HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光化学系反応中心の分光学的定量
Author(s)	村上, 明男
Description	3章 単離・精製・活性測定 3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量 h
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, 259-263
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39154
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-039.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

3．酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
h．光化学系反応中心の分光学的定量

村上　明男[1)]

酸素発生型光合成生物がもつ2種の光化学系（光化学系Ⅰと光化学系Ⅱ）の量比は，光などの環境条件により適応的に制御される．本章では光化学反応中心の定量法について紹介する．

Quantification of Photosystem Reaction Centers

Akio Murakami

Stoichiometric relationships of photosystem II, cytochrome b_6-f and photosystem I complexes are regulated by growth conditions such as light intensity and light quality.　In this chapter, I introduce (i) estimation of photosystem I/photosystem II ratio by 77K fluorescence emission spectra and (ii) quantification of thylakoid components by oxidation-reduction difference absorption spectra.

3.h.1　はじめに

光化学系Ⅰと光化学系Ⅱの量比は光量や光質などの生育環境により適応的に調節され，両光化学系の励起バランスや光の利用効率が維持される[1–3)]．光合成の環境応答などの研究において光化学系反応中心の定量は重要項目であり，これまでに様々な定量法が考案されている．

光化学系Ⅰ反応中心複合体には1分子のクロロフィルa’(d’)，光化学系Ⅱ反応中心複合体には2分子のフェオフィチンaが存在する．これらの特殊な微量色素を液体クロマトグラフィーにより精密分析する方法が開発されている[4)]．また，両光化学系複合体にはそれぞれP700やシトクトムb_{559}などの酸化還元成分が存在する．これらの成分の酸化還元差スペクトルによる光化学系反応中心の定量が行われている[5)]．この他，電子スピン共鳴などによる反応中心の定量法も報告されている[6,7)]．一方，生細胞や葉緑体の液体窒素温度でのクロロフィル蛍光スペクトルの解析により，光化学系Ⅰ/Ⅱの量比が推定できる[8,9)]．

本章では，蛍光スペクトル法と酸化還元差スペクトル法による光化学系反応中心の定量について紹介する．

3.h.2　低温蛍光スペクトルによる光化学系反応中心Ⅰ/Ⅱ量比の測定

生細胞などのクロロフィル蛍光スペクトルを液体窒素温度（77 K）で測定すると，光化学系Ⅰと光化学系Ⅱ由来の蛍光帯が明瞭に区別できる蛍光スペクトルの解析から光化学系反応中心Ⅰ/Ⅱの量比の見積もりが可能である．植物，緑藻，紅藻，一般的なラン藻（シアノバクテリア）では，685 nm付近，695 nm付近，710–740 nmに極大を示す3つの蛍光帯が普遍的に存在する（図1）[8–10)]．光化学系複合体の精製標品の解析などから，685 nmと695 nmの2つの蛍光帯は光化学系Ⅱに，710–740 nm（見かけの極大波長は生物種により異る）の蛍光帯は光化学系Ⅰに帰属することが明らかになっている[8–10)]．一方，ミドリムシ藻や褐藻などの葉緑体二次共生生物や特殊なクロロフィルをもつラン藻などの77 K蛍光スペクトルは，これらのパターンにあてはまらないことが多い．

低温蛍光スペクトルの測定では，液体窒素用のデュワー瓶やセルが必要である．蛍光分光光度計の特別付属品，あるいは特注扱いで製作したものを用いる．測定試料（生細胞，単離葉緑体，生葉，藻体）を15% ポリエチレングリコール溶液に懸濁あるいは浸漬し，専用セル（アクリル製など）に入れ液体窒素中で迅速に凍結する．蛍光分光光度計の試料室に液体窒素を満たしたデュワー瓶を設置し，試料を入れたセルをセットする．

液体窒素中での試料の状態が安定した後に蛍光スペクトル（600 nm～850 nm，励起波長435 nm付近）を測定する．なお，蛍光スペクトル測定には多くの注意点があるので成書を参照する[11)]．

光化学系Ⅱ由来の685 nmと695 nmの2つの蛍光帯（F_{685}とF_{695}）と光化学系Ⅰ由来の710～740 nmの蛍光帯（F_{PSI}）の間の蛍光強度（蛍光帯面積）の比〝$F_{PSI}/(F_{685}+F_{695})$〟は，反応中心Ⅰ/Ⅱ量比の指標となる[10)]．少量の試

