



研究技術紹介

光合成色素と光化学系反応中心の定量法

三室 守, 村上明男

基礎生物学研究所 (444 岡崎市明大寺町西郷中 38)

Mamoru Mimuro and Akio Murakami 1996. Quantification of photosynthetic pigments and photosynthetic reaction centers. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 44:9-18.

Methods for quantification of photosynthetic pigments and photosynthetic reaction centers in algae are described. Photometrical assay has been used as a conventional method, while HPLC analyses are strongly recommended for separation and quantification of pigments. Photosynthetic reaction center is estimated by the redox-titration of electron transfer components involved in respective RC's; P700 for PS 1 RC and cyt b_{559} for PS 2 RC. Several technical procedures lined by the experience of the authors are also shown for an accurate estimation.

Key Index Words: photosynthetic antenna pigment, photosynthetic reaction center, quantification.

Mamoru Mimuro and Akio Murakami: National Institute for Basic Biology, Myodaiji, Okazaki 444, Japan.

はじめに

光合成は藻類のもっとも基本的な代謝系のひとつである。光エネルギーを吸収するための光合成色素の種類と分布は、藻類の分類体系の基本的な性質のひとつとなっている。これらの色素の細胞当たりの含量は環境に適応して変化することが知られている。また、光化学系反応中心の含量も同様に変化することが近年明らかになってきた。したがって、光合成色素と光化学系反応中心は、藻類の生理的な指標として、また分類学的な考察の基礎として重要な要素となっている。(ここでは、ラン色細菌(ラン藻)を含む酸素発生型光合成を営む水界の光合成生物を「藻類」と呼ぶことにする。)

酸素発生型光合成系には、2種類の光化学系反応中心が存在する (Fig. 1)。厳密に言えば、反応中心とは光エネルギーを用いて光電変換(電荷分離)反応を起こす時の電子供与体のことを意味する。光化学系反応中心は、多くのタンパク質と色素から構成される光化学系反応中心複合体を形成している。光化学系2反応中心は酸素発生に必要な高い酸化電位を形成し、光化学系1反応中心はNADP⁺の還元のために必要な低い還元電位を形成する。反応中心複合体あ

たり各1分子の反応中心が存在するので、この当量関係を用いて、反応中心の量を複合体を構成する他の成分から求めることもできる。ふたつの光化学系反応中心複合体にはそれぞれ特徴的な色素が存在している。光化学系2反応中心複合体には、クロロフィル a (Chl a), フェオフィチン a (Pheo a), β -カロテンが結合し、光化学系1反応中心複合体には、Chl aと β -カロテンが結合している。したがって、これらの色素は酸素発生型光合成生物には普遍的に存在している。

一方、これらの反応中心複合体に光エネルギーを供給する役割を持つ色素が存在する。それらはタンパク質と結合し、色素タンパク質複合体を形成している。量的には全色素の98%以上を占めるもので、自らは光化学反応を起こさないで「アンテナ色素」と呼ばれ、電波を集めるパラボラアンテナのような役割を持つ。それぞれの反応中心複合体に対応して特有のアンテナ色素複合体 (LHCI, LHCII, CP-43, CP-47など, Fig. 1) が存在するが、「藻類」の特徴的な色素 (Chl a, Chl b, Chl c, カロテノイド (Car), フィコビリル) はおもに光化学系2反応中心にエネルギーを供給する複合体中に存在する。

この稿では、「藻類」の生理学的、分類学的、およ

び生態学的解析に必要な光合成色素と光化学系反応中心の定量法を、筆者らの経験に基づく改良点などを交えながら解説する。

1. 光合成色素の定量法

光合成色素の定量法に関しては既に報文があり、基本的な操作方法や問題点については解説されている(藤田, 1979)。しかし、最近の分析機器の感度や精度の向上により、従来は問題とされていなかった点にも十分な配慮を払う必要がある。ここでは、波長走査が可能な分光光度計と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が使えるという前提で解説する。また、簡略法でも、ある程度の精度を保てる場合はその点を明記する。

1. 試料からの色素(Chl, Car)の抽出方法

1-1. 溶媒の選択基準と抽出方法

分光法により色素を定量する場合、分子吸光係数が正確に求められ(てい)る溶媒を用いる必要がある。このためには混合溶媒であったり、溶媒中の水の含量が制御できない溶媒系はできるだけ避けることが望ましい。よく使われる溶媒として、アセトン、メタノール、エタノール、ジエチルエーテルなどが挙げられる。

ChlやCarは抽出された後、光と酸素が共存する環境では様々な反応を起こし、その産物が定量の妨げになる。予防策としては可能な限り光を弱くし、副次的な反応を抑えることである。Chlは酸性条件下ではPheoとなる。例えばPheo aは506nmと535nm(アセトン中)に特有の吸収帯があるので、スペクトルを測定することでChlとは容易に区別できる(Fig. 2A)。Pheoの混在が有意で、かつ、ChlとPheoを区別する必要がない場合はPheoにして定量を行った方が誤差が少ない。

抽出溶媒としては抽出効率が高いアセトンがよく用いられている。一定量の細胞懸濁液をガラス遠沈管に取り、細胞を遠心沈殿させ上清の水を捨てた後、溶媒を添加して色素を抽出する。このとき、試験管の底にパックされた細胞を葉さじなどで懸濁した後に溶媒を添加すると、色素の抽出効率上がる。海産性の藻類の場合は藻体を純水で1~2度洗浄し、塩分を除去することによって、抽出効率上がるのが経験的に知られている。また、細胞によっては熱を加えることで抽出効率上がる場合もある。しかし、熱処理は色素の異性化やクロロフィラーゼ活性を促進するので、処理は必要最小限(溶媒の沸点以下、1-2min)に抑える。また、この際湯浴を用い、突沸にも注意する。葉状体の場合には、藻体を凍結乾燥後に乳鉢で細胞を断片化

