

HPLC による微量光合成色素の生合成過程の追跡

HPLC Determination of Minor Photosynthetic Pigments during Photosynthetic Apparatus Formation

田 中 修 平*・仲 村 亮 正*・渡 辺 正*

Shuhei TANAKA, Akimasa NAKAMURA and Tadashi WATANABE

1. は じ め に

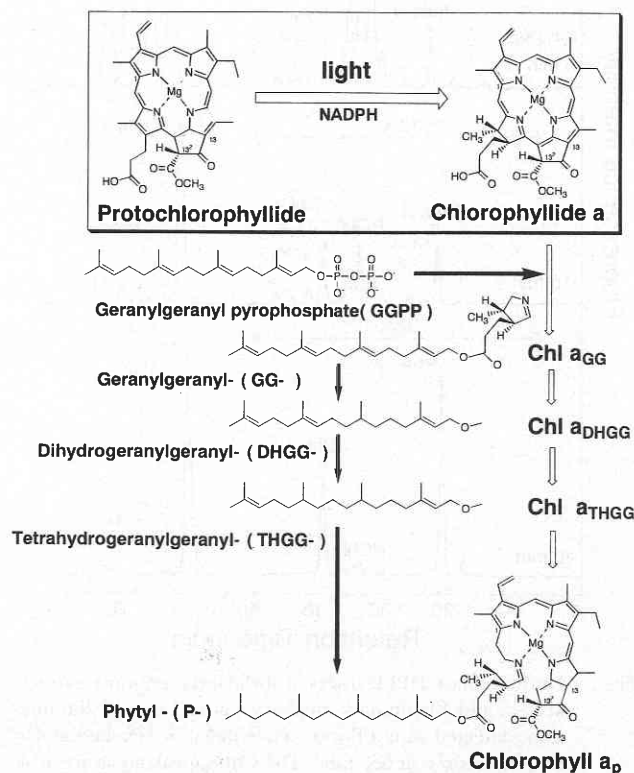
高等植物の光合成反応は高効率の光→化学エネルギー変換系であり、葉緑体のチラコイド膜に埋め込まれた2種の光化学系が連動してエネルギー変換を達成している。各光化学系は多種のタンパク質、機能色素から成る超分子複合体で、たとえば光化学系 (PS) I 反応中心複合体はおよそ13種類のタンパク質サブユニットから成り、機能分子として約100分子のクロロフィル (Chl) 類、2分子のキノン、3分子の4 Fe-4 S クラスターを持つ¹⁾。

各光化学系の反応中心複合体に含まれる Chl 類の大部分は Chl *a* だが、そのほかに微量の Chl 異性体が存在し、エネルギー変換に重要な役割を果たしている。たとえば PS II には Chl *a* の脱金属化合物であるフェオフィチン (Pheo) *a* が2分子存在し、光誘起電荷分離において一次電子受容体として機能している²⁾。また、PS I には Chl *a* の C13² 位立体異性体、Chl *a'* が反応中心あたり2分子存在することが当研究室の研究から明らかになり、この2分子の Chl *a'* が PS I の光化学活性に関与している可能性も指摘されている^{3),4)}。

これら、Chl *a* に対し0.5~1%程度の微量色素が生体内でどのように合成され、タンパク質と一定のストイキオメリーで複合化するかは化学の眼でも興味深く、超分子構造の人工的構築に有用な知見を与える可能性もある。しかし、光化学系の形成過程については、*in vivo*でのタンパク質合成^{5),6)}、Chl 生合成の研究⁷⁾、*in vitro*でのアポタンパク質と色素の再構成⁸⁾などが研究されているものの、分子レベルでは不明な点が多く、とりわけ微量色素の生合成については未知の部分が多い。

光化学系の複合化や Chl 生合成の研究には、暗所で生育した黄化葉に光照射した際におこる緑化 (greening) 過程

の解析がよく用いられる^{9),10)}。Fig. 1に Chl の生合成経路を示す⁷⁾。暗所で生育させた黄化葉中には、Chl も光化学系も存在せず、Chl の前駆体プロトクロロフィリド (Pchl_{ide}) だけが蓄積している。これに光を照射すると Pchl_{ide} が酵素的に還元されてクロロフィリド (Chlide) *a* となる。次に Chlide *a* のプロピオン酸基にゲラニルゲラニル二リン酸 (GGPP) が結合して側鎖を持つ Chl *a*_{GG} となり、この側鎖の二重結合が段階的に還元され、Chl *a*_{DHGG}、Chl *a*_{THGG} を経て成熟型の Chl *a*_p となる。この過程における主

