



| | |
|------------------|---|
| Title | 電子伝達活性 |
| Author(s) | 沈, 建仁 |
| Issue Date | 2009-03-31 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/39192 |
| Type | bulletin (article) |
| Note | 4章 分光測定 5 |
| File Information | 67-076.pdf |



[Instructions for use](#)

5. 電子伝達活性

沈 建仁¹⁾

光合成の電子伝達反応は、光化学系IIにおいて光照射により水を分解し、得られた電子をチトクロム b_6/f 複合体を経由して光化学系Iに伝達し、最終的にNADP(NAD)を還元することで終結する。この電子伝達系全体の活性は、電子供与体である水の分解によって放出される酸素量を酸素電極で測定するか、電子受容体であるNADP(NAD)の還元を分光学的に追跡することにより行われる。一方、電子伝達系の反応機構や外部因子による影響を調べるためには、水やNADP(NAD)以外の、人工的な電子供与体及び受容体を加えることによって起こる部分反応を解析することが必要である。また、チラコイド膜を可溶化し、系II及び系I粒子を調製することが簡単にできるので、単離された系IIまたは系I粒子の活性は、やはり外部から電子供与体/受容体を供給して測定する必要がある。これらの解析方法の多くは酸素電極、分光・蛍光測定を用いて行われるが、分光・蛍光測定は第2、第3節で述べられているので、ここでは酸素電極の原理と測定の実際について述べるとともに、部分反応の解析に用いられる主な電子供与体・受容体を紹介し、さらに阻害剤や光化学系IIの各種処理法について概説する。

Electron transfer mediators and inhibitors

Jian-Ren Shen

The principles and practical applications of oxygen electrode in photosynthetic research were described. Subsequently, various artificial electron transfer donors and acceptors useful for measuring photosynthetic electron transfer activities were described. Finally, various inhibitors of the electron transfer chain, together with the treatments leading specifically to the deactivation of oxygen evolution were mentioned.

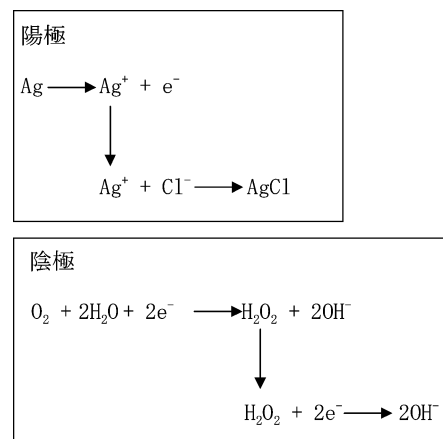
5.1 酸素電極¹⁾

光合成活性を調べるための各種測定法の中でも、酸素電極による酸素発生活性測定は比較的安価な装置で行うことができ、しかも酸素発生反応は光合成の最も特徴的な反応であるので、この反応の活性を測定することは光合成研究に不可欠である。酸素電極は、光合成による酸素発生の量のみでなく、電子受容体との組み合わせによって起きる酸素吸収量も測定することができ、電子伝達鎖全体、あるいは系II、系Iの活性を個別に調べることができる。現在、光合成研究に使われる酸素電極はほとんどポーラログラフ方式のものであり、中でもクラーク型と呼ばれる酸素電極が最もよく使用されている。以下クラーク型酸素電極の原理と液相中での使用法について述べる。気相での酸素電極の使用については第2章を参照すること。

5.1.1 酸素電極の原理

酸素電極の陽極(銀)はあらかじめ飽和KCl溶液に浸しておき、陰極(白金)との間に薄い電解質(通常KCl)でつないでおく。電圧印加により、陽極と陰極でそれぞれ次の反応が起き、電流が流れる。

一定電圧をかけたときに流れる電流は、陰極での電解



1) 岡山大学大学院自然科学研究科

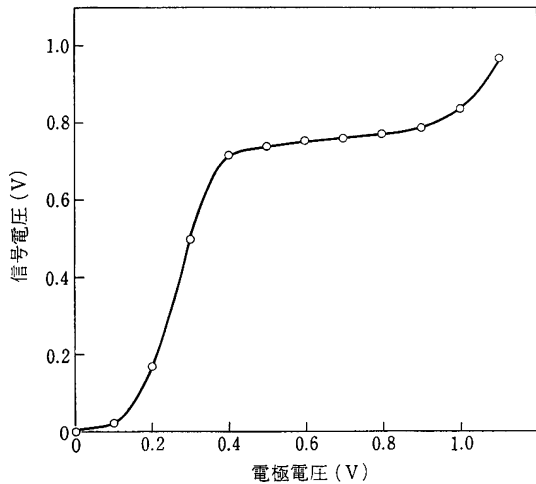


図 5.1: 酸素電極の印加電圧と流れる電流 (電圧に変換) の関係

質反応の速度, すなわち, 酸素濃度に比例するので, この原理を利用して, 光照射による試料中の酸素濃度の変化を測定する. このためには, 印加電圧が変化しても流れる電流が一定であることが望ましい. 印加する電圧 (電極電圧) と流れる電流 (電圧に変換) の関係を図 5.1 に示す. 電極電圧が 0.4-0.9 V の間で流れる電流がほぼ一定であるので, この間で流れる電流が溶存酸素量と比例することになる. 従って電極電圧は, 通常多少の変動があっても流れる電流が変動しない領域の中央値, 約 0.60~0.65 V を使用する.

