

LB 膜におけるクロロフィル分子の会合状態制御

Control of Intermolecular Association in Chlorophyll Langmuir-Blodgett Films

吉 田 章 一 郎 * · 権 平 正 幸 * · 渡 辺 正 *

Shoichiro YOSHIDA, Masayuki GONDAIRA, Tadashi WATANABE

1. 緒 言

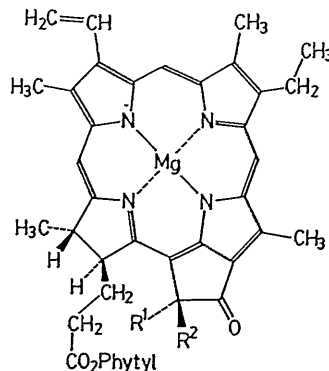
高等植物の光化学系 I 反応中心 P700 は一般にクロロフィル *a* (Chl *a*) の二量体だと推定されているが、最終的な結論は得られていない。当研究室では最近、P700 を含む光化学系 I コア部分の約 10 個の色素集合体中に、Chl *a* の立体異特性体である Chl *a'* を 2 分子検出した¹⁾。若干の関連知見も勘案するとこの Chl *a'* が二量化し P700 として機能している可能性が大きい。生体外で作製した Chl *a'* 二量体と P700 との特性比較は P700 の素性解明へ向けた重要なアプローチのひとつとなる。Chl *a'* は図 1 に示すように C13² 位の COOCH₃ が長鎖フィチル基と同じ方向に突き出ているので、等価な面どうしで安定な会合構造をつくと想像される。従来さまざまな方法でクロロフィル類の会合体制製が試みられてきたが、そのひとつに分子を制御された状態で配列できる Langmuir-Blodgett (LB) 法²⁾があり、クロロフィル LB 膜に対する水³⁾やジオキサン⁴⁾の影響が調べられた。本研究では LB 法を Chl *a'* の会合体制形成に適用し、ジオキサンの会合促進作用を主として検討した。

2. 実 験 方 法

2.1 試料

Chl *a* はハウレンソウの生葉から抽出し、シリカ順相 HPLC により分取・精製して用いた。HPLC の条件は次のとおりである。カラム：Senshupak Silica-1151-N (20mmφ×300mm)、溶離液：ヘキサン/2-プロパノール/メタノール (100/0.8/0.4)、流速：5mL min⁻¹、カラム温度：4℃、検出波長：425nm。Chl *a'* はトリエチルアミン処理により Chl *a* を部分的にエピマー化し、HPLC で分取・精製したものをを用いた。ベンゼン、アラキジン酸、ジオキサン、CdCl₂、KHCO₃ は特級試薬を使用した。

* 東京大学生産技術研究所 第 4 部



	R ¹	R ²
Chlorophyll a	COOCH ₃	H
a'	H	COOCH ₃

図 1 クロロフィル *a* と *a'* の分子構造 (R¹, R² のついた炭素が C13²)

2.2 LB 膜の作製とジオキサン蒸気の作用

清浄にした水面 (1 mM リン酸緩衝液, pH 7.8) に Chl *a* または Chl *a'* のベンゼン溶液を展開したのち、10 cm² min⁻¹ の速度で圧縮して単分子膜を作製した。アラキジン酸カドミウム (C₂₀Cd) との混合膜の場合は、Chl *a* または Chl *a'* とアラキジン酸との混合ベンゼン溶液を 0.25mM CdCl₂ 水溶液 (KHCO₃ により pH8 に調整) 上に展開した。表面圧 20mN m⁻¹ に制御された単分子膜を垂直浸漬法により石英基板に採取した。単分子膜を 1 層のみ採取する場合にはクロム混酸処理により表面を親水化した石英基板を、Y 型膜として 2 層採取する場合にはあらかじめ C₂₀Cd 単分子膜を 5 層附着させ、表面を疎水化した石英基板を用いた。水相には 0.25mM CdCl₂/1.5mM KHCO₃ 混合水溶液 (pH6.7) を用いた。LB 膜作製には協和界面科学製の LB 膜作製装置 Model AP-2 を使用し、操作はすべて弱い緑光下で行った。

LB 膜のジオキサン処理は、底部にジオキサンを入れ

研 究 速 報 ــ
 たデシケーター中 (25°C) で行なった. 膜採取後ただちに吸収スペクトルを測定してからデシケーター中に入れ, 適当な時間間隔で吸収スペクトルの変化を観測した.

3. 結 果 と 考 察

3.1 膜の累積特性

クロロフィルは累積のむずかしい分子のひとつであり, 多数層累積した例は少ない. 本実験で1層採取する場合には親水性基板を水面下に置いた状態で Chl を展開した後基板を引き上げることによって累積比1で付着させた. しかしこの方法でさらに乗せることは困難であった. C₂₀Cd を5層付着することによりかなり平滑な疎水面ができるので, 6層までは再現性よく累積することができた.