1）神戸大学・自然科学系先端融合研究環・内海域環境教育研究センター

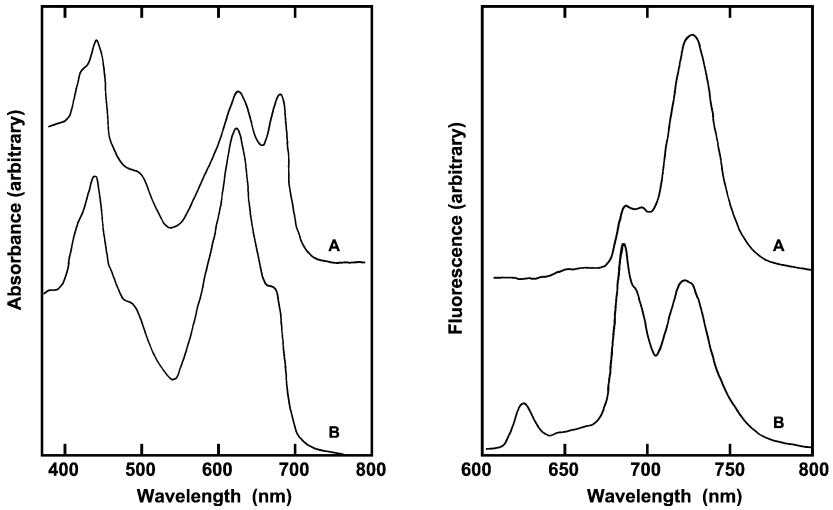

図1：*Synechocystis* sp. PCC6714 生細胞の室温吸収スペクトル（左）と 77 K 蛍光スペクトル（右）．A：橙色光で培養し，反応中心 I / II 量比が高くなった細胞（PS I /PS II ≒ 3），B：赤色光で培養し，反応中心 I / II 量比が低くなった細胞（PS I /PS II ≒ 1）．

料で解析できるため，光化学系量比の変化を追跡する培養実験などにおいて有用な手法である．ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6714（3 培養光条件），緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*（2 培養光条件），および緑色植物 *Spinacia orelacea* について調べたところ，上記の蛍光強度比と反応中心 I / II 量比の間に高い相関性が示されている[10]．

3.h.3　酸化還元差スペクトルによる光化学系反応中心の定量

チラコイド膜を用いる酸化還元差スペクトルから，各光化学系固有の反応中心色素やヘムなどの構成成分を定量することができる[12]．光合成色素よる高バックグラウンド吸収もつ試料の微小吸収変化を測定するため，セルの汚れや試料液中の気泡などに対する様々な注意が必要である[12]．

3.h.3.1　チラコイド膜の調製

細胞や葉緑体を緩衝液（50 mM　Tricine-NaOH，pH 7.5）に懸濁し，フレンチプレスや超音波処理により破砕し断片化したチラコイド膜を得る[5]．強固な細胞壁をもつ微細藻などでは破砕処理を数回繰り返す．処理中の温度上昇や泡立ちを防ぐため，予冷や間欠処理にも留意し，必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する．

低速遠心（1,600 *g*，15 min）により未破砕の細胞などの残査を除き，遠心上清のチラコイド膜を超遠心（140,000 *g*，1 hr）で回収する．沈殿を緩衝液で再懸濁し，超遠心を繰り返すことで膜に吸着したタンパク質（フィコビリンタンパク質など）などを洗い除く．通常はこの精製段階のチラコイド膜を測定に用いるが，ショ糖密度勾配遠心により細胞壁などの夾雑物を除くこともある[13]．単離したチラコイド膜は凍結保存する．

3.h.3.2　光化学系 I 反応中心の定量

光化学系 I 反応中心は，光化学系 I に 1 当量存在する反応中心分子 P 700 の酸化還元差スペクトルにより定量する[5]．

チラコイド膜を緩衝液（50 mM　Tricine-NaOH，pH 7.5）に懸濁する．テフロンホモジナイザー等で均一化することで，分光測定中にチラコイド膜が凝集・沈降しないようにする．短時間の超音波処理も有効である．なお，界面活性剤を用いたチラコイド膜の可溶化は有効と思われるが，酸化剤／還元剤の添加に伴うクロロフィルなどのバックグラウンド吸収の変化が拡大する問題もあり，個別の条件検討が必要である．チラコイド膜懸濁液（20〜60 μg Chl *a*/ml，A_{680} ≒ 1.5〜4.5）をセル（光路長：10 mm）に入れ，酸化剤（フェリシアン化カリウム）を終濃度 1 mM で加え撹拌する．二波長分光光度計で測定する場合は，λ_1 を 730 nm に設定し 690〜730 nm（λ_2）の波長範囲で測定する．まず酸化剤を加えた試料のベースラインを測定する．次に，還元剤（アスコルビン酸ナトリウム）を終濃度 1〜4 mM（100 倍液または粉末）で加え，ゆっくり撹拌した後差スペクトルを測定する（図 2 A）．P 700 の還元反応の飽和を確認するため，再度還元剤を少量加え同様に測定する．酸化剤や還元剤の至適濃度は予備実験により検討する．なお，酸化還元剤の過剰な添加は光合成色素の退色や膜断片の凝集・沈澱を引き起こし，バックグラウンド吸収が大きく変動することで測定が困難になる．通常のダブルビーム型分光光度計を