酸素電極にかかる電圧と信号取り出しのための電気回路を図 5.2 A に示す. 可変抵抗 R_1 は電極にかかる電圧の調整用, R_2 は酸素濃度に比例して流れる電流を電圧に変換し検出するのに用いる (ゲイン調整用, 電極電圧の調整にも使われる). 得られた信号は増幅器で増幅してモニターするが, 通常は飽和酸素濃度に対して光合成反応による酸素量の変化が小さいので, 酸素電極から取り出した電圧に対して, 溶存酸素量に匹敵する一定の逆電圧をかけることによってこの分の電圧をキャンセルし,

光による酸素濃度変化に対応する電圧変化を記録する. これによって記録計のレンジを拡大して測定できるようになる. 逆電圧をかける装置はオフセットまたはバッキング装置と呼び, その回路を図 5.2 B に示した. バッキング回路が付いた記録計も利用可能である. また, 記録計の代わりに信号をコンピューターに取り入れ, それをデジタルデータとして記録・保存する A/D コンバーター, ソフトウェアも発売されている.

酸素電極の陰極は他の陰イオンとも反応し電流を流してしまうので, クラーク型電極ではその表面をテフロン膜など, 酸素は通過するが他のイオンは通過しない膜で覆うことで, 電極液 (反応液) と測定液を分離している. 実際には測定液の酸素濃度と平衡状態にある反応液の酸素濃度を測定することになるので, 測定時には十分な攪拌が必要である. クラーク型の酸素電極は市販のものとして, ランクブラザーズ, ハンザテック社などのものがあり, 筆者の研究室ではハンザテックのものを使用している. その電極と測定セルを図 5.3 に示す.

クラーク型電極は連続光照射による光合成試料の酸素発生を測定するのに十分な感度を有しているが, 閃光照射による微量の酸素を検出するには感度が不十分である. このため, 陰極の電極面を大きくし, 感度を向上させた Joliot タイプ電極が作られている^{2,3)}. これを用いることで閃光照射による酸素発生量の振動パターンや, Mn クラスターの S_2 , S_3 状態の寿命を測定することができる.

5.1.2 酸素電極使用の実際

電極反応は温度に非常に敏感であり, また, 水の溶存酸素量と試料の光合成速度も温度に依存するので, 測定液の温度を一定に保つよう, 恒温水で反応容器の周りを循環させる必要がある. 市販の反応容器は恒温水が循環できるようになっているが, 恒温水循環装置を別途用意する必要がある, 恒温循環器とセットした反応容器もハンザテック社から発売されている. 光照射による電極の

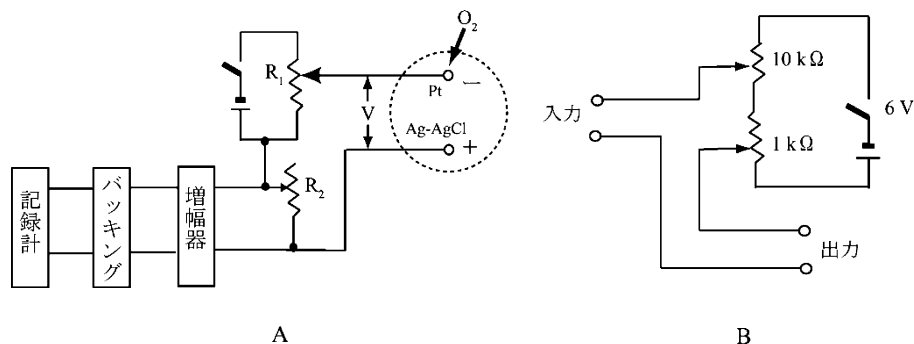


図 5.2: 酸素電極 (A) とバッキング装置の回路図 (B)

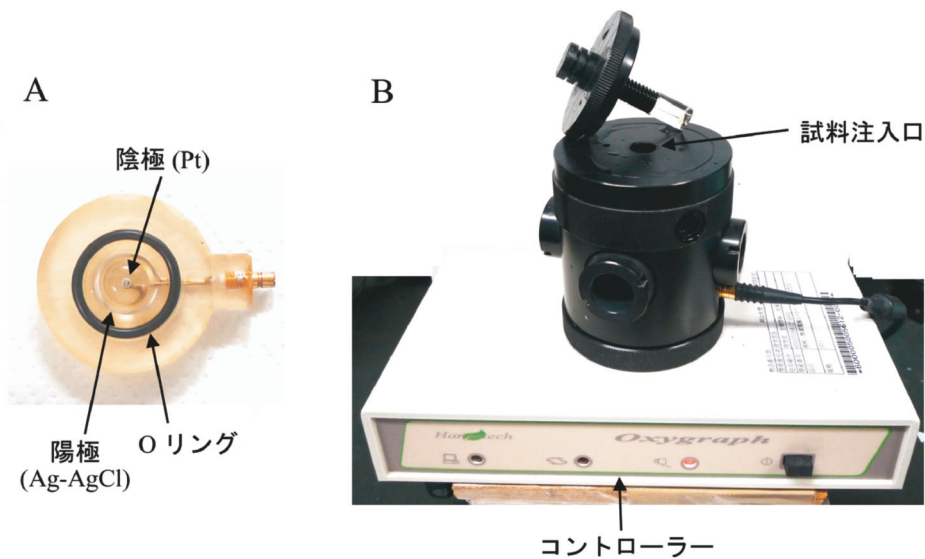


図 5.3：ハンザテック社の酸素電極。A. 酸素電極本体；B. 電極を装着した測定セル。

温度上昇を防ぐ必要もある。そのため、光源からの光を 5-10 cm の水槽または熱線カットオフフィルター、及び赤外線フィルターを通して使用する。

回転子の速度も電流値に影響を与える。回転子の速度が小さいと、電流値が小さく、回転子の速度を増加させると、電流値も増加し、やがて一定になるので、この一定になる回転速度を使用する。回転速度をさらに大きくすると、過度の攪拌によるノイズが生ずる恐れがある。

