

色素構成変化にもとづく光合成反応中心形成プロセスの解析

Dynamics of Photosynthetic Reaction Center Formation in Cucumber Seedlings
as Analyzed by HPLC Quantitation of Chlorophyllous Pigments仲 村 亮 正*・渡 辺 正*
Akimasa NAKAMURA and Tadashi WATANABE

1. はじめに

光合成の初期過程では、直列につながった光化学系 I, II (PS I, II) それぞれの反応中心 (P700, P680) における光電荷分離と、続く一連の電子移動を介して光→化学エネルギー変換が進む。多段階の電子授受を経ながらも、光吸収から二酸化炭素の還元固定に至る全過程の量子収率がほぼ 1 の量子変換系である¹⁾。このような特徴をもつ光合成反応中心の分子機構は、理学・農学だけでなく工学の側からも興味をもたれ、多くの研究がなされてきた。

PS I の反応中心 P700 は、約 20 年来、種々の間接知見をもとにクロロフィル (Chl) *a* 型色素の二量体と考えられてきたが、今なお確かな証拠はない²⁾。当研究室では近年、植物試料の色素計測を通じて、P700 近傍を構成する Chl 約 10 分子のうち 2 分子が Chl *a* の C13² 位立体異性体 Chl *a'* であることを見出し^{3)~5)}、さらに Chl *a'* の会合体の吸収スペクトルが P700 の酸化還元差スペクトルに似ているという事実⁶⁾から、Chl *a'* 2 分子が P700 自身の構成成分ではないかと推測するに至っている。

Chl 類や反応中心タンパク質は、暗所で芽生えた黄化葉 (etiolated leaf) 中には存在せず、光照射することによって初めて合成される⁷⁾。これを緑化 (greening) プロセスという。緑化過程で反応中心が形成されていくダイナミックスの解明は、工学の目で興味深いのみならず、われわれが新たに見出した Chl *a'* の生体内機能解明にもつながると期待される。そこで本研究では、成熟した植物体と分画試料に関する従来の Chl *a'* 計測結果^{4), 5)}を補完・拡張すべく、黄化葉への光照射で反応中心が形成される動的過程を、色素構成の変化に着目して追跡した。このような微量機能色素を指標とする反応中心形成過程の解析は、現在までほとんど行われていない。

*東京大学生産技術研究所 第 4 部

2. クロロフィル類の生合成

Chl 類の生合成経路は Fig. 1 のように考えられている。黄化葉中には緑色の Chl 類はなく、前駆体である黄色のプロトクロロフィリド (PChlid) のみ存在する。環がポルフィリン型の PChlid は、光照射によって C17-C18 間の二重結合が酵素的に還元され、環がクロリン環のクロロフィリド *a* (Chlid *a*) に転化する。

次に Chlid *a* のプロピオン酸基にゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) が結合して、長い側鎖をもつ Chl *a*_{GG} ができ、のち側鎖の二重結合が段階的に還元を受けた中間体である Chl *a*_{DHGG}, Chl *a*_{THGG} を経て、成熟型の Chl *a*_P (P = phytyl) となる。高等植物と藻類に含まれるもう一種の主要色素 Chl *b* は、Chlid *a* または Chl *a* からの転化物と考えられ、Chl *a* 群と同様、生合成の初期には 4 種類 (GG, DHGG, THGG, P 型) が共存する^{8), 9)}。

3. 実験方法

3.1 試料

試料植物としてはキュウリ (*Cucumis sativus*) を用いた。水に 4 時間つけた種子をバーミキュライト上に植え、恒温培養器中、暗所下 25°C に 4 日間放置して黄化子葉を得た。こののち芽生えを 3000 ルックスの白色蛍光灯下に置き、一定時間後に収穫して試料とした。

3.2 色素の抽出

色素の抽出は既報³⁾に従って行なった。黄化子葉 6 枚 (約 120 mg) を脱水用リン酸水素二ナトリウム 60 g とともによく破碎し、-20°C のアセトン 30 ml を加えて超音波処理することにより色素を抽出した。抽出液を乾固したのちアセトン 30 μl に再溶解し、その 2~6 μl を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に供した。

