



光化学系活性測定法

佐藤典裕・都筑幹夫

東京薬科大学生命科学部

192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

Norihiro Sato and Mikio Tsuzuki 1996: Measurement of activities of photosystems I and II. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 44:159-163.

Methods to measure activities of photosystems I and II in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, are described. These activities are determined with oxygen electrode through addition of artificial electron donor and/or acceptor to whole or sonicated cells. Protocol to isolate chlorophyll-protein complexes responsible for these activities is also shown. PSI complex, PSII core complex, and light-harvesting complex of PSII are separated without chlorophyll release by PAGE of thylakoid membranes in the presence of dodecyl- β ,D-maltoside.

Key Index Words: *Chlamydomonas reinhardtii*, dodecyl- β , D-maltoside, PAGE, photosystem I, photosystem II, thylakoid membranes.

はじめに

光合成は、光エネルギーを利用して酸化還元反応をひきおこし、ATPやNADPHにエネルギーを蓄えた後、有機化合物を合成する反応である。このうち、ATPやNADPHを得るまでは、チラコイド膜で行われる。チラコイド膜には光化学系I及びIIのタンパク質複合体があり、これらの複合体が光エネルギーを化学エネルギーに変換する。ここでの化学エネルギーとは、種々の物質にもたらされた還元状態であり、これらは電子を放出して酸化される。そのため、チラコイド膜で起こる一連の酸化還元反応を光合成電子伝達系という (Fig.1)。NADP⁺はこの電子伝達系の終点に位置して還元され、その電子伝達に伴って形成されるプロトンの濃度勾配を利用してATPが合成される。本稿では、光合成電子伝達系の光化学系I, 光化学系IIの活性測定法と各々の活性を担うタンパク質複合体の単離方法について紹介する。

1) 光合成の電子伝達系

光合成の電子伝達系は2つの光化学系を介して水からNADP⁺を結ぶ酸化還元物質からなる (Fig.1)。光化学系には、光エネルギーを受けて励起される集光性クロロフィルとそのエネルギーを受け取り、電子を放出する反応中心クロロフィルがある。どちらの型のクロロフィルも、タンパク質と結合しており、集光性クロロフィル・タンパク質複合体 (LHC)、反応中心クロロフィル・タンパク質複合体 (RC) を形成している。藻類や維管束植物では、反応中心クロロフィルは、クロロフィルaであり、集光性クロロフィルはクロロフィルaとbあるいはaとcである。なお、ラン藻や紅藻ではLHCの代わりにフィコビリソームが光を受ける。藻類ではカロチノイドやフコキサンチンも光を吸収しクロロフィルへそのエネルギーを渡す。まず、光化学系IIのLHCが光を受けるとLHCのクロロフィル間でエネルギーの受け渡しが起こり反応中心クロロフィルへ渡される。そこで電荷が分離し電子を放出する。これによって生じる強力な酸化力は、Z (RCを構成してい

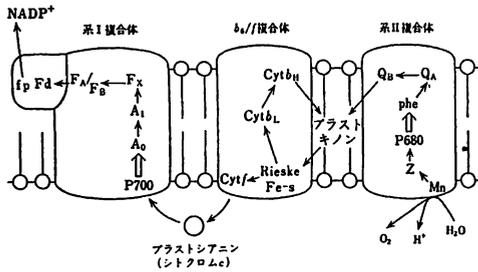


Fig.1 光合成の電子伝達系(佐藤和彦 1992. 光合成器の分子構築と機能, p.23. 宮地重遠(編) 光合成, 朝倉書店, 東京より一部を改変). 矢印は電子の流れを示す。P680: 光化学系II反応中心, P700: 光化学系I反応中心, phe: フェオオフィチン, Cyt: チトクローム, Fd: フェレドキシン, fp: フェレドキシン-NADP⁺酸化還元酵素。

るD1タンパク質のチロシン)やMnクラスターを通して水を分解し電子を引き抜く。この時、酸素が発生する。反応中心から放出された電子はフェオオフィチンから、Q_A、Q_Bといったキノン電子受容体の順番で伝達される。一方、光化学系Iでも、LHCが光を受け励起された反応中心は電子を放出し、A₀を還元する。その反応中心自身は光化学系IIより伝達されてきた電子により還元される。A₀へ渡された電子は、A₁(ビタミンK₁)やFX、F_A/F_Bといった鉄-硫黄クラスターなどを通して、最終的にはフェレドキシン-NADP⁺酸化還元酵素によるNADP⁺の還元を利用される(非循環型電子伝達)。また、電子の一部は光化学系Iに戻る(循環型電子伝達)。

