスのももとの命令は P700 とそれに電子を供給していると考えられていたシクロム f の酸化還元の様子を生きた細胞で直接分光学的に観察して証明せよというものであった。ボスのアイデアはその当時評判高かった Bill Parson の研究のまねである。Parson は Chance 研でレーザーを使って光合成細菌でシクロム c と P700 に相当する P870 との関係をきれいに証明した(これは私が行く直前であった)。同じことを緑色植物のモデルと考えられるシアノバクテリア(当時はランソウといった)の生細胞を使ってやってみるというわけ。結局 Parson の実験のようにきれいなデータは出なかったが、とにかくまとめて書いたのが上記論文である(8)。ちなみに現在ではシクロム f が直接 P700 を還元するとは考えられていない。そんなこともあってもともと苦手な生きた細胞をやめ、つぶして膜部分だけにしたもので系を単純化した上、レーザー実験はお休みして、ミリ秒領域に移った。

さて当時の私は今考えるとそれまで 2 年間曲がりなりにも光合成の世界に居たにしては実にお粗末だった。もともと勉強嫌いで直接今やっている実験の周囲しか勉強しない怠け者だから当然であろう。P700 なんて述語もちょっと光合成を勉強していれば常識の単語のはずだが不勉強な私は一から始めなければならなかった。いざ勉強してみるとこの P700 なるもの実はそれほどよく分かっていないのではないかと思いはじめた。前述のように、オランダの Kok という物理化学者が 1956 年ころに最初に発表したのが、この天

才の一連の論文は結果と考察が主で読みにくい。方法も回転円盤を使って間欠照射をくりかえし、短時間で起こる速い変化を測定しようとする巧妙なものだ(1)。そこに記述されている結論はしかしながら 50 年後の今でもほとんど正しい。その後 1960 年代にはベルリンの Witt が登場する。この人も天才で、イギリスの Norrish-Porter が始めた閃光分光法(1967 年ノーベル賞)を光合成研究用に大幅に改良した装置を駆使して次々に独断的な論文を出している。私が始めた 1969 年はもう彼のこの種の研究の末期である。彼の論文の記述は Kok に輪をかけたすごい「簡潔」なものながら同じく結論は今日でもほとんど正しい。ただし「ほとんど」というところがミソである。私のオハイオでの仕事は Witt の追試から始まっている。マネといった方が正しい。ボスの Ke 氏は実は電気はダメで配線図も読めない。にもかかわらず研究所の電気工作室の専属技師 2 人と自分の研究室に雇った軍隊上がりのテクニシャンをうまく使って Witt の装置を再現してしまった。実際は私の前任者がほとんどやったらしいことが後で分かったが、豊富な研究費があったとはいえ完全に人まかせで世界に 2 つしかない装置を作らせたのは一つの才能ではある。ちなみに Chance 研の装置はレーザこそ使っているもののもっと原始的な低感度なもので測定の楽な光合成細菌にしか使えなかった。

前任者の Don Gorman 君は私とほとんど同じくらいの歳の人で学部では数学専攻だったがハーバード大学で遺伝学の PhD をとった秀才。エレクトロニクスは私と同じアマチュアだったようだが実に良くまとまった装置に出来上がっていた。レーザは 1960 年にメイマンが発明したルビーレーザであって、私が使い始めた 1969 年にはこれを作って売っているベンチャー企業が既にいくつもありそのひとつである。パルス幅を 20 ナノ秒に集中するため(Giant pulse)Q スイッチというものがついている。後にはずっと扱いやすい Pockel cell が使われるようになったが、当時ののは回転ミラー式というやつで、エアタービン駆動の小さな鏡が数万 rpm でサイレンのような大騒音を発して回る。ルビーレーザは 6—7 ミリ径で 10 センチくらいの長さのピンク色のルビー棒の両端面を完全に近い平行に磨きあげたものが本体である。Giant pulse 用に片面だけハーフミラーにしてある。まわりをかこむキセノン閃光管から強力な白色閃光をたたき込まれると(pumping)いわゆる coherent な単色光(レーザ光線)がハーフミラーの面から飛び出してくるといしかけ。大事なことは回転ミラーを含めて 3 つの面が完全に平行になるよう調整することである。閃光管からは 1 回の pumping で大変なエネルギーが出るため、ルビーの温度が上がらないよう水冷式になっていた。この水はルビーと直ぐそばに位置する閃光管を直接冷やす。ルビーもコンデンサからの数千ボルトの電圧が常にかかっている閃光管も水に漬かっている恐ろしさ。循環水はイオン交換樹脂を通してイオンフリーに保つ。水は完全なる絶縁体であることを改めて認識した。毎日使っていると 1 月位で分解掃除が必要になる。その度にヘリウムネオンレーザを使って光軸の再調整をやる。うまくいくようになるのに数ヶ月かかった。面白かったが大変なので簡単なキセノンフラッシュにくら替えしたというわけ。閑話休題。

### 研究歴その III — P700 と P430

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

CAT)でタイミングが制御され測定記録される。

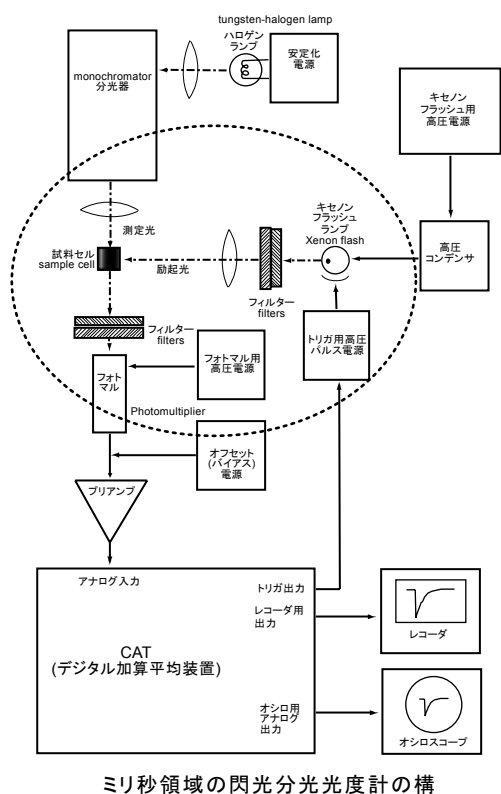


Fig.2. An instrument set-up for measuring flash-induced absorbance changes in msec range (10).