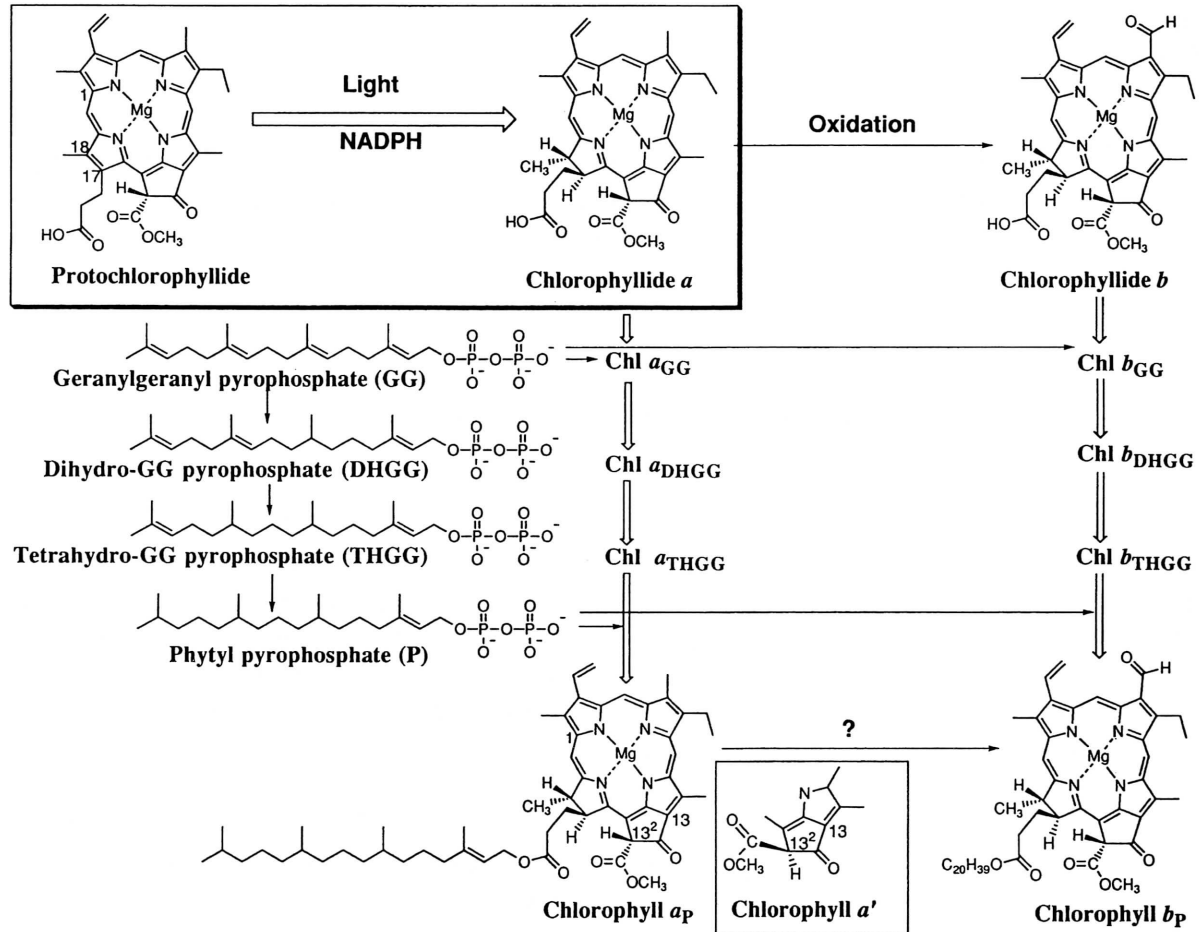


Fig. 1 Current view on the biosynthesis pathways of chlorophylls

3.3 HPLC 条件

HPLC は逆相で行なった。Waters 製の加圧式カートリッジカラム [加圧モジュール: RCM-8×10, カラム: Nova Pak C18 (粒径 4 μm, 5 mm φ×100 mm)], アセトン: アセトニトリル: 2-プロパノール: 水 = 45: 25: 15: 15 の溶離液を用い, 流速 0.9 ml/min, カラム温度 10 °C でアイソクラティック溶出させた。緑化初期の色素量は成葉中に比べるとときわめて少なく, 汎用の吸光度検出がむずかしいため, 成分色素の検出には高感度な蛍光検出 (励起 425 nm, 検出 670 nm) を用いた。

