

解説

分光電気化学法を用いた光合成電子伝達成分の酸化還元電位計測

東京大学生産技術研究所

加藤祐樹、仲村亮正、渡辺 正

1. はじめに

酸素発生型光合成生物は、アンテナ色素が捕捉した光エネルギーを光化学系 I、II の反応中心に集め、光誘起電荷分離と一連の電子移動を引き起こす。チラコイド膜上に配列された電子伝達成分は高速電子移動を行い、量子収率が 90% を超える高効率な光→化学エネルギー変換を進める。

光合成系の高速度電子移動は、機能分子間の距離、配向（分子軌道の重なり）、電子エネルギー準位相関（エネルギー差）が生み出す。近年の X 線結晶構造解析の進歩で、距離・配向が明らかになりつつあり、また遺伝子工学的な研究が、電子伝達成分の空間的配置を支えるタンパク質の役割を明らかにしてきた。しかし、電子エネルギー準位相関という物理化学的な側面は、まだ不確定な部分が多い。

本稿では、電子エネルギー準位相関を決める重要なパラメータの酸化還元電位につき、測定原理と手法を解説し、我々が取り組んでいる光化学系 I 一次電子供与体 P700 の酸化還元電位を中心に、得られた知見と計測法の有用性を紹介したい。

2. 電子伝達成分の酸化還元電位相関

電子伝達成分は、酸化還元電位を縦軸にとって並べると、図 1 のような Z スキームと呼ばれる相関図で表される。電子は、エネルギー準位が負なほど不安定であり、エネルギーが高いから、電位軸の上方を負にとれば、物体の落下と同じイメージで電子が伝達する様子を描ける。上向きの電子移動にはエネルギー供給が必要だが、光化学系 I、II それぞれの一次電子供与体 P700 と P680 のみが光励起されることで、電子のエネルギーがたたき上げられ、還元力が高められている。同時に生じる正孔が酸化力となり、PS II では水を酸化するほどの酸化力が発生していると考えられる。

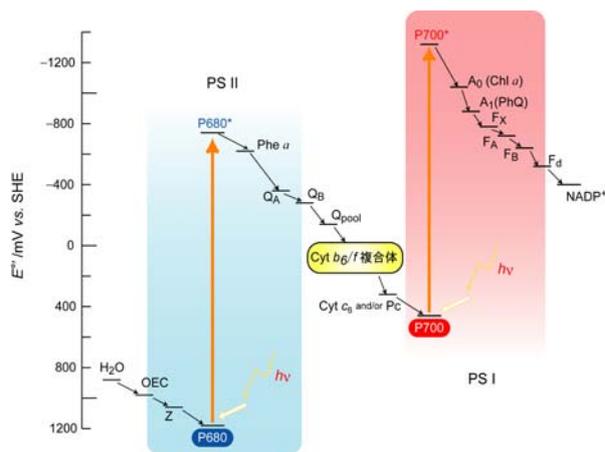


図 1 光合成電子伝達系の電子エネルギー準位相関 (Z スキーム)。電子伝達成分をそれぞれの酸化還元電位 E^* をもとにして並べてある。

電子のエネルギー準位と反応とは以下に示す関連性がある。一連の電子伝達の反応は、それぞれの成分間での酸化還元反応が連続したものとみなせる。そこで、A（電子供与体）から B^+ （電子受容体）への一電子移動を考える。



この酸化還元反応は次の 2 つの半反応に分けて捉えることができる。



酸化還元反応は平衡反応であり、この 2 つの半反応は常に完全に進行するわけではないから、反応の進み具合は熱力学的平衡状態を考える必要がある。もう少し一般化して、次式で表される酸化体 Ox と還元体 Red の平衡状態を考える。



この反応に関わる電子のエネルギー準位（電位）を E とすると、Ox、Red それぞれの活量は次に示すネルンストの式で関係付けられる。

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a(\text{Ox})}{a(\text{Red})} \quad (5)$$

平衡反応(4)の標準状態、すなわちOxとRedがいずれも活量1の状態を考えると、右向きと左向きの反応速度がつり合うが、そのとき $E = E^\circ$ であり、この電位を標準酸化還元電位 (standard oxidation-reduction potential) と定義とする。電気化学の世界では、電極を介して議論するので標準電極電位と呼んでおり、他に標準レドックス電位 (standard redox potential) や標準電位 (standard potential) などとも呼ぶ。また、ネルンスト式から分かるように、反応に関わる電位 E は、 E° を中心とする領域を取りうるものだから、 E° は反応のおおよそのエネルギー準位を表す指標となる。

反応(1)に話を戻す。ギブズエネルギー変化 ΔG は2つの半反応式(2)、(3)の電子エネルギー準位差 (電位差) $\Delta E (=E_B - E_A)$ と次の関係にある。

$$\Delta G = -nF\Delta E \quad (6)$$

したがって反応が進む、すなわち $\Delta G < 0$ となるためには、 $E_B > E_A$ とならなければならないことが分かる(図2)。しかし、 ΔG が負で絶対値が大きければ、すなわち ΔE が大きければ、反応しやすい(反応速度が速くなる)というわけではない。反応速度を考える際には、反応の活性化エネルギーを考慮に入れる必要がある。 ΔE が大きすぎるとマーカスの逆転領域とよばれる状態におちいり、かえって反応速度は低下する。また、 ΔE が小さいと逆反応が起こりやすくなるから、反応効率は低下する。したがって、光合成の電子伝達系は巧妙な電位の調節がなされていると考えられる。

さて、Z スキームは各電子伝達成分の酸化還元電位をもとにしているものだが、すべての電位が実測されているわけではない。これまでに、PS II の電子アクセ

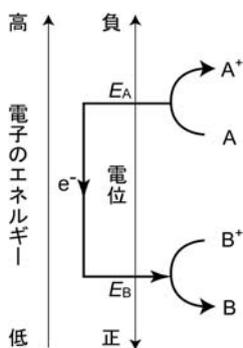


図2 酸化還元反応に伴う電子授受。電子のエネルギー準位は反応によって異なり、電子はエネルギーの高い方から低い方へ移る。

プターである Pheo *a* と Q_A 、Cyt *b₆/f* 複合体、電子伝達タンパク質である Cyt *c₆* と Pc、鉄-硫黄センター (F_A 、 F_B)、そして P700 ぐらいが実測されているに留まり、あとのものはこれらの実測電位を基に電子移動反応速度などから計算されるエネルギー差により見積もられているにすぎない。エネルギー差の計算も、電子移動反応速度は、冒頭に述べたように、電位差だけではなく距離や配向という要素を含んだパラメータであるし、多くの成分は2つ以上の近接する成分との間で生じる電子移動も考えなければならないから、反応モデルをもとにした近似値であることに注意しなければならない。

