特集

時間相関単一光子計数法による光合成初期過程の研究

山 崎 巖*

(1987年 7 月 1 日 受理)

Photosynthesis Primary Processes Studied with Picosecond
Time-Related Photon-Counting Method

Iwao YAMAZAKI*

(Received July 1, 1987)

Time-correlated single-photon counting method combined with a synchronously pumped, cavity-dumped dye laser is now an essential technique for investigating dynamical behavior of biological systems. Particularly, the use of a microchannel-plate photomultiplier results in much higher time-resolution than conventional photomultipliers. Two examples of application to studies of photosynthesis primary processes are shown concerning (1) the sequential energy transport in the phycobilin antenna pigment system of some algae and (2) the reaction kinetics in reaction centers I and II in green alga, *Chorella pyrenoidosa*. A fluorescence band (F700) was observed at 690-730 nm in the initial time region (0-180ps) along with the well-known spectrum (F685) of PSII-Chl *a*. The decay of F700 is governed by a fast energy transfer process from the antenna Chl *a* of PS I to P700 of RC I.

Key Words: Photosynthesis, Energy transfer, ps laser, Photon-counting, Fluorescence.

1. はじめに

植物の光合成反応は、太陽からの光エネルギーを電気化学エネルギーへ変換し、さらに糖の生成に至る化学的エネルギーへ変換する一連のエネルギー変換過程である。つくられた糖は細胞の増殖、分化のエネルギー源となり、地球上のすべての生物のための栄養源を提供している。この一連の光合成反応過程のうち初期過程すなわち、光の捕集と酸化還元反応から成るいわゆる「明反応」、については光との関わりが深く古くから光生物学の対象として多くの研究者に

よって扱われてきた。

光合成反応のダイナミクスを追及する研究方法としては主として時間分解蛍光分光法および過渡吸収分光法が用いられ、前者では微弱発光に対する検出感度が高いこと、後者では光検出器の応答速度が優れ、装置の時間分解能が高いこと、などが特徴としてあげられる¹⁻⁴⁾。いずれの方法においても、近年のナノ秒・ピコ秒パルスレーザーの進歩によって、それを励起光源とする時間分解分光法において光合成系の反応過程を実時間で直接的に調べることが可能になった。光子計数法による時間分解蛍光分光法につ

* 分子科学研究所 (〒444 岡崎市明大寺町西郷中38)

* Institute for Molecular Science, (Myodaiji, Okazaki 444)

Table I Characteristics of pulsed-light sources and their application to the time-correlated, photon-counting measurement.

Sources ^{a)}	Pulse width (ns)	Average power (mW)	Pulse energy (J/pulse)	Repetition rate (Hz)	Accumulation ^{b)} time
Discharge ^{c)} lamp (D ₂)	5	2.6×10^{-12}	1.3×10^{-15}	2000	20 min
N ₂ -dye ^{d)} laser	4	5×10^{-4}	1×10^{-5}	50	10 hr
Sync-pump ^{e)} dye laser	0.01	8×10^{-4}	1×10^{-9}	8×10^5	3 s
Excimer ^{d)} dye laser	12	2.5×10^3	1.5×10^{-3}	200	2 hr
UVSOR ^{f)}	0.4	10^{-4}	10^{-15}	0.9×10^8	30 min

a) Monochromatic light at 300 nm.

b) Time for a decay curve measurement in accumulation up to 5×10^4 counts.

c) Deuterium (80 Torr) discharge lamp under the operation of applied voltage 3 kV, capacitance 10 pF.

d) Second harmonic laser light from typical commercial Nz-dye lasers.

e) Second harmonic laser light from a synchronously pumped, cavity-dumped dye laser employed in this study.

f) Synchrotron orbit radiation from UVSOR in Institute for Molecular Science (Okazaki).