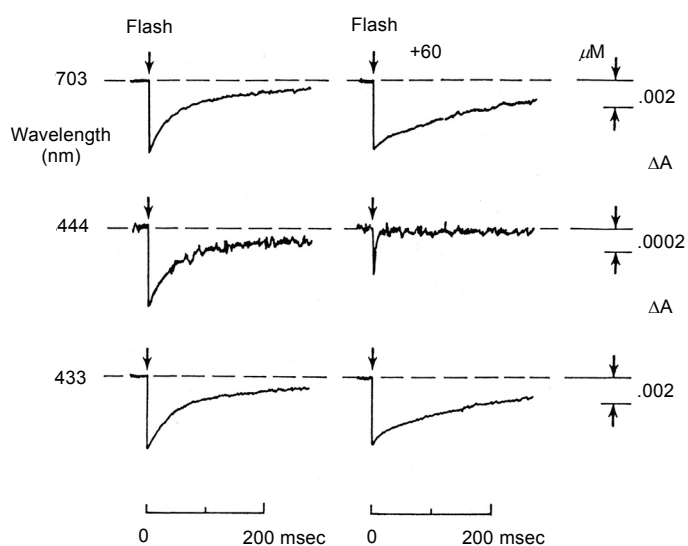


Fig.3. Flash-induced absorbance changes at 703 nm (upper), 444 nm (middle) and 433 nm (lower), in the absence (left) and the presence (right) of methyl viologen. Photosystem I particles from spinach (D144) was used for the experiment.

Fig.3 は実際の測定例である。矢印のところで閃光が発せられる。その前のトレースが暗所での吸光度を示している。一番下の段のトレース(測定光は 433 nm, 閃光は 700 nm)を見ると、閃光があたった瞬間トレースは下に一気に下がり、吸光度が低くなったことを示す。この変化は除々にもとに戻っていく。強い短い閃光で瞬間的に吸光度が下がり、次に暗所でもとに戻ってゆく過渡現象(緩和現象)を測定しているわけである。こうした装置はその後カリフォルニアに移ってから自分で作るようになり、最後に出来た1台を埼玉大学に持ち帰った(9-11)。

もとにもどる。シアノバクテリアをつぶして膜部分だけにしたものを試料にしているいろいろやっていた。電子供与剤としてよく使われるアスコルビン酸と TMPD(*N,N,N,N*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine)だけを入れた試料に閃光を当てて、ミリ秒領域での吸光度時間変化を見ていた。PSI の電子受容体として先に述べたメチルビオローゲン(MV)が当時知られていたわけだが不勉強な私は気づかず入れていなかった。実験結果が出てから文献を読むことが多い私が Witt の報告を読んでいて MV のことに気づいて入れてみた。そうしたら劇的な変化が起こった。再び Fig.3 の下の段をご覧ください。これは 430 nm 付近での吸光度変化である。P700 は光で可逆的に酸化される色素であって、酸化型と還元型の差スペクトルには 700 nm と 430 nm 付近にピーク(酸化型から還元型を減じた差スペクトルでは谷 — Fig.5 参照)があるということは Kok の時代から分かっていた。だから 700 nm では問題になる蛍光による干渉がない技術的に楽な 430 nm 付近を測定していたわけだ。MV を入れる前は、左のトレースのように、半減期 30 ミリ秒くらいで戻ってゆく。そこへ MV を入れたら、ずっと遅くなり半減期は 100 ミリ秒以上になった(右トレース)。これは妙である。今測定しているのは P700 のはずであるから、閃光で最初起こる吸光度の減少はその酸化(光酸化)を意味する。戻りは暗所における再還元である。この還元は予め加えてある電子供与

体(アスコルビン酸と TMPD)による化学的還元である. とすると MV のような電子受容体(弱い酸化剤)がこの戻りに影響を与えしかも遅くするというのはどういうことか? P700 の化学的還元反応は人工電子供与体が十分量ある状態の擬一次反応だと Witt は論文で書いている. そこで, このトレースを半対数方眼紙にプロットして見たら事態が分かり始めた(Fig.4).

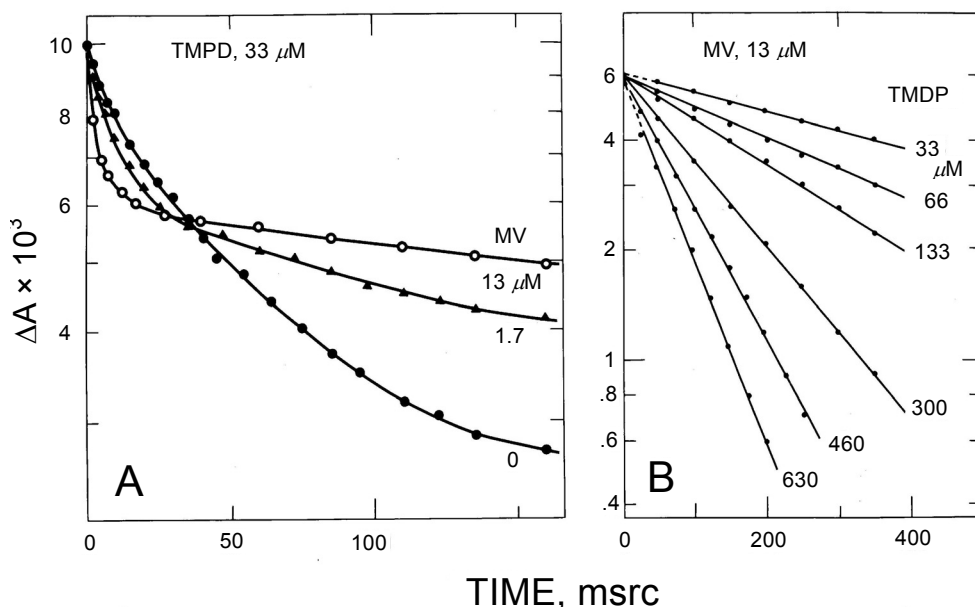


Fig.4. Flash-induced absorbance changes replotted on semi-logarithmic chart paper. Details are described in the text and the original report (12).