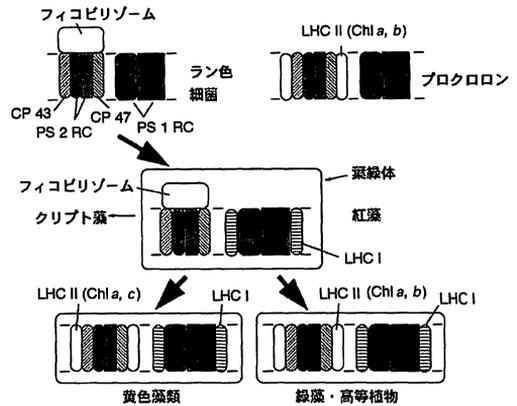


Fig. 1 光合成系での機能タンパク質複合体の系統性

光化学反応中心とアンテナ色素複合体の系統性を模式的に表している。濃い部分は光化学反応中心(PS 1 RC, PS 2 RC)を示し、LHC IはおもにPS 1 RCへエネルギーを転移するアンテナ、LHC II、CP-43、CP-47はおもにPS 2 RCへエネルギーを転移するアンテナを示す。

し、色素の溶媒抽出を行う。Chl異性体の人為的な生成を最小限に抑える方法については、渡辺・小林(1989)の論文に詳述されている。

アセトンでは色素の抽出が困難な場合には、メタノールを用いるとよい。共存する水の含量が高い場合、Chlが会合体を形成したりするので、できるだけ水の含量を下げた条件で抽出する。メタノールは異性化などの反応を起こしやすい溶媒であることに留意する。抽出が困難な藻類の場合には、アルカリ性メタノールを用いて、Chl異性体として抽出し、定量する方法も報告されている(Porra 1990)。

抽出の後、遠心操作(1000 x g, 3min)により細胞と溶媒を分離する。抽出は細胞から色素が完全に抽出されるまで複数回繰り返す。Chl定量には測定波長が異なるため、Carの混在は妨害しない。抽出後はできるだけ速やかに分光学的測定を行うことが重要である。

2. Chlの分光定量法

2-1. 定量法

分光定量法には、吸収法と蛍光法がある。前者が一般的に広く普及しており、かつ測定信頼性も高い。後者の検出感度は吸収法に比較して100倍程度まで上げることが可能である。しかし、標準試料を用いた検量線を作成する必要があり、また会合体形成などで蛍光量子収率が著しく変化するために、測定には細心の注意を払う必要がある。吸収法による定量の基本は、特定の溶媒中の分子吸光係数にしたがって、吸光度か

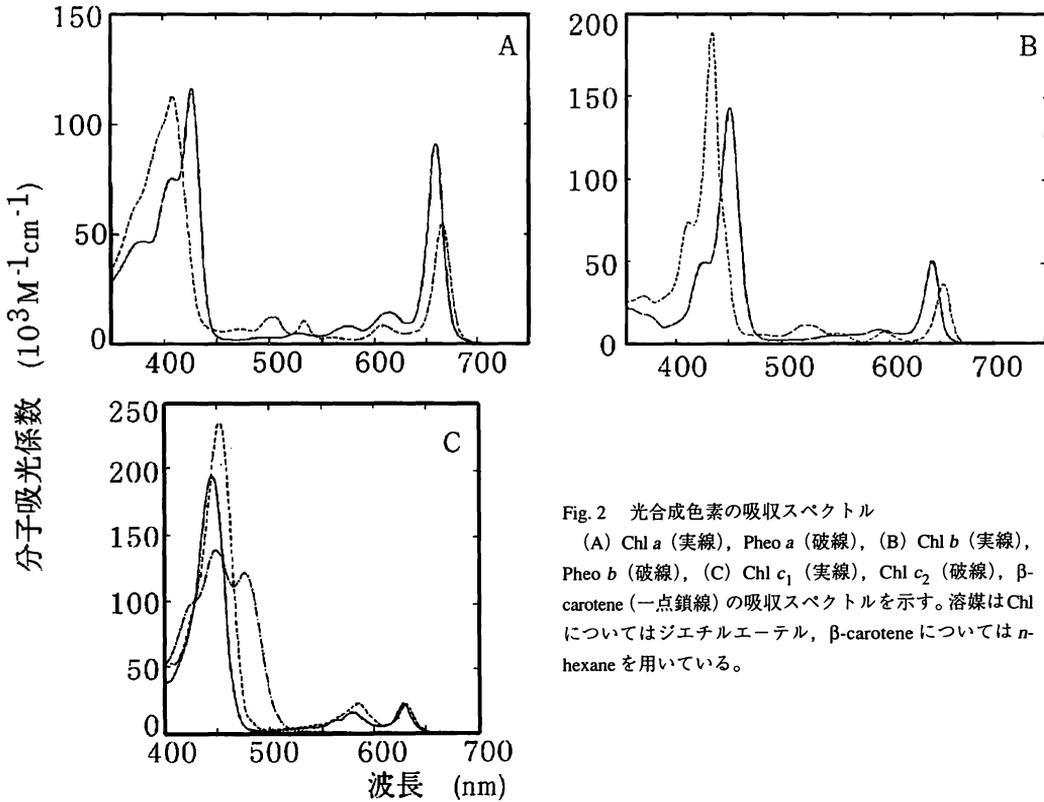


Fig. 2 光合成色素の吸収スペクトル
 (A) Chl a (実線), Pheo a (破線), (B) Chl b (実線), Pheo b (破線), (C) Chl c₁ (実線), Chl c₂ (破線), β -carotene (一点鎖線) の吸収スペクトルを示す。溶媒はChl についてはジエチルエーテル, β -carotene については *n*-hexane を用いている。