3.4 成分色素の同定

緑化途上で生じる Chl *a* の中間体 (側鎖が GG, DHGG, THGG 型のもの) は, クロマトグラム上の保持係数 *k* を指標にする方法, および塩井らが報告している結果¹⁰⁾ を参考にして同定した (後述)。また Chl *a*' は, 既報¹¹⁾ により調製した高純度の標準品を用いて同定した。

4. 結果と考察

4.1 逆相 HPLC による Chl 類の分離

一般に逆相 HPLC では, 順相 HPLC^{3)~5), 11)} に比べ, C13² 位立体異性体間 (*a* 型と *a'* 型間, *b* 型と *b'* 型間) の分離が不良である。本研究ではアセトン: アセトニトリル: 2-プロパノール: 水の混合比を一連に変えた溶離液を試みた結果, 上述の組成 (45: 25: 15: 15) がほぼ最善の分離をもたらしたため, 以後はこの溶離液組成を用いた。

4.2 クロマトグラムで見た色素構成の変化

光照射前 (*t*=0) の黄化葉, および光照射 15 分, 45 分, 4.5 時間の部分緑化葉につき, 抽出液の典型的な HPLC チャートを Fig. 2 に示す。 *t*=0 で Chl 類は全く検出されない (ただし, PChlid 類の吸収・発光特性に合わせ, たとえば励起 440 nm, 検出 625 nm とすれば PChlid 類が明瞭に検出される)。Chl *a* の前駆体 3 種は, 光照射 15 分程

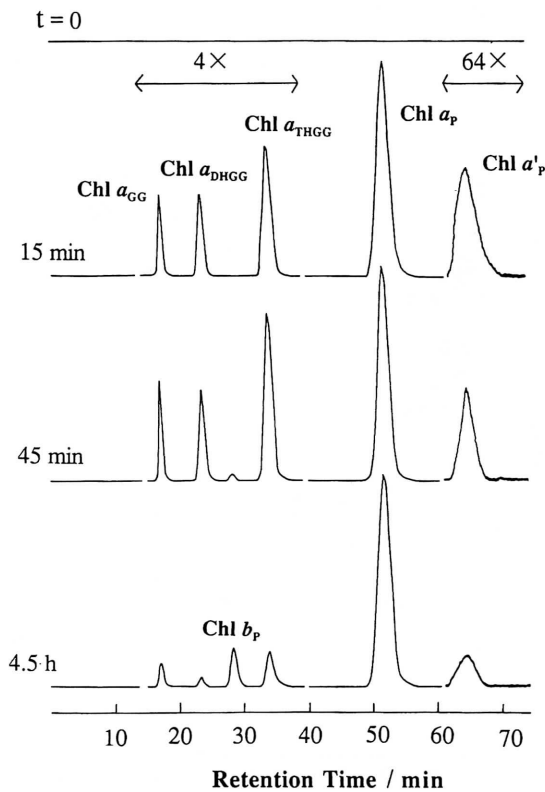


Fig. 2 Typical HPLC traces showing the evolution of pigment composition for extracts of etiolated cucumber cotyledon in the course of greening

度ですでにかなりの量が生成し、そののち減少していくようすが見てとれる。Fig. 2には示していないが、光照射24時間になると、もはや前駆体は消え、Chl a_P (および Chl b_P) のみが主成分となる。いっぽう Chl a'_P の相対量は、緑化の初期で著しく大きく、以後単調に減少する傾向にある(後述)。

Chl a と Chl b について、それぞれ前駆体を含めた4種では、保持係数の対数 ($\log k'$) が側鎖の二重結合数と直線関係にあることが知られる¹²⁾。本実験でもこれは成り立っており (Fig. 3), 色素同定の正しさを裏づける。

4.3 Chl a 合成中間体組成の経時変化

光照射時間 t とともに Chl a の中間体 (GG, DHGG, THGG 型) と最終型 (Chl a_P) の分布が変化していく状況を Fig. 4 にまとめた。原理上、Chl a_P の相対量は $t \rightarrow 0$ で0となるはずである。今回の実験条件ではこれを確認できていないが、初期にかなり少なく (全体の55~75%), 2時間程度でほぼ95%を占めるようになる。光強度を落とすか、別の植物種を試料にした実験で、光照射