さらにいえば、実測されている酸化還元電位も、研究者によって報告値が異なっているのが現状で、またその多くには誤差が含まれていることは否めない。ゆえに、我々が知っている電位というのはおおよそのものに過ぎないであろう。このことを次の項で、P700 を例に挙げて、取り上げてみたい。

3. P700 の酸化還元電位

P700 の酸化還元電位は、過去 40 年以上に渡って調べられており、数多くの報告がある¹⁾。表1にこれまでに報告されている P700 の酸化還元電位をまとめた

表1 これまでに報告されている P700 の酸化還元電位

Author(s) [Year (reference)]	Sample (treatment)	E° mV vs. SHE
Kok [1961 (2)]	Spinach (acetone extracted)	+430
Beinert <i>et al.</i> [1962 (3)]	Red algae (acetone extracted)	+430
Yamamoto and Vernon [1969 (4)]	Spinach (Triton X-100)	+480
Thorber and Olson [1971 (5)]	Green algae (SDS)	+380-420
Knaff and Malkin [1973 (6)]	Spinach (digitonin)	+520
Ke <i>et al.</i> [1975 (7)]	Spinach (Triton X-100)	+468
Ikegami <i>et al.</i> [1976 (8)]	Spinach (ether, digitonin)	+400
Evans <i>et al.</i> [1977 (9)]	Spinach (Triton X-100)	+375
Malkin [1978 (10)]	Pea (EDTA)	+385
Sétif and Mathis [1980 (11)]	Spinach (EDTA)	+492
	Spinach (Triton)	+469
	Spinach (digitonin)	+494
	Spinach (Triton, LDAO, SDS)	+459
	Spinach (SDS)	+431
	Nicotiana (SDS)	+421
Ikegami and Katoh [1989 (12)]	Cyanobacteria (ether, Triton X-100)	+355
Hamachar <i>et al.</i> [1996 (13)]	Cyanobacteria (DM)	+460
Kievit and Brudvig [2001 (14)]	Cyanobacteria (DM)	+468

が、+360 mV ~ +520 mV (vs. SHE、以降の電位はこれを基準とする)と 160 mV 以上におよぶ“ばらつき”がある。この原因として、試料分画法の違いや測定精度の限界にあるのではないかと考えられる。多くの報告は、ホウレンソウに関するものだが、1980 年に Sétif がまとめているように、界面活性剤処理によって P700 のレドックス電位が異なるとしている。しかし、それだけで物理化学的な面からすると決して小さいとはいえない“ばらつき”の説明がつくようにも思えない。そこで、我々は測定法を見直し、酸化還元電位を精密に測定できる条件の確立を目指した。

4. 酸化還元電位とは

測定法を説明する前に、酸化還元電位についてももう少し説明を加えておきたい。

2で説明したように、 E° は平衡反応(式(4))において、OxとRedがいずれも活量1の状態における電位である。このことを熱力学的に記述するには、OxとRedについては標準生成ギブズエネルギー $\Delta_f G^\circ$ を用いる。電位 E° にある電子 ne^- のエネルギーは、「電気エネルギー=電荷量×電位」の関係により、ファラデー定数 F (=96,458 C mol $^{-1}$)を使って $-nFE^\circ$ と書ける。すると次式が成り立つ。

$$\Delta_f G^\circ(\text{Ox}) - nFE^\circ = \Delta_f G^\circ(\text{Red}) \quad (7)$$

$$E^\circ = -\frac{\Delta_f G^\circ(\text{Red}) - \Delta_f G^\circ(\text{Ox})}{nF} \quad (8)$$

式(8)右辺の $\Delta_f G^\circ(\text{Red}) - \Delta_f G^\circ(\text{Ox})$ は標準反応ギブズエネルギー $\Delta_r G^\circ$ とみなせるから、 $\Delta_r G^\circ < 0$ のときには右(還元)方向に、 $\Delta_r G^\circ > 0$ のときには逆向きに、反応式(4)の平衡がずれる(反応が進行する)と解釈できる。いいかえれば、 E° が負で絶対値の大きい酸化還元対ほど反応が左(酸化)方向にずれる、すなわち電子を放出しやすい系といえる。 $\Delta_r G^\circ$ は重要な熱力学的パラメータで、膨大な量が蓄積されているから、 $\Delta_r G^\circ$ をもとに E° の多くが計算されている($\Delta_r G^\circ$ 、 E° とも化学便覧などに記載されている)。したがって、 E° が既知ならば、電子授受の方向(図2参照)をある程度予測が可能となる。

公表されているデータをみてみると、 E° がもっとも負であるのは、Li $^+$ /Li系の-3.045 Vがあるが、Liが強力な還元剤なのはこのことからいえる。後述する酸化還元滴定でよく使われる還元剤であるジチオナイト

(亜二チオン酸ナトリウム: Na $_2$ S $_2$ O $_4$)は、 $2\text{SO}_3^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} + 2e^- \rightleftharpoons \text{S}_2\text{O}_4^{2-} + 4\text{OH}^-$ の平衡反応となり、その E° は-1.13 Vである(ただし、アルカリ性のときに還元力が高いことに注意されたい)。酸化剤として使われるフェリシアン化カリウム(K $_3$ [Fe III (CN) $_6$])だと、平衡反応 $[\text{Fe}^{III}(\text{CN})_6]^{3-} + e^- \rightleftharpoons [\text{Fe}^{II}(\text{CN})_6]^{4-}$ が成立し、 E° は+0.361 Vである。

さて、標準状態から平衡がずれたときの物質の活量と電位の関係を表したものがネルンスト式であることを2でみてきた。活量は濃度に近似できるから、P700の一電子授受が伴う酸化還元平衡は次式をもとに考えればよい。

$$E = E^\circ + \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{P700}^+]}{[\text{P700}]} \quad (9)$$