MV なしのコントロールは予想に反して直線にならない(左図の●). MV をたっぷり入れると直線になったが, 50 ミリ秒以下の初めの時期に非常に速い減衰を示す別のフェーズ(相)が見えてきた(左図の○). 直線になった相に着目して時間スケールを長くし還元剤 TMPD の濃度を変えて見た(右図). すると勾配が濃度に比例する典型的な擬一次反応の様相が現れた. 直線相と速い相について測定光の波長を変えて別々にプロットしたのが Fig.5 である.

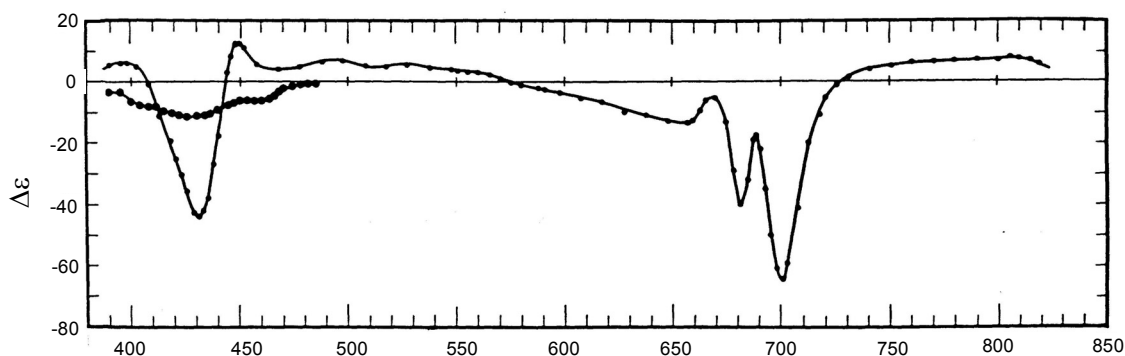


Fig.5. Flash-induced light-minus-dark difference spectra of P<sub>700</sub> and P<sub>430</sub>. Details are in the text. 波長 (nm)

大きい●が速い相, 小さい●が直線相である. 直線相は Kok が最初に報告しその後 Witt が測定して発表している P700 の差スペクトルとよく似ているし, 擬一次反応の様相から, 純粋の P700 の差スペクトルであると見た. Fig.5 は実は少し後に非常に慎重に測定して得た結果で, 吸光係数とともに今でも標準として引用されているものだが(14), 当時のもう少し荒っぽいものだった(13). 定性的には傾向は同じである. さて, 速い相(大きい●)は 430 nm 付近に山がある以外はかなり違うスペクトルである. 特に P700 の特長である 700 nm 付近には全く変化がない. さらに重要なことに気づいた. P700 にはいくつかの等

吸収点(Isosbestic point:分光用語で差スペクトルがゼロになる波長)があることを Witt が報告している。私が改めて精密に測定したこのスペクトルでは 407 nm と 445 nm の付近であるが、そこでこの速い相は決してゼロにならなくてははっきりと吸収変化がある(Fig.5)。したがって P700 とは別のものであると考えた。この時点でこの未知のものを極小点が 430 nm 付近にあることから P430 と命名した。さらに等吸収点で測定すればこの速い相だけの減衰特性が見られるはずである。これが Fig.3 の中段左である。驚くことに MV のないとき 703 nm, 444 nm, 433 nm の減衰特性が見事に同じであった(左の各段の3つのトレース)。MV を入れると、P700 だけ見ているはずの 703 nm では減衰が遅くなるだけだが(上段右), 433 nm では速いものと遅いものと 2 相になり、大部分をしめる遅い相は 703 nm におけるのと同じ減衰特性であった(下段右)。ところが 444 nm では全部が速くなってしまった(中段右)。MV は無色であるが還元型は青色でもう一つの等吸収点である 575 nm では吸収がある。これを利用して MV の還元そのものを測定した結果が Fig.6 である。MV を少しだけ入れると 575 nm での吸収増加が 444 nm での減衰と同じ様相で観測された(右)。別の実験で MV 濃度がある程度以上になると対数プロットで直線になるし勾配は濃度に比例することも確認した。P700 と TMPD の関係と同じ(擬一次反応)であるが、TMPD が還元剤であるのに対して MV は酸化剤であるから、P700 の暗所における再還元と同時に P430 の暗所における再酸化を見ていることになる。ということは P700 が光酸化されると同時に P430 は光還元されているということになる。

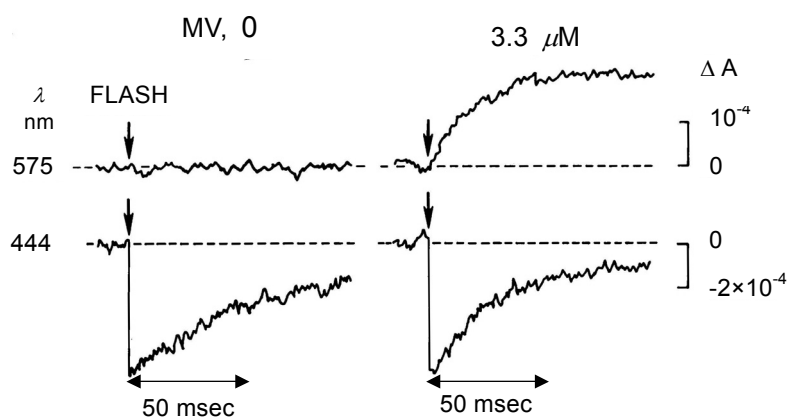


Fig.6. Flash-induced absorbance changes at 575 nm (upper) and 444 nm (lower), in the absence (left) and the presence (right) of methyl viologen. Photosystem I particles from spinach (D144) was used for the experiment.