らその濃度を算出する方法である。複数の成分が混在する場合でも、成分間の相互作用によって吸収帯に変化が起こらない限り、特定波長での各々の分子の吸光係数を組み合わせ、連立方程式を解くことにより、各々の分子の濃度を求めることができる。

2-2. 分光定量法の実際

分光光度計としては、スペクトルの測定ができる自記分光光度計が望ましい。波長のずれなどに起因する誤差を除くためにはスペクトル測定が必要となる。また、測定の際の分光器のスリット幅は3nmを越えないようにする。スリット幅が広いと、シャープな吸収帯の形が平均化され、ピークの測定値が過小評価されることになる。

測定は次の要領で行う。対照側、試料側に測定に用いる溶媒をキュベットに入れ、透過率の0%と100%のレベルを正しく補正する。揮発性の高い溶媒を用いるときには、栓付きのキュベットを使用し蒸発による測定誤差を防ぐ。600~750nmの領域で分光光度計のベースラインを記録する。次に試料側のキュベットに測

定対象の溶液を入れ、吸収スペクトルを測定し、特定波長の真の吸光度(本来吸収のない波長での吸光度からの差)を求める。吸収がない波長域で吸光度が一定の小さな値を示すはずであるから、その波長域の値を基準とする。分光光度計のベースライン補正を行った後では、720nmより長波長側の吸光度はほとんどゼロのはずであるが、しばしば有意な値を示すことがある。これは(1)細胞残渣が十分に分離できていない、(2)水の存在により色素が高次の会合体やコロイドを形成していること、に由来する。前者の場合は遠心分離操作で細胞残渣を取り除くこと、後者の場合は有機溶媒を加えて水の濃度を下げる必要となる。

分光光度計の使用に当たっては、波長ずれに十分注意する必要がある。Chl a と Chl b の混合試料の場合には、Chl b の吸収極大波長が、Chl a による吸収帯の勾配の中に隠れるため、分光器の1nm以下の波長ずれでも、Chl a/Chl b 比の測定に大きな誤差をもたらす。このことは特定波長で吸光度を測定しただけでは見逃してしまう。波長がずれている場合は、計算に用いる波

長を Chl a のピーク波長位置を基準にして、Chl b または Chl c の吸収極大の波長位置を補正する。

Chl a, Chl b の分子吸光係数についてはいくつかの報告がある (Table 1)。それらの間の差は小さく定量に実質的な問題を生じることが少ない。それに比べて、溶媒に依存した変化の方が遥かに大きく、この点を注意することの方が重要である。(Chl の混合溶液についての計算式は付録 1, 2 に示す。) Chl c₁, Chl c₂ については文献値が限定されている (Jeffrey and Humphrey, 1975) ので必要であれば、塩井の方法にしたがって分離をして (Shioi et al, 1995), 自分で決めることも必要である。

Chl, Pheo を始め、それらの派生物を含む抽出液の厳密な定量測定には HPLC による分離が不可欠である。Chl の分離・定量については文献 (渡辺・小林, 1989) を、また Car を含む場合は後述の方法を参照されたい。

3. カロテノイド (Car)

Car の分布は藻類の系統性との関連が深く、Chl の分布と同様に重要な指標となる。藻類には、極性の低いカロテンの他に、極性の高い (酸素原子を含む) 数多くのキサントフィルが存在する。光化学系反応中心には β -カロテンが、アンテナを構成する色素タンパク質には分類群との対応を示すカロテノイドが結合している。渦鞭毛藻のペリディニン、珪藻・褐藻のフコキサンチン、緑藻のルテインなどが代表例である。

3-1. Car の分離・定量法

Car は HPLC により分離し、定量することが必要である。フィールドの試料のように数多くの成分が混在する場合にも採用できる方法が既に報告されている (Mantoura and Llewellyn, 1983)。逆相のカラム、イオンペアー試薬を用いる方法で、14 種の Chl および同族体、17 種のカロテノイドを分離することが可能である。単一種を対象とする場合は、溶媒組成などがより簡単になる (イオンペアー試薬は不要になる場合が多い (Suzuki, 1994))。2, 3 の測定例を参考文献として挙げる (Fawley, 1988, 1991)。これらを参考に最適の分離方法を考案することが重要である (Britton and Young, 1994)。

HPLC による分離では、Chl を含めて従来問題とされていなかった微量成分が見いだされる可能性がある。保持時間が文献値と異なる場合、未同定物質として処理せずに解析を進めることで新たな色素の発見につながる可能性がある。検出器として Photodiode array を使うことができれば、実時間でスペクトルの測定も

行えるので、分析精度が上がる。

定量に関する問題点は、分子吸光係数の決定、色素のカラムからの回収率である。最良の分離パターンを得るために様々な組成の溶媒が用いられる。こうした系では分子吸光係数を自ら決定することが必要となる。カラムから試料を分取し、溶媒を置換して決定する方法が最も良い。標準試料として、Chl a, Chl b は市販品があり、Chl c を含むカロテノイドの標準試料 (15 種程度) も入手可能 (Water Quality Institute, Denmark が製造) なので、これらを使って、分離パターン、回収率、分子吸光係数を決めることができる。代表的な分子吸光係数を Table 2 に示す。

Car の組成を問わないで、Chl との相対的な値として求めたい場合には、可視部の吸収を用いる簡略法がある。しかし目安として以上の意味はない。方法については文献 (藤田, 1979) を参照されたい。

