



|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 熱発光・遅延発光                                                                          |
| Author(s)        | 小野, 高明                                                                            |
| Description      | 4章 分光測定 2. 分光測定法 b                                                                |
| Relation         | 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編                                                  |
| Citation         | 低温科学, 67, 453-463                                                                 |
| Issue Date       | 2009-03-31                                                                        |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/39179">https://hdl.handle.net/2115/39179</a> |
| Type             | departmental bulletin paper                                                       |
| File Information | 67-064.pdf                                                                        |



## 2. 分光測定法

### b. 熱発光・遅延発光

小野 高明<sup>1)</sup>

電荷分離反応の結果生じた光化学系II反応中心の還元側と酸化側の電子伝達成分上の正電荷と負電荷の再結合により発光が起こる。この発光（遅延発光・熱発光）は光化学系IIの電子伝達成分（特に酸素発生系）に関する有用な情報を数多く含む。

## Thermoluminescence and delayed light emission

Takaaki Ono

Thermoluminescence and delayed light emission arise from an excited state of photosystem II reaction center (P680), which is formed by charge recombinations between positive and negative charges stabilized in photosystem II. They provide useful information on the function of PSII, especially on photosynthetic oxygen evolving system. In this chapter, we describe application of these techniques for probing PSII.

### 2.b.1 はじめに

熱発光 (TL: thermoluminescence) と遅延発光 (DLE: delayed light emission, 遅延蛍光/DLF: delayed fluorescence と呼ばれる) は、主として、光吸収に伴う光合成光化学系II (系II) 反応中心における電荷分離反応の結果、系IIの酸化側に生じた正電荷（正孔）と還元側に生じた負電荷（電子）に由来するこれらの再結合により系II反応中心クロロフィル P 680 の再励起され発光が起こる。電荷再結合過程では最終的に生成する  $P 680^+ \text{Phe}^-$  上の正負電荷の再結合に伴い、ある確率で P 680 の一重項励起状態 ( $P 680^*$ ) が生成する。従って、これらの発光は光照射により系IIが励起された場合の蛍光と基本的に同じスペクトルを示す。熱発光と遅延発光はともに、系IIの酸化側、還元側で生じた分離電荷の性質に関する情報を与えるため、光化学系II自身を対象とした研究や、系IIを通じた光合成反応の全体的な評価に用いられている。

熱発光と遅延発光は同じ現象を異なった手法により観測するものであり、得られる情報も原理的には同等である。また、測定に使用する装置も基本部分は共通な場合が多く、本章では熱発光・遅延発光について、測定方法を中心に紹介する。

熱発光と遅延発光には、その由来が系II光化学反応とは直接関係ないものや、一重項励起状態 ( $P 680^*$ ) が関与しないものもあるが、それらについては一部を除き触れ

ない。また、系Iではその強度は弱く、特殊な場合以外ほとんど観測されない。熱発光と遅延発光(特に熱発光)は酸素発生系を中心とした系II自身の研究や、研究環境ストレス等が光化学系に与える影響の評価に広く使われている。応用例についてはレビュー等<sup>1-9)</sup>を参照されたい。

### 2.b.2 遅延発光と熱発光に関与する光化学系II反応

遅延発光と熱発光の理解に必要な、系IIにおける電荷分離反応と引き続いて起こる分離電荷の安定化に関与する電子伝達成分について、その概要を述べる。

図1に示されるように、系II反応中心における電荷分離の結果生じた  $P 680^+$  は  $Y_2$  (D1タンパク質 Tyr161) により還元される。酸化された  $Y_2$  ( $Y_2^+$ ) は Mn クラスターからの電子供与により再還元される。Mn クラスターは4つの Mn と1つの Ca からなる複核錯体であり、水の酸化反応で中心的な役割をはたしている。Mn クラスターを中心とする水酸化触媒は、 $Y_2^+$  への電子供与により1電子当量ずつ酸化され、最も還元された  $S_0$  から最も酸化された  $S_4$  までの状態をとる。 $S_4$  は不安定で暗所で2分子の水を酸化して  $S_0$  にもどり、1分子の酸素が生成される。暗所に置いた系IIでは、クラスターの大部分は安定状態である  $S_1$  にあるため3閃光の照射後に酸素が発生する。 $S_2$  と  $S_3$  は正電荷を持つ。D2タンパク質の Tyr160 ( $Y_D$ ) も  $P 680^+$  により酸化されるが、酸素発生反応には関与していない。酸化された  $Y_D$  は暗所

1) 茨城大学工学部生体分子機能工学科

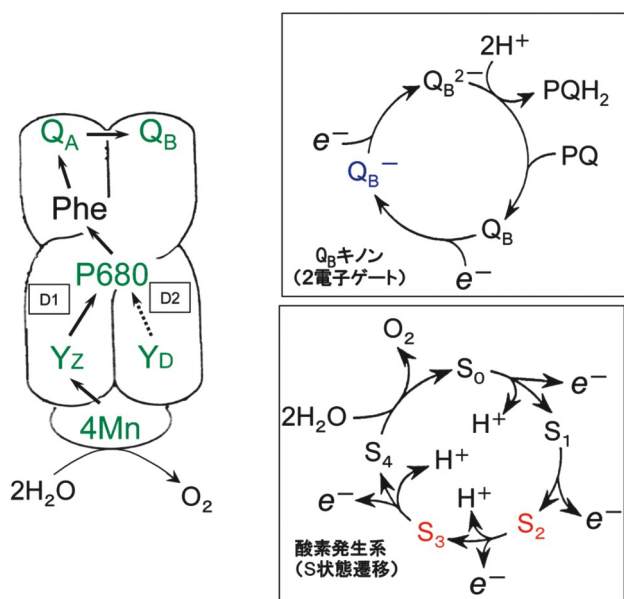


図1：光化学系IIにおける酸化還元成分の配置と電子移動の模式図(左)；酸素発生系におけるS状態遷移と $Q_B$ キノン部位における2電子ゲート(右)

熱発光と遅延発光に關与する電子伝達成分を緑で、熱発光と遅延発光に關与するS状態を赤で、 $Q_B$ キノンを青で示す。

で比較的安全に存在する。このほか、シトクロム  $b_{559}$ 、カロチノイド、クロロフィルも  $P680^+$  により酸化されるが、これらの酸化型は電荷再結合による  $P680^*$  形成には寄与しない。

一方、還元されたフェオフィチン ( $Phe^-$ ) はD2タンパク質に結合する  $Q_A$  キノン受容体により再酸化される。還元された  $Q_A$  キノン受容体 ( $Q_A^-$ ) はD1タンパク質に結合する  $Q_B$  キノン受容体を還元する。生成したセミキノン  $Q_B^-$  は比較的安全で、次の閃光での電荷分離反応により生成した  $Phe^-$  から2個目の電子を受け取る。2電子還元体  $Q_B^{2-}$  はチラコイド膜内プールの酸化型プラストキノンにより置き換えられるため、 $Q_B$  キノン受容体は閃光照射ごとに交互に  $Q_B$  と  $Q_B^-$  となる。