このように光合成の電子伝達系は、水を電子供与体とし、NADP⁺を最終電子受容体とする多段階の酸化還元反応鎖である。従って、外部より適当な電子供与体と受容体を組み合わせて与えることにより、光合成電子伝達系の特定部分の電子伝達を人為的に行わせることができ、その活性を測定できる。

2) 光化学系IおよびIIの活性測定法

緑藻クラミドモナスは、主要色素としてクロロフィルa、bを有し、また、チラコイド膜の単離等、生化学的な操作が容易なため、高等植物の光合成のモデル系として古くから研究されてきた。また、従属栄養的に生育が可能で、かつ1倍体なので光合成に関する突然変異体が得やすく、その遺伝的解析も可能である。最近では、葉緑体ゲノムと核の形質転換系も開発され、その生物材料としての用途が、遺伝子操作を利用した

分子生物学の分野にまで広がっている。電子伝達活性は、主に、酸素電極による酸素の濃度変化の測定あるいは分光学的な測定により求められる。本稿では、クラミドモナスでの、酸素電極を利用した光化学系I及びIIの活性測定例を紹介する。

(a) 活性測定のためのストック溶液

1. 0.5 M Mes/Tris 緩衝液 pH 8.1

0.5 M Mes 緩衝液 pH 5.4 と 0.5 M Tris 緩衝液 pH 9.0 を混合し、pH 8.1 にする。

2. 100 mM 塩化アンモニウム。

3. 37 mM *p*-ベンゾキノロン

昇華させた*p*-ベンゾキノロン 20 mg, 蒸留水 5 ml. 測定日ごとに作成し、暗黒下で保存。*p*-ベンゾキノロンは、時計皿に取り、ガスバーナーで熱し昇華させる。この時、時計皿の上に冷やしたビーカー等を用意し、その底面に黄色の針状結晶を得る。ドラフト内で行うこと。

4. 30 mM フェリシアン化カリウム

5. 還元型2,6-ジクロロフェニルインドフェノール溶液 アスコルビン酸ナトリウム 200 mg, 2,6-ジクロロフェニルインドフェノール (DCIP) 3 mg, 蒸留水 10 ml. 測定日ごとに作成し、暗黒下で保存。

6. 2 mM メチルピオロゲン溶液

メチルピオロゲンはパラコートのことである。猛毒なので取り扱いに注意すること。

7. 100 mM シアン化カリウム。

1月毎に1回作成。

8. 3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチルウレア (DCMU) 4.2 mg, エタノール 1 ml, 蒸留水 99 ml

(b) 細胞の調整

細胞を遠心(3000・g, 5 min)で沈殿させ、緩衝液(50 mM Tricine pH7.5)に懸濁する。この際、クロロフィル濃度が60 μg・ml⁻¹となるよう調整する。この懸濁液をストックして活性測定に用いるが、クラミドモナスの場合、測定開始までの間に細胞が沈むと活性が低下してしまうので、スターラー等で攪はんを続ける。なお、細胞を光独立栄養的に育てると、対数増殖期、直線増殖期、定常期へと生育のステージが進み、それに伴いクロロフィルあたりの光化学系活性が下がっていく。筆者らは、最も活性の高い対数増殖期の細胞[充てん細胞体積(packed cell volume)で0.2-0.5 μl・ml⁻¹の細胞濃度]を用いて光化学系活性を測定して

いる。

(c) 測定

(c-1) 光化学系II活性

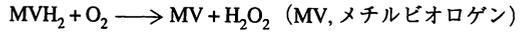
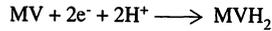
ここでは、水を電子供与体、*p*-ベンゾキノンあるいはフェリシアン化カリウムを電子受容体として光化学系II活性を測定する。なお、*p*-ベンゾキノンは膜透過性なので、活性測定には細胞をそのまま用いる。反応液組成は以下の通りである。12 µg Chl · ml⁻¹の細胞懸濁液、20 mM Mes/Tris pH 8.1, 300 µM *p*-ベンゾキノン、2 mM 塩化アンモニウム。活性は水の分解に伴う酸素発生から求める。また、膜非透過性であるフェリシアン化カリウムを電子受容体として用いる場合は、細胞をあらかじめ破碎し、チラコイド膜を露出させる必要がある。筆者らは、細胞懸濁液10 mlを15 mlのプラスチック遠心チューブに取り、氷上で冷やし、次いで、ソニケーター (UR-200P, トミー精工) で、90%以上の細胞が破碎されるまで処理している。細胞が壊れすぎると光化学系活性が落ちるので、光化学系II活性が最大になるソニケーターの出力、処理時間を調べる必要がある。この時の反応液組成は、12 µg Chl · ml⁻¹の細胞破碎液、20 mM Mes/Tris pH 8.1, 1 mM フェリシアン化カリウム、2 mM 塩化アンモニウムとする。

