

光合成色素のHPLC定量にもとづくラン藻の光適応プロセス追跡

Chromatic Regulation in Cyanobacterium as Studied by HPLC Quantitation of Photosynthetic Pigments

前 田 広 幸*・渡 辺 正**
Hiroyuki MAEDA and Tadashi WATANABE

1. は じ め に

生物が環境の状態変動を入力として検知し、出力として運動・形態変化・機能調整などを行う巧妙なメカニズムの解明は、生物化学における主要な研究課題のひとつである^{1,2)}。その際、生体の出力を計量化し正確に定量(アッセイ)できるかどうかメカニズム解明の成否を左右する³⁾。近年動物の神経系⁴⁾やイオンチャンネル⁵⁾系の機構解明がめざましく進展した理由のひとつに、系の出力を電気信号の形で計測する手法の導入が挙げられる。

環境要因の変動に対する植物の応答・適応は、一般に動物ほど顕著ではなく、そのためメカニズム解明も進んでいないが、典型例のひとつに褐藻・緑藻・ラン藻などの光合成器官の光適応がある^{6,7)}。ラン藻以上の高等植物は、太陽の光子エネルギーを電子の流れに変換する部位(反応中心)を2種類もち、これらが直列につながって、おのおのを主に駆動する光のスペクトル域に若干のずれがある。このずれはとくにラン藻(シアノバクテリア)で著しい。環境の光質が変化すると、2種の反応中心それぞれにおける光電荷分離の速度に不釣り合いが生じるため、ラン藻などは反応中心(および付随するアンテナ色素)の個数比を変えて、光合成プロセス全体の電子の流れがバランスよく進むように適応する。こうした光適応の過程を調べる上では、反応中心を含む2つの光化学系(PS=photosystem) I と II (PS II) の個数比を迅速かつ正確に定量するのが不可欠となる。従来この定量は、植物組織を分画してチラコイド膜を調製したのち酸化還元差スペクトルなどを測定することにより行われ、少なくとも4~5時間を要していた。

ところで、反応中心(RC=reaction center) I と II にはそれぞれ特殊なクロロフィル(Chl)誘導体が存在する。すなわち、RC-IIには2分子のフェオフィチン(Pheo) a (Chl a から Mg の外れた分子)が初期電子受容

体として機能している。また、クロロホルム抽出によって、RC-Iあたり1分子のChl a' (Chl a の立体異性体)が存在することを我々は確認した⁸⁻¹⁰⁾。したがって、これらの微量色素を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量すればPS-IとPS-IIの個数を簡便に見積ることができると期待される。そこで今回、この手法の妥当性を検証するため、ラン藻の光適応プロセスを題材として取り上げた。

2. 実 験 方 法

ラン藻 *Anacystis nidulans* R₂ は BG-11 培地¹¹⁾ 中、28°C で培養した。赤色の系 I 選択励起光(PS-I 光)は 60W 白熱灯を富士写真フィルム製カットフィルター(SC-66)に通して、またオレンジ色の系 II 選択励起光(PS-II 光)は 20W の蛍光灯をバンドパスフィルター(BPB-60)とカットフィルター(SC-60)に通して得た。それぞれの光強度スペクトルを Fig. 1 (1) および (2) に示す。藻体は、PS-I 光の場合は 300ルクス、PS-II 光の場合は 200ルクスとなる位置でそれぞれ培養した。吸収極大の吸光度 0.1 の藻体懸濁液約 5 ml を 12,000×g で遠心して湿潤藻体のペレット(約 10mg)とし、既報¹⁰⁾に従い色素をクロロホルム抽出した。抽出液を濃縮乾固したのちクロロホルムに溶かして、その 2 μl を順相 HPLC カラムに注入した。以上の操作はすべて暗所で行い、所要時間は 5 分以内であった。微量成分 Pheo a と Chl a' がいずれも Chl a からの転化物ではないことは、純度 99.97% の Chl a を用いた標準添加法¹⁰⁾で確認した。Pheo a と Chl a' は検出波長 425nm におけるモル吸光係数が異なるので、おのおの純度 99.9% の色素を用いて検出感度を校正した。