この場合、厳密に言えば、 E° は $[\text{P700}] = [\text{P700}^+]$ の場合の系の電位であり、また現実の系は標準状態とは違って周囲からの影響(例えば溶液なら溶媒との相互作用)があるため、理論値とは異なる。したがって、測定される E° は E° と表し、式量電位あるいは形式電位(formal potential)と呼ぶ。他に中点電位(midpoint potential)や単に酸化還元電位と呼ばれるが、我々はこれを求めているのである。

また、ネルンスト式をみると、Ox (Red) を多く加えれば、系の電位は正(負)に変化するし、逆に系の電位を正(負)にすれば、Ox (Red) の割合が増えるのが分かるだろう。したがって、系の電位をなんらかの方法で変化させ、その際の P700 の濃度変化を調べられれば、得られる電位と濃度の相関関係から $[\text{P700}] = [\text{P700}^+]$ となる電位を求めればよい。系の電位の制御を、酸化剤・還元剤を加えて行うのが酸化還元滴定法と呼ばれ、電気化学的手法では、電極と電気化学装置を用いて行う。

5. 酸化還元滴定法

光化学系の中では、電子伝達成分はアンテナ色素に対してごく微量で単に吸収スペクトルを測定したのでは検出できないが、幸い P700 など光合成の電子伝達系は酸化・還元状態にもなって大きく分光特性が変化するので、酸化還元反応前後の吸収スペクトル変化や蛍光強度の変化から酸化体、還元体の濃度を調べることができる。他に、過度吸収測定や EPR 測定を組み合わせて、目的成分の酸化・還元状態を調べるという方

法もある。酸化剤・還元剤を用いて目的とする成分を酸化・還元させて、同時に分光学的情報を得ることで酸化還元電位を求める方法を酸化還元滴定法 (oxidation-reduction titration または redox titration) という。本稿では、可視光吸収分光法と組み合わせた滴定法についてみていくことにする。

滴定法でもっともシンプルなのは、フェロシアン化物イオン/フェリシアン化物イオン ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$) 酸化還元対を用いる方法である。フェロシアン化/フェリシアン化カリウムを溶液に加えるとそれぞれ安定した陰イオンが得られるから、添加量比を調節することにより、ネルンスト式に応じて系の電位を変化させられるので、酸化還元対より少量の (目的とする) 成分を酸化・還元できる。 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ の E° 、すなわち両者の濃度が同じ場合の電位は、サンプル溶液の pH にもよるが、pH = 7 で +430 mV であるから、ネルンスト式と添加量比から電位を間接的に知ることができる。したがって、フェロシアン化/フェリシアン化カリウムの添加量比とサンプル溶液の吸光度から、目的とする成分の酸化還元電位を見積もることができる。この方法は、特に $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ の E° に近い酸化還元電位をもつ P700 や Cyt c_6 、Pc などに有効で、報告例のいくつかはこの方法により求められている。

同じ滴定法でも、電極と電位差計 (ボルトメーター) を用いれば系の電位を直接調べられる。電極一つでは電位を計れないので、基準となる電極 (参照電極、基準電極などという) に対してもう一本電極を系に導入し (作用電極という)、作用電極上における系の平衡電位と参照電極の電位との差を計測する。作用電極には、系との電子授受が素早いものが望ましく、白金がその代表例である。参照電極は、銀-塩化銀電極やカロメル電極 (saturated calomel electrode: SCE) などが一般的である。参照電極と作用電極を複合化した ORP (oxidation-reduction potential) 電極と称するものが市販されており、pH メーターと接続して電位を測定することもできる。pH メーターあるいはボルトメーターは入力インピーダンスが大きくないと ($10^{12}\Omega$ 程度が望ましい)、電流が流れて IR 降下が生じるため、正確な電位測定はできない (したがって、“テスター” は不可)。極端な場合は、参照電極と作用電極の電位差が無くなるように電流が流れ続ける (系は平衡とならない)。入

力インピーダンスが大きい測定装置を用いれば、測定装置にはわずかな電流が流れるだけで、瞬時に参照電極、作用電極上で電気化学的平衡が成り立つから、系の平衡電位を調べられる。このようにして測定される電位を開回路電位 (open circuit potential) という。酸化還元電位を調べるには、酸化剤・還元剤を加えてさまざまな電位における電子授受平衡状態を作り出した上で、この開回路電位を測定する必要がある。

また、作用電極と目的とする成分との平衡をすみやかに達成するために、適当な電子メディエーターを加える。種々の E° をもつメディエーターがいくつかあるが、系中の電子授受平衡を考慮に入れると機能する電位領域はおおよそ $E^\circ \pm 120 \text{ mV}$ 程度であるから、目的成分の E° に応じて選択する必要がある。広い電位範囲にわたって滴定を行う場合には、 E° の異なる複数のメディエーターを共存させる。このあたりのことは成書¹⁵⁾を参考にされたい。

こうした電極を用いた滴定法は、酸化還元平衡法 (redox poisoning method) や電位差滴定法 (redox potentiometry) などと呼ばれている。測定には図 3¹⁵⁾のようなセルが用いられる。目的物を酸化・還元するには、酸化剤・還元剤をマイクロシリンジなどを用いて測定セルに少しずつ加える。系全体を平衡にするために、攪拌などして系全体を均一にする。酸化剤には 0.1 M 程度のフェロシアン化カリウム溶液、還元剤には 0.01 M の水酸化ナトリウム溶液に 0.05 M 程度のジチオナイトを溶解したものがよく用いられる。他に、アスコ

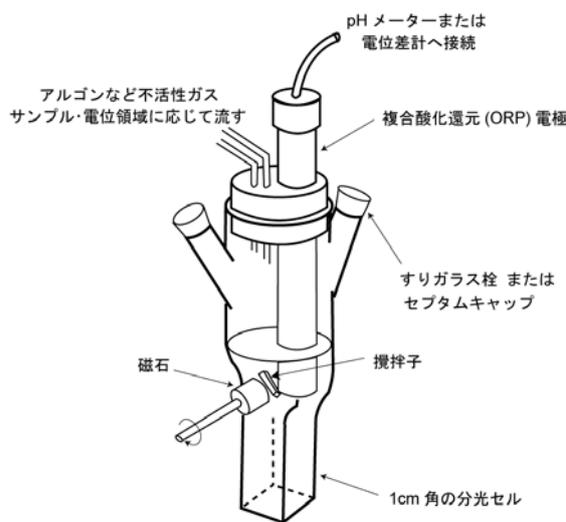


図 3 電極を用いた酸化還元滴定測定に用いるセルの一例。教科書¹⁵⁾などを参考にして作図。

ルビン酸やジチオスレイトールなども対象とする成分の電位領域によっては用いられるが、いずれにしてもサンプル溶液の pH 緩衝能を十分高くしておくことが必要である。こうして、酸化剤・還元剤を加え、電極上の平衡電位と吸光度変化を同時に測定することにより、各電位における目的とする成分の酸化還元状態が調べられる。