クラミドモナスの野生株では、*p*-ベンゾキノン、フェリシアン化カリウムを電子受容体とした場合、それぞれ約 300, 200 µmol O₂ · (mgChl)⁻¹ · hr⁻¹程度の活性が認められる。

(c-2) 光化学系I活性

ここでは光化学系I活性の測定に還元型の2,6-ジクロロフェニルインドフェノール (DCIP)、メチルピオロゲンそれぞれ電子供与体、電子受容体として用いた例を紹介する。これらの物質は膜透過性ではないので、細胞を破碎する。光化学系I活性が最大になるソニケーターの出力、処理時間をあらかじめ調べておく。なお、反応組成は以下の通りである。2.4 µg Chl · ml⁻¹の破碎した細胞懸濁液、20 mM Mes/Tris 緩衝液 pH 8.1, 21 µM DCIP, 2 mM アスコルビン酸ナトリウム、80 µM メチルピオロゲン、6 µM DCMU, 0.4 mM KCN, 2 mM 塩化アンモニウム。活性はメチルピオロゲンの再酸化に伴う酸素吸収から求める。また、光化学系IIでは、酸素1分子の発生につき、4個の電子が水より引き抜かれるが、当量の電子が光化学系Iに伝達されると、2分子の酸素が吸収されることになる (次式参照)。なお、DCMUとシアン化カリウムは、それぞれ光化学系IIとカタラーゼによる酸素発生を阻害し、塩

化アンモニウムは脱共役する。



3) 光化学系I複合体および光化学系II複合体の単離方法

光化学系II複合体等のクロロフィルとタンパク質の複合体は、チラコイド膜からイオン交換クロマトグラフィー、シヨ糖密度勾配遠心法、ポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) 等を利用して単離してきた (例、de Vitry *et al.* 1991)。これらの方法で複合体が精製された結果、各複合体におけるサブユニットや色素の組成、光化学反応に携わる因子の同定、複合体の構造解析が進化した (例、Ikeuchi 1992)。前二者の方法に比べ、PAGEを用いた方法には、ゲル上に複数の複合体を高い解像度で分離し、それらを同時に精製できる利点がある。これまでのPAGEでは、チラコイド膜を可溶化する際や界面活性剤をゲルに添加する際に、リチウムドデシル硫酸やオクチルグルコシド等を使用してきた。しかし、これらの界面活性剤は、タンパク質複合体からクロロフィルを遊離し、また複合体のサブユニット間の結合を著しく破壊するという欠点がある。そこで、私たちはよりマイルドな方法として、クラミドモナスのチラコイド膜をドデシル-β, D-マルトシド (DodGlc₂) で可溶化し、ポリアクリルアミド電気泳動にかけた結果、光化学系の複合体がクロロフィルを遊離せずに、またサブユニット数もある程度保持した状態で単離されるようになった (Sato *et al.* 1995)。

(a) チラコイド膜の単離と可溶化

まず、シヨ糖密度勾配遠心を用いたクラミドモナスのチラコイド膜精製法を紹介する (Chua and Bennoun 1975)。全ての操作は低温 (0-4°C) で行う。11の細胞培養液を遠心し (2,500 · g, 5 min)、細胞を沈殿させる。0.3 M シヨ糖、25 mM Hepes/KOH pH 7.5, 1 mM MgCl₂ を含む緩衝液で洗浄後、同じ緩衝液20 mlで懸濁する。細胞をソニケーター (あるいはフレンチプレス、ガラスビーズ等) で破碎し、破碎液を遠心 (2,000 · g, 10 min) にかける。可溶性タンパク質やミトコンドリア等を含む上清を除き、沈殿をガラスホモジナイザー等を使い、0.3 M シヨ糖、5 mM Hepes/KOH pH 7.5, 10 mM EDTAを含む緩衝液20 mlに懸濁する。これにより、チラコイド膜のスタッキングをなくし、Ca²⁺依存性