3. 結 果 と 考 察

光質の異なる条件下で培養した *Anacystis nidulans* はそれぞれ特徴的な吸収スペクトルを示す (Fig. 1 の 1' と 2')。680nm の吸収極大は主として系 I (PS-I) のアンテナ色素、625nm の吸収極大は主に系 II (PS-II) のアン

*東京大学生産技術研究所 第4部

**東京大学生産技術研究所 付属計測技術開発センター

研究速報

テナ色素(フィコビルン)の吸収を反映し、吸光度比 A_{680}/A_{625} の値は、PS-II光下のほうがPS-I光下より小さい。これは、PS-II光下ではPS-IIにおける電子移動量の増大とつり合うようにPS-Iの相対量が増え、逆にPS-I光下ではPS-Iの活性増大を補償すべくPS-IIの相対量が増すためである¹²⁾。

PS-I光またはPS-II光下で生育し、吸収スペクトルが定常となった藻体をクロロホルム抽出して得た試料のHPLC分析チャートをFig. 2に示す。両試料とも β -カロテン(β -Car), Pheo *a*, Chl *a'*およびChl *a*を含むが、その構成に明瞭な差があることがわかる。特にPheo *a*とChl *a'*の量比に顕著な違いが生じているのは、光適応により光化学系の量比が調節されたからにはほかならない。これら2つの微量色素の量比を5回の測定の平均値±標準偏差として表すと次のようになる。

$$\text{Chl } a/\text{Pheo } a = 0.58 \pm 0.08 \quad (\text{PS-I 光下})$$

$$\text{Chl } a/\text{Pheo } a = 1.43 \pm 0.07 \quad (\text{PS-II 光下})$$

色素と反応中心との個数比、すなわちChl *a'*/RC-I = 1およびPheo *a*/RC-II = 2¹³⁾を用いてこれらを反応中

心の量比に換算すると以下の値が得られる。

$$\text{RC-I}/\text{RC-II} = 1.16 \pm 0.16 \quad (\text{PS-I 光下})$$

$$\text{RC-I}/\text{RC-II} = 2.85 \pm 0.15 \quad (\text{PS-II 光下})$$

この結果は、同種のラン藻についてMyersら¹⁴⁾がRC-IをP700で、RC-IIを閃光照射時の酸素発生量で定量した値

$$\text{RC-II}/\text{RC-II} = 1 \quad (\text{PS-I 光下})$$

$$\text{RC-I}/\text{RC-II} = 2.5 \quad (\text{PS-II 光下})$$

とよく一致するものであり、反応中心の量をChl *a'*とPheo *a*の量で見積る方法の妥当性を裏づける。

次に、本法で光適応の経時特性を追跡した。PS-II光下で吸光度比 A_{680}/A_{625} がほぼ1となった時点でPS-I光に切りかえ、培養を続けると、細胞の増殖を反映する吸光度増大は認められるが、680nmピークの生長は625nmピークの生長に比べて著しく抑制されている(Fig. 3)。この経時変化は細胞数の倍加時間が約30時間であることを考慮すると、細胞分裂時に調整が行われたことを示唆する¹²⁾。36時間後にはほぼ完全にPS-I光に順化して、吸光度比 A_{680}/A_{625} 比は0.6程度となる。この吸光度比の経時変化と、Chl *a'*とPheo *a*の量比から計算されたRC-I/RC-II比の経時変化との間には、Fig. 4のような良好な相関が認められる。逆に、PS-I光に順化した藻体をPS-II光のもとに置いた場合にも、吸光度比 A_{680}/A_{625} とHPLC法によるRC I/RC II比とがほぼ同じ時定数で変化することが確認された(Fig. 5)。以上の結果は、色素のHPLC計測が反応中心の定量に十分使えるものであることを示している。