いていえば、最近ではシンクロナス励起モード同期色素レーザーが普及し、数ピコ秒のパルス幅をもちしかも繰り返し速度の著しく高いパルス光を比較的容易に使用することが可能になり、時間相関光子計数法は時間分解能および装置の感度および精度の点で飛躍的に向上することになった^{2,4)}。この事情を Table I で見てみよう。この表には時間相関光子計数法において、種々のパルスレーザーを励起光源とする場合の特徴をまとめた。シンクロナス励起モード同期色素レーザーを用いた場合次のような利点がある。

- (1) パルス幅が5-10ps程度であり、これまでのパルス光源と比較して2桁短い。
- (2) パルスあたりのエネルギーは 3×10^{-8} J (KDP結晶などによる第2高調波では 1×10^{-9} J) であり、他のレーザー例えば Nd:YAGレーザーと比較して数桁小さいが、生体系を扱う場合に生体系の損傷を少なくすることができるという利点となる。
- (3) 繰り返し速度が高く、蛍光減衰測定時間を著しく短くすることができる。

これらの利点を活かして、筆者のグループを含めていくつかのグループがこの実験方法および装置に基づいて、生体系の研究を進めている。

ここでは光合成アンテナ色素系および反応中心における光エネルギー伝達に関して、筆者がこれまで進めてきたピコ秒時間分解蛍光スペクトルに基づく研究結果を中心に、次の3つの問題について紹介する。紅藻、らん藻および緑藻をとりあげ、生細胞中のフィコビリ色素クロロフィル系について、(1) 外殻色素蛋白から内殻反応中心に至る一方向の光エネルギー伝達のダイナミクス、(2) フィコビリゾームの蛋白構成において異なる二三の藻類についての比較から、蛋白構造と光伝達機能との関係、(3) チラコイド膜中の反応中心 I に由来するクロロフィル蛍光を検出し、反応中心における反応論の問題、について述べる。

2. ピコ秒レーザーと時間相関光子計数法の実験装置

Fig. 1 に筆者の研究室で用いている実験装置の概略を示す。ピコ秒レーザーとしてシンクロナス励起モード同期色素レーザー (Spectra Physics 375, 344 S) およびアルゴンイオンレーザー (Spectra Physics 171-18) を用いている。色素レーザーは繰り返し速度 800 kHz で発振させ、1個のパルスの時間幅は5-10ps (fwhm) 出力エネルギーは 6.8×10^{-4} W/cm² (570 nm)

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental setup of a picosecond laser and a time-correlated single photon-counting method. PD, photodiode; TAC, time-to-amplitude converter; MCPHA, multi-channel pulse-height analyzer. See text for details.

である。観測系は時間相関光子計数法に基づく蛍光減衰測定装置である^{4,5)}。まず試料から発せられた蛍光は分光器（ニコン P 250）で分光され、マイクロチャンネルプレート（MCP）光電子増倍管（浜松ホトニクス R1564 U）により検出される。光電子増倍管からの信号は1 GHz プリアンプ（HP 8447 D）により増幅された後、通常の時間—電圧変換系により蛍光減衰曲線を得る。ここで用いている MCP 光電子増倍管は2枚の MCP をもち、電子走行距離が短い（～0.5 mm）ことに対応して電子走行時間の拡がりがある通常の光電子増倍管に比較して短く、その結果レーザー散乱光パルスが40 ps の半値幅をもって観測される^{4,5)}。とくに最近では、チャンネルプレートにおけるチャンネルの直径が従来の12 ミクロンに対し6 ミクロンのタイプが実用化され、さらに高い時間分解能が得られている⁶⁾。

実験では始めに多くの観測波長について蛍光減衰曲線が測定される。通常0.625 nm ずつ観測分光器の波長を駆動し、問題とする蛍光スペクトルの波長範囲600 から750 nm あるいは550 から750 nm にわたり240 あるいは320 個の減衰曲線が測定される。1つの波長での減衰曲線測定は10秒間の積算時間で行われ、1個の試料についての測定時間は1 ないし1.5 時間である。減衰曲線の測定の後、任意の時間領域についての時間分解スペクトル（最小時間差2.6 ps）の作製が行われる。これらのデータ処理および装置の制御はすべてコンピューターによって行われる⁴⁾。

3. 光合成アンテナ色素系における光エネルギー伝達

らん藻、紅藻など海中に生息する藻類の光合成色素系は、緑色高等植物にみられるチラコイド膜中のクロロフィルの地に、補助色素として種々のフィコビリ蛋白の集合体であるフィコビリゾームをもち、光合成反応中心への効率の高い光エネルギー伝達の役割を担っている^{7,8)}。Fig. 2 に種々の藻類におけるフィコビリゾームの構造模式図を示す。この光エネルギー伝達過程は、蛋白の高次構造の中に配列した開環型テトラピロールが発色団分子となって、電子励起分子が関与する双極子—双極子相互作用によるいわゆる Förster 機構によって起こるのであるが、光エネルギー伝達の効率が非常に高い（～0.9）ことが特徴的であり、高次構造分子集合体における分子過程としても興味をもたれる。Fig. 3 にそれぞれのフィコビリ蛋白の吸収および蛍光スペクトルをしめす。これらの光エネルギー伝達の機構については古くからとりあげられてきたが⁹⁻¹¹⁾、とくに最近では光子計数法による蛍光法あるいは過渡吸収法によって、ピコ秒時間分解測定に基づいて、この過程が直接的に調べられてきている¹²⁻¹⁵⁾。