## 2.b.3 遅延発光と熱発光

### 2.b.3.1 遅延発光<sup>8,10-16)</sup>

葉緑体などの試料を光照射すると、遅延発光または遅延発光と及ばれる微弱な発光が、光照射直後から分の時間域でおこる。発光強度は光照射直後が強く、時間とともに指数関数的に減衰する(強度変化の様子は減衰曲線と呼ばれる)。この発光は、光照射の結果生じた系IIの酸化側と還元側の様々な電子伝達成分上に分布した正負電荷が再結合する時にP680を再励起することに由来する。光照射後どの時間領域で発光するかは、電荷再結合

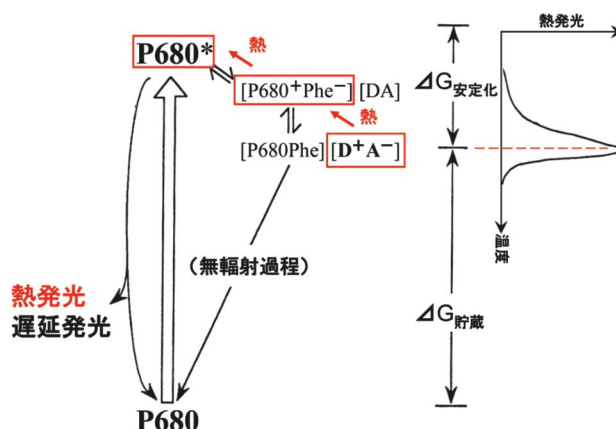


図2：光化学系IIにおける電荷再結合による発光スキーム  
励起状態のP680 ( $P680^*$ ) のエネルギーは電子移動反応により自由エネルギー ( $\Delta G_{安定化}$ ) を失い  $D^+A^-$  電荷分離状態として安定化される。電荷分離過程は可逆過程であり、電荷再結合過程の活性化エネルギー ( $\Delta G_{活性化} \approx \Delta G_{安定化}$ ) に相当するエネルギーを得るとP680が再励起され発光が起こる。一定の温度条件化では、確率的にP680が再励起され発光(遅延発光)がおこる。一方、加熱状態では、活性化エネルギーに対応する温度で電荷再結合が高い確率で起こり発光(熱発光)する。

を起こす正負電荷の安定性(再結合に必要な自由エネルギーの変化の大きさ)に依存し、それらがどの電子伝達成分上にあるかで決まる。すなわち、光照射直後の発光は光化学系IIの反応中心に近い酸化還元成分間での電荷再結合に由来し、時間経過とともに反応中心からより離れた酸化還元成分上の電荷同士の再結合に由来する発光が主成分となる。光化学系Iで生成した分離電荷の再結合に由来する遅延発光も報告されている<sup>17,18)</sup>。

### 2.b.3.2 熱発光<sup>1-9)</sup>

光照射後に試料を急速冷却すると、液体窒素温度(77 K)などのように温度が十分に低ければ、冷却過程で電荷再結合を起こさなかった正負電荷は、低温下で安定にトラップされる。この後、試料温度を徐々に上げ、電荷再結合の活性化エネルギーに相当する熱エネルギーを供給すると、トラップされた正負電荷間で再結合が起こり、ある確率でP680が再励起され発光が観測される。(図2)

## 2.b.4 熱発光測定と遅延発光測定

光照射に続いて観測される遅延発光の場合は、一定温度環境から供給される熱エネルギーに依存して電荷再結合が起こる。そのため、光照射後の発光強度の時間経過は、各正負電荷対の再結合の確率の違いを反映して、異なった時定数を持つ指数関数的減衰成分の足し合わせとして表される。一般に、各々の減衰成分を正確に分離す

るにはかなり煩雑な操作が要求される。実際の実験では、遅延発光に含まれる成分の数、強度、時定数が不明の場合も多い。各成分の正確な分離ができないと、観測された遅延発光の起源となる正負電荷対の正確な同定や定量が困難となる。

一方、熱発光では、活性化エネルギーが外部加熱で与えられる為、特定成分間での電荷再結合が特定温度領域で起こる。試料温度に対して熱発光強度をプロットした曲線（熱発光グローカーブ又は熱発光バンド）は山型（ピークを与える）となり、遅延発光の各減衰成分は異なったピーク温度をもつバンドとして分離される。正負電荷の酸化還元電位と関連する再結合の自由エネルギー変化の大きさの違いが熱発光バンドのピーク温度の違いとして現れる。このピーク温度から、関与する正負電荷対の酸化還元電位を推定できる。また、バンドの強度から各正負電荷対の相対量のある程度見積もる事ができる。さらに、各正負電荷対の酸化還元電位の変化がピーク温度の変化として現われるため、僅かな変化も容易に検出出来る。遅延発光では、酸化還元電位の変化は主に発光強度の減衰キネティックスの変化として現われる為、解析は容易ではない。

以上のような理由から、近年では系IIで起こる光化学反応過程に関する研究手法としては熱発光がもっぱら用いられ、遅延発光が用いられる事は少ない。従って、本稿でも熱発光を中心に話を進める。しかしながら、熱発光測定だけからでは、発光に伴う自由エネルギー変化などの熱力学的パラメーターを正確に求める事は困難である。遅延発光の測定により熱発光測定で求めたパラメーターの評価が行える。また、遅延発光測定では、試料の冷却や加熱装置が不要で、より簡便な装置で測定可能である。また、装置によって異なるが、熱発光測定では試料交換も含み、1試料あたり20-30分程度の測定時間が必要だが、遅延発光測定では数分で測定を終えることが出来、原理的には、多検体測定や連続測定、イメージングも可能である。また、ミリ秒領域に現われる遅延発光の強度はチラコイド膜を介した膜電位形成と関連する事が知られている<sup>19)</sup>。さらに、藻類細胞などでは、光照射後数秒から1分程度の発光は、電子伝達系全体の状態を反映すると思われる特徴的な時間変化を示す。これらの特色を生かし、藻類の遅延発光を環境中の藻類の量や種類の評価に用いたり<sup>20)</sup>、環境モニタリングプローブとして用いたりする研究も行われている<sup>21,22)</sup>。

## 2.b.5 測定装置と測定の実際

### 2.b.5.1 装置の構成

熱発光測定はほとんどの場合、それぞれの研究者が自作した装置でおこなわれており、その装置構成も研究者ごとにより異なる。また、装置の詳細は論文等には記述されていない。しかしながら、基本的には以下の四つの部分から構成されている。微弱光の測定部と試料の光照射部の利用で遅延発光測定に対応できる。

- 試料ホルダー部
- 試料温度の制御部
- 微弱光の測定部
- 試料の光照射部

これらの構成の主要な部分について以下に述べる。

### 2.b.5.2 試料ホルダー

熱発光測定では試料を光照射後、急速に冷却し、その後、一定の速度で試料温度を上げる。様々な試料ホルダーが用いられるが、可動タイプと固定タイプの2つに分けられる。

図3は筆者が用いている可動タイプの試料ホルダーの概略である。非常にシンプルな作りだが十分に実用に耐える。試料は適当な大きさのアルミ板とアクリル板の間に挟み込み固定する。アルミ板には試料加熱用のヒーターが装着されている。ヒーター装着に際しては、試料全面が均一に加熱されるよう注意を払う。この例では、

