

外来化学物質による葉緑体内色素の分子変性

Molecular Alterations of Chloroplast Pigments by Exogenous Chemicals

小 林 正 美*・真 崎 仁 詩*・渡 辺 正*
Masami KOBAYASHI, Hitoshi MAZAKI and Tadashi WATANABE

1. 結 言

高等植物の光合成は葉緑体中で行われ、その初期光過程はクロロフィル (Chl) 類により駆動される。光過程の最小機能単位 (光合成単位) には約450分子のChl *a*、約150分子のChl *b*、2分子のPheo *a*および1分子のChl *a'* (Fig. 1) が含まれ、このうちPheo *a* 2分子は系II反応中心P680の初期電子受容体である¹⁾。また、我々が最近明らかにしたように、Chl *a'* 1分子は系Iの反応中心P700のごく近傍に存在する²⁾。これらを含め、すべてのChl類は構造タンパク内に組み込まれて、相互配向が厳密に規制された状態で機能していると考えられている。

生体外において、Chl類は共存化学物質によりエビ化 (炭素10における立体異性化)³⁾、アロマー化 (環Vの酸化分解)、フェオフィチン化 (Mgの脱離) などさまざまな分子変性を受けやすい。こうした変性が葉緑体内でも起これば、光合成機能の阻害ないし破壊にいたるであろう。この点に鑑み、本研究では、化学環境と生体機能との相互作用解明に寄与することを目的に、除草剤の一群をなすアミン類の一種としてピロリジンを、また重金属イオンの一種としてHg²⁺を選んで、これらによる葉緑体内クロロフィル類の分子変性を検討した。

2. 実 験 方 法

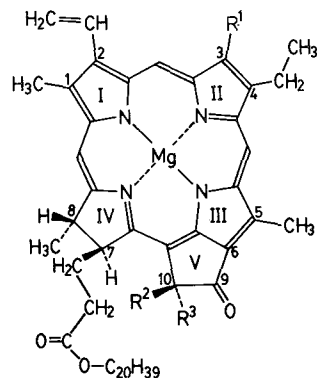
生葉を糖等張液と共に約10秒間ホモジナイズして懸濁液を作り、これを遠心 (2500×*g*, 1分間) して葉緑体を沈澱させ、包膜を有するclass 1葉緑体を単離した。これを、ピロリジンを含む糖等張液またはHg²⁺を含む水溶液に懸濁させたのち色素をクロロホルムで抽出した。抽出液を5 μmシリカ充填カラム (4.6φ×150mm) に注入し、ヘキサン/2-プロパノール/メタノール混合溶媒を移動相とする高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。

3. 結 果 と 考 察

3.1 色素の抽出・分析方法の検討

上記の条件により8種類のChl誘導体を分離したHPLCチャートをFig. 2に示す。従来光合成色素の分析に用いられてきた薄層クロマト (TLC)、ショ糖カラムクロマト、Sephadexカラムクロマト、逆相HPLCなどの分解能は、本法に比べて著しく劣る。また本法において、カラム通過中の分子変性はほぼ完全に無視できることを確認した。

調製直後の葉緑体のクロロホルム抽出液は、Fig. 3(A) に示すHPLCチャートを与える。葉緑体内液に含まれるCl⁻イオンとChl *a*とが抽出操作中に反応して生じる塩素化Chl *a* (Cl-Chl *a*) を唯一のartifactとして、4種類の



	R ¹	R ²	R ³
Chlorophyll <i>a</i>	CH ₃	H	COOCH ₃
Chlorophyll <i>a'</i>	CH ₃	COOCH ₃	H
Chlorophyll <i>b</i>	CHO	H	COOCH ₃
Chlorophyll <i>b'</i>	CHO	COOCH ₃	H

Fig. 1. Structure and Carbon Numbering for Chlorophylls. Replacement of the Mg atom with two H atoms gives the corresponding pheophytin (Pheo).