われわれは4つの型の藻類（Fig. 2），すなわちフィコエリトリン（PE）を含むもの（PE細胞），PE を含まないもの（PC細胞），および

Fig. 2 Schematic representation of the stacking phycobiliprotein structures in phycobilisomes of various species of blue-green and red algae.

Fig. 3 Absorption and Fluorescence spectra of phycobiliproteins. Förster's critical distance R_0 is estimated to be 59-64 Å from spectral overlap between absorption and fluorescence spectra for each pair of donor and acceptor pigments (Ref. 10).

その形状において、半球型のもの、半円板型のものなどをとりあげ蛋白構造の違いがエネルギー伝達のうえでどのような違いとして現れるか調べた。

3.1 紅藻およびらん藻の育生

Anabaena cylindrica (M-1), *Anabaena variabilis* (M-2) および *Anacystis nidulans* (M-4) は白色光照射 (2.5 W/m^2) の下で生育された。*Porphyridium cruentum* (R-1) は

ASP-2 溶媒中で生育された。*Flemmyella diplosiphon* (M-100) および *T. tenuis* は、赤色光照射 (2.5 W/m^2) の下で PE 細胞型を、また緑色光照射 (1.0 W/m^2) の下で PC 細胞型を生育した¹⁵⁾。

Fig. 4 Time-resolved fluorescence spectra of *Porphyridium cruentum* obtained with excitation at 540nm. The time zero corresponds to the time in which the excitation pulse reaches maximum intensity.

Fig. 5 Time-resolved fluorescence spectra of *Anacystis nidulans* obtained with excitation at 580 nm. The time zero corresponds to the time in which the excitation laser pulse reaches maximum intensity.

3.2 フィコビリゾームアンテナ色素系の時間分解蛍光スペクトル

P. cruentum (PE細胞型, 半円球型) Fig. 4
に540 nmのレーザー励起によって得られた時間分解蛍光スペクトルを示す。それぞれのスペクトルはその最大強度で規格化されている。初期の時間領域0—51 psでは、蛍光スペクトルは578 nmに極大をもつPEが主成分であるが、時間が進むにつれて645 nmに極大をもつPCが増加していく。51—128 psでは蛍光スペクトルはPCとAPCのスペクトルの重ね合わせである。128 ps以降ではAPC蛍光が660 nmに極大をもって現れ、同時にChl *a*の蛍光が681 nmに肩として現れてくる。333 ps以降ではChl *a*蛍光が主成分となる。480 ps以降ではスペクトルは変化せずPEとChl *a*のスペクトルから成る。ここでPEスペクトルが後の時間領域において消失せずに残っていることが注目される。

Fig. 6 Fluorescence rise and decay curves for the individual phycobilins of *P. cruentum*. The dotted lines are obtained experimentally from the spectrum analysis. The open circles in PE are the plot of the fast component which was obtained from subtraction of the slow component from the total decay.

A. nidulans (PC細胞型, 半円板型) Fig. 5
に580 nmのレーザー励起によって得られた時間分解蛍光スペクトルを示す。初期の時間領域0—51 psにおいては645 nmに極大をもつPCの蛍光が主となり、しかしこのスペクトルは時間とともに次第に長波長側へ移動し、660 nmに極大をもつAPC蛍光がその強度を増していく。200 ps後に681 nmに極大をもつChl *a*蛍光が現れ、600 ps以降ではChl *a*が主成分となる。しかしまだAPC蛍光が肩として残る。これらの時間分解スペクトルの解析によって得られた

Fig. 7 Fluorescence rise and decay curves for the individual pigments of *A. nidulans*. The dotted lines are obtained experimentally from the spectrum analysis. The solid lines are the best-fit curves calculated from equation of $\exp(-2kt^{1/2})$ type.