表面圧20mN m⁻¹での分子表面占有面積は110Å²/分子であり, そのまま移し取られていれば基板表面濃度は0.9×10¹⁴分子/cm²となる.

検討したうちで混合膜が累積できた希釈剤は C₂₀Cd のみであった. 混合による膜の収縮や膨張がなければ平均分子占有面積 (A₁₂) は, A₁₂=x₁A₁+x₂A₂ (x₁, x₂:成分1, 2のモル分率, A₁, A₂:同じ表面圧での純粋な成分1, 2の分子占有面積) で表せる⁵⁾. Chl・C₂₀Cd 混合膜では, Chl のモル分率0.5のとき65Å²/分子, 0.25のとき46Å²/分子となって計算値とほぼ一致し, 見かけ上は均一な膜となっていることを示した.

3.2 クロロフィル LB 膜

Chl a および Chl a' の単分子膜, 2分子膜の吸収スペクトルを図2, 図3に示す. 採取直後の膜では Soret 帯および赤色帯の吸収ピークがそれぞれ438nm 付近と678nm 付近にあるが, ジオキサン蒸気中に放置すると数時間で10nm ほど長波長側にシフトし, 同時に赤色帯の吸収ピークが著しく生長した. このスペクトル変化に関して Chl a と Chl a' との差は認められなかった. Leblanc ら⁴⁾の Chl a 2分子膜に関する報告によれば, こうしたスペクトル変化はジオキサン分子の両端にある酸素原子がクロロフィルの中心金属 Mg に配位し, ジオキサン分子により架橋された二量体を含むオリゴマーの形成に起因する. 本実験では単分子膜においても同様な変化が観測されたことから, 膜面方向でも同様の会合体が形成されているものと考えられる.

3.3 クロロフィル・アラキジン酸カドミウム混合 LB 膜

クロロフィル単独の単分子膜で会合体形成を示唆するスペクトル変化が観測されたことから, 基板に対して水平方向での会合が起こっていることがわかった. そこで C₂₀Cd でクロロフィル分子を希釈することにより水平方向での結合を抑制した単分子膜を2層累積すれば, 層間での会合のみが生じ, とくに立体障害の少ない Chl a' では二量体が形成されると期待した.