本法の最大の利点は、簡便法・迅速性にある。従来の反応中心定量法ではチラコイド膜調製が不可欠で、一般に4時間以上の時間と8段階以上の操作を要するのに対

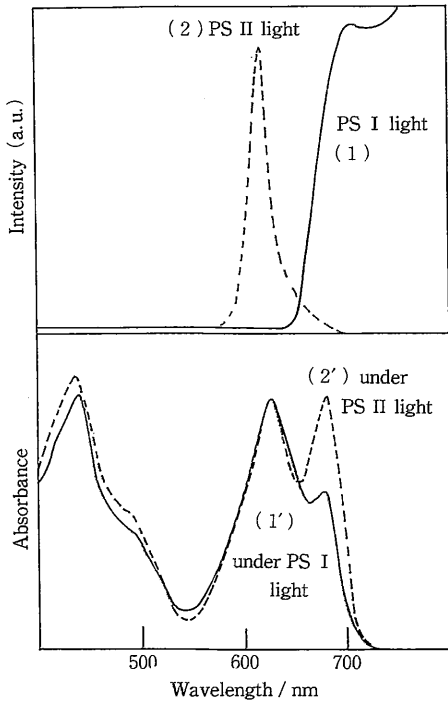


Fig. 1 Spectral distribution of the light sources employed: PS-I light (1) and PS-II light (2). Stationary absorption spectra of *Anacystis* cell suspensions under PS-I light (1') and under PS-II light (2').

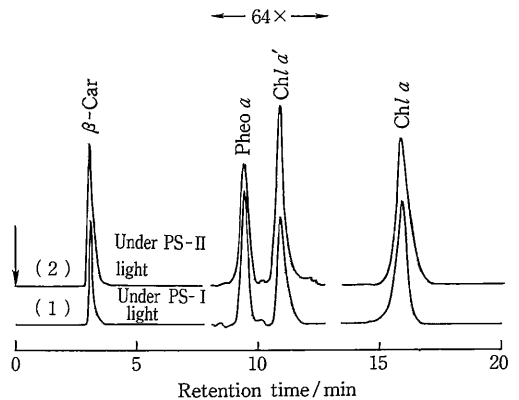


Fig. 2 HPLC traces for chloroform extracts of *Anacystis* grown under PS-I light (1) and PS-II light (2). Detection wavelength, 425 nm.

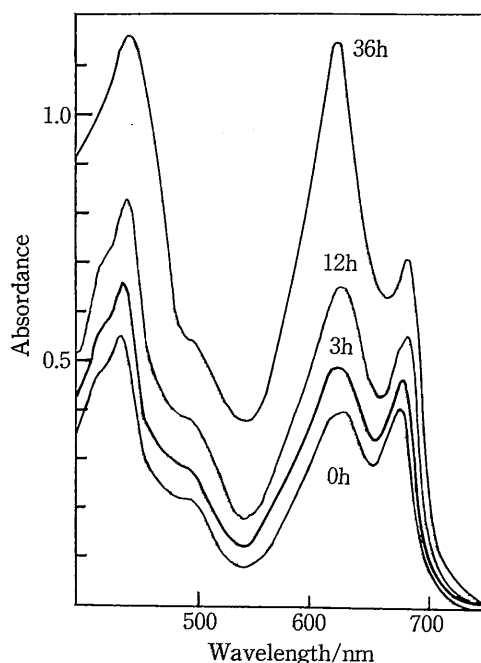


Fig. 3 Temporal evolution of the absorption spectrum of *Anacystis* cell suspension after switching PS-II light into PS-I light.

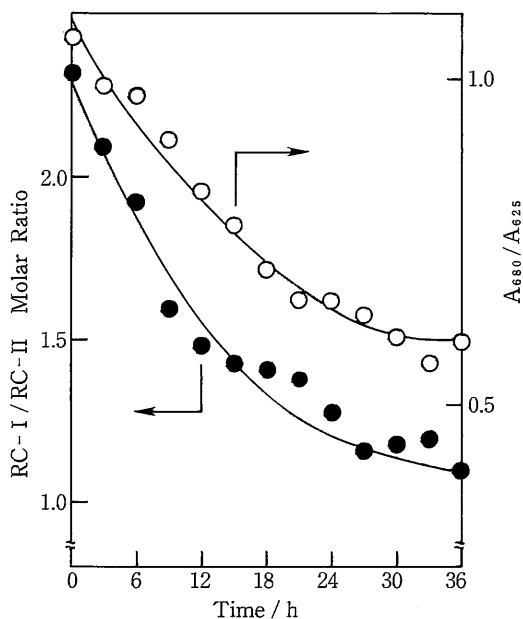


Fig. 4 Temporal evolutions of the absorbance ratio A_{680}/A_{625} (○) and of the reaction center molar ratio RC-I/RC-II (●), determined by HPLC quantitation of Chl *a'* and Pheo *a*, after switching PS-II light into PS-I light.