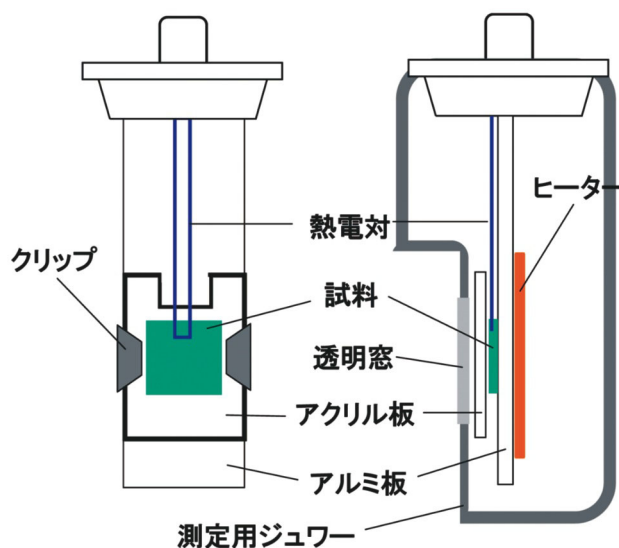


図3：可動タイプの試料ホルダーの例  
正面（左）と側面（右）。右図は測定用ジュワーに装着した状態。測定用ジュワーの透明窓が平面状になっており、光ファイバーを試料に接近して設置できるようになっている。



シリコンラバーヒーターを厚さ 1 mm のアルミ板の裏面に直接接着してある。素早い温度変化が可能なように、アルミ板の厚さと装着するヒーターの W 数を最適化する必要がある。

液体の試料は 1 cm 四方の口紙に浸み込ませ、アルミ板とアクリル板の間に挟み、クリップでしっかり固定する。葉などはコルクボーラーなどで打ち抜き、直接試料ホルダーに挟み込む。温度測定用の熱電対 (Cu/コンスタン) を試料上に直接置き試料と共にホルダーに挟み込む。この状態でホルダーを透明窓を持つジュワー瓶に移す。ジュワーを液体窒素で予冷し、ヒーターの印加電圧を調節する事で、試料温度を制御する。光照射後、ホルダーを液体窒素中に投入し、急速冷却する。5 秒以内に 100 K に達する。冷却した試料ホルダーを測定用ジュワーに移し、ヒーター電源を投入して測定を開始する。試料温度はヒーターからの熱の供給量と試料ホルダー自身の熱容量に応じて上昇するので、ヒーターへの印加電圧を変化させることで昇温速度を調整できる。この方法では、試料温度が全温度範囲で直線的に昇温するわけではないが、 $-50^{\circ}\text{C}$  から  $+50^{\circ}\text{C}$  までほぼ一定速度で昇温でき、熱力学的パラメーターを求めるなど正確な昇温速度の制御が必要な場合を除き、実用上問題ない。昇温速度を正確に制御したい場合は、測定用ジュワー内に冷却した窒素ガス (液体窒素中に投入した蛇管に窒素ガスを通すことにより容易に得られる) を一定流量で流して冷却しつつ、適当な温度制御装置によりヒーター出力をフィードバック制御する。

図 4 は固定タイプの試料ホルダーの例である。この場合、試料用の凹 (直径 15 mm, 深さ 0.5 mm) を持つア

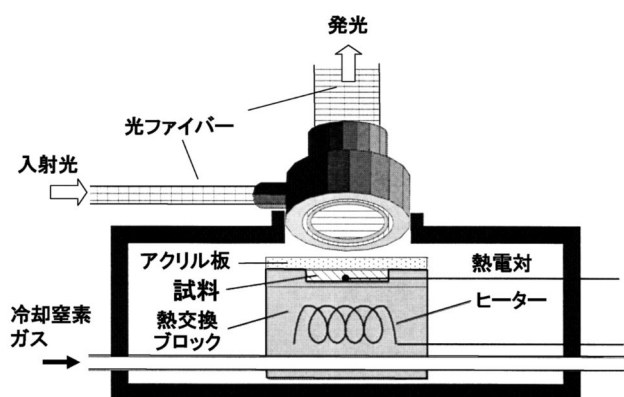


図 4: 固定タイプの試料ホルダーの例

熱交換ブロックに埋め込まれたヒーターと冷却窒素ガスで試料温度を制御する。リング型ライトガイドで励起光を試料面まで誘導し、リング型ライトガイドの中空部分を通り、試料に近接して設置された光ファイバーで試料からの発光を集める。

ルミ板を温度制御可能な熱交換ステージ (顕微鏡用熱交換ステージなどが利用できる) に固定してある。試料をホルダーに乗せ、上からアクリル板で蓋をする。試料温度は熱交換ブロックに埋め込まれたヒーターと冷却窒素ガスで制御する。試料に接して置かれた熱電対で温度を検出する。適当な光源からの光をライトガイドで試料ホルダーまで導入し、試料を光照射する。照射後、冷却窒素ガスの流量を最大まで上げ試料を急冷する。25 秒以内に 100 K に達する。可動タイプと比べると冷却速度は比較的遅いが、熱発光測定の主な適応例である酸素発生系の場合、 $\text{S}_2\text{Q}_A^-$  電荷分離状態の寿命が  $5^{\circ}\text{C}$  で約 30 秒なので、電荷分離状態のトラップには十分な冷却能力である。冷却後、適当な温度制御装置によりヒーター出力をフィードバック制御することにより昇温速度を制御する。この装置では、 $6 \sim 108^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の範囲で昇温速度を正確に制御できる。上に述べた例では、加熱にヒーターを用いているが、この代わりにペルチェ素子も利用できる。

### 2.b.5.3 発光の検出

熱発光・遅延発光の強度はかなり低いため、その検出には光電子倍增管 (PMT: photo multiplier tube) が用いられる。クロロフィル蛍光に対応する長波長領域で十分な感度を持つものを選択する。マルチアルカリの光電面を持つ PMT はバイアルカリ光電面を持つ PMT より長波長感度が高いが、バイアルカリの方が暗電流は低い。エンドオンタイプの受光面を持つ PMT 使用が望ましい。PMT を冷却することにより暗電流を減らし、信号/ノイズを高めることができる。またシングルフォトンカウンティング計測により微弱光を感度よく測定できる。PMT 冷却機能付のフォトンカウンティング装置が市販されている。

微弱光測定では試料からの発光を効率よく PMT の光電面に集めることが重要である。立体角を稼ぐためには試料と PMT の距離を可能な限り短くする。PMT を試料に接近して配置する事が困難なら、試料からの発光をレンズで PMT の光電面に集光したり、試料近傍に光ファイバーを置いて発光を PMT に誘導したりする。微弱光測定用に PMT、電源等を一体化したコンパクトなシングルフォトンカウンティング装置 (浜松ホトニクス) も市販されている。遅延発光測定では ICCD (intensified CCD) も用いられている<sup>23)</sup>。