蛍光生成減衰曲線について、Fig. 6 および 7 に

それぞれ示す。

一連の時間分解蛍光スペクトル (Fig. 4 および 5) からは、PE, PC, APC および Chl *a* の蛍光が逐次的に生成し減衰していくことがわかり、励起エネルギーが色素蛋白の積層の順序で伝達していくことを示している。蛍光生成減衰曲線 (Fig. 6 および 7) は単純な指数関数型ではなく複雑であるが、特徴的なことは蛍光立ち上り時間が積層の順序で内殻にいくほど長くなっており、いずれも上で示した伝達経路と対応していること、エネルギードナーとアクセプターのどの 1 組をとってもアクセプター蛍光立ち上り時間はドナー蛍光の減衰時間より著しく速いこと、などがあげられる。

これら一連の蛍光生成減衰曲線は $\exp(-2kt^{1/2})$ 型の関数に適合することが示されている^{12,14,15}。フィコビリן色素蛋白の積層順序に対応させて、次の経路を考えよう。

ここで k_1, k_2, k_3 , および k_4 は $s^{-1/2}$ の次元をもつエネルギー移動の速度定数である。実際の励起レーザーパルス波形によってコンボルーションをつくり、速度定数をパラメーターとして実験曲線のシミュレーションを行なう。*P. cruentum* および *A. nidulans* に関して計算された最適曲線をそれぞれ Fig. 6 および Fig. 7 に示す。これ

Table II Rate constants of the energy transfer in phycobilin-Chl *a* system of the algal intact cells

Pigment system	Algae	Rate constants ($k, ps^{-1/2}$)			
		PE	PC	APC	Chl <i>a</i>
PC-APC-Chl <i>a</i>	<i>Flemyella diplosiphon</i>	—	0.071	0.13	0.042
	<i>Anabeana cylindrica</i>	—	0.065	0.33	0.059
(PE-less)	<i>Anabeana variabilis</i>	—	0.077	0.14	0.057
	<i>Anacystis nidulans</i>	—	0.067	0.13	0.067
	<i>Porphyridium aerugineum</i>	—	0.12	0.13	0.091
PE-PC-PAC-Chl <i>a</i>	<i>Flemyella diplosiphon</i>	0.11	0.40	0.13	0.056
	<i>Nostoc</i> sp.	0.17	0.29	0.13	0.063
	<i>Porphyridium cruentum</i>	0.14	0.24	0.27	0.10

Rate constants (k) were calculated with the decay kinetics of $\exp(-2kt^{1/2})$.

らの図からわかるように一連のフィコビリ色素の蛍光生成減衰曲線は計算曲線とよく一致している。このようにして求められたエネルギー移動速度定数の値を Table II にまとめる。

3.3 光エネルギー伝達のチャンネル構造

今回とりあげた 8 種の藻類において、フィコビリ色素系エネルギー移動の様子はその速度において異なっている。まず Table I からは、*Nostoc* sp, *P. cruentum* などの PE 細胞型では *A. nidulans*, *A. cylindrica* などの PC 細胞と比較して PC-APC 過程において速いことが注目される。さらに全体のエネルギー伝達速度すなわち外殻のフィコビリ色素、PE あるいは PC が光吸収してから反応中心へエネルギー移動が行なわれるまでの時間についてみれば (Fig. 6 および Fig. 7), *P. cruentum* では 360 ps であるのに対して *A. nidulans* では 825 ps である。このような違いはフィコビリゾームの構造の違いに帰せられるはずであるが、まずフィコビリゾームの巨視的な構造について考えてみよう。*P. cruentum* のフィコビリゾームは半円球状であるのに対し、*A. nidulans* のそれは半円板状である (Fig. 2)。このことは、内殻のアクセプター分子に対する外殻のドナー分子の数が、前者においては後者に比較して多数存在することになりエネルギー移動速度において違いを生むと考えられる。しかし PE 細胞型である *Nostoc* sp. は *A. nidulans* と同様な半円板型であるので、この考え方は正しくないであろう。したがって原因はエネルギー伝達に関与する色素蛋白のシーケンスの違いにあり、すなわち *A. nidulans* では外殻から内殻に向って PC-APC の順序で積み重ねられているのに対して *P. cruentum* では PE-PC-APC となっており、始めに光励起される色素において異なり、これが後の PC-APC 過程に影響を与えていることになる。