どうもこれは当時までいろいろな物質がいろいろな人によって提唱されていたが証拠不十分で未だナゾとされていた初期電子受容体(P700 が酸化され飛び出す電子を最初に受け取る分子)そのものではないか。ちなみに MV のないときの減衰曲線は逆数プロットで直線になった。これを古典的二次反応で P430 が直接 P700 を還元している様子を表していると説明した。ここまでは一人でコツコツ考えながら実験していて、そのうちに事の重大さにだんだん興奮しつつあったのだが、数ヶ月間ボスに何も報告していなかったのが、遂に「何やってる」と聞かれてしまった。話したが信用しない。これらの現象がハウレンソウと他の数種のシアノバクテリアでもあることを確認したり、他にもいくつも試して証拠を固めたところで、まだ理解していないボスを差し置いて 1970 年の秋ごろ研究所内で 세미나を開き数十人の前で発表した。そして翌 1971 年 2 月にはアメリカ生物物理学会で初めて公表した。その間にいくつも論文を書いた。いろいろ曲折があったが速報は 5 月に米国アカデミーの機関誌 (Proc. NAS) に出せた(12)。6 月にイタリアであった国際光合成会議で世界に発表したが、何となく皆あつけにとられていた感じだった(13)。Chance 先生だけはうれしそうに握手を求めにきてくれたが Witt 氏は私が近づいたらソップを向いて行ってしまったのは今でも覚えている。ちなみに Chance と Witt は当時誰でも知る犬猿の仲で元の弟子の仕事を喜ぶ Chance 氏を Witt 氏は見ている不快だったこともあるが、後で私と同年代の Witt 研の人たちと話してわかったことだが、自分たちが見落としていたので、してやられたという悔しさが強かったらしい。

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



Norrish, Porter, Eigen(1967年ノーベル賞)だのが絡んでいて複雑である。最初に来た1967年秋私が幸いほっておかれた理由のひとつは Chance 先生は当時毎日スウェーデンからの電話を待っていてピリピリしていたからと聞いた。ずっと後で仲良くなったスウェーデンの老教授(授賞委員)の話では、それまで毎夏休暇はスウェーデンでヨット遊び(彼は大金持ちの上何とオリンピック金メダリスト)をし、かつ露骨に受賞運動していたとかで、委員会の不興を買ったらしい。1966年夏に私がもらった彼の手紙がスウェーデンから来た理由がその時初めて分かった。結局この年前記3人しかこの分野では受賞できなかった。Witt氏はMitchell説を支持する論文を発表していて、当時反Mitchell陣営の急先鋒だったChance先生がお好きなはずはない。なお、50代半ばだったお二人とも今なお現役で活躍中でWitt氏などは後述のように最近PSIの結晶解析をNatureに発表している。再び閑話休題。P430とP700に関してはこの時期やった測定結果で埼玉に来てから書いたもの(16)も含めて多数の論文を発表できた(12-16)。中でもP700の吸光係数(extinction coefficient)の論文(14)は未だに引用される私のベストセラーである。

#### 研究歴そのIV — 地下実験とEPRなど

私はこの年(1971年)の秋、この所有欲の強いKe氏のもとを去り、かねてから招ばれていたカーネギー研究所植物部門(Carnegie Institution of Washington Department of Plant Biology)という西海岸カリフォルニアのスタンフォード大学構内にあるやはり民間の研究所に移ってしまった。鉄鋼王カーネギーが学問の進歩などに役立てよと遺言して残した莫大な財産で運用されるこの財団は地震地学関係や動物発生学それから有名なCold Spring Harborなどいくつもの研究所を東部にもつが、これだけ西部にある。所長のC. S. French先生(知る人ぞ知るフレンチプレスの発明者)の自由にやれとの雰囲気では本当にノンビリしてしまいここに3年も居てコンピュータとエレクトロニクスばかり勉強していた。この時期にこの辺(シリコンバレー)でマイクロプロセッサが生まれたのだからいろいろ体験できて実に楽しかったが(11)、PSI関係の仕事は装置を組んだ以外ほとんど何もしていない。給料こそ大分上がっていたが相変わらずポストドクであった。そのうちFrench先生に気に入られてスタッフになれそうになったとき先生は定年(?)で所長をやめ、新しい所長は光合成屋ではなかったこともあってこの話はファイになった。スタンフォード大学はサンフランシスコの南に位置するが湾を隔てて車で1時間位東北へ行った所にカリフォルニア大学のバークレー校がある。そこには有名なCalvin(ノーベル賞ばかりで恐縮)が居たのだが、もうひとり光合成の有名人Arnon氏がいて私を招んでくれた。彼の研究室は1960年代にPSIの出口でフレドキシンや酵素が関与するNADP還元 of 生化学的メカニズムを確立したことで有名だが、当時は「3つの光化学系説」というのに固執していた。ちなみにこの説はつい最近までときどき浮上してきていたが(17)、彼が1994年に85歳で現役のまま亡くなられた後、消えた。

他に直ぐ行くところもなかったし、シリコンバレーを離れたくなかったし、Berkeleyというヒッピーの聖地にも興味があったので1974年秋に引っ越した。ここでの身分はResearch Biochemistといって大学の職員録にも載っていて、10年以上居る人はザラで単なるポストドクではない身分らしかったが決して終身雇用ではない。給料はまた大分上がった。仕事は2人の相棒と3人で2波長分光光度計でArnon説を支持するデータを出すことだった。1人でやれる実験をなぜ3人がかりでやってたのか今でも分からない。2波長分光光度計は前述のようにChance先生が開発し私が以前西村研で使っていたものである。Arnon研のはその後Amincoという会社が商品化したもの。これが私が招ばれた理由の一つと分かった。毎朝午前中一杯、午後の実験の計画のためディスカッションをやる。私の行くまではこの2人がArnon先生の指示をただ聞くだけで話は直ぐ終わっていたようだが、私はArnon先生の「3つの光化学系説」が嫌いなのですぐタテ突く。この説はP700なんか要らないという説で、吸光係数まで出している私が気に入るはずはない。当然議論は長引く。当時既に60過ぎのArnon先生はさすがに大物で30半ばの若造の話も腹を立てず辛抱強く聞いてはくれた。私の英語は以前怒りっぽいKe氏との白熱した(?)議論(debate)