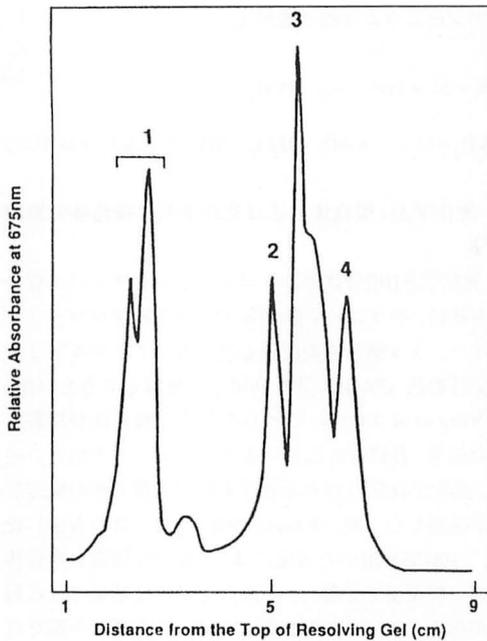


Fig.2. クラミドモナスのチラコイド膜の DodGlc₂/PAGE 12.5 μg Chl を含むチラコイド膜を DodGlc₂/PAGE (ディスクゲル) につけ、主に4種のクロロフィル-タンパク質複合体のバンドを得た。

ATPaseやトラップされた澱粉粒を放つ。次いで、遠心 (50,000 · g, 10 min) により沈殿した膜を1.8 M ショ糖, 5 mM Hepes/KOH pH 7.5, 10 mM EDTA を含む緩衝液 15 ml に懸濁する。この懸濁液 5 ml に, 1.3 M ショ糖, 5 mM Hepes/KOH pH 7.5, 10 mM EDTA を含む緩衝液 2 ml, 0.5 M ショ糖, 5 mM Hepes/KOH pH 7.5 を含む緩衝液 5 ml を順に上層し, 遠心 (160,000 · g, 1 hr) にかける。この結果, チラコイド膜と眼点が, 各々 1.3 M と 0.5 M ショ糖層に浮上する。チラコイド膜を回収し, 5 mM Hepes/KOH pH 7.5, 10 mM EDTA を含む緩衝液で4倍に希釈し, 使用するまで -80°C で保存する。

単離したクラミドモナスのチラコイド膜を, クロロフィルの終濃度が 0.5 mg · ml⁻¹ になるように, 0.5% DodGlc₂, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM NaCl の緩衝液で, 1時間, 可溶化する。次いで, 不溶画分を遠心 (5500 · g, 5 min) で沈殿させる。チラコイド膜を可溶化する際の DodGlc₂ の濃度は, 至適濃度領域が狭く, 高すぎると複合体が分解し, 逆に低すぎると複合体が充分には可溶化されないの, 注意を要する。

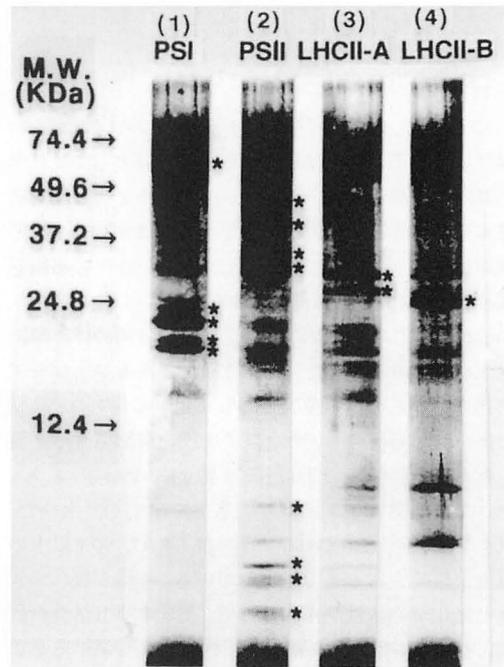


Fig.3. クラミドモナスの各クロロフィル-タンパク質複合体の SDS/PAGE

12.5 μg Chl を含むチラコイド膜の DodGlc₂/PAGE (ディスクゲル) で得られた各クロロフィル-タンパク質複合体のバンド (Fig. 2, 1-4) を切り出し, SDS/PAGE につけ, サブユニット組成を調べた。各複合体に特異的に検出されるタンパク質 (星印) は, バンド 1, 2 がそれぞれ光化学系 I 複合体, 光化学系 II コア複合体であり, またバンド 3, 4 は共に光化学系 II の LHC であることを示している。