4. フィコビルリン

フィコビルリンは、ラン色細菌、紅藻、およびクリプト藻に存在する水溶性の光合成色素タンパク質である。近年、結晶構造学と分子生物学の発展によって急速にその解析が進み、分子レベルでの機能と構造との関連が詳細に知られるようになってきた。フィコビルリンタンパク質は、大別すると、紅いフィコエリスリン (PE) と青いフィコシアニン (PC), さらに碧いアロフィコシアニン (APC) になる。それらはさらに細かく分類されている。ラン色細菌と紅藻はともに必ず PC と APC を持ち、種によって PE を持つものもある。また、PE を持たない紅藻も存在する。クリプト藻のフィコビルリンはラン色細菌や紅藻のそれとは分光学的な性質などが大きく異なる。

フィコビルリンについては可視部の吸収を基にした定量が行われているが、報告されている分子吸光係数を用いることは、必ずしも妥当ではないことが明らかになってきた。フィコビルリンタンパク質は細胞内でフィコビリゾームという高次の会合体を形成しており、この構築と維持のためにリンカータンパク質が存在している。さらに、このリンカータンパク質の存在によって、フィコビルリンのスペクトルや分子吸光係数が大きく変わることで、このリンカータンパク質の結合状態を制御する方法がないこと、が明らかになってきた。したがって、従来使われてきた分子吸光係数の再検討が必要がある。

4-1. フィコビルリンの定量法

もっとも確実な定量法は色素 (発色団) を直接測定する方法である。フィコビルリンタンパク質の分子吸光

Table 1. 光合成色素の分子吸光係数

Chl a and Chl b ($\text{ex } 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)								
by Mackinney (1941)			by Porra <i>et al.</i> (1989)			by Porra <i>et al.</i> (1989)		
in 80% acetone			in 80% acetone			in 100% methnaol		
$\lambda(\text{nm})$	Chl a	Chl b	$\lambda(\text{nm})$	Chl a	Chl b	$\lambda(\text{nm})$	Chl a	Chl b
663	73.2	8.40	663.6	76.79	9.79	665.2	71.43	20.20
645	14.95	41.3	646.6	18.58	47.04	652.0	31.65	38.55

Phycobilin chromophores (in 8 M urea, pH 2.0 - 3.0) ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)			
$\lambda(\text{nm})$	PCB	PEB	PUB
660	35.4	0	0
565	7.8	42.8	0
495	1.5	12.0	104

Phycobiliproteins (in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 and 0.15 M NaCl in monomer base)			
$\lambda(\text{nm})$	APC	C-PC	C-PE
652	5.65	1.23	0
615	2.68	5.92	0
562	0.849	2.41	9.62

$\lambda(\text{nm})$	APC	C-PC	C-PE
652	205	47.0	0
615	97.3	226	0
562	30.8	92.1	384.8

Table 2. 代表的なカロテノイドの吸収極大と分子吸光係数

Species	Abs max	Molar extinction coefficients ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Solvent	MW
β -carotene*	425, <u>453</u> , 479	139.0	<i>n</i> -hexane	536
13-cis	<u>441</u> , 467	107.3	<i>n</i> -hexane	
15-cis	<u>446</u> , 472	103.2	<i>n</i> -hexane	
α -carotene*	422, <u>444</u> , 474	150	petroleum ether	536
lutein*	421, <u>445</u> , 479	168	ethanol	658
violaxanthin*	417, <u>441</u> , 471	153	ethanol	600
zeaxanthin*	426, <u>452</u> , 479	133	petroleum ether	568
neoxanthin*	415, <u>438</u> , 467	135	ethanol	600
siphonaxanthin	427, <u>450</u> , 478		petroleum ether	600
fucoxanthin*	420, <u>444</u> , 467	109	acetone	658
peridinin*	430, 454, 483		<i>n</i> -hexane	630
	<u>475</u>	83.4	ethanol	
diadinoxanthin*	424, <u>445</u> , 474	131	<i>n</i> -hexane	582
diatoxanthin	428, 449, 477		<i>n</i> -hexane	566
β -cryptoxanthin	425, <u>452</u> , 479	132	petroleum ether	552
echinenone*	<u>456</u> , 482	119	petroleum ether	550
myxoxanthophyll	450, <u>478</u> , 510	126	acetone	730

分子吸光係数は下線を付した吸収極大での値である。文献値に基づき筆者が換算した値を示している。*は標準試料として入手が可能なカロテノイド (12 ページ参照)。この他に、alloxanthin, canthaxanthin, 19'-hexanoloxy-fucoxanthin, prasinoxanthin がリストにはある。MW: 分子量

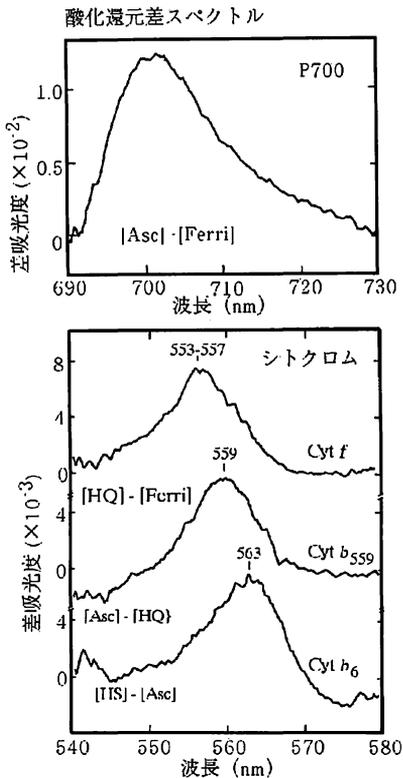


Fig. 3 ラン色細菌チラコイド膜で測定したP700とシトクロムの酸化還元差スペクトル

P700の差スペクトルはフェリシアン化カリウム (Ferri) での酸化とアスコルビン酸ナトリウム (Asc) での還元で得られる。3種のシトクロムはフェリシアン化カリウムで酸化後、ヒドロキノン (HQ)、アスコルビン酸ナトリウム、ハイドロサルファイトナトリウム (HS) と順次還元剤を加えることにより得られる。シトクロム *f* の極大波長は種によって変化する。チラコイド膜の濃度: P700用, 20 μ g Chl *a*/ml, シトクロム用, 60 μ g Chl *a*/ml。