でかなりうまくなっていたはずだが、ここで一段と磨きがかかった。なにしろ毎日である。午後からの実験は 5 時前には終わらせ相棒 2 人は帰宅。その後私はこの機械で自由に自分の考えた実験をやった。

Arnon 研には当時私位の歳の同じ身分のポストドクが 5, 6 人さらに助教授(やはり同じくらいの歳でテニユアはない)が数人, 皆 Arnon 先生独裁のもとに仕事をやっている。毎朝皆で仕事前にキャンパスの裏にあるコーヒー屋に抜け出す。ここで先生の悪口を中心としたおしゃべりでウサをはらす。私の英語ではとてもこのアメリカ人たちの会話に入れなかったけどリスニングの練習になった。その中でときどき出てくる語に **Underground experiment** というのがあった。どうやら核兵器の地下実験ではなくボスに無断でコソコソやる実験のことだった。私もこうして地下実験をやリ、P700 に関する論文を 2 つ書いた。それを斜面になったバークレーキャンパスの上の方にある Calvin 研でのゼミでしゃべった時、私としては不得意な数学を少し使った内容のためその物理化学者につつかれた以外はおおむね受けがよかったので、Arnon 先生の名前も付けて完成品の原稿を渡したのだけれど一向に見てくれない。しつこく催促して結局 1 年後にようやく発表できた(18,19)。

研究費は潤沢にあり、私は職員としていろいろな設備の購入で業者との交渉やら人を雇う交渉までやっていた。Arnon 先生はついに EPR(電子スピン共鳴装置:ESR)にまで手を出し、ドイツの Bruker 社のものを一番安かったという理由で買ってしまった。機械には全く弱い先生は私がお守りをするという前提であった。ところが来て見るとまだ製品化されたばかりの試作品みたいな代物。次々に部品はすっ飛び、そのたびにサービスマンが東海岸のアメリカ支社から飛行機でやってくる。物理の PhD をもつ実に有能なアメリカ人ですっかり仲良くなりずいぶん勉強になった。液体ヘリウムが使い放題だったこともあってイギリス製の熟練を要する微妙なクライオスタットも 1 年近くで使いこなすまでになった。今度は分光計に代わって高価なこの機器で再び「3 つの光化学系説」の証明にいそしんだわけである。装置が充分使いこなせるようになった頃また夜の「地下実験」を始めた。話は戻るが 1971 年に P430 を発表したとき同じ Proc. NAS 誌の 1 号前にやはり PSI の初期受容体として「膜結合型フェレドキシン」が発表されていた(21)。液体ヘリウム温度で始めて観測できるこの信号は世間一般も私自身も P430 と同じものとして議論していたが状況証拠でしかなかった。ここへ来て私も低温 EPR を使えるようになったので可視分光法と直接に比較してもっとはっきりした結論を出そうと思ったのである。分光実験の方はカーネギー研究所で私が以前作った装置を当時の共同研究者のスタッフが未だ使っていたのでそこで一緒にやることにした。こちらは夜というわけにいかないの、何度か休暇をとり 100 マイルをすっ飛ばして出かけていった。バークレーとカーネギーでやっていたこの地下実験の結果を発表したのは結局埼玉大学に来てからだった(20)。結論は「P430 は Component X (A2) である」というものであった。Component X とは最初に見つかった「膜結合フェレドキシン」(Malkin-Bearden が発見、後に Center A と命名された)とは別の鉄イオウクラスタで数年あとにカナダの研究者が発表したものである。A2 というのは又別の研究者(Sauer ら)が分光学的に観測して命名したもので、記載されているスペクトルをプロットし直して差スペクトルを出して見ると P430 そっくりになるのだ(22)。

彼らは考察で A2 と命名し P430 とは別物として扱っているが、その理由を以下に説明する。Component X は現在 FeSx と省略される鉄イオウクラスタで大サブユニット(PsaA/PsaB)に結合しているものだが、非常に強い還元状態(低い酸化還元電位)で初めて見えてくる EPR 信号( $g = 1.76$  付近)として発見された。Center A や少し後で見つかった Center B はもっと高い電位で還元されることから、同じく非常に低い電位で初めて見えてくる A2 を、より初期の受容体として位置づけた。ただし Component X 発見以前にたてられた P430=Center A/B 説をそのまま受け入れてしまったため、P430=A2 (Component X) の可能性を見逃してしまった。詳細は省略するが、私のこのとき出した「P430 は Component X (A2) である」説は当時から無視され、最近 Ke 氏の書いた回顧録(23)でも未だ完全に無視されている。埼玉大学にきてからも O 君らががんばって実験してくれた結果これをサポートする結果が

出て論文も書いているのだが(24). ちなみに Sauer と Bearden は Calvin 研, Malkin に至っては Arnon 研に居て毎朝コーヒーショップに行く仲間だったのだが一度も PSI について討論をした覚えはない.