われわれの結論では¹⁵⁾、PC には発色団分子間のエネルギー移動ステップ数を最小にする特別なチャンネルが存在し、PE 細胞型において

は PE からこのチャンネルを通して APC へのエネルギー移動が起こる。一方 PC 細胞型においては PC におけるこのチャンネルの外側も励起され、チャンネルの中の移動ステップ数が増すために結果として APC からのエネルギー移動が遅くなると考えている。この考え方は実際に、最近の X 線結晶解析の結果¹⁶⁾からも支持され、例えば PC 色素蛋白においては外側と内側に分布する 2 種類の異なった発色団分子が、とくに内側の発色団分子は反応中心に向かって 1 本のチャンネルをつくっており、これが光エネルギー伝達を高くし、また効率を高いものになっている。

4. 光合成系 I および II における光エネルギー伝達

緑色高等植物の光合成色素系においてはクロロフィルが主たる色素分子として働き、その蛍光の時間的挙動を調べることは一般の光合成反応初期過程を明らかにするうえで重要である。ここでは緑藻 *Chlorella pyrenoidosa* をとりあげ、前節までのフィコビリ系におけるエネルギー伝達に続いて、チラコイド膜クロロフィルおよび反応中心における光エネルギー伝達に関するピコ秒時間分解蛍光分光の実験結果^{17,18)}について述べる。

4.1 緑藻の育生

緑藻 *C. pyrenoidosa* (C-105) は白色光の連続照射 (2.5 W/m^2) の下、0.5% CO を含む空気の供給の下で生育した。

4.2 チラコイド膜クロロフィル系の時間分解蛍光スペクトル

Fig. 8 に緑藻 *C. pyrenoidosa* 生細胞について測定された、励起後 0—180 ps の時間分解蛍光スペクトルおよび励起後 1.1 ns のスペクトルを示す。685 nm に極大をもつ蛍光帯、F 685、がすべての時間領域において支配的であるがこれは良く知られている系 II—Chl *a* の蛍光帯に一致する。この蛍光帯を別にして、26—128 ps の

Fig. 8 Time-resolved fluorescence spectra of *Chlorella pyrenoidosa* in the 0-180 ps time region (—) and at 1.1 ns (.....), obtained with excitation at 630 nm. The highest intensities are normalized to a common value. Difference spectra (.....) between the 1.1 ns spectrum and the respective spectra are shown after 2-fold expansion.

スペクトルをみると、1.1-nsスペクトルと比較して、700 nm付近において強度が増加しているのがみられ F 685 とは別の蛍光帯が現れていることがわかる。Fig. 8 にはこの隠されている蛍光帯が、1.1-nsスペクトルと各時刻におけるスペクトルと各時刻におけるスペクトルとの差スペクトルとして示されている。この蛍光帯を F 700 と呼ぶ。蛍光減衰曲線は観測波長によって異なり (Fig. 9), 3つの指数関数減衰 ($\tau_1 = 104 \pm 26$ ps, $\tau_2 = 642 \pm 83$ ps, $\tau_3 = 1725 \pm 59$ ps) の和として適合させることができる。観測波長 690–730 nm の減衰曲線ではこれら3つの成分、690 nm より短波長領域では中間成分および遅い成分の2つの成分から成る。時間分解スペクトルとの対応から、速い成分は F 700 に対応する。それぞれの蛍光帯の発光強度は、反応中心 II 電子伝達系を阻害する DCMU を添加するか、

あるいは励起光強度を大きくすることによって、F 685 は著しく変化するのに対して、F 700 は殆ど変化を示さない。これらの特性は F 700 が光合成系 II ではなく系 I—Chl *a* からの蛍光発光であることを示唆する。

一般に緑藻および高等植物は 77 K においては 3つの蛍光帯から成るスペクトルを示す¹⁹⁻²²⁾。すなわち緑藻では系 II—Chl *a* に由来する F 685 および F 695, および系 I—Chl *a* に由来する F 720 である。77 K でみられる F 720 に相当する蛍光帯は常温生細胞ではみられず、低温と常温のスペクトルの対応は簡単ではない。最近 Ikegami, Ke^{23,24)} らは反応中心 I 蛋白複合体の蛍光スペクトルを調べ、F 675, F 655 および F 705 の3種の蛍光帯を見出し、そのうち F 705 は系 I の電子受容体の還元状態に応じて強度が減少することから、この発光は P 700 に極めて近くに存在する Chl *a* において、電荷再結合により生じた励起 Chl *a* からの遅延蛍光に帰属している。ここで見出された新しい蛍光帯 F 700 は上の F 705 と良く対応している。またこれまでも二、三の報告において、系 I 粒子あるいは緑藻のけい光減衰において 80–110 ps 寿命成分が見出され、これらは系 I—Chl *a* 蛍光であるとされていたのであるが、今回の結果はそれらの帰属とも良く対応する。今回の実験において、緑藻生細胞からは2種の蛍光帯 F 700 および F 685 が発せられ、それぞれ系 I および II において反応中心に接近して存在する Chl *a* からの発光であることが結論される。