6. 正確に酸化還元電位を測定するためには

酸化還元滴定法により酸化還元電位を正確に求めるには、系全体の酸化・還元雰囲気をつくりだせるだけ速やかに均一にして平衡化させ、かつその電位を正確に知ることになるであろう。しかしながら、実際はどうだろうか。酸化還元滴定法で、一番の問題となるのは、酸化・還元剤を滴下してから目的成分の酸化還元状態が平衡に達するのを見極めることにあるのではなかろうか。平衡の見極めは、分光測定で吸光度変化を観測して行うが、系全体が平衡に達するのに時間が掛かるようであれば、吸光度は時間とともに自然に変化するから、いつ測定値をよみとればいいのか分かりづらくなってしまふ(後述する分光電気化学測定でも同じ)。また、論文によっては、数 mV 刻みで吸光度を測定し、非常に多くの点数からなるネルンストプロットが報告されているが、酸化剤あるいは還元剤を滴下し、吸光度が変わっていく様子と電位変化を連続的に調べているのではないか、と思われるものもある。そうした場合だと本来の“開回路電位”を計測しているのか、疑問が付きまとう。

吸光度変化を正確に調べるには、ベースラインが完全に安定していなければならないが、測定に時間が掛かるようであれば、その変化も考慮に入れなければならない。酸化・還元剤を加えていけば変化することも考えられるから、目的成分と酸化・還元剤の濃度にも注意しなければならないであろう。目的成分の吸光度変化が大きい場合には、こうした誤差は小さいかもしれないが、キノン類やシトクロム類など吸光度変化が小さい場合は、誤差は無視できないものとなり、注意を要する。また、系全体を攪拌するなどして均一にしても、特に PS I や II など可溶化するために界面活性剤を用いた懸濁液では、泡立てないように気をつけないければならないから、攪拌の速さも制限される。したがって、測定容器の大きさによっても平衡化に掛かる

時間は変わってくるであろうし、滴下する酸化・還元剤の濃度や種類によっても変わってくることも考えられる。一測定にだいたい数時間掛かるのが平均的なようだが、測定時間が長いと、目的成分によっては一部が失活してしまう可能性もある。したがって、測定時間が長いほど、誤差が生じる傾向にあるものと考えられる。

さらに、P700 の酸化還元電位測定に限っていえば、酸化剤としてよく用いられるフェリシアン化カリウムだと、Sétif らが報告しているように、系中の P700 を完全に酸化できず、過剰に加えても 90%程度しか酸化できないようである¹¹⁾。これは、 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ の E° が P700 のレドックス電位に比べてやや低いことと、系にフェリシアン化物イオンだけを滴下したとしても、熱力学平衡状態ではわずかに還元されてフェロシアン化物イオンも生成しているためだと考えられる。よって、P700 の定量を正確にできないから、電位と濃度の相関には、分光学的に測定された結果と実際とはずれが生じることになる。

以上挙げられるだけでも、実験を行う際に考慮すべき要素が多いと思われるが、研究者や実験条件によって値が異なってくるのもこうしたところに理由があるのではなかろうか。

7. 電気化学装置を用いて電位を制御する^{16,17)}

酸化還元滴定法では、酸化・還元剤によって系の電位を変化させることはできるが、あくまで「変化させる」であり、任意で制御することは(特にメディエーターを混在させている場合)ほぼ不可能である。それに対して、電気化学装置を使えば任意の電位に瞬時に変化させ、制御できる。電気化学的手法の最大の利点はここにある(もう一つの利点は、反応(速度)を電流として精密に取り扱えることにある)。電気化学装置のもっとも汎用的なものにポテンショスタットというものがあつ、これを使えば参照電極に対して作用電極の電位を 0.1 mV の精度で制御できる。電位を変化させて電極上で反応を進行させる(平衡をずらす)とその際に電流が流れるが、参照電極ではなく対極(対電極、補助電極などともいう)というもう一つの電極を用いてそちらに電流を流すことで、常に作用電極の電位は参照電極に対する電位として制御できる。電気化学測定は、こうした 3 電極式の系で行う。

それでは、図 3 のセルにもう 1 本の電極を加えて、

ポテンシオスタットを用いれば、系全体の電位を制御できるのだろうか。注意しなければならないのは、あくまで制御できるのは、「電極の電位」である。そして反応系は、電極表面近傍でのみ電極電位に応じて反応が進行させられているのであり、電子授受が速ければネルンスト式に従った濃度変化が生じているのである。具体例として図4に、 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ のような電子授受の速い酸化還元対の電極電位に対する濃度変化の様子¹⁶⁾を模式的に示す。電極電位を図4(A)のように制御し、その際に電極上で生じる反応の「応答」を電流で観測する方法をサイクリックボルタンメトリー