### 2.b.5.4 試料の照射

電荷分離状態を実現する為には試料を励起光照射する必要がある。実験目的により最適な光照射方法 (光源、照射方法、照射条件) を選択する。固定タイプの試料ホ

表 1：熱発光バンド・遅延発光成分と発光に関与する分離電荷対

| 発光                     |                  | 電荷分離対・起源     |                                                                    |
|------------------------|------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------|
| 熱発光バンド                 |                  | 遅延発光成分       |                                                                    |
| バンド名                   | ピーク温度(°C)        |              |                                                                    |
| Low temperature bands  | -250, -220, -200 |              | Chl の凝集体                                                           |
| Z-band                 | ~-160            |              | Chl <sup>+</sup> Chl <sup>-</sup>                                  |
| Zv-band                | -80 to -30*      | ~150 $\mu$ s | P 680 <sup>+</sup> (Chl <sup>+</sup> ?)Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> |
| A-band                 | ~-15             | ~4 ms        | S <sub>3</sub> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>                         |
| A <sub>T</sub> -band   | ~-15             | ~4 ms?       | His(Y <sub>Z</sub> ·)Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>                   |
| Q-band                 | ~+5              | ~2 s         | S <sub>2</sub> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>                         |
| B <sub>1</sub> -band   | ~+20             | ~30 s        | S <sub>3</sub> Q <sub>B</sub> <sup>-</sup>                         |
| B <sub>2</sub> -band   | ~+30             | ~60 s        | S <sub>2</sub> Q <sub>B</sub> <sup>-</sup>                         |
| AG-band                | ~+40             |              | S <sub>2</sub> Q <sub>B</sub> X <sup>-</sup>                       |
| C-band                 | ~+50             | ~10 min      | Y <sub>D</sub> ·Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>                        |
| High temperature bands | +50 to +70       |              | 酸化的化学発光                                                            |
| High temperature bands | ~+130            |              | 脂質の過酸化                                                             |

\*ピーク温度は光照射温度に依存して変化する。

四角内は、光化学系 II に由来する発光。緑文字は酸素発生系に関係する発光。

ルダールでは光ファイバーで効率的に試料を照射できる。

以下に、いくつかの例と留意点を述べる。

酸素発生反応の研究では、酸素発生系の S 状態 (S<sub>2</sub> と S<sub>3</sub> 状態) と系 II 還元側の Q<sub>B</sub><sup>-</sup> (場合によっては Q<sub>A</sub><sup>-</sup>) 間で起こる電荷再結合に由来する発光を観測する (図 1 参照)。通常は試料の閃光照射でこれらを生成する。この光源としてキセノン (Xe) フラッシュが用いられる。試料中の全ての系 II が 1 回だけ全部励起されるように、短い閃光寿命 (~3  $\mu$  秒以下) と強い閃光強度が必要である<sup>#1</sup>。試料の照射温度は、装置の冷却能力・電荷再結合の寿命・電荷分離対生成の温度依存性を考慮して決める。熱発光測定の場合、閃光照射後の試料冷却に秒オーダーの時間が必要なので、特別な場合を除き、酸素発生系と Q<sub>B</sub> (Q<sub>A</sub>) 上で安定化された正負電荷のみが発光に寄与する。遅延発光では、これらの電荷分離状態からの発光は (測定温度にも依存するが) 閃光照射後、数百ミリ秒以降に現われる発光の大部分を占める。酸素発生活性を保持した試料を暗順応後 1 閃光照射すると S<sub>2</sub>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> が、Q<sub>A</sub><sup>-</sup> から Q<sub>B</sub><sup>-</sup> への電子移動を止める系 II 特異的阻害剤 (DCMU) を加えて 1 閃光照射すると S<sub>2</sub>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> が安定電荷対として生成するので (図 8 参照)、これらに由来する熱発光や遅延発光を測定する事で、自作の熱発光・遅延発光装置の能力

や精度の評価が可能である。

低温にピークを持つ熱発光バンド (表 1 参照) の測定では、通常、発光温度付近で光照射した後、試料を急冷する。通常、電荷分離状態形成の量子収率が低いため励起光として連続光を用いる場合が多い。また、試料を室温からゆっくりと冷却しながら連続光照射すると、様々な電荷分離状態が実現し、昇温に伴いそれらに由来する熱発光バンドが重なって観測される。

遅延発光測定では、試料を秒オーダーの連続光で照射し、その後の発光減衰曲線の様子を調べることもある。

## 2.b.6 装置のセットアップ

図 5 は固定タイプの試料ホルダーを持つ熱発光測定装置のブロックダイアグラムを示す。リング型ライトガイド (外側) で励起光を試料近くまで誘導し、その中空部分を通して試料近くまでいく別の光ファイバーで試料からの発光を集める (図 4)。光ファイバーの反対の出口側のレンズで発光を PMT 受光面に集める。Xe 閃光光源と PMT の前に電動シャッターが置かれている。閃光照射時には Xe 閃光側のシャッターを開け、PMT 側のシャッターを閉じる。閃光照射後、Xe 閃光側のシャッターを閉じ、PMT 側のシャッターを開けることで、熱発光測定と同じ光学系で遅延発光の測定ができる。

可動タイプの試料ホルダーを使用する熱発光測定でも基本的には同じブロックダイアグラムでよい。ただし、試料照射は測定とは別に行われるので、緑色で囲まれた部分のみ使う。試料からの発光を効率よく検出するため、

<sup>#1</sup> 実際には、試料全体を完全に励起できない (飽和していない) 強度の照射閃光でも、強い照射を受ける試料表面からの発光がより強く検出されるので、S 状態遷移に伴う熱発光強度の閃光照射依存 4 周期振動を検出できる場合が多い。また、~10  $\mu$  秒程度の閃光寿命であれば、詳細な解析が必要な場合を除いて使用できる。

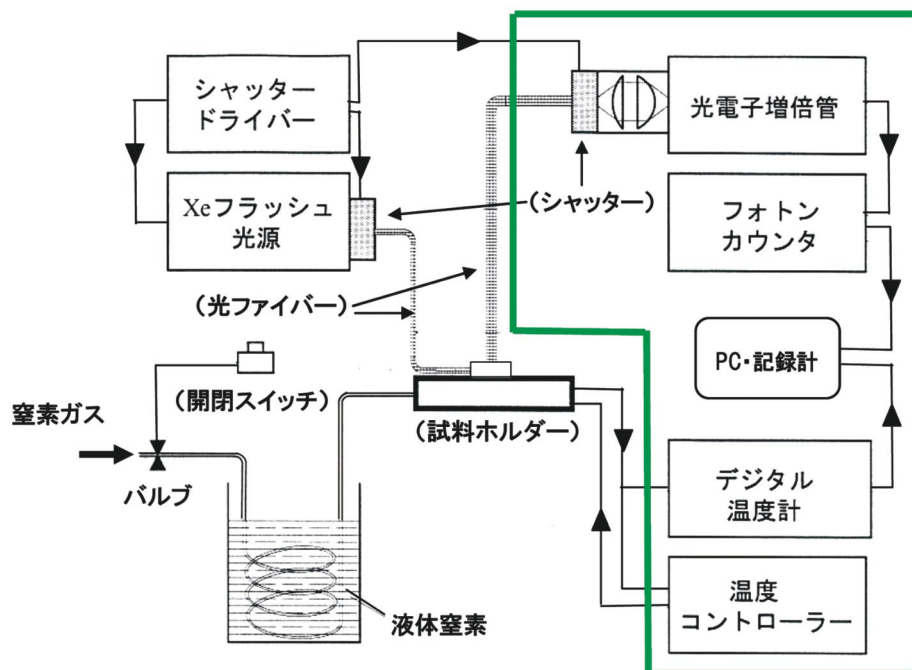


図5：熱発光測定のプロックダイアグラム  
固定タイプの試料ホルダーを使用する場合を示してある。可動タイプの試料ホルダーを使用する場合、試料の照射は測定系とは切り離されて行われるので、緑色で囲まれた部分のみが必要となる。