4.3 反応中心周辺における光エネルギー伝達

ここでは、前節において示された F 700 および F 685 の蛍光減衰特性に関して、励起レーザー光強度依存性および繰返し速度依存性について示し、系 I および系 II のエネルギー伝達機構について考えてみよう。

前節で述べたように *C. pyrenoidosa* 生細胞の蛍光減衰曲線は指数関数減衰の3つの成分を考慮することによって解釈され、速い成分は F 700,

Fig. 9 Fluorescence decay curves (.....) of *C. phrenoidosa* and an instrumental response function of the excitation laser pulse (—). Excitation laser wavelength is 630 nm. These decay curves can be analyzed in terms of three exponential decays with lifetimes of $\tau_{fast} = 104 \pm 26$ ps, $\tau_{mid} = 642 \pm 83$ ps and $\tau_{slow} = 1725 \pm 59$ ps, with different amplitudes depending on the monitoring wavelength.

中間および遅い成分は F 685 に対応させることができる。このうち、系 II に由来する F 685 の減衰曲線の形は励起レーザー光強度あるいはレーザー繰返し速度によって著しく変化する。その様子を Fig. 10 に示す。レーザー光強度すなわち光密度を高くすることによって遅い成分の相対強度が増加することがわかる。同様な変化はレーザーパルス繰返し速度を増すことによってみられる。一方 F 700 についてはこれらの励起条件によって殆ど変化を受けない。F 685 の遅い成分にみられるこのような変化は、系 II 反応中心における電子受容体の還元とそれに伴う逆反応過程、すなわち電荷再結合による遅延けい光のモデルと良く対応する^{25,26)}。

光合成反応中心 I および II に関して Fig. 1 に示すような反応スキームを考える。一定の励起光照射の下ではその光密度あるいはレーザーパルスの繰返し速度に応じて、閉じた反応中

心と開いた反応中心のある一定の平衡状態にあると考えられる。いずれの反応中心からも同一の蛍光帯 F 685 が発せられるが、開いた反応中心では P 680 へのエネルギー移動に続いて電子移動が起こるためにその反応速度は速く蛍光寿命は P 680 へのエネルギー移動速度で決められる。一方閉じた反応中心では、上と同様な P 680 へのエネルギー移動が起きても電子受容体がすでに還元されているので電子移動は起こらず、電荷再結合—エネルギー移動の逆反応によって F 685 がいわゆる遅延蛍光として発せられ、その寿命は Chl *a* 分子のもつ輻射および無輻射遷移速度によって決められる。この反応スキームに基づいて、F 685 の蛍光減衰曲線の解析から 1 個の反応中心あたりの吸収断面積として $5.7 \times 10^3 \text{ Å}^2$ 、閉じた反応中心が再び開いた状態に戻る平均時間として 0.2 ms、などの値が導かれた。

Fig.10 Fluorescence decay curves of *C. pyrenoidosa* intact cells under the excitation with different laser intensities at 685 nm.

Fig.11 Reaction scheme for the energy transfer and the electron transfer in reaction center II of *C. pyrenoidosa*.

5. 結論

光合成初期過程に関する時間分解蛍光分光について、最近のわれわれの研究結果を述べてきたが要約すれば、(1)フィコビリナークロロフィル系における光エネルギー伝達の様子が時間分解蛍光スペクトルのうえで実時間で捉えられ、外殻蛋白によって捉えられた光エネルギーが内殻反応中心に至る種々の色素蛋白の間で逐次的に一方方向に 500-800 ps の間に伝達すること、(2)フィコビル色素蛋白の中で発色団分子は特別な配列をもっており、光エネルギー伝達のおよび効率を高くする特別なチャンネルが存在すること、(3)チラコイド膜クロロフィル系では、光合成系 I 反応中心に属するクロロフィルからの蛍光スペクトルがはじめて室温生細胞において観測され、反応中心 1 個あたりの吸収面積が見積もられた。