一定温度での水の飽和酸素濃度を表 5.1 に示す。流れる電流は基本的に溶存酸素量に比例するが、電極の汚れその他の原因により、溶存酸素量が 0 でも一定の電流が流れる。測定の前には酸素が 0 と飽和濃度に対応する電流値（電圧に変換）をチェック（キャリブレーション）しておく必要がある。以下酸素電極の用意とそのキャリブレーションについて述べる。

酸素電極のセット

以下ハンザテック社のものを例に説明する。ランクブラザーズ社のものについても基本的に同じである。

1. 長時間使用した電極の表面は汚れが溜まっている可能性があるため、よく洗ってから乾かしておく。電極を傷つけないよう洗剤で洗うのもよいが、汚れがひどい場合は、専用の粉末洗剤で電極表面を軽く磨くか、粉末洗剤の代わりに、やわらかい歯磨き粉で磨くとよ

い。磨いた後は液体洗剤または水でよく洗ってすすいでおく。

- 乾いた陽極 (Ag) の回りに O リングをセットし、陽極と陰極の上に飽和 KCl を数滴ずつたらす。円形に切ったタバコ紙をのせ、陰極 (Pt) の上に 1 滴の飽和 KCl をたらし、タバコ紙より若干小さく切ったテフロン膜を重ね、O リングをのせ、その上からアプリケーションを用いて O リングがフィットするようにセットする。
- セットした電極をサンプルホルダーにフィットさせ、水漏れがないようしっかり固定する。電極のリード線をつなぎ、反応容器に水を入れ、攪拌しながら電流値（電圧）が安定するまで待つ。通常は 30 分 - 1 時間で電極が安定するが、場合によっては 1 日待つこともある。この場合はテフロン膜のセットは測定の 1 日前から行っておく必要がある。
- テフロン膜のセットがうまくできているかどうかは、以下に示すキャリブレーション時に、信号のノイズは十分小さいか、異常なドリフトはないか、ジチオナイトを添加したときの酸素濃度の減少速度は適当か（通常は数秒で最小値まで減少する）などで判断する。一旦セットしたテフロン膜は乾かさないうちに水溶液に浸しておく。きちんとセットしたテフロン膜は 1 週間程度そのまま使用できる。長時間使用しない電極

表 5.1：1 気圧の空気と平衡になった蒸留水中の酸素濃度（飽和酸素濃度）⁴⁾

| 温度 (°C) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 酸素濃度 (μM) | 442 | 386 | 341 | 305 | 276 | 253 | 235 | 220 | 206 | 192 | 176 |

は、よく洗ってから乾燥状態で保存する。

キャリブレーション

1. 恒温水槽を測定温度に設定する。測定用バッファも恒温槽に入れ、測定温度に保っておく。
2. 測定セルに適量の水を入れ、攪拌しながら空気を取り込み、出力電圧が一定になるまで待つ（通常5分から10分）。この電圧値が設定した温度における、空気と平衡した水の飽和酸素濃度に対応するものである。
3. ジチオナイト ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) をマイクロスポイトで少量加え、ふたを水面との間に空気層がなくなるまで挿入し、電圧が下がるのを待つ（数秒～1分程度）。電圧が十分下がり、安定したらその値を酸素濃度0の時の出力電圧とする。この電圧値と飽和酸素濃度の電圧値との差が、設定温度の飽和酸素濃度（例えば、25°Cの場合は253 μM ）に相当する。
4. ジチオナイトを十分洗い落とす。ハンザテック社の専用ソフトウェアを使用する場合は、再度水を充填してから飽和酸素濃度の電圧値を測定し、その値は自動で酸素濃度に変換される。

実際の測定

1. キャリブレーション終了後、測定セルの水をアスピレーターあるいは先端を柔らかいシリコンチューブで保護したパストールピペットで吸い取り、全量2 ml になるように、測定セルにバッファ、電子受容体、試料の順に加え、空気層がなくなるまでふたを挿入する。
2. スターラーを回転し、記録計をスタートさせ、出力信号（電圧）が安定になるまで待つ（1-2分程度、これより長くなると、試料の失活を考慮する必要がある）。
3. 測定セルに飽和光を照射し、1-2分ほど測定した後、光照射を止め、暗黒のまましばらく記録計を動かす続け、光照射を止めた後の電圧が安定かどうかを確認する。
4. 光照射をONした直後の電圧信号の傾きから、酸素発生の活性 ($\mu\text{moles O}_2/\text{mg chl}/\text{ml}$ として表す) を計算する。光照射前と照射後の電圧信号（ベースライン）が一定でなければ、それらの傾きも計算に入れる。
5. 測定セルの試料を捨て、蒸留水で数回、テフロン膜を傷つけないようセル内を洗浄し、蒸留水で満たして保管する。長期間（1週間以上）使用しない時は電極を解体し、乾燥状態で保管する。

5.2 電子受容体と供与体^{1,5)}

細胞や“intact”葉緑体の場合は、 CO_2 (NaHCO_3) を電子受容体として電子伝達鎖全体の活性を酸素電極で測定することができる。一方、単離したチラコイド膜、系II、あるいは系I標品を用いた場合、あるいは電子伝達の部分反応の活性を知りたい場合、外部から各種電子受容体及び供与体を加えて測定する必要がある。外部から与えられた電子担体は主に(1)酸化還元電位、(2)反応部位への接近の容易さによって電子伝達鎖のさまざまな成分と反応する。電子供与体と受容体を同時に加えて測定する時には、供与体と受容体同士で起こりうる化学反応に注意する必要がある。全電子伝達鎖、及び光化学系II、系Iに使われる主な供与体、受容体の作用部位を図5.4に示し、その使用例を表5.2に示した。