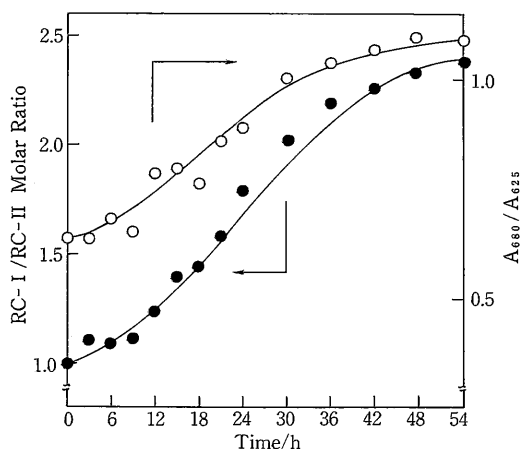


Fig. 5 Temporal evolutions of the absorbance ratio A_{680}/A_{625} (○) and of the reaction center molar ratio RC-I/RC-II (●) after switching PS-II light into PS-I light.

し、HPLC法では基本操作は2段階、所要時間は5分程度ですむ。吸光度0.1前後の藻体懸濁液の所要量でも、従来法では少なくとも700ml以上が必要となるが、HPLC法では5ml以下でよい。たとえば、Fig. 5の14点のデータを得るのに用いた藻体懸濁液の総量は70ml以下であり、これを従来法で得るには10l以上の試料を要する。試料に光を均一に照射しなければならないことなどを考えれば、実験室レベルでは事実上不可能であろう。今回HPLC法を用いることで3時間間隔の経時変化が追跡できるようになった。こうした測定は、光適応メカニズム解明に新たな知見を与えるかもしれない。たとえばFig. 4とFig. 5を比べると、PS-I光への適応に比べてPS-II光への適応が遅く、しかも後者には一種の誘導期があるように見える。PS-II光下ではPS-Iの合成が促進され、PS-I光下ではPS-Iの合成が抑制されると考えれば、この結果は、合成抑制プロセスよりも合成促進プロセスの方が複雑で、多段階の素過程が関与することを示唆している。

本HPLC法は、光合成の初期過程メカニズム解明に関わる種々の研究に利用できるであろう。たとえば緑化過程におけるRC形成プロセス、老化過程におけるRC構成変化プロセスの解明など、興味ある応用がいくつか考えられる。

4. 謝 辞

ラン藻*Anacystis nidulans* R₂を提供いただき培養についてもご教示いただいた東京農工大学・松永 是教授、竹山春子氏に感謝いたします。(1991年5月31日受理)

研 究 速 報

参 考 文 献

- 1) Lewin, B. (Ed.), *Genes* 3rd Ed., Wiley, New York (1987).
- 2) Schleif, R., *Genetics and Molecular Biology*, Addison Wesley (1986).
- 3) Connor, J.A., *J. Physiol.*, **213**, 31 (1971).
- 4) Hodgkin, A.L., *The Conduction of the Nervous Impulse*, Liverpool Univ. Press, Liverpool (1964).
- 5) Katz, B., *Nerve, Muscle and Synapse*, McGraw-Hill, New York (1966).
- 6) Jones, L.W. and Myers, J., *J. Phycol.*, **1**, 7 (1965).
- 7) Melis, A. and Anderson, J.M., *Biochim. Biophys. Acta*, **742**, 473 (1983).
- 8) Strain, H.H. and Manning, W.M., *J. Biol. Chem.*, **146**, 275 (1942).
- 9) Watanabe, T., Kobayashi, M., Hongu, A., Nakazato, M., Hiyama, T. and Murata, N., *FEBS Lett.*, **191**, 252 (1985).
- 10) Kobayashi, M., Watanabe, T., Nakazato, M., Ikegami, I., Hiyama, T., Matsunaga, T. and Murata, N., *Biochim. Biophys. Acta*, **936**, 81 (1988).
- 11) Rosmarie, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R., *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 1 (1979).
- 12) Fujita, Y. and Murakami, A., *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1547 (1987).
- 13) Omata, T., Murata, N. and Satoh, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **765**, 403 (1984).
- 14) Myers, J., Graham, J. and Wang, R.T., *Plant Physiol.*, **66**, 1144 (1980).