*東京大学生産技術研究所 第4部

研 究 速 報

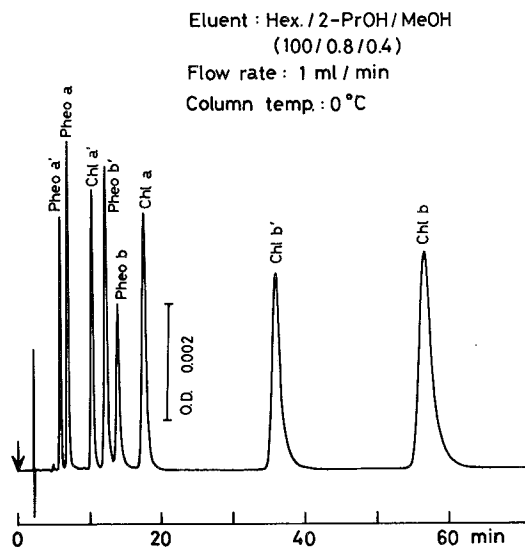


Fig. 2. HPLC Traces for a Mixture of Eight Chl Derivatives.

色素が明瞭に検出される。数十の試料に関する測定値を平均すると、色素分子数比として

$$\text{Chl } a / \text{Chl } a' = 400 \pm 80$$

$$\text{Chl } a / \text{Pheo } a = 120 \pm 20$$

が得られた。閃光法などによる系 I と系 II の反応中心の定量を通じて得られている報告値⁴⁾

$$\text{Chl } a / \text{P700} = 400 \pm 50$$

$$\text{Chl } a / \text{P680} = 230 \pm 40$$

と、 $\text{Chl } a' / \text{P700} = 1^2)$ および $\text{Pheo } a / \text{P680} = 2^1)$ なる化学量論を考慮すると、本法により生体中の色素組成が迅速かつ正確に分析できていることがわかる。

抽出液をひとたび TLC で展開すると、多くの色素変性が起こる (Fig. 3 中段)。また、色素の抽出に常用されている熱メタノールで生葉を抽出してもさまざまな酸化的分解が生じる (Fig. 3 下段)。このように、葉緑体内の色素組成を正しく評価するには、抽出・分析条件を厳しく吟味することが不可欠である。

3.2 ピロリジンによる葉緑体の色素変性

ピロリジンが 11.1 mM 共存すると 20 時間以内に $\text{Chl } a / \text{Chl } a'$ の値が 70 ± 10 程度まで低下した。これは、ピロリジンが塩基触媒³⁾ となってエピ化 ($\text{Chl } a \rightarrow \text{Chl } a'$) を促進したことによる。ただしこのエピ化の速度は試料の調製条件によって大きく左右され、また平衡組成 ($\text{Chl } a / \text{Chl } a' = 3$) まで進行することはなかった。これは、葉緑体調製標品の中に、包膜を失ったチラコイド膜やその断片が少量混在しており、これらに含まれる $\text{Chl } a$ が選択的にエ

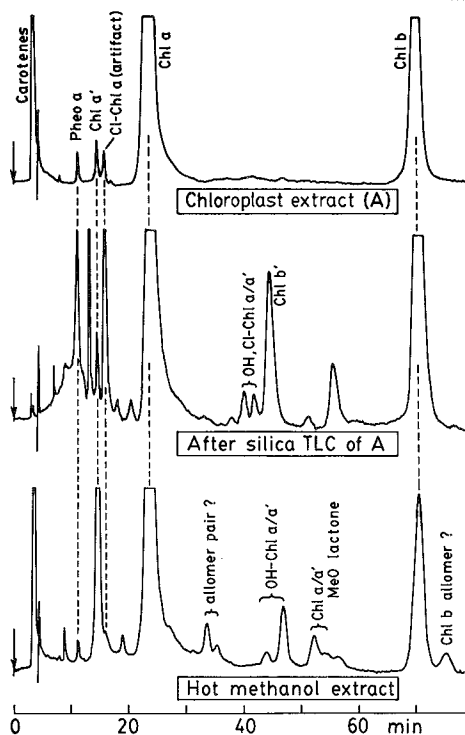


Fig. 3. HPLC Traces for Chloroplast Extracts. Top: Extracted with Chloroform (-20°C); Middle: Pigment Degradation during TLC Development (1h under N_2 and 2h under air); Bottom: Extracted with Hot Methanol (65°C).