### 研究歴その V — 複合体, サブユニットそしてクロロフィル a' など

そうこうしているうち, 1978 年暮れに九大の西村先生から電話を頂き, 埼玉大学に行かないかとのこと. 埼玉大学の鈴木浩一先生からもお電話を頂いた. 滞米生活も 12 年近くなり, 両親も老いてきたことだし有り難くお受けして翌年 4 月助教授として帰国赴任. 未だ独身ながら既に 40 だった. さて埼玉大学に赴任して最初の数年は当時できたばかりの基生研(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)の客員部門助教授を兼任して頻繁に愛知県岡崎市に出張していた. 基生研では未だ何もない新しい研究室に次々と機械を購入し据え付けた. パークレーでの 2 年間の経験を買われ, 低温 EPR が購入されることになったとき, 機種選定の段階でとなりの生理研の教授とうっかりアメリカ式 debate(正論を主張すること)をやってしまい, 後でこの医学系の大ボスの大変なお怒りを買ってしまったと分かった. 結局この教授の scientific ではない根拠(何であるかここでは触れない)に基づく主張が通り, 何とあの Bruker EPR が入ってきた. クライオスタットも含めて 4 万ドル(当時約 1 千万円)払ったと Arnon 先生から聞いていたのだが, Bruker 日本支社の最初の見積は本体だけで 3 千万円というのもびっくり. 機械も外観は代わったが相変わらず初期故障の連続. ただ日本人の若いサービスの人が有能で, 1 年かけてとにかく日本ではじめてのバイオ用液体ヘリウム低温 EPR を立ち上げた(25). 2 年間の客員任期の間にかかなりの数の論文が出たがどれも人のお手伝いばかりだった.

埼玉大学では初めて持った自分の研究室でこれからはじっくりと PSI 複合体の精製に専念する決意をしていた. 私の初めての卒業研究生の一人 K 君は修士課程に残ってくれ, その後の研究室の PSI 研究の礎を作ってくれ数年後には成果が出始めた(26). 私の手製の HPLC と東ソーから頂いた高価な SW カラムを駆使してコツコツとやっていた I 君は, 修士 2 年の 1986 年秋になって分子量 8 千位のタンパク質をホウレンソウからかなり大量にとった. 2 人で電車にのって当時江東区あたりにあった ABI 東京支社に出かけ N-末端アミノ酸配列解析をお願いした. I 君の試料はキレイで量も十分な上やってくれた女性が実に有能な方だったので一発で 30 残基以上判明してしまった. 配列をよく見ればシステインが 3 つもあつたりしたのに例の不勉強がたたり重大さに気付かなかつた. これが Center A/B のアポタンパク質(PsaC)であることが分かったのは, このシーケンスをその頃世界で初めて葉緑体(タバコ)DNA の全塩基配列をきめ発表されたばかりの杉浦昌弘教授(名古屋大遺伝子実験施設)に送り, 結果を知らされたその年の暮れである. ORF(未同定遺伝子)の中にこのタンパク質のアミノ酸配列にそっくりののを見つけたとのこと. ちなみに, この杉浦グループの仕事はほぼ同時に完成したゼニゴケ葉緑体 DNA の仕事(京大の小関・大山グループ)の業績とともに, この後世界中で始まった全ゲノム研究の嚆矢で我が国が誇るべき業績である. 後で分かったが当時阪大とデンマークの研究所でそれぞれ全く独立にシーケンスが出つつあり, 翌 1987 年はこれらの論文が同時に出て久しぶりに世界の檜舞台に出た喜びを味わった(27). 1987 年という年は, 春埼玉大学キャンパスで 1000 人からの参加者のあった日本植物生理学会大会を開催するお世話をしたり, 教授に昇進, 夏には 3 ヶ月アメリカに出張して, 私的には東京に引っ越したり, かつての P430 の 1971 年とともに私にとって印象深い年であった. その後修士を卒業後会社にいていた S 君が出来たばかりの博士課程に戻ってきた. 遺伝子の技術を持ってきてくれて, それから理研の井上頼直さんの研究室から頂いた好熱性シアノバクテリアのいくつかの PSI サブユニットの配列決定が続いた(28-30). そのうち F 君が偶然熱ショックタンパク質(HSP:分子シャペロン)の遺伝子をひっかけ(31), それを機会にこの世界にも入り込み, 丁度このころ来てくれた仲本準氏が現在大きく発展させつつある(32).

話は少しさかのぼる. 1984 年暮れか 1985 年初めだったか定かではないが基生研に教授で移ったば

かりの旧友村田紀夫氏に東大生研(生産技術研究所)の渡辺 正氏(当時助教授)を紹介された。彼は工学系の化学者だがクロロフィル類の HPLC による定量分析法を開発し、いろいろな植物試料を分析しているうちにそれまで人工産物とされていたクロロフィル a のエピマ(Chlorophyll a' : Fig.7)がどの試料にもクロロフィル a の数百分の 1 だけ含まれていることに気付いた。その量比がクロロフィル a : P700 比に近いとらみ、「P700=Chlorophyll a'」仮説を立てた。私は P700 定量の権威ということで、村田氏が紹介したわけである。早束手伝った。その結果は P700 : a' 比は 1 : 2 ということで 1985 年に発表された(33)。当時 P700 はクロロフィル a の 2 量体(ダイマー)と考えられていたから、このときの結論は「a ではなく a' のダイマーである」というものだった。翌 1986 年修士課程に入ってきた K 君が大サブユニット 2 つだけで光化学活性をもつ標品を作ってくれた。これは当時間違ひなく世界初だったのだが、K 君の名人芸的一面もあり、実際発表したのは翌年卒論で入ってきた T 君がより再現性のある方法を開発してくれてからであった(35)。当時、私も特に強い界面活性剤(LDS)を使って PSI 標品を作った。これはほんの少しだけクロロフィル a が残っているほとんど無色の標品で大サブユニット(現在の PsaA と PsaB)だけで構成され活性は全くない。これに、渡辺さんがくれた Chlorophyll a' の純品を混ぜたら P700 が出来るかしらと思ったのだ。結果は予想通りで(Fig.8), 化学的酸化還元(中段), 明暗(下段)共に P700 の差スペクトル(上段)とかなり良く似ている。この実験は今振り返ると自分でほとんど全てやった最後のものになってしまったが、とにかくすぐに発表した(36)。有名な国際誌だから世界中皆読んだはずだが反響はなかった。1990 年代になって岡崎であったシンポジウムでこの話をしたら、アメリカの研究者たちは初めて聞くようなビックリした顔をしたが、その後も相変わらず総説などでもほとんど無視されて来た。その間、渡辺研究室で抽出法などが改良された結果、どうしても 1:1 になるということで(34), 私たちはヘテロダイマーの可能性を示唆した(36)。