どの供与体、受容体を使用するかは、使用する試料の種類、測定したい部分反応によって決まる。一般に、細胞、“intact”葉緑体には細胞膜、葉緑体包膜があるため、脂溶性のキノン類は反応部位に到達することが可能で使用できるが、水溶性の電子担体は使用できない。これらの試料では光リン酸化と共役しており、Mg, ADP, Pi を添加しないと電子伝達速度が低いが、1-2 mM NH_4Cl のような脱共役剤の添加により活性が著しく増加する。チラコイド膜は系IIと系Iの受容体側がストロマ側に露出しているため、それらの部位で電子を受け取ることができる受容体は使用できるが、ルーメン側に存在する系IIと系Iの電子供給側で電子を供給するには、膜を通過することが可能な脂溶性の供与体は機能を果たすことができるが、水溶性の供与体は使用できない場合がある。

反応液の組成やpHも試料に応じて選択する必要がある。一般に葉緑体やチラコイド膜における電子伝達鎖全体の活性や単離した系Iの活性は至適pHが7~8であるが、系IIにとっての至適pHは6.0-6.5である。電子伝達鎖全体の活性は特にイオンを必要としないが、通常5-10 mM MgCl_2 、10-20 mM NaCl の存在下で測定することが多い。一方、系IIの酸素発生複合体には Ca^{2+} 、 Cl^- イオンが結合しており、これらのイオンは遊離しやすいので系IIの酸素発生活性を測定する時は Ca^{2+} 、 Cl^- イオンを添加して行う。特にシアノバクテリアではチラコイド膜でも Ca^{2+} 、 Cl^- イオンの存在下で測定した方がよい。

光照射は、光強度に対する光合成活性の依存性を解析する以外は飽和光を用いなければならない。市販のハロゲンランプを光源とした「コールドライト」などが利用できる。「コールドライト」と言っても強い光強度下ではか

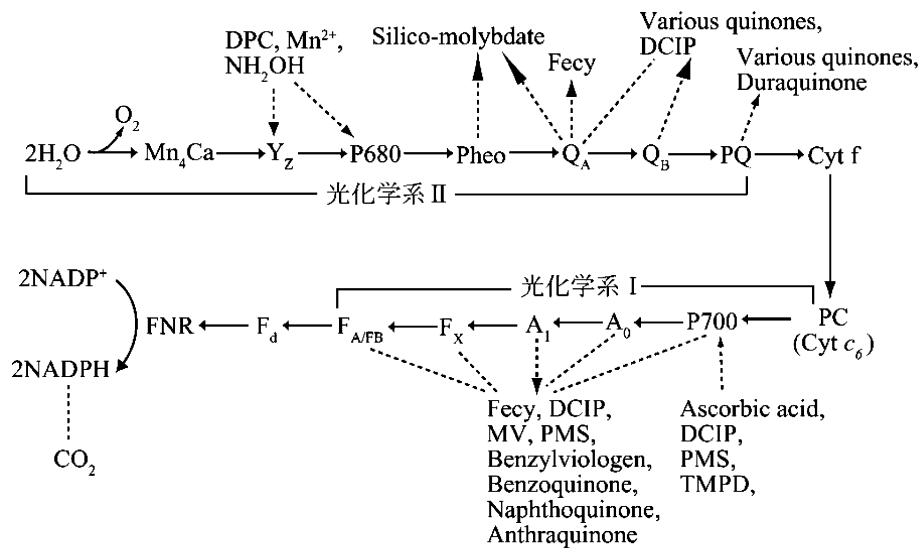


図 5.4：光合成電子伝達系と主な電子受容体，供与体の作用部位。矢印は電子の流れを示し，破線は電子受容体または供与体への電子の受け渡しを示す。矢印のない破線は電子の流れが必ずしも確定されていないこと，あるいは電子伝達の速度が必ずしも最適でないことを示す。略語：DPC, diphenylcarbazide; DCIP, 2, 6-dichlorophenolindophenol; Fecy, potassium ferricyanide; MV, methyl viologen (paraquat); PMS, phenazine methosulfate; TMPD, N, N, N', N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

表 5.2：代表的な電子受容体と供与体の使用例

| 略称 | 名称 | 作用部位と機能 | 溶媒 | 使用濃度 | ストック濃度 |
|-----------|---|----------------|-------|----------------------------|-------------------------|
| 炭酸水素ナトリウム | sodium bicarbonate (NaHCO ₃) | 全電子伝達鎖受容体 | 水 | 5 mM | 2 M |
| NADP* | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate | 全電子伝達鎖受容体 | 水 | 0.2 mM | 20 mM |
| DCBQ | 2, 6-dichlorobenzoquinone (2, 5-dichlorobenzoquinone) | PSII 受容体 | エタノール | 0.4-1.0 mM | 40 mM |
| DMBQ | 2, 6-dimethylbenzoquinone (2, 5-dimethylbenzoquinone) | PSII 受容体 | エタノール | 0.4-1.0 mM | 40 mM |
| PPBQ | phenyl- <i>p</i> -benzoquinone | PSII 受容体 | エタノール | 0.4-1.0 mM | 40 mM |
| DCIP | 2, 6-dichloroindophenol | PSII (PSI) 受容体 | 水 | 0.1-0.2 mM | 20 mM |
| Fecy | potassium ferricyanide | PSII (PSI) 受容体 | 水 | 1-2 mM | 200 mM |
| MV | methyl viologen | PSI 受容体 | 水 | 1-2 mM | 200 mM |
| ナフトキノン | 1, 4-naphthoquinone | PSI 受容体 | エタノール | 0.05 mM | 10 mM |
| DPC | diphenylcarbazide | PSII 供与体 | エタノール | 0.5-1 mM | 200 mM |
| ヒドロキシアミン | hydroxyl amine (NH ₂ OH) | PSII 供与体 | 水 | 1-2 mM | 200 mM |
| 還元型 DCIP | Ascorbate+DCIP | PSI 供与体 | 水 | Asc. 10 mM+ DCIP 0.1 mM | Asc. 1 M, DCIP 20 mM |