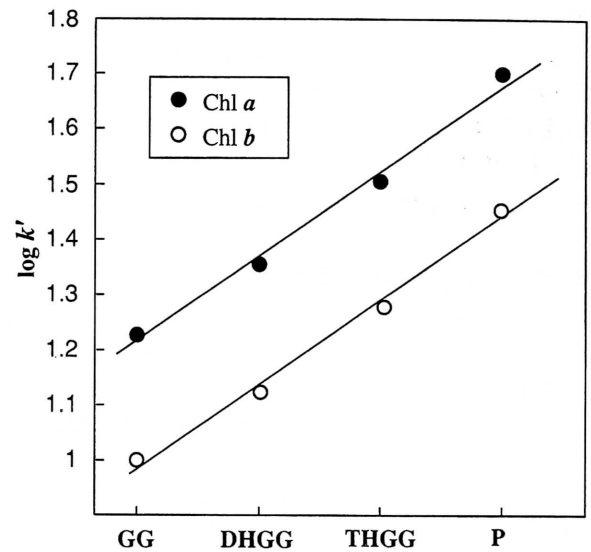


Fig. 3 Plots of $\log k'$ (k' : capacity factor) against the number of double bonds (4, 3, 2 and 1 for GG-, DHGG-, THGG- and P-form, respectively) in the "tail" of Chl a and b derivatives

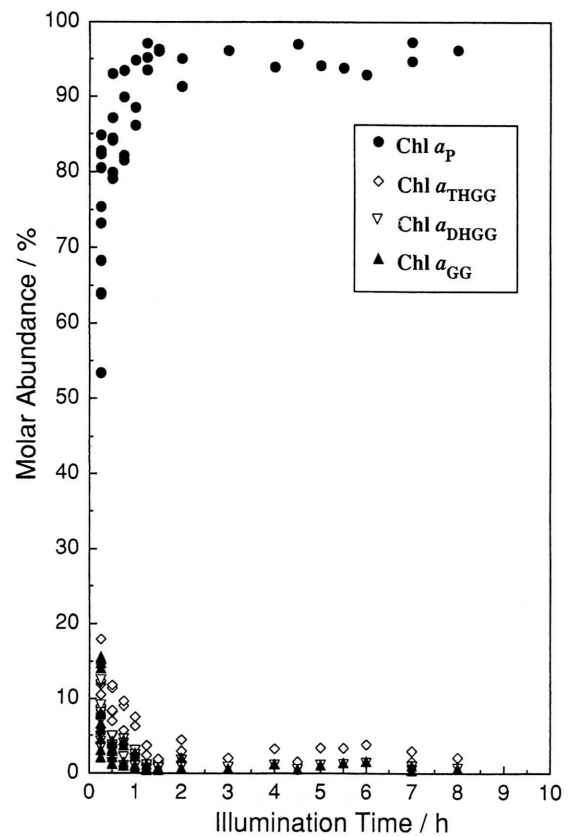


Fig. 4 Evolution of relative molar abundances of intermediate and final species of Chl a against illumination time

研究速報

初期の挙動をもっと明確に追跡できるかもしれない。

なお、緑化途上の植物体内に GG, DHGG, THGG 型 Chl *a* の C13²位立体異性体が共存するか否かは、Chl *a*' の生合成メカニズムに関連して興味深い問題だが、これら中間体3種の絶対量が少ないために今回の測定では確認できなかった。これは今後の検討課題としたい。

4.4 Chl *a*' 相対量の経時変化

われわれが注目している色素 Chl *a*' について、*a* 型色素全体および Chl *a*_p に対する割合を、光照射時間の関数として Fig. 5 に示す。光照射 15 分では、Chl *a* 全体に対する割合は約 0.7~0.9% で、これは成葉中の約 2 倍に当たる。照射時間とともにこの割合は減少し、4.5 時間前後から通常の成葉と同じ約 0.47% のレベルに落ちつく。なお、この 0.47% は、モル比 [Chl *a*'] / [P700] = 2 に対応する³⁾。反応中心タンパクに結合して機能する成熟型の Chl *a*_p の量を分母にすると、緑化初期では約 0.8~1.3% になるため、Chl *a*' 相対量の経時変化が強調される。

緑化前には Chl *a*'_p は存在しないので、ごく初期には Chl *a*'_p の量が 0 から増えていくはずであるが、光照射初期における計測値のばらつきが大きく、その傾向は確認できなかった。光照射条件および暗所下の生育時間をこまかく制御することにより、Chl *a*'_p 量の正しい経時変化を明らかにできると予想している。