用いた測定では，サンプル側とリファレンス側の両方のセルにチラコイド膜懸濁液を入れ，ベースラインを補正する．次に，サンプル側に還元剤，リファレンス側に酸化剤を加え，差スペクトルを測定する．

光酸化-暗還元の差スペクトルでP 700を定量することも可能である（図2 B）．還元剤を添加したチラコイド膜懸濁液に光照射のON-OFFを繰り返してP 700の酸化-還元を誘起する．四面透明セルを用い，分光光度計の測定光束に対して直角方向の面から青色光を照射した状態でスペクトルを測定する．そのため，光電子増倍管（ホトマル）に照射光が入らないよう光学フィルターで保護する．光照射のON-OFFを繰り返して測定することにより，スペクトルの精度を向上させることができる．

P 700濃度の算出方法：差スペクトルの極大波長（700 nm付近）とベースライン（730 nm付近）の吸光度差を読みとる（図2参照）．報告されている差分子吸光係数（$\Delta\varepsilon_{red-ox}=64\ mM^{-1}cm^{-1}$）[14]を用いてP 700量（クロロフィル当たりのモル濃度）を算出する．

3.h.3.3 光化学系II反応中心とシトクロム b_6-f 複合体の定量

光化学系II反応中心のP 680は酸化還元電位が非常に高いので，酸化剤・還元剤を用いた差スペクトル測定は困難である．このため，光化学系II反応中心の定量法として，酸素発生の閃光収率の測定[15]，二次電子受容体Q_Aの分光測定[16]，放射標識した除草剤の結合，電子スピン共鳴によるチロシンラジカルの測定[6,7]などの様々な方法が開発されている．いずれ方法も特殊な装置を必要とする．ここではラン藻で開発され[5]広く適用されている[17]，シトクロム b_{559} の酸化還元差スペクトルによる光化学系II反応中心の定量法を紹介する．なお，同一試料でシトクロム b_6-f 複合体も定量可能である．

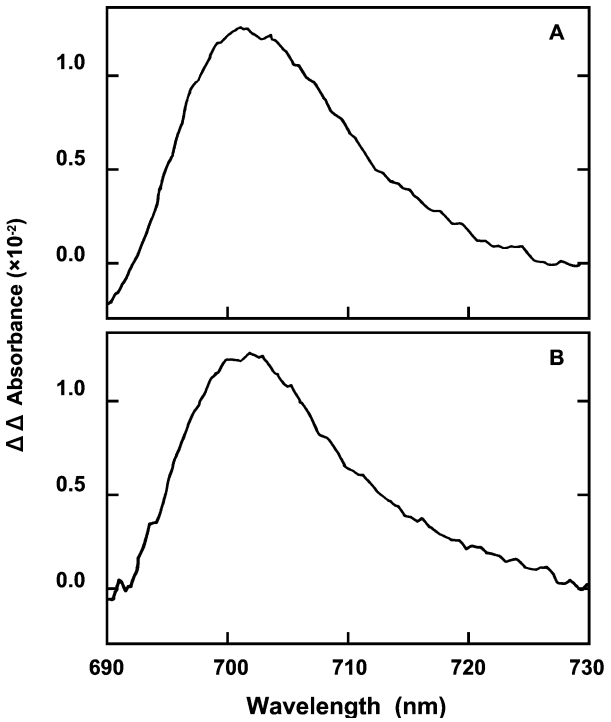

図2：*Synechocystis* sp. PCC6714単離チラコイド膜で測定したP 700の酸化還元差スペクトル．A：[Na ascorbate]−[K ferricyanide]の差スペクトル，B：[暗還元]−[光酸化]の差スペクトル．