可動タイプの試料ホルダー測定用ジュワーの透明窓部分の一部を平面状(図3)とし、試料ホルダー(ジュワー内)と光ファイバー(ジュワー外)を近接して設置できるよう工夫してある。

遅延発光測定のみを目的とする場合は、通常、試料温度の厳密な制御は必要ないので、試料周りの自由度は高く、目的に応じたセットアップが可能である。液体試料の場合は通常の光学キュベットを用いてもよい。励起光源のアフターグローが問題とならない時間領域のみで測定を行う場合は光源と試料間のシャッターは必ずしも必要ではない。シャッターを用いた場合、励起光照射直後のミリ秒以下の時間領域の遅延発光の測定は困難だが、現在、この領域の遅延発光測定が必要となる場合はあまりないと思われる。遅延発光の測定方としては、ベクレルタイプの燐光計を用いる方法があるが、現在ではほとんど使われていない。

### 2.b.7 市販の熱発光・遅延発光測定装置

熱発光・遅延発光測定は、その大部分が研究者により自作された装置を用いておこなわれているが、市販品もある。

熱発光装置はPhoton System Instruments社で市販されている(TL-200/PMT)。この装置は固定タイプの試

料ホルダーを備え、PMTを試料ホルダーの直ぐ上に近接して設置してある。励起閃光光源はLEDを用い、閃光照射後、100 msからの遅延発光測定もできる。

浜松ホトニクス社では微弱発光計測システム(PMX-6100, PMX-2100)を供給しており、この装置を用いて遅延発光測定が可能である。光源と試料間、試料とPMT間にシャッターがあり、励起光照射後に前者を閉じた後、後者を開け遅延発光の測定を行う(図6)。両装置とも非常にコンパクト(PMX-2100は78 mm×163 mm×125 mm)に作られている。3つのLEDユニットを備えており、LEDの波長を選択することにより目的に応じた様々なシーケンスによる試料励起が可能である。PMX-6100では様々な形態の試料に対する試料ユニットが用意され、専用計測ソフトウェアにより本体とPCをUSBケーブルで接続するだけで測定ができる。バッテリー(5 V)ユニットを準備すればフィールドでの測定も可能である。

### 2.b.8 熱発光バンド(遅延発光減衰曲線)と関与する系IIの酸化還元成分

試料を光照射すると、光照射条件等に依存して様々な熱発光バンドが現われる(図7)。表1は観測される熱発光バンドとそのピーク温度、起源となる分離電荷対、お



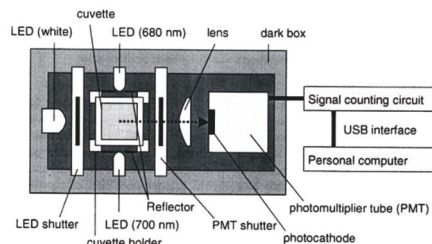
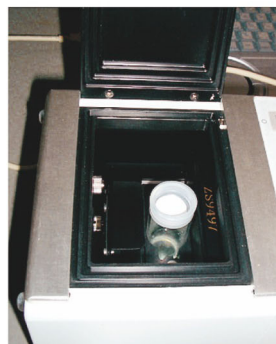
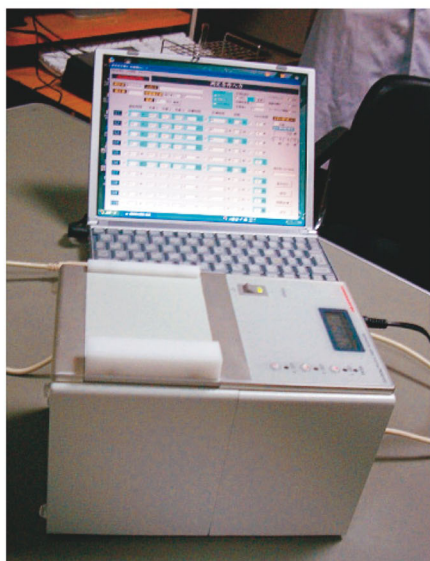


図 6：遅延発光測定装置 (PMX-6100)

(左) 装置の全体写真 (右上) 試料室：ガラス製の試料ビンによる測定 (右下) 測定系のセットアップ

(写真は浜松ホトニクス社の好意による)

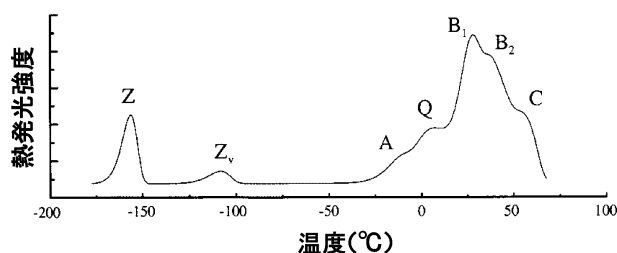


図 7：主要な熱発光バンド

各バンドの概要を示すための模式図で実測結果ではない。

よび対応する遅延発光減衰成分の緩和時間をまとめたものである。系IIの光化学反応と密接に関連した重要な熱発光バンドは $-50 \sim +50^{\circ}\text{C}$ の間に現われる。

#### 2.b.8.1 熱発光バンド<sup>1-9)</sup>

##### 2.b.8.1.1 B-バンド<sup>24,25)</sup>

$\sim +20^{\circ}\text{C}$ にピークを示す $\text{S}_3\text{Q}_\text{B}^-$ 再結合由来の $\text{B}_1$ -バンドと $\sim +30^{\circ}\text{C}$ にピークを示す $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ 再結合由来の $\text{B}_2$ -バンドがある。十分に暗順応した試料を1閃光照射すると $\text{B}_2$ -バンドのみが現れる(図8)。 $\text{S}_3\text{Q}_\text{B}^-$ 再結合による相対発光強度は $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ 再結合によるものより強い(1.7~2.0倍)。 $\text{B}_1$ -バンドと $\text{B}_2$ -バンドのピーク温度はpHに依存して変化し、 $\sim \text{pH } 7.5$ 以上では同じピーク温度を示す。 $\text{B}$ -バンドのピーク温度は $\text{S}_2$ や $\text{S}_3$ の酸化還元電位の僅かな変化を反映して変化するので、酸素発生活性に影響を与える様々な処理がMnクラスターに与える変化を鋭敏に検出できる。 $\text{B}$ -バンド( $\text{B}_1 + \text{B}_2$ )の強度は照射閃

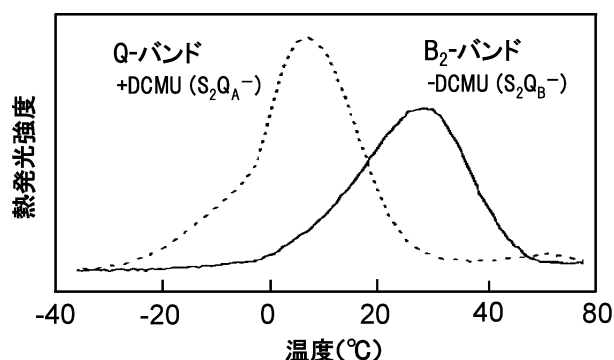


図 8：熱発光  $\text{B}_2$ -バンド ( $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ ) と  $\text{Q}$ -バンド ( $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ )

光回数に対して4周期振動を示す(図8)。十分に暗順応した酸素発生系は $\text{S}_0 : \text{S}_1 = 25 : 75$ となる状態にあり、還元側は $\text{Q}_\text{B}^- : \text{Q}_\text{B} = 25 : 75$ の状態にあるので、閃光照射回数に応じて $\text{S}_3\text{Q}_\text{B}^-$ と $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ 状態にある系IIの数は表2のように4周期で変化する。ミスヒット(閃光によって電荷分離が起こらない場合)やダブルヒット(閃光によって電荷分離が2回起こる場合)の確率や、 $\text{S}_3\text{Q}_\text{B}^-$ と $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ の発光強度比を考慮すると観測される4周期振動を再現できる。酸素発生活性に必須のCaイオンやClイオンなどを除去し、酸素発生活性を失った試料の $\text{B}$ -バンド強度の振動を解析して、これらがどのS状態遷移段階に必要なかを調べる事ができる。

##### 2.b.8.1.2 Q-バンド<sup>25,26)</sup> と A-バンド<sup>26,27)</sup>

$\sim +10^{\circ}\text{C}$ にピークを示す $\text{Q}$ -バンドは $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ 再結合に



表2：閃光照射による熱発光 B-バンドに寄与する分離電荷数の変化と熱発光強度の変化

| 閃光回数                  | 0           | 1           | 2           | 3           | 4           | 5           | 6           |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 系 II の数               | $1S_0Q_B$   | $1S_1Q_B^-$ | $1S_2Q_B$   | $1S_3Q_B^-$ | $1S_0Q_B$   | $1S_0Q_B^-$ | $1S_1Q_B^-$ |
| $1S_0Q_B^-$           | $1S_1Q_B$   | $1S_2Q_B^-$ | $1S_3Q_B$   | $1S_0Q_B^-$ | $1S_0Q_B^-$ | $1S_1Q_B$   |             |
| $5S_1Q_B$             | $5S_2Q_B^-$ | $5S_3Q_B$   | $5S_0Q_B^-$ | $5S_1Q_B$   | $5S_1Q_B$   | $5S_2Q_B^-$ |             |
| $1S_1Q_B^-$           | $1S_2Q_B$   | $1S_3Q_B^-$ | $1S_1Q_B$   | $1S_1Q_B^-$ | $1S_1Q_B^-$ | $1S_2Q_B$   |             |
| 熱発光                   |             |             |             |             |             |             |             |
| 系 II の数 <sup>1)</sup> | 0           | 5           | 2           | 1           | 0           | 5           | 2           |
| 強度 <sup>2)</sup>      | 0           | 5           | 2.7         | 1.7         | 0           | 5           | 2.7         |

十分に暗順応した光化学系 II ( $S_0:S_1=Q_B^-:Q_B=25:75$ ) を閃光照射し、ミスヒット、ダブルヒットがないと仮定する。

<sup>1)</sup> 熱発光に寄与する光化学系 II の数

<sup>2)</sup> 熱発光強度  $= 1 \times S_2Q_B + 1.7 \times S_3Q_B$

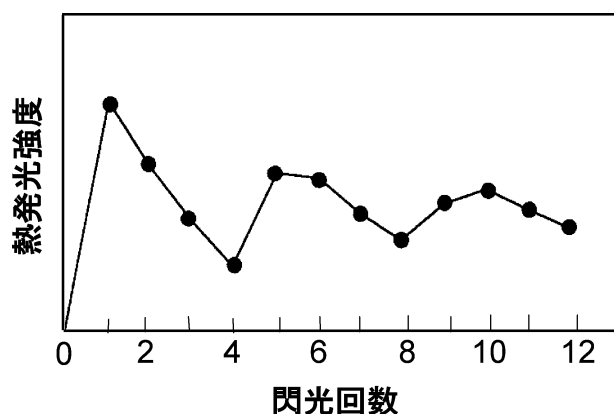


図9：熱発光 B-バンド ( $B_1+B_2$ ) 強度の 4 周期振動  
十分に暗順応した葉緑体を閃光照射し熱発光測定を行い B-バンド ( $B_1+B_2$ ) 強度を閃光回数に対してプロットした。

由来する。系 II 阻害剤である DCMU により  $Q_A^-$  から  $Q_B$  への電子移動を阻害した試料を光照射 (閃光又は連続光) すると現われる (図 8)。  $Q_B$  を失った精製された系 II コア標品では、光照射によりこのバンドがあらわれる。 B-バンドと同様に、ピーク温度は  $S_2$  や  $S_3$  の酸化還元電位の僅かな変化を反映して変化する。また、Q-バンドのピーク温度は系 II 阻害剤の種類に応じそのピーク温度が様々なに変化することが知られている。

～ $-10^\circ\text{C}$  にピークを示す A-バンドは  $S_3Q_A^-$  再結合に由来する。通常の光照射条件ではこのバンドが現れることはない。  $S_1Q_B$  状態にある試料を 2 発の閃光で照射し  $S_3Q_B$  を作った後急冷し、液体窒素温度 77 K で連続光照射 (～1 min) する。 77 K 照射では電荷分離の結果  $Q_A^-$  が生成し、P 680<sup>+</sup> はシトクロム  $b_{559}$ 、カロチノイド、クロロフィルにより酸化される。昇温に伴い、 $Q_A^-$  は  $S_3$  と再結合して A-バンドが現れる。

#### 2.b.8.1.3 A<sub>T</sub>-バンド<sup>28,29)</sup>

～ $-10^\circ\text{C}$  にピークを示す A<sub>T</sub>-バンドは、Tris 処理やヒドロヒシルアミン処理等で Mn クラスターが失われた

試料を～ $20^\circ\text{C}$  で光照射すると現われる。閃光照射でも現われるが、フルチャージには連続光照射が必要である。 $Q_A^-$  と光酸化されたヒスチジン残基 (又は  $Y_2^+$ ) の再結合に由来するとされている。 A-バンドと同じ温度に現われるがその起源は異なることに注意が必要である。

#### 2.b.8.1.4 AG-バンド<sup>30)</sup>

～ $+40^\circ\text{C}$  にピークを示す AG-バンドは、電子伝達の逆行反応により  $S_3Q_B$  状態にある PS II へ電子が供給されて生成する  $S_2Q_B^-$  に由来すると考えられている。電子供給には光化学系 I 循環的電子伝達反応が関与している。

#### 2.b.8.1.4 C-バンド<sup>26,31)</sup>

～ $+50^\circ\text{C}$  にピークを示す C-バンドは  $Y_D^+Q_A^-$  再結合に由来すると考えられている。 C-バンドは系 II 阻害剤である DCMU を加えた試料を液体窒素温度で連続光照射 (～2 min) すると現われる。  $S_0$  と  $S_1$  は正電荷を持たないため、77 K 照射で生成した  $Q_A^-$  が  $Y_D^+$  と電荷再結合を起こす。 C-バンドは他の様々な条件においても観測される。界面活性剤ミセルに取り込まれたクロロフィルからも～ $+50^\circ\text{C}$  にピークを示すバンドが現れるので注意が必要である。

#### 2.b.8.1.5 Z<sub>v</sub>-バンド<sup>31,32)</sup>

$-40^\circ\text{C}$  ～  $-100^\circ\text{C}$  で試料を連続光照射すると、照射温度より 10～ $20^\circ\text{C}$  高い温度にピークを示す Z<sub>v</sub>-バンドが現れる。反応中心標品など、Mn クラスターを持たない試料でも現われる。 P 680<sup>+</sup> $Q_A^-$  再結合に由来すると考えられている。