図4, 図5に C₂₀Cd・Chl a および C₂₀Cd・Chl a' 混合 LB 膜の吸収スペクトル変化を示す. 赤色帯ピークの

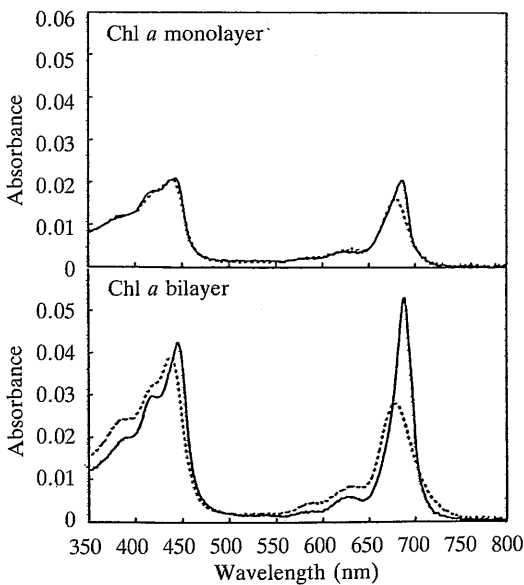


図2 Chl a 単分子膜および2分子膜の吸収スペクトル; 点線:未処理, 実線:ジオキサン蒸気処理後 単分子膜:1h, 2分子膜:2h

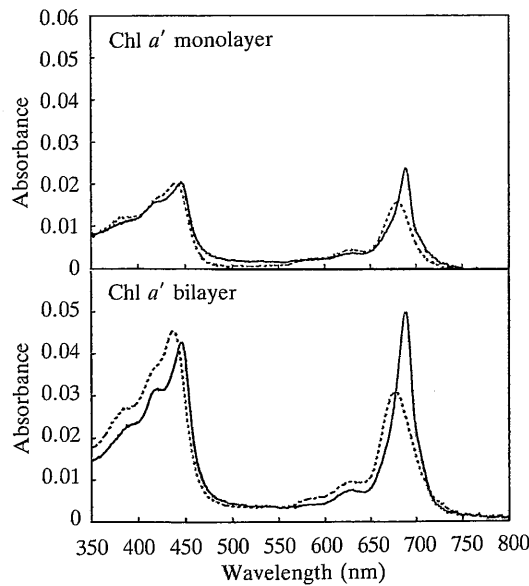


図3 Chl a' 単分子膜および2分子膜の吸収スペクトル; 点線:未処理, 実線:ジオキサン蒸気6h処理後

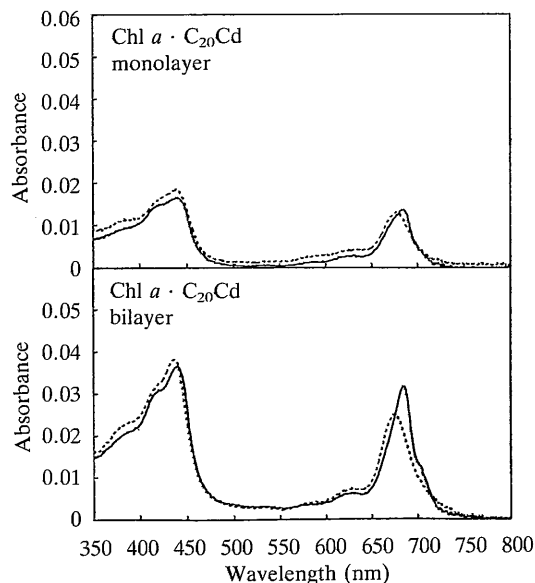


図4 Chl *a* · C₂₀Cd(1:1)混合膜の吸収スペクトル；
点線：未処理，実線：ジオキサン蒸気2h処理後

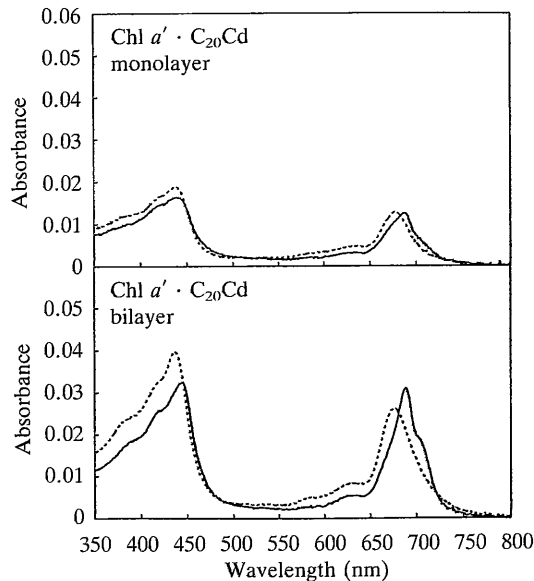


図5 Chl *a'* · C₂₀Cd(1:1)混合膜の吸収スペクトル；
点線：未処理，実線：ジオキサン蒸気4h処理後

生長はChl単独の膜に比べて少ないものの，単分子膜，2分子膜ともピークの位置は同じであった．また2分子膜では705nm付近に肩となった吸収が見られるが，Chl *a*とChl *a'*とでほとんど差はない．C₂₀Cd/Chl *a*モル比を3:1とさらに希釈しても傾向は変わらなかった．単分子膜においても会合を示唆する変化が見られたことは希釈剤の効果が十分でないことを示すもので，見かけ上混合されていても微小なクロロフィル集合体が分散していると推定される．

4. ま と め

以上のように，LB膜中のChl分子にジオキサンを作用させることによってMg···O···Mgの形の配位結合が形成され，分子間の相互配向を制御できることが判明した．このプロセスにおいてChl *a*とChl *a'*の間に差が認められないのは，比較的大きなジオキサン分子がブリッジとなった会合であるために，Chl分子の局所的な立体構造のちがいが反映されなかったためと思われる．

これに対し，溶媒中でのクロロフィルの自己会合においては，Chl *a*とChl *a'*との間にきわめて顕著な差が存在する⁶⁾．

(1992年7月21日受理)

参 考 文 献

- 1) H. Maeda, T. Watanabe, M. Kobayashi, and I. Ikegami, *Biochim. Biophys. Acta*, **1099** (1), 74-80 (1992).
- 2) 小宮山真, 渡辺 正, 大川祐輔, "LB膜", 冬樹社, 1990.
- 3) C. Chapados, D. Germain, and R. M. Leblanc, *Biophys. Chem.*, **12**, 189-198 (1980); C. Chapados, and R. M. Leblanc, *ibid.*, **17**, 211-244; C. Chapados, *ibid.*, **21**, 227-242 (1985); S. Krawczyk, R. M. Leblanc, and L. Marcotte, *J. Chim. Phys.*, **85**, 1073-1078 (1988).
- 4) R. M. Leblanc and C. Chapados, *Biophys. Chem.*, **6**, 77-85 (1977).
- 5) P. Tancrede, G. Munger, and R. M. Leblanc, *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 45 (1982).
- 6) T. Watanabe, M. Kobayashi, A. Hongu, and T. Oba, *Chem. Lett.*, No. 9, 1847-1850 (1992).