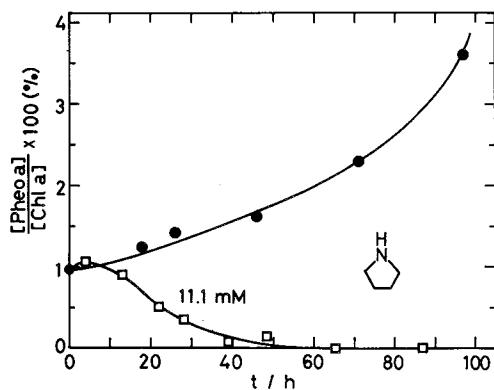


Fig. 4. Temporal Evolution of the $[\text{Pheo } a] / [\text{Chl } a]$ Ratio in Chloroplasts in 1 M Sorbitol Aqueous Solution at 15°C

ピ化を受けていることを示唆する。

これに対し、系 II の初期電子受容体として機能する 2 分子の $\text{Pheo } a$ は、ピロリジンにより顕著な変性を示した (Fig. 4)。ピロリジンが共存しない場合、葉緑体中では時

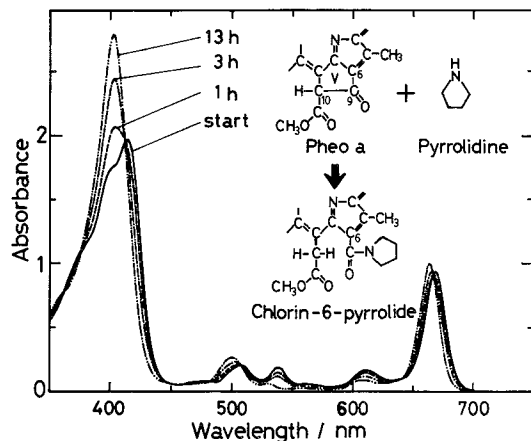
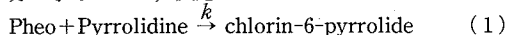


Fig. 5. Time Courses of Visible Spectral Change for a Pheo *a* Chloroform Solution (2 μ M) Containing 8.4 mM Pyrrolidine.

間とともにChl *a*がPheo *a*に転化し、かつPheo *a*のエピ化も起こった。しかし11.1mMのピロリジンを添加した系では、Pheo *a*の相対量が次第に減少し、Pheo *a'*の生成もみられなかった。Pheo *a*量の減少が明確に開始するまでの誘導期は、ピロリジンが葉緑体包膜とチラコイド膜を通過し、系II反応中心近傍のPheo *a*のサイトまで達するのに要する時間と考えられる。

このPheo *a*の変性に関する知見を得ることを目的に、ピロリジンとPheo *a*との反応をクロロホルム中で可視分光測定により検討した (Fig. 5)。時間とともに吸収スペクトルが等吸収点をもって短波長シフトすることより、Pheo *a*が1:1で変性物に転化することがわかる。この変性物は、ここで用いているシリカHPLCでは溶出しない、かなり極性の高い物質である。以上の知見から、この変性物は、アミンが環Vの炭素9に付加しC9-C10結合が開裂したchlorin-6-amide⁵⁾と推定される。

次に、ピロリジンの添加濃度を一連に変化させ、Pheo *a* / *a'*総量 $[\text{Pheo } a, a']$ をHPLCにより経時的に定量した (Fig. 6)。Pheo *a*の初期濃度はピロリジン濃度より十分に小さいので、反応