#### 2.b.8.1.6 その他の熱発光バンド

これまで述べた熱発光バンドは光化学反応の結果、系 II に生成する正負電荷の再結合に由来したが、系 II と直接関係ない熱発光バンドも存在する。試料を液体窒素温度で連続光照射すると～ $-160^\circ\text{C}$  にピークを示すブロードなバンドが現れる (Z-バンド<sup>24,33)</sup>)。また、試料を液体ヘリウム温度で連続光照射すると～ $-200$ ,  $-220$ ,  $-$

250°Cにピークを示すブロードなバンドがあらわれる<sup>34)</sup>。これらのバンドは光照射によりクロロフィルの凝集体においてクロロフィル分子間の電子移動がおり、その結果生成した  $\text{Chl}^+\text{Chl}^-$  間の電荷再結合反応に由来すると考えられている。また、50°C以上の高温では様々な酸化プロセスや脂質の過酸化に由来するバンドがあらわれる<sup>35-37)</sup>。これらの過程で生成する一重項酸素などの活性種からクロロフィルへのエネルギー移動により化学発光がおこる。これらのバンドは試料を光照射しなくても現われるが、光照射によりその強度が高くなる場合が多い。

### 2.b.8.2 遅延発光減衰曲線

遅延発光の減衰曲線は様々な寿命を持つ分離電荷対間の再結合に由来する、異なった時定数で指数関数的に減衰する曲線の足し合わせと理解される。表1に見られるように、各減衰成分の緩和時間より関与する正負電荷対の種類が推定できる。暗順応した葉緑体標品を1閃光照射した後の遅延発光減衰曲線を図10に示す。主成分は、DCMUの存在下では～8秒、非存在下では～70秒で緩和し、それぞれ、 $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ 、 $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ の再結合に由来している。

藻類やシアノバクテリアの細胞や葉では、様々な部分で安定化された電荷が関与し、それらの再結合も細胞の生理状態を反映するため減衰曲線はより複雑となり、指数関数的に減衰する曲線の足し合わせでは記述できなく

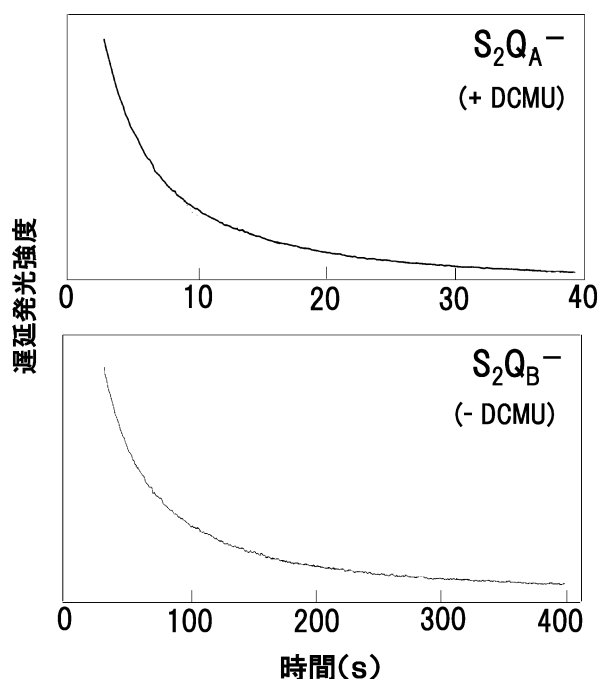


図10： $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ と $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ 再結合に由来する遅延発光減衰曲線  
十分に暗順応した葉緑体を DCMU 存在下(上)又は、DCMU 非存在下(下)で1閃光照射した。15°Cで測定。

なる。図11は好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 細胞を、様々な条件で光照射した後の遅延発光の減衰曲線を示したものである。それぞれのピークの由来は不明な部分も多いが、細胞の生理状態の指標となる。

### 2.b.9 熱力学的パラメーターの算出

様々なモデルに基いた理論式を用い、熱発光と遅延発光をフィッティングし、発光に関与する分離電荷対再結合の熱力学的パラメーターを求める事ができる。詳細についてはそれぞれの文献を参照されたい<sup>8,24,38-42)</sup>。

### 2.b.10 試料

葉緑体標品や光化学系II膜標品、シアノバクテリアや藻類細胞など溶液中に分散している試料は、固定タイプの試料ホルダーの試料用のくぼみに直接のせる。筆者が用いている可動タイプの試料ホルダーでは、試料(～200  $\mu\text{g Chl/ml}$ )、～70  $\mu\text{l}$ をピペットでろ紙(15 mm×15 mm)に浸み込ませ、アルミ板とアクリル板の間にはさみ込む。～20  $\mu\text{g Chl/ml}$ 程度の試料でも十分に測定可能である。生葉などは葉脈などが少ない部分を選び、リーフパンチ(または、コルクボーラー)で打ち抜いたものを直接ホルダーにのせる。試料葉がホルダーに密着するように注意する。生葉を DCMU などの薬剤で処理したい場合は、薬剤が入った溶液中で真空浸透(vacume infiltration)する。軽く減圧後、急に常圧に戻すことを数回

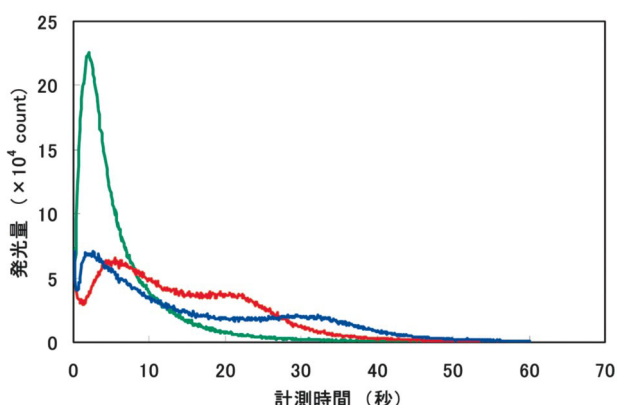


図11：シアノバクテリア細胞における遅延発光減衰曲線  
好熱性シアノバクテリア (*Thermosynechococcus elongatus*) 細胞 (5  $\mu\text{g Chl/ml}$ ) を赤色光 (700 nm) で照射 (緑)、白色光で30秒間照射→赤色光 (700 nm) で照射 (赤)、白色光で30秒間照射→5秒暗→赤色光 (700 nm) で照射 (青) した後、遅延発光測定装置 (浜松ホトニクス：PMX-6100) で遅延発光減衰曲線を測定。(勝又，小野 未発表)