係数はタンパク質の影響を大きく受けているので、それを取り除いて、色素本来の分子吸光係数を用いればよい。しかし、PCとAPCは同じ色素(フィコシアノピリン, PCB)を持つためにこの方法では区別ができない。PE(フィコエリスロピリン(PEB))を発色団として持つ。B-PE, b-PE, R-PEはフィコウロピリン(PUB)をも含むと(PC+APC)については容易に区別できる。尿素溶液中(8~9M, pH 2~3)では、色素は安定でかつタンパク質は完全に高次構造が壊れているので、色素本来の分光的性質が現れる。この測定法の信頼性は高い(Glazer and Hixon 1975, 1977)(計

算式の立て方と分子吸光係数については付録1, Table 1を参照)。APCは単量体あたり2分子のPCBを、PCは3分子のPCB, C-PEは5分子のPEBを含むので、換算する必要がある。

リンカータンパク質が共存する場合でも、それらの影響の少ない条件で測定を行えば、一定の精度での定量が可能である(Bennett and Bogorad 1975)。この場合の測定誤差はPEとPCについては10-15%程度、APCについては20%程度と考えられる。具体的には、10mMリン酸緩衝溶液(pH 6.0)中でフィコビリントタンパク質の濃度を3mg/ml以下(極大波長の吸光度で0.5以下)にし、特定波長の吸光度値から連立方程式を解いて求める(計算式の立て方と分子吸光係数については付録1, Table 1を参照)。

II. 光化学系反応中心の定量法

チラコイド膜に存在する二つの光化学系反応中心の定量は、一般的にそれぞれの光化学系複合体中に固有に含まれている色素や酸化還元成分などを分光学的に測定することにより行われている。光化学系1には固有な色素としてChl *a'* (Chl異性体)が反応中心当たり1ないし2分子、光化学系2には反応中心当たり2分子のPheo *a*が含まれている。藻体からこれらの色素を含む全ての色素を有機溶媒で抽出後、HPLCを用いて分離し、吸収法で検出することにより、光化学系反応中心を定量する方法がある(渡辺・小林 1988)。一方、光化学系複合体に固有の酸化還元成分について、その酸化還元反応に伴う吸収変化(差スペクトル)を測定することにより、光化学系反応中心の定量が行われている(Fujita and Murakami 1987)。また、光化学系複合体を構成するペプチドの含量を特異性の高い抗体を用いて免疫学的に定量する方法もあるが、絶対値としての測定は困難である。しかし、培養条件などを変えたときに起こるペプチドの相対的な量の変化についての情報は得られる(Aizawa et al. 1992)。ここでは、単離チラコイド膜の分光光度計での酸化還元差スペクトル測定に基づいた光化学系反応中心の定量法を、筆者らのラン色細菌・紅藻・緑藻での経験をもとに解説する。チラコイド膜のシトクロム *b₆-f* 複合体や可溶性電子伝達系成分、プラストシアニンやシトクロム *c₅₅₃* などの定量も基本的には同じ方法で行える。

1. チラコイド膜の調製

1-1. 細胞破碎

細胞を緩衝液(50mM Tricine-NaOH, pH7.5)で十分

に洗浄した後、同緩衝液に懸濁する。フレンチプレス、超音波処理、またはガラスビーズ法などにより細胞を破碎する。細胞の破碎に必要なフレンチプレスの処理圧・処理速度や超音波の発振出力・処理時間は細胞の種類により大きく異なり、予備実験から必要最小限の処理条件を決める必要がある。一般的には、細胞が小さいほど細胞破碎が困難で、破碎のためにはより強力な処理条件が必要である。フレンチプレスの場合は2回以上の繰り返しにより破碎効率が上がる。処理時の発熱から試料を保護するため、フレンチプレスのセルや超音波発振子などをあらかじめ水冷したり、超音波発振を間欠的に行うなどの工夫も必要である。また、処理の際の試料の泡立ちなどにも十分注意する。さらに、内在性プロテアーゼの作用を防ぐため、プロテアーゼ阻害剤を緩衝液に添加したほうが良い。細胞破碎や次の項で述べるチラコイド膜分離の操作はすべて0~4℃で行い、また、色素の定量操作と同様に遮光にも注意する。

チラコイド膜調製に使用する細胞は、収穫直後のものでも、一旦凍結保存(-70℃以下)したもので問題はない。また、凍結融解により細胞破碎の効率が上がる場合もある。紅藻 *Porphyra* などの葉状体の細胞は、ハサミで切り刻んだ藻体を液体窒素で凍結後、乳鉢などを用いてさらに断片化し、フレンチプレス等で破碎する。

1-2. チラコイド膜の分画

細胞破碎液から低速遠心(1,600 xg, 15min)で細胞残渣を沈殿として除いた後、上清を超速心(140,000 xg, 1hr)し、チラコイド膜分画を沈殿させる。沈殿を1mM MgCl₂を含む緩衝液(50mM Tricine-NaOH, pH7.5)に懸濁後、もう一度超速心を行い、水溶性蛋白質などの可溶性成分を十分に除く(フィコビルンを含む試料の場合は、超速心上清に色が残らなくなるまでこの操作を繰り返す)。通常ではこの精製段階のチラコイド膜を用いて酸化還元成分の分光測定が可能である。沈殿物の中に細胞壁や他のオルガネラなどの夾雑物が多い場合には、分光測定時に添加する酸化還元剤によりベースラインが大きく変動することが多いので、チラコイド膜をシヨ糖密度勾配遠心(Chua and Bennoun 1975)などを用いてさらに精製する必要がある。調製直後に測定を行わない場合は、単離チラコイド膜を凍結保存(-70℃以下)する。