チラコイド膜懸濁液（50〜100 μg Chl a/ml，$A_{680nm}\fallingdotseq$ 4〜8）をセル（光路長：10 mm）に入れ，酸化剤（フェリシアン化カリウム）を終濃度1 mMになるように加える．二波長分光光度計の λ_1 を570 nmに設定し，540〜580 nm（λ_2）の波長範囲で測定する．酸化剤を加えた試料に，還元剤（ヒドロキノン）を粉末で加える．ヒドロキノンの添加では高酸化還元電位のシトクロム f（$Em_7\fallingdotseq$ 340 mV）が還元される．この段階でベースライン測定を行う．次に還元剤（アスコルビン酸ナトリウム）を粉末で加え，静かに撹拌し1分間ほど静置した後にシトクロム b_{559} の差スペクトルを記録する（図3 B）．シトクロム b_{559}（$Em_7\fallingdotseq$80 mV）還元の飽和を確認するため，差スペクトル測定を2，3回繰り返す．

同じ試料を用いて3種の還元剤を逐次加え差スペクトルを連続測定することで，シトクロム b_6-f 複合体も定量出来る[5]．フェリシアン化カリウムとヒドロキノンの間の酸化還元差スペクトルではシトクロム f（$Em_7\fallingdotseq$340 mV），アスコルビン酸ナトリウムと亜ジチオン酸ナトリウム（ハイドロサルファイトナトリウム）の間の酸化還元差スペクトルではシトクロム b_6（$Em_7\fallingdotseq-50$ mV）の各成分が選択的に現れる（図3 A，C）．

特定の1成分だけを測定する場合は還元剤を溶液として加える場合もあるが，同一試料で3種のシトクロムを連続測定する際には，粉末（固形物）で加えることで試料の濃度変化を抑えることができる．粉末を加える際には，薬さじ（小）を用い少量（数粒）づつ分けて加え，その都度よく撹拌して溶解させる．なお，還元剤は湿気などにより変質することが多いので，デシケータ中で保管する．

シトクロム b_{559} とシトクロム b_6-f 濃度の算出方法：

差スペクトルの極大波長559 nmとベースラインとの吸光度差を読み取る．ベースラインが斜めになった場合は，540 nmと570 nm付近の差スペクトルの谷を直線で結びベースラインとする．シトクロム b_{559} の濃度は，精

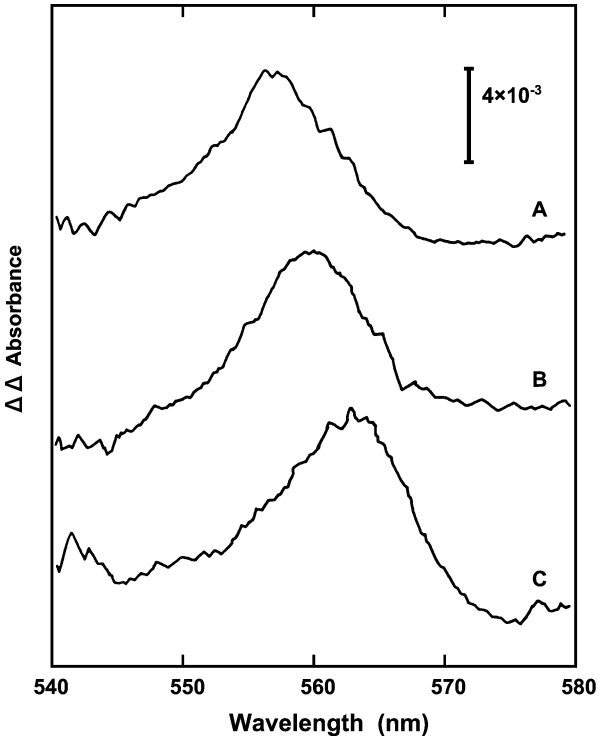

図3：*Synechocystis* sp. PCC6714 単離チラコイド膜で測定したシトクロム *f*，シトクロム b_{559}，シトクロム b_6 の酸化還元差スペクトル．A：[Hydroquinone]−[K ferricyanide]の差スペクトル（シトクロム *f*），B：[Na ascorbate]−[Hydroquinoe]の差スペクトル（シトクロム b_{559}），C：[Na dithionite]−[Na ascorbate]の差スペクトル（シトクロム b_6）．

製標品の還元型スペクトルのモル吸光係数[18]をもとに計算した559 nmでの差吸光係数 $\Delta\varepsilon_{red-ox}=15\ mM^{-1}cm^{-1}$ を用いて計算する[19]．なお，光化学系II反応中心複合体当たりのシトクロム b_{559} の数（1あるいは2個）については，光化学系II反応中心の精製標品では1個との報告があるが，まだ決着していない[20–23]．我々はラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6714 についてのシトクロム b_{559}，アロフィコシアニン(フィコビリソームのコア)，シトクロム c_{550} などの量，および酸素発生の閃光収量との相互比較を行い，光化学系反応中心II当たり2分子のシトクロム b_{559} ヘムが含まれると判断している[5]．しかし吸光係数の扱いの問題などもあり今後も検討が必要である．