Fig. 1 Biosynthetic pathway of Chl *a*

*東京大学生産技術研究所 第4部

研 究 速 報

要色素 Chl *a*, *b* の生合成については、遺伝子レベルの研究を含めさかんに研究されているが^{5,7)}、微量色素 Chl *a'*, Pheo *a* に関しては分析手法の不備などから緑化過程での生合成量を実測した例はほとんどなく¹¹⁾⁻¹³⁾、Chl *a'*, Pheo *a* に Chl *a* 同様の GG ~ THGG 異性体が存在するかどうかさえ明らかではない。

本研究では、光化学系複合化のメカニズム、微量色素の生合成過程の解明を目指し、まず緑化過程における Chl *a'*, Pheo *a* の生合成過程を実測するために、Chl *a*, *a'*, Pchl の GG ~ P 異性体を逆相・順相 HPLC によって分離・定量可能な条件を確立し、実際に緑化過程における微量色素の生合成過程を追跡した。

2. 実 験 方 法

2.1 植物試料

試料にはオオムギ (*Hordeum vulgare*) を用いた。種子

約 5 g を Hoagland 栄養液でしめさせたバーミキュライト上に植え、25 °C、暗所下で 6 日間生育させて黄化葉を得た。その後、8000 lx の白色蛍光灯で 1 分間光照射し、再び暗所に戻して所定時間ごとにサンプルを採取した。サンプルはチラコイド膜の調製まで液体窒素中に凍結保存した。

2.2 チラコイド膜の調製と色素の抽出

黄化葉約 0.5 g を等張液 (0.33 M sorbitol, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tricine-NaOH (pH = 7.8)) 5 ml 中で破碎し、ナイロンメッシュ (50 μm) で濾過の後、10000 × g, 5 分の遠心処理によりチラコイド膜を得た。これを 10 μl の低張液に懸濁して色素分析に用いた。実験はすべて 4 °C、緑色光下で行った。

色素は上記のチラコイド膜標品にアセトン:メタノール = 1:1 混合溶媒 2 ml を加えて抽出した。色素抽出液は 0.5 μm PTFE フィルターで濾過・乾固ののち溶離液 20 μl に溶解し、5 μl を順相および逆相高速液体クロマトグラフ

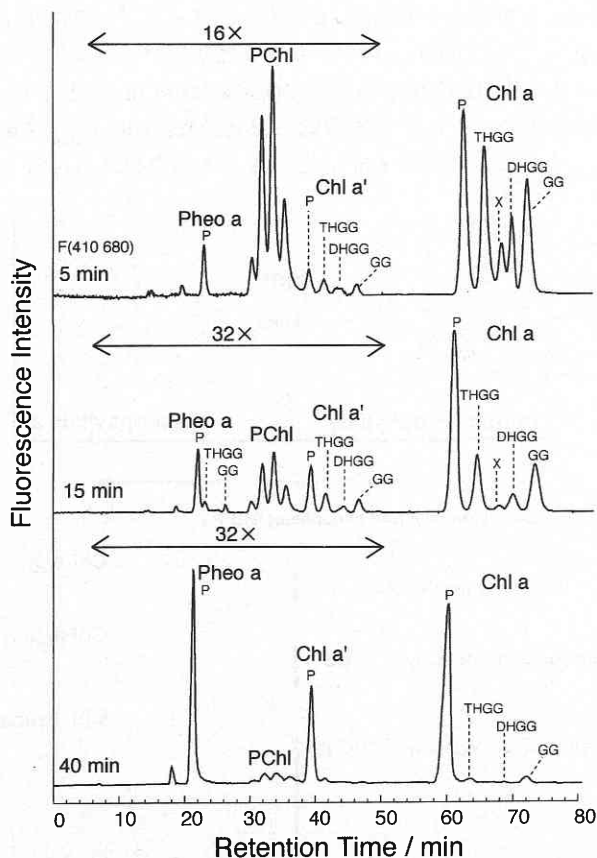


Fig. 2 Normal-phase HPLC traces of thylakoid membrane extracts at 5, 15 and 40 min dark incubation after 1 min of illumination, detected with a fluorescence detector (excited at 410 nm, monitored at 680 nm). The Chl *a*_p peak areas are arbitrarily scaled to a common intensity.