2. 光化学系1反応中心の定量

光化学系1反応中心の定量は、光化学系1に1当量

存在しているP700と呼ばれている反応中心分子の分光学的な測定により行う。チラコイド膜を用いた光化学系反応中心の分光測定は、Chlなどの色素による高吸光度のバックグランド吸収をもつ試料について、色素の1%以下の存在量の反応中心やヘムの酸化還元に伴う微少吸収変化を測定するので、通常の分光測定に比べて得られるスペクトルのS/Nは非常に悪い。したがって、比較的高性能の分光光度計を用い、その性能に合わせて波長走査速度などの設定を行う。また、キュベットの汚れや懸濁液中の気泡の発生には細心の注意が必要である。

2-1. P700の測定と定量

チラコイド膜は緩衝液(50mM Tricine-NaOH, pH7.5)にテフロンホモゲナイザーなどを用いて均一に懸濁する。また、超音波処理を1~2秒間行い、懸濁液を均一化しても良い。チラコイド膜懸濁液(Chl濃度:20~60µg/ml, 680nmの吸光度で1.5~4.5)をキュベットに入れ、酸化剤(フェリシアン化カリウム)を最終濃度1mMになるように加える。二波長分光光度計を二波長モードで使用する場合は、 λ_1 を730nmに設定し、 λ_2 を690~730nmの範囲で波長走査する。まず、酸化剤を加えた試料をセルホルダーに入れて、ベースラインの補正とレコーダへの記録を行う。次に、還元剤(アスコルビン酸ナトリウム)を溶液(最終濃度1~4mM)または粉末(葉さじで極微量)で加え、静かに攪拌した後スペクトルを記録する(Fig. 3)。P700の還元反応の飽和を確認するため、さらにもう一度同じ操作を繰り返す。加える酸化剤と還元剤の至適濃度は試料により若干異なる。また、過剰量の試薬の添加はChlの退色や膜粒子の凝集などを起こし、バックグランド吸収が大きく変化する結果、P700の測定は困難になる。ダブルビーム型の分光光度計を使用する場合は、試料側と参照側の両キュベットにチラコイド膜懸濁液を分注し、ベースライン補正をした後、参照側キュベットに酸化剤、試料側キュベットに還元剤を加えて差スペクトルを測定する。スペクトルのメモリー機能が付属している場合は、二波長法と同様に試料側のキュベットだけでも測定が可能である。

P700の定量に関して、光照射により酸化反応を起こして差スペクトルを測定する方法もある(Abe et al. 1994)。試料に還元剤を添加し、光照射のON/OFFで差スペクトルを測定するため、同一試料で繰り返し測定が可能で、最少量の試料でスペクトルのS/Nを向上出来る。

P700濃度の計算は次のように行う。得られた差スペクトルの差のピーク(700nm付近)と730nmのベースラインとの間の吸光度差を読みとる(Fig. 3)。差分子吸光係数($\Delta\epsilon_{700-730\text{nm}} = 64 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Hiyama and Ke 1972)を用いてP700のモル濃度を計算する。定量値は通常Chl当たりのモル濃度で表現する。

3. 光化学系2反応中心の定量

光化学系2の反応中心P680は酸化還元電位が非常に高いので、P700のような酸化還元剤の組合せによる簡単な測定は困難である。このため、光化学系2反応中心の定量には、酸素発生の閃光収率の測定、二次電子受容体 Q_A の分光測定、および放射標識した除草剤の結合数の測定など種々の方法が用いられている。しかし、これらの方法にも固有な装置が必要で、また試料の取り扱いに多くの注意が必要である。ここではラン色細菌で開発され(Fujita and Murakami 1987)、一般的に用いられ始めている(Yu et al. 1993)、シトクロム b_{559} の酸化還元差スペクトルによる光化学系2反応中心の定量法を紹介する。

3-1. シトクロム b_{559} の測定

チラコイド膜懸濁液(Chl濃度:50~100 $\mu\text{g/ml}$, 680nmの吸光度が約4~8)をキュベットに入れ、酸化剤(フェリシアン化カリウム)を最終濃度1mMになるように加える。分光光度計は二波長モードで λ_1 を570nmに設定し、 λ_2 を540~580nmの範囲で波長走査する。まず、酸化剤を加え良く攪拌した後、還元剤(ヒドロキノン)の粉末を極少量加える。ヒドロキノンの添加により、高酸化還元電位のシトクロム f だけが還元される。この段階で、はじめてベースライン補正と記録を行う。次に還元剤(アスコルビン酸ナトリウム)の粉末を微量加え、静かに攪拌し、1分ほど静置した後スペクトルを記録する。シトクロム b_{559} の還元反応の飽和を確認するため、さらに同じ操作を2,3回繰り返す(Fig. 3)。

また、この一連の測定の応用により、チラコイド膜に存在するシトクロム b_6-f 複合体の定量も可能である(Fujita and Murakami 1987)。フェリシアン化カリウムとヒドロキノンの間の差スペクトルではシトクロム f 、さらに、アスコルビン酸ナトリウムとヒドロサルファイトナトリウムの間の差スペクトルではシトクロム b_6 が測定出来る(Fig. 3)。