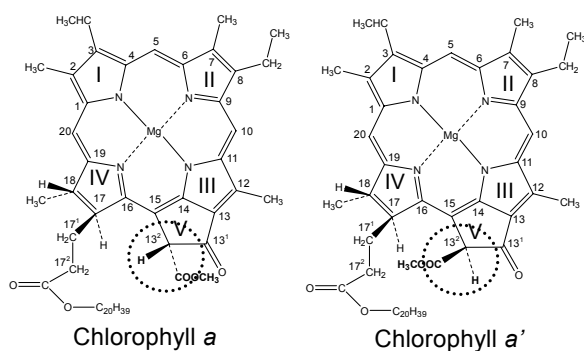


Fig.7. Structures of chlorophyll *a* and its epimer, chlorophyll *a'*. Difference is shown by the circles.

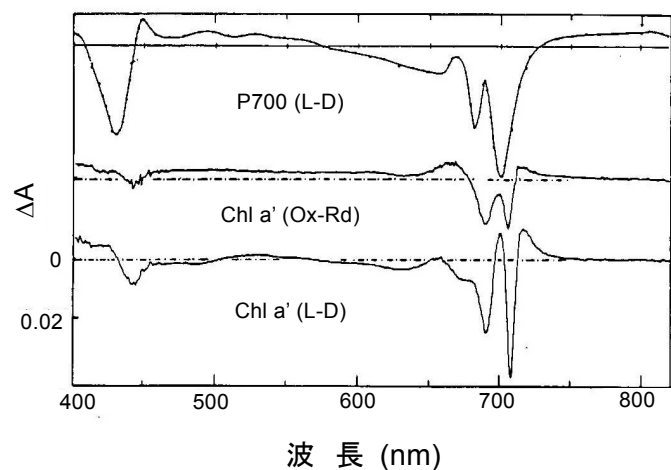


Fig.8. Light-minus-dark difference spectrum of P700 (upper), chemically induced (middle) and light induced (bottom) oxidized-minus-reduced difference spectra of reconstituted P700 (PsaA/PsaB protein complex + chlorophyll *a'*).

話は変わって 1992 年名古屋で国際光合成会議があったとき、私が座長をやった PSI の部会の発表者の一人は何とあの Witt 先生だった。多分 80 歳近かったと思うのだが、PSI の結晶解析の 3 次元構造を発表して話題をさらった。翌日の朝日新聞に座長の私のコメントと共に載った。まだここでは P700 の三次構造ははっきりしていなかった。それから 10 年近く後に彼らは相当細部まで立ち入った構造を Nature 誌に発表した。もう 90 歳近いはずの Witt 氏がどこまで関与したのかは別として、この 2001 年の論文には、P700 の構造が Chlorophyll a と Chlorophyll a' のヘテロダイマーとして姿を現した(37)。私たちの最初の発表から 20 年近く経って Chlorophyll a' もようやく認知されたようだ。

## おわりに

ここ十年近く雑用にかまけて私の研究活動は低下、それでも学生諸君ががんばってくれて、前任の鈴木先生のヨウシュヤマゴボウまで含めた1報をなんとかものした(38)。どうやら私にとって最後のPSI関連の原著論文になりそうである。ここ数年大昔のサイクリック系関連の仕事に戻り、Y君、S君ががんばってくれた。そして今最後の卒研究生U君がよい結果を出してくれてしめくくれるのを楽しみにしている。最近研究室に来てくれた若い日原(園池)由香子さんもPSI関係でDNAマイクロアレーを駆使した研究などで既に世界的だし、仲本君もシアノバクテリアのHSPでは世界でも指折りの研究者である。この間私がお手伝いしたPSI以外の仕事は結構あるが、矢部さん(東大分生研)のPatch clamp、関島先生・藤倉さん(埼玉県立大)のカイコACPIP、それにクロロフィルa'関係で現筑波大の小林君などの仕事など退職後もお手伝いするつもりでいる。これまで私を支えてきてくれた大勢の学生さんたちや西城戸講師それに生化学科・分子生物学科をはじめ多くの先生方に深く感謝し、この独断と偏見に我田引水と自画自賛の拙文を終わらせて頂く。

## 参考文献

1. Kok B. On the reversible absorption change at 705  $\mu\text{m}$  in photosynthetic organisms. *Biochim Biophys Acta* **22**: 399-401 (1956).
2. Hiyama T. Photosystem I: Structures and Functions. in '*Handbook of Photosynthesis*' M. Pessarakli ed., Marcel Dekker, pp 195-217 (1996);  
改訂版現在印刷中(2004年出版予定)
3. 檜山哲夫 光化学系Iを構成する蛋白質. *蛋白質 核酸 酵素* **34**: 768-772 (1989).
4. 檜山哲夫 鉄イオウクラタスタの生化学. *CACS Forum* **8**: 2-8 (1988).
5. Hiyama T., Fukui S., Kitahara K. Purification and properties of lactate racemase from *Lactobacillus sake*. *J. Biochem (Tokyo)* **64**: 99-107 (1968).
6. Hiyama T., Nishimura M., Chance B. Energy and electron transfer systems of *Chlamydomonas reinhardi*. II. Two cyclic pathways of photosynthetic electron transfer in the pale green mutant. *Plant Physiol.* **46**: 163-168 (1970).
7. Hiyama T., Nishimura M., Chance B. Energy and electron transfer systems of *Chlamydomonas reinhardi*. I. Photosynthetic and respiratory cytochrome systems of the pale green mutant. *Plant Physiol.* **44**: 527-534 (1969)
8. Hiyama T., Ke B. Laser-induced reactions of P700 and cytochrome f in a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *Biochim Biophys Acta* **226**: 320-327 (1971).
9. 檜山哲夫 生物試料の微小吸収変化の測定, 「微小スペクトル変化の測定」(井上頼直編), 学会出版センター (1983).
10. 檜山哲夫 ミリ秒・マイクロ秒の領域, 「計算機分光学の原点」(前田浩五郎編), pp83-92, 時潮社 (1998).
11. 檜山哲夫 雑談 --- パソコン昔話など 埼玉大学総合情報処理センターニュース **7**: 16-19 (1999).
12. Hiyama T., Ke B. A new photosynthetic pigment, "P430": its possible role as the primary electron acceptor of photosystem I. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 1010-3 (1971).
13. Hiyama, T., Ke, B. P430: a possible primary electron acceptor of photosystem I. In *Proc. II International Congress of Photosynthesis*. Ed. G. Forti, pp491-497 (1971).
14. Hiyama, T., Ke, B. Difference spectra and extinction coefficients of P 700 .