*NADP を電子受容体とする場合，必要に応じて Fd, Fd-NADP 酸化還元酵素 (FNR) を添加する必要がある。

なりの熱が発生するので，熱線カットフィルターや 10 cm 程度の水槽を通すことで熱をカットする。さらにイエローフィルターなどを通してクロロフィルやフィコピリンなどに吸収される長波長側の光を使うと安全である。光が飽和しているかどうかを簡単に確認するには，ニュートラルフィルターを用いて光強度を 80-90% に下げた時に活性が減少しないか確認すればよい。

酸素電極や分光学的手法で電子伝達の活性を測定する

時は，通常葉緑体やチラコイド膜は 10-20 μg chl/ml，精製した系 II や系 I 粒子は 5-10 μg chl/ml の濃度で行う。より高濃度で測定する場合，chl による自己吸収や攪拌が不十分による酸素濃度のムラや吸光度の変動に由来するノイズに注意する必要がある。より低い濃度で測定する場合は，活性が低いために測定の誤差が相対的に大きくなる可能性がある。以下全電子伝達鎖，光化学系 II，光化学系 I の順にそれぞれの活性測定について述べる。

3.2.1 全電子伝達鎖

細胞, "intact" 葉緑体, チラコイド膜における全電子伝達鎖の活性は, 電子供与体として水, 電子受容体として CO_2 (NaHCO_3), NADP^+ , ベンゾキノン, アントラキノンを用いて, 酸素電極で測定することができる. NADP^+ を受容体として用いる場合は, その光による還元で生成される NADPH 量を 340 nm の吸収増大で測定することができる (NADPH の 340 nm でのモル吸光係数は $6.2 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である). さらにメチルピオロゲン (MV) を電子受容体として用い, 酸素電極で酸素吸収量を測ることで測定できる. キノン類や Fecy (potassium ferricyanide, フェリシアン化カリウム), DCIP (2, 6-dichloroindophenol) を電子受容体として用いる場合は, 系 II から電子を受け取る可能性があるため, 系 II 由来の活性を考慮する必要があり, 実質的に全電子伝達系の活性を測定するのは難しい. 以上の電子受容体のうち, CO_2 (NaHCO_3) 以外は全電子伝達系の活性は膜電位の形成によって律速されるので, 電子伝達系の活性のみを調べる場合は, 2 mM NH_2Cl や 10 mM メチルアミンなどを脱共役剤として添加して測定を行う.

[実験例 1]

シアノバクテリア細胞の全電子伝達鎖活性の測定

酸素電極を用意し, 測定セルに 2 ml の BG11 培地を入れ, 10 $\mu\text{g chl/ml}$ になるよう細胞を加え, 2 M のストック溶液から 5 mM NaHCO_3 になるよう加え, 光照射による酸素濃度の増加を測定する. 得られた値を $\mu\text{moles O}_2/\text{mg chl/hr}$ に換算して, 炭酸固定と共役した全電子伝達鎖の活性を決定する. 活性が低く, 誤差が相対的に大きいような場合は, 測定液の試料濃度を 15-20 $\mu\text{g chl/ml}$ 程度に増やす (20 $\mu\text{g chl/ml}$ 以上の濃度はできるだけ避けた方がよい). この方法は炭酸固定能を保持した "intact" 葉緑体についても使用可能である.

[実験例 2]

シアノバクテリア及び高等植物のチラコイド膜の全電子伝達鎖活性の測定

2 ml の測定用バッファー (たとえば, 0.4 M sucrose, 40 mM Hepes (pH 7.0), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) に 10 $\mu\text{g chl/ml}$ になるようシアノバクテリアまたは高等植物のチラコイド膜を加え, さらにそれぞれのストック溶液から最終濃度が 1 mM KCN, 1 mM MV になるよう加え, 光照射による酸素吸収量を測定する. この方法では, 水の分解によって生じた電子が, 光化学系 II, 系 I を経由して MV に渡され, 還元された MV はさらに

酸素を還元し過酸化水素を生成する. KCN は過酸化水素の分解を触媒するカタラーゼを阻害するためのものである (KCN は 10 倍の濃度ではプラストシアニンから PSI への電子供給を阻害するので注意すること). 1 分子の MV は 1 分子の酸素を還元し, 酸素が 4 分子還元されれば 2 分子の過酸化水素と 2 分子の酸素になる. 従って, 光化学系 II で 2 分子の水が分解され, 1 分子の酸素が発生すると, 電子伝達系に 4 電子が流れ, MV によって 2 分子の酸素が吸収され, 全体としては 4 電子あたり 1 分子の酸素が吸収されることになる. 即ち, 電子当量としては酸素発生と同じ値でマイナスのものになる.

上記の測定で高等植物のチラコイド膜を用いた場合は, 脱共役剤として 2 mM NH_4Cl または 10 mM メチルアミンを添加することで活性が増加する. シアノバクテリアから単離されたチラコイド膜は多くの場合 "脱共役" の状態にあるので, 特に脱共役剤を添加しなくてもよい. しかし, シアノバクテリアから単離されたチラコイド膜はしばしば系 I の電子供与体であるシトクロム c_6 (C_{553}) が脱離するので, 全電子伝達鎖の活性が高くないかもしれない. MV は細胞膜を透過するので, シアノバクテリアの生細胞の全電子伝達鎖, あるいは適当な電子供与体との組み合わせで光化学系 I の活性をこの方法で測定することも可能である.