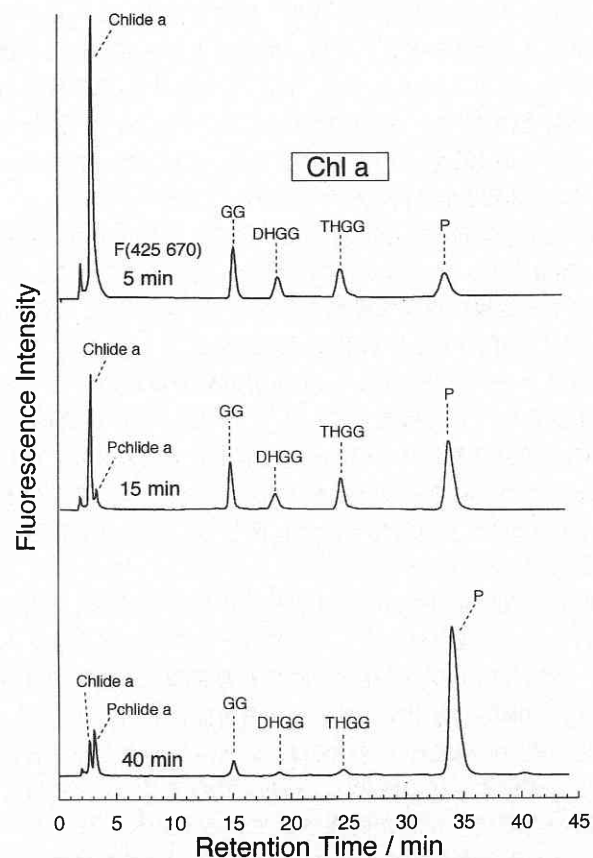


Fig. 3 Reversed-phase HPLC traces of thylakoid membrane extracts at 5, 15 and 40 min dark incubation after 1 min of illumination, detected with a fluorescence detector (excited at 425 nm, monitored at 670 nm). The amount of total Chl *a* forms are arbitrarily scaled to a common intensity.

イー (HPLC) 分析に供した。

2.3 HPLC 条件

HPLC は順相と逆相を併用した。順相 HPLC には、Silica-2151 N (6 mmφ × 150 mm, センシユー科学) を用い、ヘキサン:メタノール:2-プロパノール:アセトン = 100:0.5:0.2:0.2 を溶離液とし、流速 0.9 ml/min, カラム温度 -10°C で色素を溶出させた。緑化初期の色素量は成葉中に比べると著しく少ないため、成分色素の検出には高感度な蛍光検出器 (励起 410 nm, 検出 680 nm) を用いた。

逆相 HPLC には Pegasil ODS を充填したチタン製カラム (6 mmφ × 150 mm, センシユー科学) を用い、アセトン:アセトニトリル:メタノール:水 = 43:32:20:5 を溶離液とし、流速 1.0 ml/min, カラム温度 15°C で色素を溶出させた。検出は蛍光検出 (励起 425 nm, 検出 670 nm) で行った。

3. 結果と考察

3.1 HPLC によるクロロフィル生合成中間体の分離と色素の同定

Fig. 1 に示すように、緑化の中間段階では極性の高い Chlide *a*, Pchl *id*e と疎水性の Chl *a'*, Pheo *a* が共存する。Chl *a'*, Pheo *a* の分析には疎水性色素の分析に適す順相 HPLC が有利だが、Chlide *a*, Pchl *id*e は溶出しない。そこで、Chl *a'*, Pheo *a*, Chl *a* 型色素の分析には順相 HPLC を、Chlide *a*, Pchl *id*e の分析には逆相 HPLC を用いた。

順相 HPLC で光化学系形成途上のサンプルを分析した HPLC チャートを Fig. 2 に示す。溶離液の組成を一連に変化させることによって、Pheo *a*, Pchl, Chl *a'*, Chl *a* 型色素の GG ~ P 異性体、計 16 種類を分離する条件を確立できた。各ピークの同定は各色素の蛍光特性、Chl *a'*, Pheo *a* については Chl *a*_{GG-P} をエピマー化、フェオフィチン化したサンプルとの保持時間の比較で行った。過去に Pheo *a*, Pchl, Chl *a'* の GG ~ P 異性体を HPLC で分離した例はない。