シトクロム *f* とシトクロム b_6 の差吸光係数としては，それぞれ $\Delta\varepsilon_{red-ox}=21\ mM^{-1}cm^{-1}$（554/557 nm）と $\Delta\varepsilon_{red-ox}=14\ mM^{-1}cm^{-1}$（563 nm）を用いる[24,25]．シトクロム b_6-*f* 複合体当たり1分子のシトクロム *f* と2分子のシトクロム b_6 が含まる．

3.h.4 おわりに

本章ではラン藻での測定例を中心に光化学系反応中心などの定量法について紹介したが，緑色植物オオムギ[26]，クロマツ[27]，緑藻 *Chlamydomonas*[28]，紅藻 *Porphyra*[29]でも同様な測定が可能である．

参考文献

1）Y. Fujita, A. Muakami, K. Aizawa & K. Ohki. The Molecular Biology of Cyanobacteria, ed D. A. Bryant, Kluwer Academic Publishers, (1994) P.677.

2）Y. Fujita, K. Ohki, & A. Murakami, Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanism. eds L. C. Rai & J. P. Gaur, Springer-Verlag, (2001) P.135

3）村上明男・佐藤公行「光シグナルトランスダクション」（編集）蓮沼・木村・徳永，シュプリンガー・フェアラーク東京，(1999) P.101

4）渡辺正・仲村亮正・小林正美，日化2002（2002）P.117

5）Y. Fujita & A. Murakami, Plant Cell Physiol. **28** (1987) P.1547.

6）R. Danielsoon, P.-Å. Albertsson, F. Mamedov & S. Styring, Biochim. Biophys. Acta, **1608** (2004) P.53

7）D.-Y. Fan, A. B. Hope, P. J. Smith, H. Jia, R. J. Pace, J. M. Anderson & W. S. Chow, Biochim. Biophys. Acta **1767** (2007) P.1064

8）N. Murata & K. Satoh, Light Emission by Plant and Bacteria, eds. Govindjee et al., Academic Press, (1986) P. 137.

9）佐藤公行，植物細胞工学 **1**（1989）P.170

10）A. Murakami, Photosyn. Res. **53** (1997) P.141

11）三室守，実験生物学講座4 生化学実験法（編集）金谷・藤田，丸善（1983）P.205

12）三室守・村上明男，藻類 **44**（1996）P.9

13）N.-H. Chua & P. Bennoun, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72** (1975) P.2175

14）T. Hiyama & B. Ke, Biochim. Biophys. Acta **267** (1972) P.160

15）M. Kawamura, M. Mimuro & Y. Fujita, Plant Cell Physiol. **20** (1979) P.697

16）A. Melis, Phil. Trans. R. Soc. Lond., B**323** (1989) P.379

17）L. Yu, J. Zhao, U. Mulenhoff, D. A. Bryant & J. H. Golbeck, 1993. Plant Physiol. **103** (1993) P.171

18）H. S. Garewal, & A. R. Wasserman, Biochemistry **13** (1974) P.4063.

19）W. A. Cramer & J. Whitmarsh, Ann. Rev. Plant Physiol. **28** (1977) P.133

20）D. H. Stewart & G. W. Brudvig, Biochim. Biophys. Acta, **1367** (1998) P.63

21) O. Kaminskaya, J. Kern, V. A. Schuvalov & G. Renger. Biochim. Biophys. Acta, **1708** (2005) P.333
22) I. Yruela, F. Miota, E. Torrado, M. Seibert & R. Picorel, Eur. J. Biocheim. **270** (2003) P.2268
23) G. M. MacDonald, R. J. Boerner, R. M. Everly, W. A. Cramer R. J. Debus & B. A. Barry Biochemistry **33** (1994) P.4393.
24) H. Böhme, B. Plezer & P. Böger, Biochim. Biophys. Acta, **592** (1980) P.528
25) A. L. Suart & A. R. Wasserman, Biochim. Biophys. Acta, **314** (1973) P.284
26) K. Ohashi, A. Murakami, A. Tanaka, H. Tsuji & Y. Fujita, Plant Cell Physiol. **33** (1992) P.371
27) K. Shinohara, A. Murakami & Y. Fujita, Plant Physiol. **98** (1992) P.39
28) A. Melis, A. Murakami, J. A. Nemson, K. Aizawa, K. Ohki & Y. Fujita, Photosyn. Res. **47** (1996) P.253
29) S. Abe, A. Murakami, K. Ohki, Y. Aruga & Y. Fujita, Plant Cell Physiol. **35** (1994) P.901