は擬一次速度式

$$[\text{Pheo } a, a']_t = [\text{Pheo } a, a']_0 e^{-kt} \quad (2)$$

で解析できる。Fig. 6のデータを式(2)に従ってプロットするとFig. 7(A)となり、各直線の勾配から速度定数 k (s^{-1}) を算出しピロリジンの濃度に対してプロットすると傾きが約2の直線が得られた (Fig. 7(B))。すなわち、最終的に環Vに付加するピロリジンは1分子であるが、反応(1)の遷移状態において、2分子のピロリジンが攻

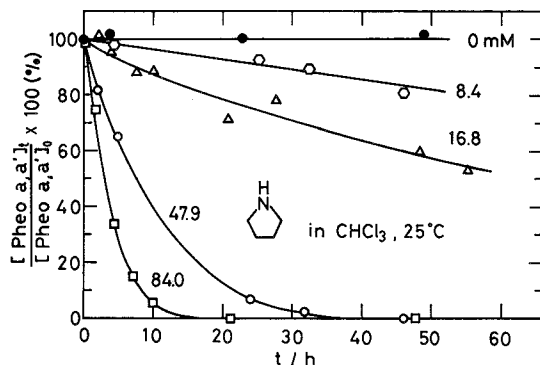


Fig. 6. Decomposition of Pheo *a(a')* by the Action of Pyrrolidine in Chloroform at 25°C.

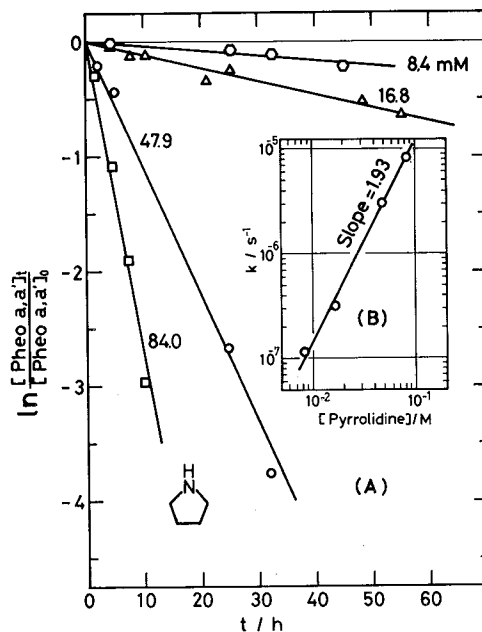


Fig. 7. (A) Kinetic Plots According to Eq. (2) for the Pheo *a(a')* Degradation as a Function of Pyrrolidine Concentration in Chloroform. (B) Dependence of the Pheo *a(a')* Degradation Rate Constant k on the Pyrrolidine Concentration.

撃する段階が律速になっていると推定される。

他方、ピロリジンによるPheo *a*のエピ化の速度定数を生体外で測定したところ、反応(1)の速度定数より少なくとも3桁以上大きいことがわかった。それにもかかわらず葉緑体中では、ピロリジンはPheo *a*に対して付加反応のみ行い、エピ化促進作用はほとんど示さない。これは、系IIの反応中心近傍のPheo *a*が、式(1)の変性を受けやすい特殊な配向状態で構造タンパク中に存在するこ

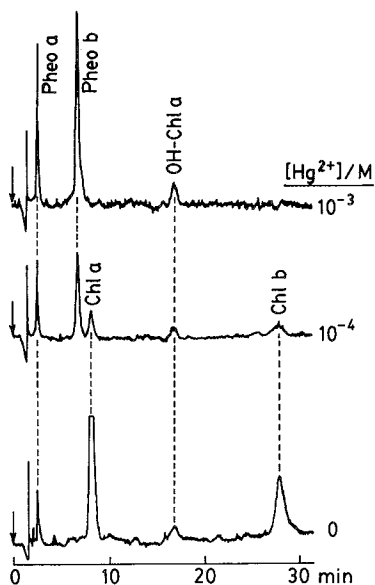


Fig. 8. HPLC Traces Showing the Alteration of Chloroplast Pigments by Hg^{2+} at 25°C .