行う。葉の表皮を剥いて薬剤が入りの溶液中に浸してもよい。

## 2.b.11 熱発光測定に際しての留意点

- 1) 熱発光バンドのピーク温度は、装置によってばらつく。実際の試料温度と温度測定用熱電対が示す温度は必ずしも一致しない。また、試料が均一に加熱されず、試料中に温度のばらつきや勾配ができるとバンドの形などに影響を与える。しかし、理論式に従ってバンドのフィッティングを行い、熱力学的パラメーターなどを求める場合などを除いては、通常の使用ではあまり問題とならない。
- 2) 熱発光バンドのピーク温度は pH により変化する。生葉で熱発光を測定する場合、凍結、加熱により細胞組織が破壊される為、単離葉緑体で測定した場合と異なる温度にバンドが現われる場合がある。
- 3) 熱発光バンドのピーク温度は昇温速度によって変化する。高い昇温速度ではより高い温度にピークが現われる。
- 4) 凍った試料の融解に伴い昇温速度が変化するため、0℃近傍に現われる熱発光ピークが歪んだり、偽のピークが現われることがある。溶液に凍結防止剤として～25%(v/v)程度の glycerol を添加することにより改善することができる。
- 5) 光照射する前に試料を十分暗順応させる。暗順応に必要な時間（と温度）は、測定しようとする熱発光バンドにより異なる。
- 6) ある処理や条件下で熱発光バンドのピーク温度や形が変化した場合、変化が系Ⅱの酸化側の正電荷キャリアーと還元側の負電荷キャリアーのどちら側（又は両側）に由来するかは原理的にわからない。すなわち、 $S_2Q_B^-$  再結合由来の  $B_1$ -バンドのピーク温度が変化した場合、これが  $S_2$  の性質の変化に由来するものか、 $Q_B$  の性質の変化に由来するものかを区別する事は出来ない。しかし、 $Q_B$  の性質が変わった場合は  $S_2Q_A^-$  再結合に由来する  $Q$ -バンドには変化が現われず、 $S_2$  の性質が変わった場合は  $Q$ -バンドにも同じような変化が現われる可能性が高い。
- 7) 熱発光測定に使用した試料は、通常、凍結と加熱により生理学的な活性を失っている。

## 参考文献

- 1) P. V. Sane & A. W. Rutherford, Light Emission by

- Plants and Bacteria, eds. J. Ames & D. C. Fork, Academic Press, Orlando, 1986, P.329.
- 2) S. Demeter & Govindjee, *Physiolgia Plantarum*. **75** (1989) P.121.
  - 3) I. Vass & Y. Inoue, The Photosystems: Structure, function and Molecular Biology, ed. J. Barber, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1992, P.259.
  - 4) Y. Inoue, Biophysical Techniques in Photosynthesis, eds. J. Ames & A. J. Hoff, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, P.93.
  - 5) I. Vass & *Photosyn. Res.* **48** (1996) P.117.
  - 6) J. M. Ducruet, *Exp. Bot.* **54** (2003) P.2419.
  - 7) I. Vass, *Photosyn. Res.* **76** (2003) P.303.
  - 8) E. Tyysjärvi & I. Vass, Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, eds. G. Papageorgiou & Govindjee, Springer, Dordrecht, 2004, P.363.
  - 9) P. V. Sane, Photosynthesis Research Protocols, ed. R. Carpentier, Humana Press, Totowa, 2004, P.229.
  - 10) D. E. Fleishman & B. C. Mayne, *Curr. Topics Bioenerg.* **5** (1973) P.77.
  - 11) J. Lavorel, Bioenergetics of Photosynthesis, ed. Govindjee, Academic Press, New York, 1975, P.223
  - 12) S. Malkin, Primary Process of Photosynthesis, ed. J. Baber, Elsevier, Amsterdam, 1977, P.349.
  - 13) J. Ames & H. J. van Gorkom, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**, P.47.
  - 14) Govindjee & P. A. Jursinic, Photochemical and Photobiological Reviews, ed. K. C. Smith, Vol. 4, Plenum Press, New York, 1979, P.125.
  - 15) P. A. Jursinic, Light Emission by Plants and Bacteria, eds. J. Ames & D. C. Fork, Academic Press, Orlando, 1986, P.291.
  - 16) H. J. van Gorkom, *Photosyn. Res.* **48** (1996) P.107.
  - 17) A. Sonneveld, L. N. M. Duysens, A. Moerdijk, *Biochim. Biophys. Acta* **636** (1981) P.39.
  - 18) Y. N. Kaurov, G. E. Aksyonova, E. R. Lovyagina, T. V. Veselova, I. I. Ivanov, *Biochim. Biophys. Acta* **1143** (1993) P.97.
  - 19) S. Itoh, N. Murata, A. Takamiya, *Biochim. Biophys. Acta* **245** (1971) P.109.
  - 20) U. Bodemer, V. Gerhardt, Y. Z. Yacobi, Z. Zohary, G. Friedrich, M. Pohlmann, *Archiv. Für. Hydrobiologie. Special Issues Adv. Limnol.* **55** (2000) P.87.
  - 21) M. Katsumata, T. Koike, M. Nishikawa, H. Tsuchiya, *J. Jap. Soc. Water Envi.* **28** (2005) P.23.
  - 22) M. Katsumata, T. Ayano, K. Kazumura, T. Koike, *J. Photochem. Photobiol. B* **90** (2008) p.152.
  - 23) C. Wang, D. Xing, Q. Chen, *Biosens. Bioelect.* **20** (2004) P.454.
  - 24) W. Arnold & J. R. Azzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61** (1968) P.29.
  - 25) A. W. Rutherford, A. R. Croft, Y. Inoue, *Biochim. Bio-*

- phys. Acta* **682** (1982) P.457.
- 26) A. B. Rubin & P. S. Venediktov, *Biofiz.* **14** (1969) P.105.
- 27) S. Demeter, Z. S. Rózsa, I. Vass, E. Hideg, *Biochim. Biophys. Acta* **809** (1985) P.379
- 28) Y. Inoue, T. Yamashita, Y. Kobayashi, K. Shibata, *FEBS Lett.* **82** (1977) P.303.
- 29) T. Ono & Y. Inoue, *FEBS Lett.* **278** (1991) P.183.
- 30) T. Miranda & J.-M. Ducruet, *Plant Physiol. Biochem.* **33** (1995) P.689.
- 31) S. Demeter, C. Goussias, G. Bernát, L. Kovács, V. Petrouleas, *FEBS Lett.* **336** (1993) P.352.
- 32) T. Ichikawa, Y. Inoue, K. Shibata, *Biochim. Biophys. Acta* **408** (1975) P.228.
- 33) K. Sonoike, H. Koike, I. Enami, Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* **1058** (1991) P.121.
- 34) T. Noguchi, Y. Inoue, K. Sonoike, *Biochim. Biophys. Acta* **1141** (1992) P.18.
- 35) P. V. Sane, T. S. Desai, V. G. Tatake, Govindjee, *Photochem. Photobiol.* **26** (1977) P.33.
- 36) I. Vass, D. J. Chapman, J. Barber, *Photosynth. Res.* **22** (1989) P.295.
- 37) J.-M. Ducruet & D. V. Vavilin, *Free Radc. Res.* **31** (1999) P.187.
- 38) J. T. Randall & M. H. F. Wilkins, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **184** (1945) P.366.
- 39) I. Vass, G. Horvath, T. Herczeg, S. Demeter, *Biochim. Biophys. Acta* **634** (1981) P.140.
- 40) D. de Vault, Govindjee, W. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (1983) P.983.
- 41) D. de Vault & Govindjee, *Photosynth. Res.* **24** (1990) P. 175.
- 42) P. B. Vidyasagar, S. Thomas, M. Banerjee, U. Hedge, A. D. Shaligram, *J. Photobiochem. Photobiol.* **B19** (1993) P.125.