- Biochim Biophys Acta* **267**: 160-71 (1972).
15. Hiyama T., Ke B. A further study of P430: a possible primary electron acceptor of photosystem I. *Arch Biochem Biophys* **147**: 99-108 (1971).
  16. Hiyama T. Quantum yield and requirement for the photoreduction of P700. *Physiol. Veg.* **23**: 605-610 (1985).
  17. 檜山哲夫 光化学系 I 不要説—光合成明反応の見直しは必要か? *蛋白質 核酸 酵素* **41**: 2130-2131 (1996)
  18. Hiyama T., McSwain. B.D, Arnon D.I. Correlation of redox levels of component electron carriers with total electron flux in an electron-transport system. P-700 and the photoreduction of NADP+ in chloroplast fragments. *Biochim Biophys Acta* **460**: 65-75 (1977).
  19. Hiyama T., McSwain. B.D, Arnon D.I. Evidence for two types of P-700 in membrane fragments from a blue-green alga. *Biochim Biophys Acta* **460**: 76-84 (1977).
  20. Hiyama T., Fork D.C. Kinetic identification of component X as P430: a primary electron acceptor of Photosystem I. *Arch Biochem Biophys* **199**: 488-496 (1980).
  21. Malkin R., Bearden A.J. Primary reactions of photosynthesis: photoreduction of a bound chloroplast ferredoxin at low temperature as detected by EPR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* **68**: 16-19 (1971).
  22. Sauer K, Mathis P, Acker S, van Best J.A. Electron acceptors associated with P-700 in Triton solubilized photosystem I particles from spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **503**: 120-134 (1978).
  23. Ke B. P430: A retrospective, 1971-2001. *Photosynthesis Res.* **73**: 207-214 (2002).
  24. Hiyama T., Ohinata A., Kobayashi S. Paraquat (methyl viologen): Its interaction with primary photochemical reactions. *Z. Naturforsch.* **48c**: 374-378 (1993).
  25. 檜山哲夫 電子スピン共鳴法. *実験生物学講座 4 生化学的実験法* 丸善 (1983).
  26. Hiyama T., Katoh A., Shimizu T., Inoue K., Kubo A. Preparation and properties of photosystem-I reaction center complex. in *Progress in Photosynthesis Research*, Biggins J. ed. Vol II, pp45-48, Martinus Nijhof Publishers (1987) .
  27. Hayashida N., Matsubayashi T., Shinozaki K., Sugiura M., Inoue K., Hiyama T., The gene for the 9 kd polypeptide, a possible apoprotein for the iron-sulfur centers A and B of the photosystem I complex, in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet* **12**: 247-250 (1987).
  28. Shimizu T., Hiyama T., Ikeuchi M., Koike H., Inoue Y. Nucleotide sequence of the *psaC* gene of the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3644 (1990).
  29. Shimizu T., Hiyama T., Ikeuchi M., Inoue Y. Nucleotide sequences of the *psaA* and *psaB* genes encoding the photosystem I core proteins from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Plant Mol Biol* **18**: 785-91 (1992).
  30. Sue S., Sugiya K., Furuki M., Shimizu T., Inoue Y., Nakamoto H., Hiyama T. Nucleotide sequence of the *psaD* gene from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Photosynthesis Res.* **46**: 265-268 (1995).
  31. Furuki M., Tanaka N., Hiyama T., Nakamoto H. Cloning, characterization and functional analysis of groEL-like gene from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which does not form an operon with *groES*. *Biochim Biophys Acta* **1294**:

106-110 (1996).

32. Nakamoto H., Hiyama T. Heat-shock proteins and temperature stress in '*Handbook of Plant and Crop Stress*', M. Pessarakli ed., Marcel Dekker, pp 399-416 (1999).
33. Kobayashi M., Watanabe T., Nakazato M., Ikegami I., Hiyama T., Matsunaga T., Murata N. Chlorophyll a'/P-700 stoichiometries in higher plants and cyanobacteria determined by HPLC analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **936**: 81-89 (1985).
34. Watanabe T., Kobayashi M., Nakazato M., Ikegami I., Hiyama T. Chlorophyll a' in photosynthetic apparatus: Reinvestigation. in *Progress in Photosynthesis Research*, Biggins J ed. Vol I, pp303-306, Martinus Nijhof Publishers (1987).
35. Hiyama T., Yanai N., Takano Y., Ogiso H., Suzuki K., Terakado K. A Photosystem-I Reaction center complex constituted only by two subunits. in *Current Research in Photosynthesis*, Vol II, 587-590 (1990).
36. Hiyama T., Watanabe T., Kobayashi M., Nakazato M. Interaction of chlorophyll a' with the 65 kDa subunit protein of photosystem I reaction center. *FEBS Lett.* **214**: 97-100 (1987).
37. Jordan, P. Fromme, P. Witt, H. T. Klukas, O. Saenger W., Krauss, N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411**: 909-917 (2001).
38. Hiyama T., Yumoto K., Satoh A., Takahashi M., Nishikido T., Nakamoto H., Suzuki K., Hiraide T. Chromatographic separation of a small subunit (PsbW/PsaY) and its assignment to Photosystem I reaction center, *Biochim Biophys Acta* **1459**: 117-124 (2000).