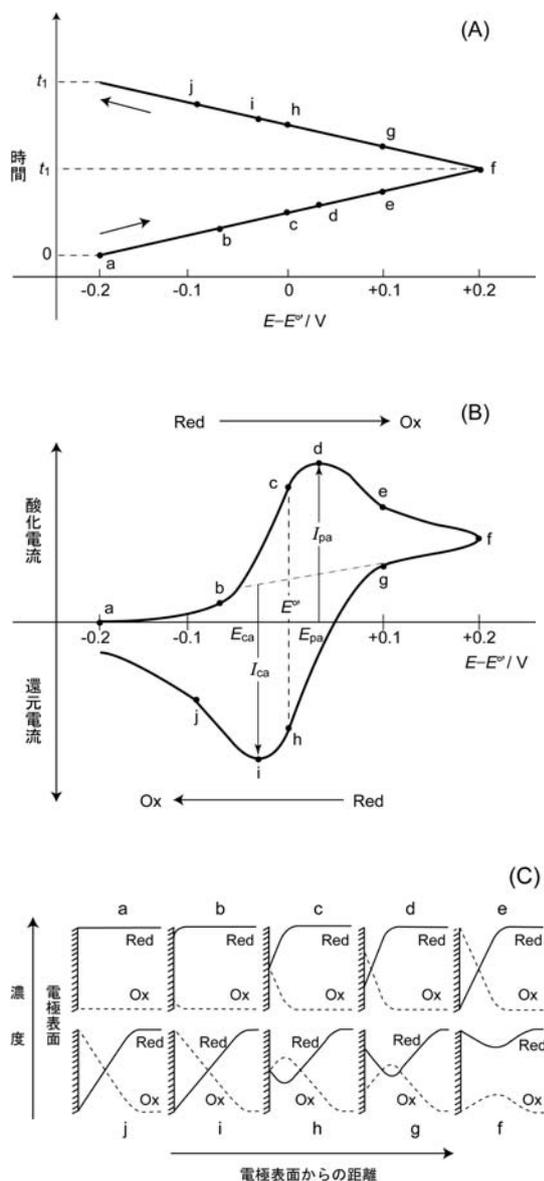


図4 電位走査(A)による電流応答 (ボルタモグラム) (B)および各点a~eにおけるRed・Oxの濃度プロファイル(C)。教科書¹⁶⁾を参考に作図。

というが、電子授受が速い系だと図4(B)の下部に示したような電位-電流曲線 (ボルタモグラムという) が観測できる。酸化還元電位 E° は酸化電流ピークと還元電流ピークの中点の電位として求められるが、それではいったい反応系はどのようなになっているのだろうか。

電極近傍の酸化体・還元体の濃度プロファイルは図4(C)のようになり、電極表面では濃度比がネルンスト式に従って変化する。しかし、電極から離れたところ (バルク) では、濃度はほとんど変化しないのである。バルクと電極表面の間に注目すれば、濃度は連続的に変化して勾配ができており、この勾配を拡散層という。観測されるボルタモグラムにはこの拡散層によって生じる電流も含まれるため、必ずしも電位-電流の一義的な相関ではないことに注意しなければならない (だから、大雑把に言えば、電流ピークを示す電位 E_{pa} 、 E_{ca} と E° は異なる)。ちなみに、クロロフィルなどの単分子やシトクロム類などわりと小さいサイズのタンパク質なら拡散が速いので、こうしたサイクリックボルタンメトリーから酸化還元電位を調べられるが^{18,19)}、PS Iなどの超分子複合体だと測定は困難になる。サイクリックボルタンメトリーにより P700 の酸化還元電位の測定を試みた報告が一件あるが¹⁴⁾、電流応答は小さいものであり、またボルタモグラムから酸化還元電位が求められたとしても、P700 以外に反応種を含む PS I のような複合体だと電流-電位曲線だけでは反応種の特定はできない。

それでは、電極電位を一定にすればどうだろうか。例えば、+0.1 V (図4のe) では、電極表面では Red は完全に酸化されているが、はたしてバルク中に存在する全ての Red を完全に酸化できたりするのだろうか。電位を一定にすると、図5に示したように拡散層が広がっていくから、時間をかければ系全体まで広げられ

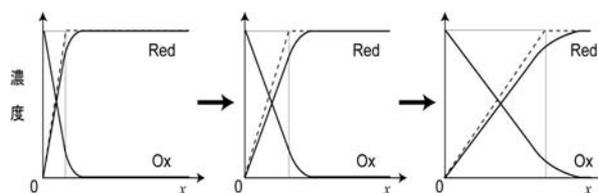


図5 電極反応が進むにつれて拡散層の厚みδが広がる様子。点線は拡散層に対するネルンストの仮定モデル。

るように思えるかもしれない。拡散層の時間変化を考えてみると、物質の拡散係数を D_0 とし、物質濃度が直線的に (図 5 の点線のように) 変化していくと仮定すれば、拡散層の厚み δ は $\delta = (\pi D_0 t)^{1/2}$ という時間 t の関数で表せる^{17a)}。水溶液では、分子やイオンはだいたい $D_0 = 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ なので、例えば 10 秒で 180 μm 程度の厚みが形成される。逆に厚み 1 cm になるには 3000 秒 (50 分) ほどかかる計算になるから、だいぶ時間が掛ければ系全体を・・・と考えるかもしれないが、実際には対流の影響で厚みは 0.05 cm 程度で頭打ちとなる。したがって、攪拌したとしても、図 3 のようなセルで系全体の酸化還元を電気化学的に制御するのは現実的ではない。

8. 薄層電解セルを用いた分光電気化学測定

それでは、測定系を電極近傍だけに制限してしまえば、系全体を電気化学的に酸化・還元できる (電気化学の用語では「電解する」という) のではなからうか。これが薄層電解セルの発想である^{17b)}。測定系を電極から拡散層の厚み以下に抑えて電極電位を制御すれば、理論上ではある時間後には系全体の物質濃度がその電位に応じたものになる。数十 μm から数百 μm の厚みであれば、数秒から数十秒という短時間で系全体を平衡化できるという計算になる^{17c)}。

電極に、 SnO_2 や In_2O_3 (Indium-Tin Oxide: ITO 電極と呼ばれる) などの半導体を薄膜にした電極や、金や白金などの網電極を用いて、電解しながら分光測定できるものを透明薄層電解セル (optically transparent thin-layer electrode cell: OTTLE cell) という。最近では市販もされている。我々は、PS I 一次電子供与体 P700 の酸化還元電位を精密に測定するのを目的に、図 6 に示すようなセルを設計・作成した²⁰⁾。電極は金の 100 mesh/inch の網電極を用い、光路長が 200 μm 程度となるように設計した。同一サンプルでデータの再現性を調べたり異なる条件下で測定できるように、サンプル溶液の量は 200 μL 程度の少量で済むようにした。

9. 測定条件の確立 ～電子メディエーターの見直し

薄層電解セルを用いた場合でも、PS I 反応中心内部に位置する P700 と電極の直接電子授受は難しいので、測定には電子メディエーターを必要とする。我々は、P700 の酸化還元電位を精度よく測定するために、電子