Fig. 3 に逆相 HPLC のチャートを示す。逆相 HPLC では Pchl *id*e *a*, Chlide *a*, Chl *a*_{GG-P} を分離できた。各ピークの同定は各色素の蛍光特性、GG ~ P 異性体については各ピークの保持係数から同定を行った¹⁴⁾。

3.2 光化学系形成過程における色素組成変化の追跡

Chl *a'*, Pheo *a* に GG ~ THGG 異性体が存在するか否かを調べるには、Chl *a*_{GG-THGG} 異性体が比較的多く存在する光化学系形成の初期を検討する必要がある。また、連続光による緑化を行った場合、暗所で蓄積した Pchl *id*e からの Chl 合成と、光照射後に生成した Pchl *id*e からの Chl 合成の足し合わせを観測することになるため色素組成は複雑なキ

ネティクスをとると予想された。そこで、短時間の光照射で黄化葉中に存在する Pchl *id*e をすべて Chlide *a* に転化し、再び暗所に戻すことによって暗所で蓄積した Pchl *id*e のみからの Chl 合成を追跡した。

暗所下の経過時間が 5 分、40 分、100 分の順相 HPLC チャートを Fig. 2 に示す。時間の経過に伴って Pheo *a*, Chl *a'* の相対量は増加した。暗所下の時間 5, 15, 40 分いずれでも Pheo *a* は Chl *a* に比べ GG ~ THGG の割合が低く、Pheo *a* は成熟型が優先的に合成される可能性が示唆された。GG 型のバクテリオクロロフィル (Bchl) *a* を主要色素として持つ紅色光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* G-9⁺ では、バクテリオフェオフィチンは Bchl とは対照的に P 型の側鎖を持つことが知られているが¹⁵⁾、高等植物で同様の現象が確認されたのは初めてで、今後、Pheo *a* の生合成経路を考える上で有用な結果が得られた。Chl *a'* に関しては Chl *a* 同様、GG ~ THGG 異性体が存在するとわかった。

暗所下 5 分、10 分、40 分の逆相 HPLC チャートを Fig. 3 に示す。5 分では Chlide *a* が全 Chl *a* 型色素の 60% 程度を占めるが、時間とともにイソプレノイド側鎖の結合、側鎖中の二重結合の還元の前駆体 Pchl *id*e が再び合成・蓄積されていく過程も観測できた。各段階での Chl *a*_{GG-P} の存在比は順相 HPLC、逆相 HPLC ともほぼ一致し、ピーク同定の正しさを裏づけている。

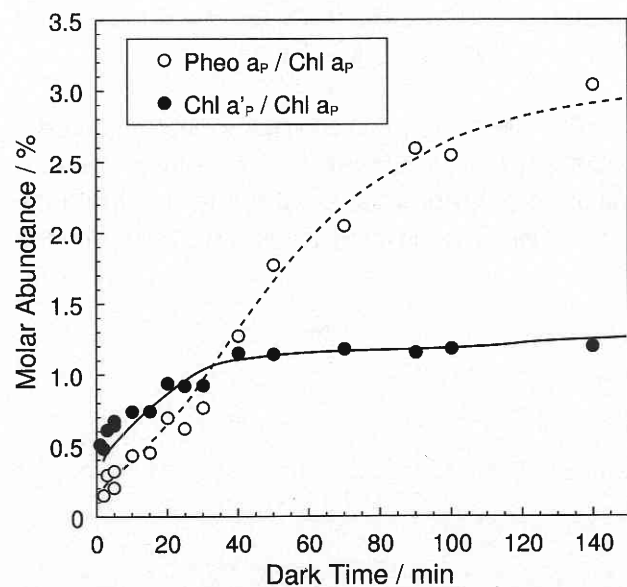


Fig. 4 Time courses of Chl *a'*_p / Chl *a*_p (●) and Pheo *a*_p / Chl *a*_p (○) molar ratios during dark incubation after 1 min of illumination.