これらの測定に用いる還元剤は酸素、水により酸化、分解をうけやすいので、購入した試薬は小分けし、デシケータなどを用いて暗所で保存する。

3-2. シトクロム b_{559} (光化学系2反応中心)濃度の

計算

得られた差スペクトルのピーク波長559nmとベースラインとの吸光度差を読みとる。ベースラインが斜めになった場合は、540nmと570nm付近のスペクトルの谷を直線で結んでベースラインとする。分子吸光係数は精製シトクロム b_{559} の還元型スペクトルの分子吸光係数(Garewal and Wasserman 1974)をもとに計算した差分子吸光係数 $\Delta\epsilon_{559-570\text{nm}} = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Cramer and Whitmarsh 1977)を用いる。定量値はP700と同様にChl当たりのモル濃度で表すことが多い。

ところで、光化学系2複合体における反応中心当たりのシトクロム b_{559} の数については、1個という報告と2個という報告があり、議論が続いている。しかし、少なくともラン色細菌については他の測定法による定量値との比較(Fujita and Murakami 1987)や単離した光化学系2複合体成分についての定量(MacDonald et al. 1994)から、光化学系2当たり2個のシトクロム b_{559} ヘムが含まれていると判断出来る。したがって、シトクロム b_{559} 量から光化学系2反応中心量を計算する場合は、シトクロム b_{559} 量の1/2の値を使用する。

ここで解説した方法は単に藻類に限られたものではなく、高等植物のオオムギ(Ohashi et al. 1992)やクロマツ(Shinohara et al. 1992)の葉緑体での光化学系反応中心の定量にも適応されている。

参考文献

- Abe, S., Murakami, A., Ohki, K., Aruga, Y. and Fujita, Y. 1994. Changes in stoichiometry among PSI, PSII and Cyt b_6-f complexes in response to chromatic light for cell growth observed with the red alga *Porphyra yezoensis*. *Plant Cell Physiol.* 35 : 901-906.
- Aizawa, K., Shimizu, T., Hiyama, T., Satoh, K., Nakamura, Y. and Fujita, Y. 1992. Changes in composition of membrane proteins accompanying the regulation of PSI/PSII stoichiometry observed with *Synechocystis* PCC 6803. *Photosyn. Res.* 32 : 131-138.
- Benett, A. and Bogorad, L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58 : 419-435.
- Britton, G. and Young, A. J. 1994. Methods for the isolation and analysis of carotenoids. p. 409-457. In : Young, A. and Britton, G. (eds.) *Carotenoids in photosynthesis*, Chapman & Hall, London.
- Chua, N.-H. and Bennoun, P. 1975. Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*: Wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction

- center. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 : 2175-2179.
- Cramer, W. A. and Whitmarsh, J. 1977. Photosynthetic cytochromes. Ann. Rev. Plant Physiol. 28 : 133-172.
- Fawley, M. W. 1988. Separation of chlorophylls c_1 and c_2 from pigment extracts of *Pavlova gyrrans* by reversed-phase high performance liquid chromatography. Plant Physiol., 86 : 76-78.
- Fawley, M.W. 1991. Disjunct distribution of the xanthophyll luteoxanthin in the green algae (Chlorophyta) . J. Phycol. 27 : 544-548.
- 藤田善彦 1979 光合成色素の定性と定量法 p. 473-507. 西澤一俊・千原光雄(編) 藻類研究法、共立出版、東京 .
- Fujita, Y. and Murakami, A. .1987. Regulation of electron transport composition in cyanobacterial photosynthetic system : Stoichiometry among photosystem I and II complexes and their light-harvesting antennae and cytochrome b_6-f complex. Plant Cell Physiol. 28 : 1547-1553.
- Garewal, H. S. and Wasserman, A. R. 1974. Triton X-100-4M urea as a an extraction medium for membrane proteins. I. Purification of chloroplast cytochrome $b-559$. Biochemistry 13 : 4063-4071.
- Glazer, A. N. and Hixson, C. S. 1975. Characterization of R-phycoyanin : Chromophore content of R-phycoyanin and C-phycoerythrin. J. Biol. Chem. 250 : 5487-5495.
- Glazer, A. N. and Hixson, C. S. 1977. Subunit structure and chromophore composition of Rhodophyten phycoerythrins : *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. J. Biol. Chem. 252 : 32-42.
- Hiyama, T. and Ke, B. 1972. Difference spectra and extinction coefficients of P700. Biochim. Biophys. Acta 267 : 160-171.
- Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. 1975. New specific equation for determining chlorophylls a , b , c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanz. 167 : 191-194.
- MacDonald, G. M., Boerner, R. J., Everly, R. M., Cramer, W. A., Debus, R. J. and Barry, B. A. 1994. Comparison of cytochrome $b-559$ content in photosystem II complexes from spinach and *Synechocystis* species PCC 6803. Biochemistry 33 : 4393-4400.
- Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem., 140 : 315-322.
- Mantoura, R. F. C. and Llewellyn, C. A. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta, 151 : 297-314.
- Ohashi, K., Murakami, A., Tanaka, A., Tsuji, H. and Fujita, Y. 1992. Developmental changes in amounts of thylakoid components in plastids of barley leaves. Plant Cell Physiol. 33 : 371-377.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted from four different solvents : verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta, 975 : 384-394.
- Porra, R. J. 1990. A simple method for extracting chlorophylls from the recalcitrant alga, *Nannochloris atomus*, without formation of spectroscopically-different magnesium-rhodochlorin derivatives. Biochim. Biophys. Acta, 1019 : 137-141.
- Shinohara, K., Murakami, A. and Fujita, Y. 1992. Biochemical characteristics of thylakoid membranes in chloroplasts of dark-grown pine cotyledons. Plant Physiol. 98 : 39-43.
- Shioi, Y., Watanabe, K. Takamiya, K. Garrido, J.L. and Zapata, M. 1995. Separation of mono- and divinyl chlorophyll species by high-performance liquid chromatography using an octadecyl polyvinyl alcohol polymer column. Anal. Biochem., 231 : 225-229.
- Suzuki, R. 1994. A simplified technique for the rapid determination of phytoplankton pigments by reverse-phase high performance liquid chromatography. J. Oceanography, 49 : 571-580.
- 渡辺正・小林正美 1988. 光合成機能分子としてのクロロフィル類. 日本化学会誌 4 : 383-395.
- 渡辺正・小林正美 1989. クロロフィル類の精密分析. 油化学 38 : 876-885.
- Yu, L., Zhao, J., Mulenhoff, U., Bryant, D. A., and Golbeck, J. H. 1993. PsaE is required for in vivo cyclic electron transport flow and photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 7002. Plant Physiol. 103 : 171-180.