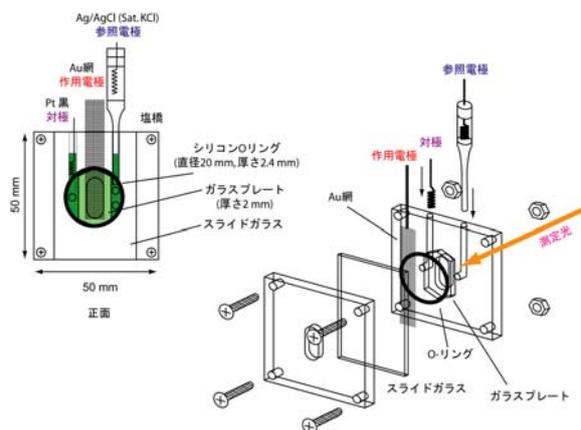


図 6 分光電気化学測定用の透明薄層電解セル

メディエーターの見直しも行った。滴定法で酸化剤としてよく用いられるフェリシアン化カリウムだと、電気化学的平衡に達するのに時間が掛かることが分かったからである (後述)。そこで、我々は同じ電位領域に E° をもつフェロセン類²¹⁾に着目した。フェロセンは $E^\circ = +422 \text{ mV}$ (pH = 7) であり、その誘導体であるフェロセンジメタノールは $E^\circ = +465 \text{ mV}$ 、ジメチルフェロセンは $E^\circ = +341 \text{ mV}$ と異なる電位領域で電子授受を行うので、これらを混合して使用することとした。フェロセン類は、水に不溶であるから、あらかじめ 10 wt% で調製した界面活性剤ドデシルマルトシドの水溶液に溶解させておき、測定の際に希釈して用いることとした。酸化した後の再還元の場合にも系を速やかに平衡状態にするのを目的に、テトラクロロベンゾキノン ($E^\circ = +260 \text{ mV}$) とフェナゾニウムメソスルフェイト (PMS, $E^\circ = +80 \text{ mV}$) も用いることとした。PS I は、Chl *a* 濃度にして 1.5 mM から 2.0 mM 程度となるように、界面活性剤ドデシルマルトシド 0.3 wt% の水溶液に懸濁してサンプル溶液を調製した。その他の詳細な条件については文献²⁰⁾を参照されたい。

透明薄層電解セルを用いて測定したスペクトルの一例を図 7 に示す。図 7(A) は、ホウレンソウ由来の PS I サンプルの Q_y 帯付近における吸収スペクトルである。電極電位を +50 mV および +650 mV に制御した際のスペクトルを載せており、両者にほとんど差はないが、差し引いて拡大すると、図 7(B) に示すような差スペクトルが得られる。700 nm に大きな吸光度の減少が、808 nm 付近にブロードな吸光度の増大が見られ、光酸化法などで得られる明暗差スペクトル²²⁾とほぼ同様で

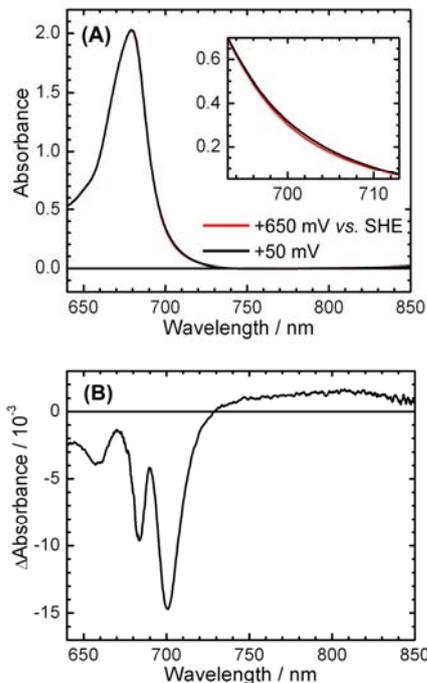


図7 ホウレンソウ由来のPS Iサンプル溶液の透明薄層電解セル中における吸収スペクトル(A)と酸化還元差スペクトル(B)。

あることから、観測されたのは $P700^+ - P700$ 差スペクトルだといえる。

そこで次に、700 nm および 808 nm に測定波長を固定し、+50 mV で還元状態に保持してから+650 mV に酸化し、その後+50 mV に戻すという操作を行い、その際の吸光度の時間変化を追跡した (図8)。まず、電子メディエーターにフェリシアン化カリウムを 1 mM の濃度で用いた場合をみても、測定波長にかかわらず、吸光度は時間に対して徐々に変化し、平衡に到達するまでに 8 分程度要することが分かった。一方、フェロセンを用いた場合では、濃度を 100 μM とフェリシアン化カリウムを用いた場合の 1/10 にしても、4 分程度で平衡に到達した。さらに、フェロセンとフェロセンジメタノールを 50 μM ずつ用いた場合には、2 分以内で平衡に到達できた。この結果は、等電点が 4 付近の PS I は (測定を行った pH = 8 では) 負に帯電しているから、アニオンであるフェロシアン化物イオンと P700 は電子授受が起こりにくいためだと考えられる。それに対して、酸化してカチオンとなるフェロセン類の方が電子授受が速く、分光電気化学測定法には有効だといえる。

また、測定波長が 700 nm の場合 (図8(B)) では、

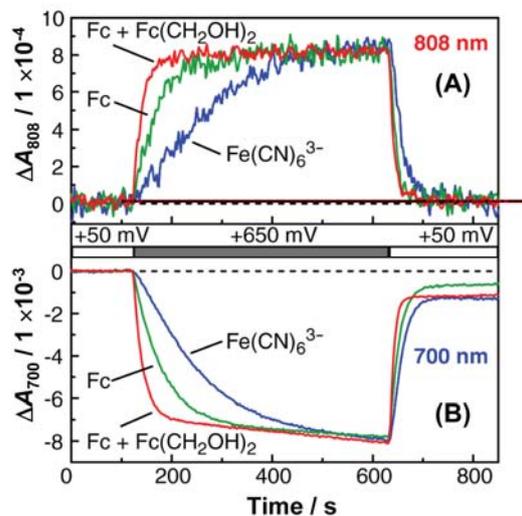


図8 電位を変化 (+50 mV \rightarrow +650 mV \rightarrow +50 mV) した際の 808 nm および 700 nm における吸光度時間変化。電子メディエーターとして $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を 1 mM、フェロセン (Fc) を 100 μM 、フェロセンジメタノール ($\text{Fc}(\text{CH}_2\text{OH})_2$) を 100 μM 加えてある。文献²⁰⁾からデータを引用、一部改定。