5.2.2 光化学系 II

光化学系 II の電子受容体として最もよく使われるのは, PPBQ (phenyl-*p*-benzoquinone), 2, 6-DCBQ (2, 6-dichlorobenzoquinone), 2, 5-DCBQ (2, 5-dichlorobenzoquinone), 2, 5-DMBQ (2, 5-dimethylbenzoquinone), BQ (benzoquinone) などの各種キノン類で, 主に Q_B から電子を受け取る. Q_B 部位が損傷を受けた場合は Fecy がよい受容体になる. DCIP も Q_A , Q_B 両方からの電子受容体として用いられる. 特に酸素電極が利用できない, あるいは酸素発生活性が失われた場合, DPC (diphenyl-carbazide) を電子供与体とし, DCIP の光還元を 600 nm で測定することで光化学系 II の活性を評価することが有効である. 一方, 系 II の酸化側では, 通常水が電子供与体となるが, 酸素発生複合体が損傷を受けた場合, DPC, NH_2OH , Mn^{2+} などが電子供与体として使用することができるが, このうち, NH_2OH , Mn^{2+} は DCIP をゆっくり還元させるので, 実質的には DPC が最も有効な電子供給体である.

[実験例 1]

光化学系 II 膜断片 (BBY 標品) 酸素発生活性の測定

酸素電極を用意し, 2 ml の測定バッファー (0.4 M

sucrose, 40 mM Mes (pH 6.0), 10 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) に 0.4 mM PPBQ を入れ, ホウレンソウ BBY 標品を 10 μg chl/ml になるよう加え, 光照射による酸素濃度の変化量を測定する. 測定バッファーの Ca²⁺ イオンは酸素発生系が損傷を受けているかどうかの指標であり, 損傷を受けていない高等植物の BBY 標品の活性測定には Ca²⁺ イオンが必要ないが, コア標品やシアノバクテリアの系 II 標品は Ca²⁺ イオンがないと活性が低くなる. 電子受容体として, PPBQ 以外に, 2, 6-DCBQ, 2, 5-DMBQ がほぼ同じ活性を与える. チラコイド膜や葉緑体でも, プラストキノンから系 I への電子供給を阻害する DBMIB (2, 5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone) の添加により, この方法で系 II の活性を測定することができる. コア標品やシアノバクテリアの系 II 標品には, 1 mM Fecy を同時に入れた方がより高い活性が得られる.

[実験例 2]

酸素発生活性を失った光化学系 II の活性測定

光化学系 II の酸素発生活性は, トリスなどの各種処理, 各種ストレスによって簡単に失われる. このように酸素発生能を失った光化学系 II の電子伝達活性は, DPC を電子供与体, DCIP を電子受容体として測定することができる. 還元された DCIP の定量は, 600 nm での吸光度変化により行われる (600 nm での DCIP のモル吸光係数は $1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 通常の分光光度計を用いて, 試料セルの側面, 測定光と直角の方向から光照射を行い, 600 nm での吸光度変化を追跡する.

3 ml の測定バッファー (0.4 M sucrose, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) に, 1 mM DPC, 0.2 mM DCIP を加え, 20 μg chl/ml になるよう試料を入れ, 攪拌しながら光照射による 600 nm での吸光度変化を測定し, DCIP のモル吸光係数から活性を求める. DCIP の還元は 2 電子反応なので, 測定された活性は酸素発生活性の 2 倍に相当する. チラコイド膜や葉緑体標品も, 光化学系 I の活性を阻害すればこの方法で系 II の活性が測定できる.

5.2.3 光化学系 I

系 I の電子受容体としては, メチルビオロゲン (MV), 各種キノン, DCIP, Fecy がある. 一方, 系 I の供与体として, 還元型の DCIP, PMS (phenazine methosulfate), TMPD (N, N, N', N' -tetramethyl-*p*-phenylenediamine) を用いるが, それらの還元型を作るには, 高濃度のアスコルビン酸と合わせて使用する. さらにチラコイド膜などで系 I のみの活性を測定する場合, 系 II 由来の電子を DCMU (3-(3, 4-dichlorophenyl)-1,

1-dimethylurea) で阻害しておく必要がある.

[実験例]

チラコイド膜の系 I 活性の測定

酸素電極のセルに 2 ml の測定バッファー (0.4 M sucrose, 40 mM Hepes (pH 7.0), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) を入れ, 最終濃度 2 mM アスコルビン酸ナトリウム, 0.1 mM DCIP, 0.2 mM MV, 1 mM KCN, 10 μM DCMU を加え, 光照射による酸素濃度の減少を測定する. 必要であれば脱共役剤として 2 mM NH₄Cl, または 10 mM メチルアミンなどを加える. MV は 4 分子還元されれば 4 分子の酸素を還元し, それらが酸素ラジカル O₂⁻ を經由して 2 分子の過酸化水素と 2 分子の酸素になるので, ネットとしては 2 分子の酸素が吸収されることになる. 従って, これによって測定される酸素吸収の活性は, 系 II における酸素発生活性の 2 倍に相当する. しかし, アスコルビン酸の存在下では, 酸素ラジカル O₂⁻ は過酸化水素まで還元されるが酸素を作らないので, 見かけの酸素吸収量は 4 電子あたり 2 分子よりも著しく大きくなる. これを避けるため, 過剰量の SOD (superoxide dismutase) を添加して酸素ラジカル O₂⁻ からの過酸化水素と酸素への分解を促進する必要がある⁵⁾. なお, KCN はカタラーゼを阻害することで生成された過酸化水素の分解を防ぐためのものである.

5.3 阻害剤⁶⁾

阻害剤は電子伝達系の特定のステップを阻害する薬剤であり, その作用様式は主に 2 種類に分けられる. すなわち, (1) 電子伝達体と競合して, その結合する部位に結合することで電子伝達を阻害する; (2) 電子伝達体の結合部位あるいはその周辺の構造を破壊することで電子伝達を阻害する. 光合成電子伝達系の主な阻害剤の作用部位を図 5.5 に示し, 典型的な阻害剤の使用例を表 5.3 に示した.