実験方法の観点からみた場合、時間相関光子計数法は生体系の反応機構を調べるうえでいくつかの利点があり、蛍光をプローブとするために感度が高く、測定精度が極めて高いこと、励起光強度を比較的小さくすることができ生体系への損傷が小さくてすみことなどが特徴としてあげられる。元来、光子計数法は弱い光の検出において優れているのであるが、時間分解能については劣り、光電子増倍管の構造に帰因する避けられない欠点であったが、最近ではマイクロチャンネルプレート光電子増倍管が普及し、時間分解能の欠点も克服されつつある⁶⁾。実際にわれわれの装置で行った試験では 5 ps のレーザーパルスが 20 ps の装置関数として観測され、ストリークカメラ法とかなり近い性能をもつに至っている。

参考文献

- 1) 大谷弘之, 小林孝嘉: 蛋白質・核酸・酵素 別冊 28 巻, 「時間領域から見た生命現象」, 木原裕他編 (1985) p. 226.
- 2) 櫛田孝司, 木村修一: 応用物理 52 (1983) 920.
- 3) 木下一彦: 蛍光測定—生物学への応用, 日本分光学会測定法シリーズ 3, 木下一彦, 御橋廣真編 (学会出版センター, 東京, 1983) p. 99.

- 4) 山崎 巖, 久米英浩, 玉井尚登, 土屋広司, 大庭弘一郎: 応用物理 **54** (1985) 702.
- 5) I. Yamazaki, N. Tamai, H. Kume, H. Tsuchiya and K. Oba: Rev Sci. Instrum. **56** (1985) 1187.
- 6) 小山和彦, 久米英浩: 浜松ホトニクス技術ノート "Application of MCP-PMTs to Time-Correlated Single-Photon Counting and Related Precautions" (1987).
- 7) E. Gantt: Ann. Rev. Plant. Physiol. **32** (1981) 327.
- 8) A.N. Glazer: Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem **14** (1985) 47.
- 9) G. Tomita and E. Rabinowitch: Biophys. J. **2** (1962) 483.
- 10) J. Grabowski and E. Gantt: Photochem. Photobiol. **28** (1978) 47.
- 11) A. Murakami, M. Mimuro, K. Ohki and Y. Fujita: J. Biochem. **89** (1981) 79.
- 12) G. Porter, C.J. Tredwell, G.F.W. Searle and J. Barber: Biochim. Biophys. Acta, **501** (1978) 232.
- 13) T. Kobayashi, E.O. Degenkolb, R. Bersohn, P.M. Rentzepis, R. MacColl and D.S. Berns: Biochem. **18** (1979) 5073.
- 14) I. Yamazaki, M. Mimuro, T. Murao, T. Yamazaki, K. Yoshihara and Y. Fujita: Photochem. Photobiol. **39** (1984) 233.
- 15) M. Mimuro, I. Yamazaki, T. Yamazaki and Y. Fujita: Photochem. Photobiol. **41** (1985) 597.
- 16) T. Schirmer, W. Bode, R. Huber, W. Sidler and H. Zuber: J. Mol. Biol. **184** (1985) 257.
- 17) I. Yamazaki, M. Mimuro, N. Tamai, T. Yamazaki and Y. Fujita: FEBS Letters, **179** (1985) 65.
- 18) M. Mimuro, N. Tamai, T. Yamazaki and I. Yamazaki: FEBS Letters, **213** (1987) 119.
- 19) K. Satoh and W.L. Butler: Plant Physiol. **61** (1978) 373.
- 20) N.I. Bishop and G. Oquist: Physiol. Plant, **49** (1980) 477.
- 21) C.P. Rijgersberg and J. Ames: Biochim. Biophys. Acta, **593** (1980) 261.
- 22) S. Bose: Photochem. Photobiol. **36** (1982) 725.
- 23) I. Ikegami and B. Ke: Biochim. Biophys. Acta, **764** (1984) 70.
- 24) I. Ikegami and B. Ke: Biochim. Biophys. Acta, **764** (1984) 80.
- 25) W.L. Butler and R.J. Strasser: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74** (1977) 3382.
- 26) L.N.M. Duysens: in Chlorophyll Organization and Energy Transfer in Photo synthesis, Ciba Foundation Symposium **61** (Elsevier, Amsterdam, 1979) p.323.