+650 mV で電位を保持すると、吸光度が一定にならず、徐々に減少した。さらに、+50 mV への再還元後は元のベースラインに戻らず、完全な可逆応答は得られなかった。これは、PS I に存在するアンテナクロロフィルが不可逆酸化されて 700 nm の吸光度もそれに伴って減少するため、LHC を含む高等植物や緑藻の PS I ではこの不可逆酸化がより顕著にみられる。電気化学測定では電極電位を変えるだけで、酸化・還元サイクルを何度も繰り返せるので、反応の可逆性や不可逆酸化成分がどの程度結果に影響しているかを、正確かつ簡便に評価できる。このことは、滴定法では実現できない強力な利点だといえる (図7(B)のスペクトルも $P700^+$ を再還元してスペクトルを測定し、不可逆酸化されたアンテナクロロフィルの寄与を除去してある)。以上の結果から、吸光度変化が小さく S/N 比からすると不利ではあるが、完全な可逆性を示す 808 nm における吸光度変化の追跡が P700 酸化還元電位の測定には適しているといえる。

10. P700 酸化還元電位測定 ~ホウレンソウと *T. elongatus* の比較

最後に、ホウレンソウと好熱性シアノバクテリア

Thermosynechococcus elongatus から分画した PS I における P700 の酸化還元電位を測定した結果²³⁾を紹介する。

確立した分光電気化学測定条件にて、さまざまな電極電位に制御して得られた吸光度の時間変化を図 9 に示す。いずれの電位においても平衡状態が観測され、吸光度変化が可逆なことが確かめられた。電位をランダムに、また繰り返し変化させても同じ結果となり、再現性が高いことも確かめられている。各電極電位における吸光度変化 ΔA からネルンストプロットを行った結果が図 10 である。図 10 の(A)、(B)ともネルンストプロットと呼ばれるが、酸化還元電位の解析は図 10(A)の方が平易であろう。プロットはよい直線性を示し、最小二乗法により傾きが *T. elongatus* で 62.1 ± 2.9 mV/decade、ホウレンソウで 60.7 ± 1.7 mV/decade と、室温における一電子酸化還元反応の理論値(ネルンスト式より $\ln \rightarrow \log$ 変換して $2.303RT/F$) 59 mV/decade に近い値となり、P700 の一電子授受を観測できていることが裏付けられる。図 10(B)はしばしば滴定曲線 (titration curve) とも呼ばれるが、プロットが実線で示した一電子酸化還元理論曲線とよく一致していることが示された。

P700 の酸化還元電位は図 10(A) の $\text{Log}([P700^+]/[P700]) = 0$ となる切片から求められ、*T. elongatus* で $E^{\circ'} = +423 \pm 1$ mV、ホウレンソウで $E^{\circ'} = +470 \pm 2$ mV という結果となった。図からも明らかのように、両者では、P700 の酸化還元電位が明確に異なることが示された。酸化還元電位の違いが単離操作による PS I の変性によって生じたものでないことは、強い界面活性剤処理によって分画した PS I コア標品でも両者の P700 酸化還元電位に同程度の差が見られることから確かめられている。両者の酸化還元電位が異なる原因について考察を現在進めているが、一つの理由に、生体内で電荷分離反応により電子を放出した P700 (P700⁺) を再還元する水溶性電子伝達タンパク質の種類にあるのではないかと考えている。酸素発生型光合成生物は、水溶性電子伝達タンパク質にシトクロム *c*₆ もしくはプラストシアニン (あるいは両者) をもつが、*T. elongatus* は前者を、ホウレンソウは後者を電子伝達系に用いる。両者は電位が異なることが知られており、これらから効率よく電子を受け取るために、P700 の酸化還元電位が調節されていると考えられる。

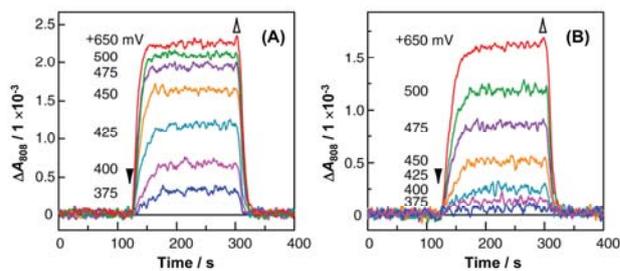


図 9 電位変化に伴う *T. elongatus*(A)およびホウレンソウ(B)由来の PS I サンプルの 808 nm における吸光度変化。文献²³⁾からデータを引用、一部改定。

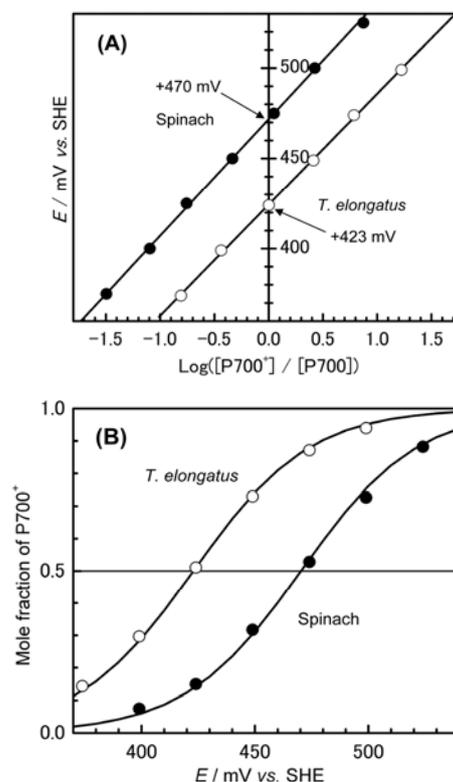


図 10 各電位における ΔA_{808} (図 9) をもとにして作成したネルンストプロット。(A)の直線は、データを最小二乗の結果を表すもので、この 0 切片から酸化還元電位 $E^{\circ'}$ を求める。(B)はしばしば滴定曲線ともよばれ、実線は各 $E^{\circ'}$ をもとにした一電子酸化還元理論曲線を表す。文献²³⁾のデータを一部引用。

したがって、我々の結果は、電子伝達系成分の酸化還元電位調節機構の一端を示したものだといえる。

11. 終わりに

ホウレンソウと *T. elongatus* の P700 酸化還元電位測定は、当研究室にて 5 人以上の測定者が、これまでに述べ 10 回以上は行ってきている。それでも誤差は ± 2 mV 程