タイプ (1) の阻害剤として, 光化学系 II では還元側にある Q_B 結合部位に特異的に結合する DCMU, アトラジン, トリアジン, シマジン, *o*-フェナンスロリン, HOQNO (2-heptyl-4-hydroxyquinoline oxide) などがあリ, 例えば, チラコイドや生細胞で光化学系 I の活性のみを測定する場合, 10 μM DCMU を添加して系 II の活性を阻害しておく手法はよく用いられる. 光化学系 II 型 (Q_AQ_B 型) 反応中心を持つ光合成細菌の場合は *o*-フェナンスロリンが阻害剤として用いられる. アトラジンはその Q_B 部位への結合の特異性と ¹⁴C 同位体標識による

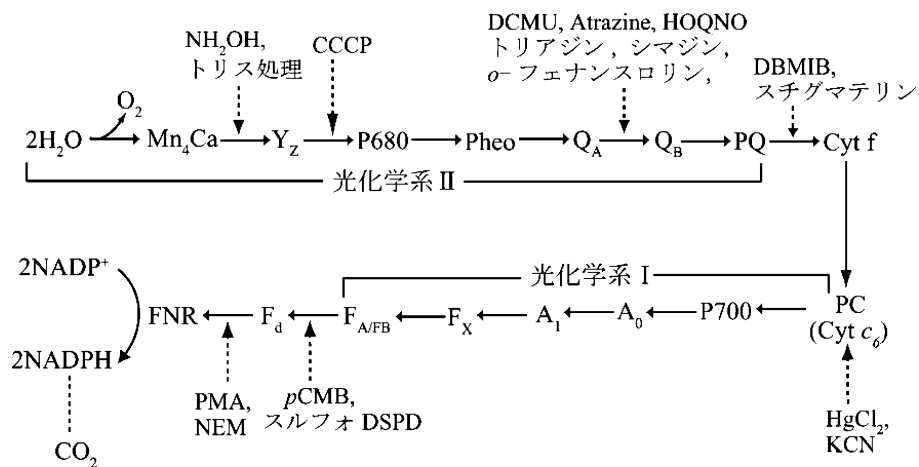
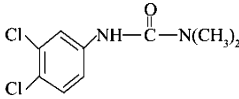
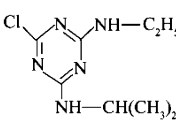
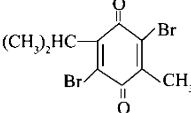
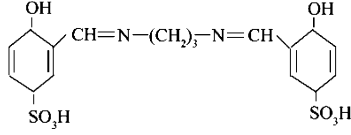


図 5.5：光合成電子伝達系に対する各種阻害剤の作用部位（矢印の付いた破線で表してある）。略語：CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone; DCMU, 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea; HOQNO, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline oxide; *p*CMB, *p*-chloromercuribenzoate; PMA, phenyl-mercuribenzoate; NEM, *N*-ethylmaleimide;スルフォDSPD, disulfodisalicilydenepropanediamine.

表 5.3：光合成電子伝達系の阻害剤の使用例

| 阻 害 剤 | 溶 媒 | 使用例 |
|---|-------|------------|
| DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) | エタノール | 10 μ M |
|  | | |
| Atrazine | エタノール | 10 μ M |
|  | | |
| DBMIP (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl- <i>p</i> -benzoquinone) | エタノール | 5 μ M |
|  | | |
| Sulfo-DSPD (disulfodisalicilydenepropanediamine) | 水 | 1 mM |
|  | | |
| HgCl ₂ | 水 | 10 mM |
| KCN | 水 | 10 mM |

定量分析が可能であることから、シアノバクテリアの生細胞中での系IIを定量することにも利用される。系Iの電子供給側では、DBMIBとスチグマテリンが阻害剤としてよく用いられ、それらはシトクロム *b₆f* のプラスト

キノン結合部位に結合して、還元型プラストキノンの酸化を防ぐことで電子伝達を阻害する。DBMIBは10 μ M以上の濃度では光化学系Iに直接電子を供給するので注意が必要である。アンチマイシンAは光合成細菌の電子

伝達系で働くシトクロム bc_1 複合体を特異的に阻害するが、シトクロム b_6f では有効な阻害剤ではない。

タイプ(2)の阻害剤としては、光化学系IIの酸素発生複合体中のMn原子を遊離させるヒドロキシアミン、トリス処理、熱処理（これらの作用については次節を参照）、P 680 への電子供給を阻害する CCCP (carbonylcyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone), 系 I の電子供給側を阻害する $HgCl_2$, KCN (炭酸固定を阻害する濃度の数十倍の濃度), 及び系 I の還元側を阻害するスルフォDSPD (sulfo-disalicylidene-propanediamine), PMA (phenyl-mercuribenzoate), NEM (*N*-ethylmaleimide), *p*CMB (*p*-chloromercuribenzoate), などがあげられる。このうち、CCCP は脱共役剤であるが、10-100 倍高い濃度で用いると阻害剤になる。 $HgCl_2$ と KCN はプラストシアニン中の銅を遊離させることで系 I への電子供給を阻害するが、 $HgCl_2$ は系 II の酸素発生反応も阻害するので注意が必要である。*p*CMB はフェレドキシンの阻害剤として、PMA, NEM はフェレドキシン-NADP⁺ オキシドレダクターゼ (FNR) の阻害剤として用いられるが、PMA や NEM はフェレドキシンを阻害する場合もあるので注意が必要である。

電子伝達反応と光リン酸化反応 (ATP 合成反応) を切り離すための薬剤は脱共役剤として知られている。これらの薬剤はチラコイド膜を介したプロトンの電気化学的ポテンシャルを解消することによって、ATP 合成に必要な駆動力をなくし、ATP 合成反応を阻害する。通常、生細胞や葉緑体では光合成電子伝達系は光リン酸化反応と共役しているので、全電子伝達鎖の速度は ATP 合成反応によって律速されているが、脱共役剤の使用によって全電子伝達鎖の速度を著しく促進することができ、電子伝達系の活性のみを分析する時には脱共役剤の使用が不可欠である。よく用いられる脱共役剤として、ナイジェリシン、バリノマイシン, FCCP (カルボニルシアニド-*p*-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン), グラミシジ