付録 1.

成分 1 の濃度を x_1 , 成分 2 の濃度を x_2 , 成分 1 の λ_1 での分子吸光係数を a_1 , λ_2 でのそれを a_3 , 同様に成分 2 については, a_2, a_4 とすると, λ_1, λ_2 で観測される吸光度 y_1, y_2 は,

$$\begin{matrix} y_1 = a_1 x_1 + a_2 x_2 \\ y_2 = a_3 x_1 + a_4 x_2 \end{matrix} \quad \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_1 & a_2 \\ a_3 & a_4 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix}$$

解を求めると

$$x_1 = (a_4 y_1 - a_2 y_2) / D \quad (1) \quad D = a_1 a_4 - a_2 a_3 \quad (3)$$

$$x_2 = (-a_3 y_1 + a_1 y_2) / D \quad (2) \quad x_1 + x_2 = ((a_4 - a_3) y_1 + (a_1 - a_2) y_2) / D \quad (4)$$

3 成分系については

$$\begin{matrix} y_1 = a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 \\ y_2 = a_4 x_1 + a_5 x_2 + a_6 x_3 \\ y_3 = a_7 x_1 + a_8 x_2 + a_9 x_3 \end{matrix} \quad \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_1 & a_2 & a_3 \\ a_4 & a_5 & a_6 \\ a_7 & a_8 & a_9 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \end{pmatrix}$$

解を求めると

$$x_1 = (y_1 (a_5 a_9 - a_6 a_8) - y_2 (a_2 a_9 - a_3 a_8) + y_3 (a_2 a_6 - a_3 a_5)) / D \quad (5)$$

$$x_2 = (-y_1 (a_4 a_9 - a_6 a_7) + y_2 (a_1 a_9 - a_3 a_7) - y_3 (a_1 a_6 - a_3 a_4)) / D \quad (6)$$

$$x_3 = (y_1 (a_4 a_8 - a_5 a_7) - y_2 (a_1 a_8 - a_2 a_7) + y_3 (a_1 a_5 - a_2 a_4)) / D \quad (7)$$

$$D = a_1 a_5 a_9 + a_2 a_6 a_7 + a_3 a_4 a_8 - a_1 a_6 a_8 - a_2 a_4 a_9 - a_3 a_5 a_7$$

という一般解を得る。これに既知の値 (Table 1 を参照) を代入することで計算式を求めることができる。

例 1. Chl a, Chl b (80% アセトン中, 光路長 1 cm) について

$a_1 = 73.2, a_2 = 8.40, a_3 = 14.95, a_4 = 41.3$ を式 (1) (2) に代入すると,

$$[\text{Chl a}] = (41.3 A_{663} - 8.40 A_{645}) / (2897.58) \quad (\text{mM})$$

$$[\text{Chl b}] = (-14.95 A_{663} + 73.2 A_{645}) / (2897.58) \quad (\text{mM})$$

$$[\text{Total Chl}] = [\text{Chl a}] + [\text{Chl b}] = (26.35 A_{663} + 64.8 A_{645}) / (2897.58) \quad (\text{mM})$$

付録 2.

Chl a, Chl b, Chl ($c_1 + c_2$), Chl c_2 の混合物に対して求められた式 (光路長 1 cm) (Jeffrey and Humphrey, 1975)

Chl a, Chl ($c_1 + c_2$) ($c_1 + c_2$ を区別しないで定量) (90% acetone, 光路長 1 cm)

$$[\text{Chl a}] = 11.47 A_{664} - 0.40 A_{630} \quad (\text{mg/ml})$$

$$[\text{Chl } (c_1 + c_2)] = -3.73 A_{664} + 24.36 A_{630} \quad (\text{mg/ml})$$

Chl a, Chl c_2 (渦鞭毛藻, クリプト藻) の場合 (100% acetone, 光路長 1 cm)

$$[\text{Chl a}] = 11.43 A_{663} - 0.64 A_{630} \quad (\text{mg/ml})$$

$$[\text{Chl } c_2] = -3.63 A_{663} + 27.09 A_{630} \quad (\text{mg/ml})$$

Chl a, Chl b, Chl ($c_1 + c_2$) の混合物の場合 (90% acetone, 光路長 1 cm)

$$[\text{Chl a}] = 11.85 A_{664} - 1.54 A_{647} - 0.08 A_{630} \quad (\text{mg/ml})$$

$$[\text{Chl b}] = -5.43 A_{664} + 21.03 A_{647} - 2.66 A_{630} \quad (\text{mg/ml})$$

$$[\text{Chl } (c_1 + c_2)] = -1.67 A_{664} - 7.60 A_{647} + 24.52 A_{630} \quad (\text{mg/ml})$$