(b) ドデシルマルトシド電気泳動

上清を以下の要領でディスクあるいはスラブ電気泳動にかける。なお, ゲルに載せるクロロフィルは, 0.64 μg Chl · mm² 以下とする。

濃縮ゲル: 2.5% (weight/vol.) アクリルアミド, 62 mM Tris/HCl pH 6.7, 0.01% (weight/vol.) DodGlc₂
 分離ゲル: 5% (weight/vol.) アクリルアミド, 375 mM Tris/HCl pH 8.9, 0.01% (weight/vol.) DodGlc₂
 電極用緩衝液: 5 mM Tris, 38 mM グリシン

電気泳動用のゲルとして, 複合体のサブユニット組成の分析等, サンプルが少量で済む場合には, ディス

クゲル (長さ 5 cm, 直径 0.5 cm) を, また複合体に結合している脂質の分析等, サンプルを大量に必要とする場合には, スラブゲル (8.2X13.8X0.8 cm³) を使う。電気泳動は, 暗条件下, 先端の緑色のバンドが分離ゲルから流出する前に終える。ディスクゲル, スラブゲルでは各々, 100 V, 200 V の定電圧条件下, 低温下 (0-4°C) で行うが, 温度上昇による複合体の分解, あるいはクロロフィルの遊離を抑えるため, 泳動中のゲルの温度には注意が必要である。

Fig.2 は, ディスクゲル電気泳動後のゲル上でのクロロフィルのバンドの分布を 675 nm のクロロフィルの吸収で示したものである。主に 4 つのバンドが認められ, いずれもタンパク質との複合体である。各バンドの SDS 電気泳動によるサブユニット組成 (Fig.3) は, 移動度の大きいものから順に, 光化学 I 複合体, 光化学系 II コア複合体, 及び 2 種類の LHCI であることを示している。

なお, 各複合体をゲル中から精製するには, まず複合体を含むゲルを切り出し, 20 mM Tris/HCl pH 7.8 の緩衝液中でホモジナイズする。次いで, 遠心 (20,000-g, 30 min) にかけて, ゲル片を沈殿させ, 上清を更に超遠心 (160,000 g, 12 h) にかける。得られた沈殿を 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 M スクロースの緩衝液に懸濁し, -80°C で保存する。

DodGlc₂/PAGE で精製した光化学系複合体の色素や光化学活性の詳細な解析はまだ進めていないが, 精製の過程でクロロフィルが遊離しないことから想像できるように, いわゆる境界脂質と呼べるものも保持されている (Sato *et al.* 1995)。DodGlc₂/PAGE により単離された光化学系複合体は, チラコイド膜の機能発現における脂質の役割を解明する糸口になるのではと考えている。

4) おわりに

本稿では, 光化学系活性の最も基本的な測定方法を紹介したが, 既に種々の人工的な電子受容体, 電子供与体が見いだされており, 光化学系活性のみならず,

光合成電子伝達系の他の部位の活性も詳細に測定できる。またチラコイド膜の DodGlc₂/PAGE は, クロロフィルを遊離せずに光化学系複合体を分離できるので, 複合体レベルでの光化学系の量を正確に知ることが可能である。光化学系活性は, 植物の生理状態を知る 1 つの指標であり, 温度や光の環境要因等で変化することが示されてきた。そして, この DodGlc₂/PAGE により, 複合体レベルでの光化学系の量的及び質的変動の追跡が可能となった。なお, ここでは触れなかったが, クロロフィル蛍光を用いて光化学系 II の状態を知る方法もある。Holmes らの論文 (Holmes *et al.* 1989) が参考となろう。

謝辞

本稿は, 川口昭彦博士, 園池公毅博士のご指導のもとで行った研究をもとにしている。この場を借りて, お礼を申し上げます。

参考文献

- 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. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2175-2179.
- de Vitry, C., Diner, B. A. and Popot, J. L. 1991. Photosystem II particles from *Chlamydomonas reinhardtii*: purification, molecular weight, small subunit composition, and protein phosphorylation. J. Biol. Chem. 256, 9300-9307.
- Holmes, J. J., Weger, H. G. and Turpin, D. H. 1989. Chlorophyll a fluorescence predicts total photosynthetic electron flow to CO₂ or NO₃⁻/NO₂⁻ under transient conditions. Plant Physiol. 91, 331-337.
- Ikeuchi, M. 1992. Subunit proteins of photosystem II. Bot. Mag. Tokyo 105, 327-373.
- Sato, N., Sonoike, K., Tsuzuki, M. and Kawaguchi, A. 1995. Impaired photosystem II in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in sulfoquinovosyl diacylglycerol. Eur. J. Biochem. 234, 16-23.