ンA, アラメシチン, NH_3 , NH_4Cl , などがある。

5.4 トリス処理などによる光化学系IIの失活と再活性化

光化学系IIの酸素発生反応は電子伝達系の中でも最も失活しやすい部位であり、各種処理によって活性が失われることが知られている。系IIの酸素発生反応を失活させる処理とそれらの作用機構を表5.4にまとめた。これらの処理の作用機構は4つに分けられる：(1)系II表在性タンパク質の全部または一部を遊離させる；(2)Mnを遊離させる；(3)表在性タンパク質とMnを同時に遊離させる；(4)Mnと表在性タンパク質には影響しないが、MnクラスターのCaのみを遊離させる。(1)に属するのは高塩濃度による処理で、例えば、1Mの一価カチオンであるNaClは高等植物系IIの23 kDa, 17 kDaタンパク質を遊離させるが、33 kDaタンパク質は遊離しなく、Mnも結合したままである。このように処理した高等植物の系IIは数mMのCa²⁺, Cl⁻存在下で未処理系IIとほぼ同じ酸素発生活性を示す。1Mの二価カチオンであるCaCl₂やMgCl₂で処理すると、33 kDaを含む3つの表在性タンパク質が遊離し、酸素発生活性が著しく低下する。(2)の処理に属するのはヒドロキシアミンであるが、場合によっては表在性タンパク質の一部または大部分を脱離させるので注意が必要である。(3)は熱処理やトリス処理があげられ、特にトリス処理はMnと表在性タンパク質の両方を遊離させる処理として、高等植物のチラコイド膜、系II標品、あるいはシアノバクテリアの系II標品に広く使われている。(4)は単離した高等植物の系II標品に特異的に働く方法で、pH 3.0のバッファーで5分程度処理することによってMnクラスターに結合しているCa原子のみが脱離する。

表在性タンパク質のみが脱離した場合は、脱離した表在性タンパク質を系IIと混合することで再結合させ、

表 5.4：光化学系II酸素発生反応を阻害する各種処理

| 処理 | 作用機構 | 文献 |
|--|--|--------|
| 1 M Tris, pH 8.0 | Mn と表在性タンパク質を脱離 | 10, 11 |
| 1 M CaCl ₂ (MgCl ₂) | 3つの表在性タンパク質を脱離させるが、Mnは遊離しない | 12, 13 |
| 1 M NaCl | 高等植物の系IIの表在性23 kDa, 17 kDaタンパク質のみを脱離、シアノバクテリア系IIには効果なし。Mnは遊離しない。 | 14, 15 |
| 2-10 mM NH ₂ OH | Mnを還元して遊離させる。表在性タンパク質も部分的に脱離 | 16 |
| 100 citric acid, pH 3.0 | 高等植物の系II MnクラスターのCaを脱離、シアノバクテリア系IIには効果なし。Mnと表在性タンパク質は遊離しない。 | 17 |
| 熱処理 | 表在性タンパク質を優先的に脱離させるが、場合によってはMnも脱離。 | 18 |

PSII を再構成し、酸素発生を回復させることができる^{7,8)}。一方、トリス処理やヒドロキシアミン処理のような、Mn を脱離させた場合、電子受容体である DCIP や Fecy の存在下で弱い光照射によって Mn を酸化してから再結合させることが必要であり、これは光再活性化と呼ばれる手法である⁹⁾。

参考文献

- 1) 加藤栄, 宮地重遠, 村田吉男編, 光合成研究法, 共立出版, 1981.
- 2) P. Joliot, & A. Joliot, *Biochim. Biophys. Acta* **153** (1968) 625.
- 3) P. Joliot, *Photosynth. Res.* **76** (2003) 65.
- 4) G. A. Truesdale, & A. L. Downing, *Nature* **173** (1954) 1236.
- 5) S. Izawa, *Methods in Enzymol.* **69** (1980) 413.
- 6) A. Trebst, *Methods in Enzymol.* **69** (1980) 675.
- 7) A. Seidler, *Biochim. Biophys. Acta* **1277** (1996) 35.
- 8) I. Enami, S. Yoshihara, A. Tohri, A. Okumura, H. Ohta, & J.-R. Shen, *Plant Cell Physiol.* **41** (2000) 1354.
- 9) G. M. Cheniae & I. F. Martin, *Biochim. Biophys. Acta* **253** (1971) 167.
- 10) Y. Yamamoto, M. Doi, N. Tamura, & M. Nishimura, *FEBS Lett.* **133** (1981) 265.
- 11) T. Kuwabara, & N. Murata, *Plant Cell Physiol.* **24** (1983) 741.
- 12) T. Ono, & Y. Inoue, *FEBS Lett.* **164** (1983) 255.
- 13) T. Ono, & Y. Inoue, *FEBS Lett.* **166** (1984) 381.
- 14) H.-E. Åkerlund, C. Jansson, & B. Andersson, *Biochim. Biophys. Acta* **681** (1982) 1.
- 15) M. Miyao, & N. Murata, *Biochim. Biophys. Acta* **725** (1983) 87.
- 16) N. Tamura, & G. M. Cheniae, *Biochim. Biophys. Acta* **809** (1985) 245.
- 17) T. Ono, & Y. Inoue, *FEBS Lett.* **227** (1988) 147.
- 18) I. Enami, M. Kitamura, T. Tomo, Y. Isokawa, H. Ohta, & S. Katoh, *Biochim. Biophys. Acta* **1186** (1994) 52.