研究速報

3.3 Pheo *a* と Chl *a'* の相対量の経時変化

Fig. 2の順相HPLC分析で求めたPheo a_p /Chl a_p 比とChl a'_p /Chl a_p 比の経時変化をFig. 4に示す。Chl a'_p /Chl a_p は光照射後、暗所に戻して30分程度の間増加し、成熟葉中の定常値の2倍強にあたる約1.2%で一定となった。一方Pheo a_p /Chl a_p は、Chl a'_p /Chl a_p よりも遅れて増え、40分過ぎから急激に増加し、100分以降は成熟葉中の定常値の3倍程度(約3.0%)で一定となった。Chl a' 、Pheo a は光照射直後ですで見られ、両者が存在しない段階は見られなかった。これは、試料の採取中に弱い光が当たってしまい、実験前に微量のChl a' とPheo a が生成したためと考えられる。

Pheo a_p /Chl a_p がChl a'_p /Chl a_p より遅れて増え始めるのは、両微量色素がそれぞれPS I、PS IIの活性に関与していると考えれば既存の研究結果と一致する。すなわち、光化学系形成過程では、まずPS Iの活性が現れ、その後にPS IIの活性が現れると報告されている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。微量色素を指標としてこの過程を追跡した今回の実験結果も同様の傾向を示しており、HPLCによる微量色素の測定が光化学系の形成度のよい指標となる可能性が示唆された。

またPheo a_p /Chl a_p とChl a'_p /Chl a_p が成熟葉の2.5倍強ほどの高い値で一定となったのは、光照射後に再び暗所に戻すことによりChlの合成量が限られ、そのために反応中心複合体のみは形成されるが、成熟葉中のおよそ半分のChl a をもつアンテナ複合体は形成しなかったためであろう。これは、断続光照射でChl合成量を制限し、黄化葉の緑化を行うと反応中心複合体に富むチラコイド膜が形成されるという過去の報告とも一致する¹⁸⁾。

今回の実験で、従来例のないPheo a 、Chl a' の生合成過程の追跡を行える分析条件が確立できた。今後は、Pheo a とChl a' の生合成中間体の詳しい分析とPS IIの活性測定を併用し、Pheo a とChl a' の生合成経路および反応中心形成

過程に関する分子レベル描像を得ることを目指す。

(1997年12月24日受理)

参考文献

- 1) R. Nechushtai, A. Eden, Y. Cohen and J. Klein, "Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction" (D. R. Ort and C. F. Yocum ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, p. 289.
- 2) K. Satoh, *ibid.*, p. 193.
- 3) H. Maeda, T. Watanabe, M. Kobayashi and I. Ikegami, *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**, 74 (1992).
- 4) 小林正美, 秋山満知子, 木瀬秀夫, 渡辺 正, 生物物理, **37(5)**, 196 (1997).
- 5) Y. Cohen, S. Yalovsky and R. Nechushtai, *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 1 (1995).
- 6) A. N. Webber and N. R. Baker, "Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction" (D. R. Ort and C. F. Yocum ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, p. 41.
- 7) S. Reinbothe and C. Reinbothe, *Eur. J. Biochem.*, **237**, 323 (1996).
- 8) H. Paulsen, *Physiol. Plant.*, **100**, 760 (1997).
- 9) N. K. Boardman, "Encyclopedia of Plant Physiology" (A. Pirson and M. H. Zimmermann, ed.), Vol. 5, Photosynthesis I (A. Trebst and M. Avron, ed.), Springer Verlag, Berlin, 1977, p. 583.
- 10) J. K. Hooper, R. A. White, D. B. Marks and J. L. Gabriel, *Photosynth. Res.*, **39**, 15 (1994).
- 11) 仲村亮正, 渡辺 正, 生産研究, **47**, 177 (1995).
- 12) A. Nakamura and T. Watanabe, submitted to *FEBS Lett.*
- 13) N. V. Ignatov and F. F. Litvin, *Photosynth. Res.*, **42**, 27 (1994).
- 14) Y. Shioi, R. Fukae and T. Sasa, *Biochim. Biophys. Acta*, **722**, 72 (1983).
- 15) E. Walter, J. Schreiber, E. Zass and A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta*, **62**, 899 (1979).
- 16) M. Plesnicar and D. S. Bendall, *Biochem. J.*, **136**, 803 (1973).
- 17) K. Ohashi, A. Tanaka, and H. Tsuji, *Plant Physiol.*, **91**, 409 (1989).
- 18) G. Tzinias, J. H. Argyroudi-Akoyunoglou and G. Akoyunoglou, *Photosynth. Res.*, **14**, 241 (1987).