とを示唆する。

3.3 水銀(II)イオンによる色素変性

葉緑体懸濁水溶液に HgCl_2 を加えて暗所に24時間静置し、色素組成をHPLCにより分析した。結果をFig. 8に示す。

HgCl_2 未添加の葉緑体では若干のアロマー化とフェオフィチン化が認められるだけであるが、 Hg^{2+} 濃度 0.1mM では $\text{Chl } a, b$ ともに約80%が、また 1mM ではほぼ全部がフェオフィチン化した。このように、 Hg^{2+} イオンは葉緑体内の色素に対して顕著な変性作用を示す。

Hg^{2+} イオン濃度 0.1mM と 1mM における反応後の溶液のpH値はそれぞれ 5.72 および 4.51 であり、もしプロトンだけの作用によってフェオフィチン化が起こるならば、24時間後のフェオフィチン化率はそれぞれ 0.02% および 4% に留まるはずである⁶⁾。より詳細な測定を行った結果、 Hg^{2+} がまず中心金属の Mg^{2+} と置換し、こののち速やかにフェオフィチン化が起こることが判明した⁶⁾。

3.4 除草剤による色素変性

アミン系除草剤の一種であるSimetryneが $\text{Pheo } a$ のエピ化を著しく促進することをヘキサン中の測定により確認した (Fig. 9)。このような変性作用が葉緑体についてもみられるか否か現在検討中である。

4. ま と め

外来化学物質 (ピロリジンおよび Hg^{2+}) によって、葉

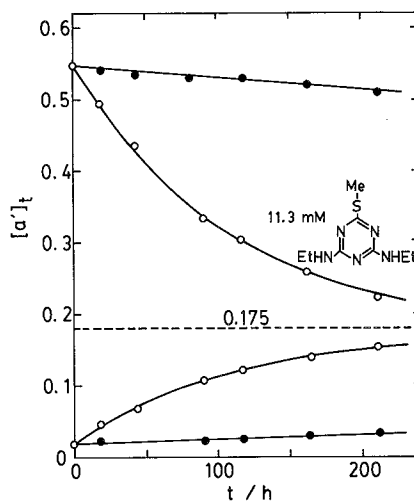


Fig. 9. Time Courses for the $\text{Pheo } a/a'$ Epimerization in the Absence (●) and Presence (○) of 11.3mM Simetryne in Hexane at 4°C .

緑体内の色素が著しい分子変性を受けること、およびアミン系除草剤が生体外で $\text{Pheo } a$ のエピ化を促進することを初めて明らかにした。この種の検討を今後さらに進めることにより、化学環境と植物の光合成機能との関わりが分子レベルで解明できると期待される。

この研究は本所昭和60年度選定研究費および昭和62年度文部省科学研究費 (課題番号62602508) の一部を用いて実施した。クロロフィル類の抽出・精製手法の開発にあたっては南方薬品工業(株)仲里正孝氏より多大なるご助力をいただいた。記して謝意を表する。

(1987年10月6日受理)

参 考 文 献

- 1) T. Omata, N. Murata and K. Satoh, *Biochim. Biophys. Acta*, **765**, 403 (1984); N. Murata, S. Araki, Y. Fujita, K. Suzuki, T. Kuwabara and P. Mathis, *Photosynth. Res.*, **9**, 63 (1986)
- 2) T. Watanabe, M. Kobayashi, M. Nakazato, I. Ikegami and T. Hiyama, *Progr. Photosynth. Res.*, **1**, 3. 303 (1987)
- 3) T. Watanabe, H. Mazaki and M. Nakazato, *Biochim. Biophys. Acta*, **892**, 197 (1987)
- 4) R.E. Glick, S.W. McCauley and A. Melis, *Planta*, **164**, 487 (1985); T. -Y. Leong and J.M. Anderson, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 57 (1986)
- 5) A. Weller and R. Livingston, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1575 (1954)
- 6) H. Mazaki and T. Watanabe, 未発表データ