度に収まり、測定者による誤差もほとんどない。このような正確性を可能とする測定条件の要因として、正確な電位の制御と速やかな平衡の達成が挙げられる。そしてこのことが、電位変化に対する明確な吸光度変化の決定につながっているといえる。

このようにして確立した測定条件により、ハウレンソウと *T. elongatus* では明確に700の酸化還元電位が異なることを初めて見出すに至った。このような明確な差異は、長年測定されてきたにもかかわらず、測定精度と実験条件によって埋もれていたといえるのではなからうか。さらに、紅藻や緑藻など含めたさまざまな酸素発生型光合成生物のP700について酸化還元電位測定を進めており、酸化還元電位の生物種依存性を見出しつつある。今後、更なる展開としては、PS IIにも測定を広げ、光合成電子伝達系の電子エネルギー準位関連の詳細を明らかにしたい。

参考文献

1. (a) Ke, B. (2001) Redox potential of P700, in *Photosynthesis: Photochemistry and Photobiophysics*, pp 471-473, Kluwer Academic Publishers; (b) Golbeck, J. H. (1987) Structure, function and organization of the Photosystem I reaction center complex, *Biochim. Biophys. Acta* 895, 167-204.
2. Kok, B. (1961) Partial purification and determination of oxidation reduction potential of the photosynthetic chlorophyll complex absorbing at 700 m μ , *Biochim. Biophys. Acta* 48, 527-533.
3. Beinert, H., Kok, B., and Hoch, G. (1962) The light-induced electron paramagnetic resonance signal of photocatalyst P700, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 209-211.
4. Yamamoto, H. Y., and Vernon, L. P. (1969) Characterization of a partially purified photosynthetic reaction center from spinach chloroplasts, *Biochemistry* 8, 4131-4137.
5. Thornber, J. P., and Olson, J. M. (1971) Chlorophyll-proteins and reaction center preparations from photosynthetic bacteria, algae and higher plants, *Photochem. Photobiol.* 14, 329-341.
6. Knaff, D. B., and Malkin, R. (1973) The oxidation-reduction potentials of electron carriers in chloroplast photosystem I fragments, *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 555-562.
7. Ke, B., Sugahara, K., and Shaw, E. R. (1975) Further purification of "Triton subchloroplast fraction I" (TSF-I particles): Isolation of a cytochrome-free high-P700 particle and a complex containing cytochromes f and b6, plastocyanin and iron-sulfur protein(s), *Biochim. Biophys. Acta* 408, 12-25.
8. Ikegami, I. (1976) Fluorescence changes related in the primary photochemical reaction in the P700-enriched particles isolated from spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 449, 245-258.
9. Evans, M. C. W., Sihra, C. K., and Slabas, A. R. (1977) The oxidation-reduction potential of the reaction-centre chlorophyll (P700) in photosystem I, *Biochem. J.* 162, 75-85.
10. Malkin, R. (1978) Oxidation-reduction potential dependence of the flash-induced 518 nm absorbance change in chloroplasts, *FEBS Lett.* 87, 329-333.
11. Sétif, P., and Mathis, P. (1980) The oxidation-reduction potential of P-700 in chloroplast lamellae and subchloroplast particles, *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 477-485.
12. Ikegami, I., and Katoh, S. (1989) Preparation and characterization of P700-enriched photosystem-I complexes from the thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus sp.*, *Plant Cell Physiol.* 30, 175-182.
13. Hamacher, E., Kruip, J., Rögner, M., and Mantele, W. (1996) Characterization of the primary electron donor of photosystem I, P700, by electrochemistry and Fourier transform infrared (FTIR) difference spectroscopy, *Spectrochim. Acta A* 52, 107-121.
14. Kievit, O., and Brudvig, W. G. (2001) Direct electrochemistry of photosystem I, *J. Electroanal. Chem.* 497, 139-149.
15. (a) 高宮建一郎 (1981) Redox poisoning 法による電子伝達解析, "光合成研究法" (加藤榮, 宮地重遠, 村田吉男編), pp 396-402, 共立出版; (b) Dutton, P. L. (1978) Redox potentiometry: Determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems, in *Methods in Enzymology: vol. LIV, Biomembranes*

- (Fleischer, S., and Packer, L., Eds.) pp 411-435, Academic Press, New York.
16. 渡辺正, 金村聖志, 益田秀樹, 渡辺正義 (2001) "電気化学", pp 85-101, 丸善.
 17. Bard, J., and Faulkner, L. R. (2001) *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, (a) pp 156-166; (b) pp 417-455; (c) pp 680-693, Wiley, New York.
 18. (a) Kobayashi, M., Ohashi, S., Iwamoto, K., Shiraiwa, Y., Kato, Y., and Watanabe, T. (2007) Redox potential of chlorophyll *d* *in vitro*, *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 596-602; (b) Watanabe, T., and Kobayashi, M. (1991) Electrochemistry of chlorophylls, in *Chlorophylls* (Scheer, H., Ed.), pp 287-315, CRC press, London.
 19. Proux-Delrouyre, V., Demaille, C., Leibl, W., Sétif, P., Bottin, H., and Bourdillon, C. (2003) Electrocatalytic investigation of light-induced electron transfer between cytochrome *c₆* and photosystem I, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 13686-13692.
 20. Nakamura, A., Suzawa, T., and Watanabe, T. (2004) Spectroelectrochemical determination of the redox potential of P700 in Spinach with an optically transparent thin-layer electrode, *Chem. Lett.* 33, 688-689.
 21. Szentrimay, R., Yeh, P., and Kuwana, T. (1977) Evaluation of mediator-titrants for the coulometric titration of biocomponents, in *Electrochemical studies of biological systems* (Gould, R. F., Ed.), pp 143-169, American Chemical Society.
 22. Nakamura, A., Akai, M., Yoshida, E., Taki, T., and Watanabe, T. (2003) Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll *a'* and phylloquinone in Photosystem I of oxygenic photosynthetic organisms: Universal existence of one chlorophyll *a'* molecule in Photosystem I, *Eur. J. Biochem.* 270, 2446-2458.
 23. Nakamura, A., Suzawa, T., Kato, Y., and Watanabe, T. (2005) Significant species-dependence of P700 redox potential as verified by spectroelectrochemistry: Comparison of spinach and *Thermosynechococcus elongatus*, *FEBS. Lett.* 579, 2273-2276.