これまでに報告された反応中心形成プロセスに関する研究から、実験条件によって時間スケールは異なるが、Chl *a* あたりの PS I 活性は、光照射開始後かなり短時間で最大値(成葉の2倍程度)をとり、そののち一定レベルへ漸減していくことが知られている^{13)~15)}。これは、光照射によってまず反応中心コアの色素-タンパク質複合体が合成され(Chl あたりの活性は大)、そののち光捕集アンテナ複合体(LHC)ができて光合成器官が完成すると考えれば理解できる。今回の結果(Fig. 5)も、Chl *a*'_p が PS I 反応中心の構成部品だと仮定すれば、定性的にはこの解釈に合う。

今後、色素構成変化の追跡に加えて、P700 の相対量とタンパク質組成の経時変化も系統的に調べることにより、Chl *a*' の機能、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の描像が得られるものと期待している。

(1994年12月21日受理)

参考文献

- 1) R. Cogdell and R. Malkin, *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*, Elsevier, 1992, p. 1
- 2) P. Setif, *ibid.*, p. 471

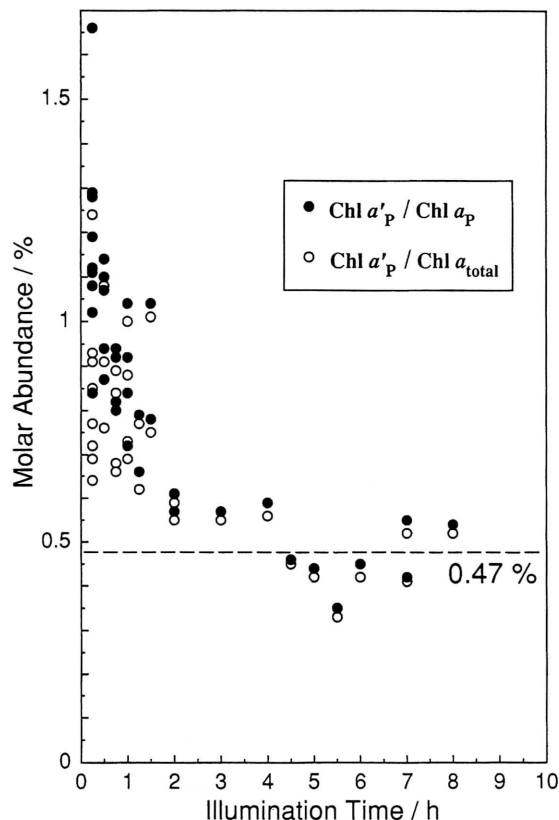


Fig. 5 Evolution of Chl *a*'_p molar abundance against Chl *a*_p (●) and total Chl *a* forms (○) during illumination

- 3) H. Maeda, T. Watanabe, M. Kobayashi and I. Ikegami, *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**, 74 (1992)
- 4) H. Maeda, T. Watanabe, S. Kobayashi and T. Hiyama, *Photosynth. Res.*, **35**, 179 (1993)
- 5) H. Maeda, T. Watanabe and K. Sonoike, *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **20**, 139 (1993)
- 6) T. Watanabe, M. Kobayashi, A. Hongu and T. Oba, *Chem. Lett.*, 1847 (1992)
- 7) J. W. Bradbeer, *The Biochemistry of Plants*, Vol. 8, Academic Press, 1981, p. 423
- 8) S. I. Beale and J. D. Weinstein, *Biosynthesis of Tetrapyrroles*, Elsevier, 1991, p. 155
- 9) M. O. Senge, *Photochem. Photobiol.*, **57**, 189 (1993)
- 10) Y. Shioi and T. Sasa, *Biochim. Biophys. Acta*, **756**, 127 (1983)
- 11) T. Watanabe, A. Hongu, K. Honda, M. Nakazato, M. Konno and S. Saitoh, *Anal. Chem.*, **56**, 251 (1984)
- 12) Y. Shioi and T. Sasa, *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1315 (1982)
- 13) N. K. Boardman, *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 5, Springer, 1977, p. 583
- 14) D. J. Kyle and S. Zalick, *Plant Physiol.*, **69**, 1392 (1982)
- 15) K. O. Burkey, *Photosynth. Res.*, **10**, 37 (1986)