

*Acaryochloris marina*の光化学系IIの単離精製と性質[§]¹首都大学東京 大学院 理工学研究科²東京理科大学 理学部³東京大学 大学院 総合文化研究科⁴京都大学 大学院 人間・環境学研究科⁵JST さきがけ小島 茜^{1,2,*}、金藤 隼人²、長尾 遼³、三室 守⁴、鞆 達也^{2,5}

1. はじめに

光合成光化学系II (PS II) の反応中心クロロフィルの酸化還元電位(約+1.2 V) は水の電位 (+0.88 V, pH6) より高いため、水から電子を引き抜き、酸素発生を行うことが可能である。PS II の水分解において得られる酸素は呼吸反応でATPを得る従属栄養生物のエネルギー変換においても重要な意味をもつ。これまでに知られていた酸素発生型の PS II コア標品 (LHC等のアンテナを含まない標品) に結合しているクロロフィル (Chl) は、全て Chl *a* であった。しかし、Chl *a* より長波長側に吸収極大をもつ Chl *d* を主要色素としてもつ *Acaryochloris marina* が 1996 年に宮下らにより発見され¹⁾、その後、村上ら²⁾や外国のグループら^{3,4)}においても *Acaryochloris spp.* が発見され、大久保らによる遺伝子解析⁵⁾や世界各地で採取された海底堆積物および湖沼堆積物の分析⁶⁾から Chl *d* を合成する光合成生物が、地球上のあらゆる水界中に普遍的に分布していることが示唆された。Chl *a* と Chl *d* の構造と有機溶媒中の吸収スペクトルを図1に示す。Chl *d* は Chl *a* のクロリン環のC3位がビニル基からホルミル基へ変化しているため、吸収極大が長波長側にシフトする。これら *Acaryochloris* 種の主要色素は Chl *d* であるが Chl *a* も微量にもつため、水分解反応を担う、PS II の色素が何であるか議論がわかれていた。初期電子受容体は Pheophytin (Pheo) *d* でなく、Chl *a* 型の PS II と同様に Pheo *a* であることは当研究グループらにより報告されている^{7,8)}。ある程度生化学的に純化された PS II 標品を用いて分光解析を行った結果、Chl *d* が *Acaryochloris*

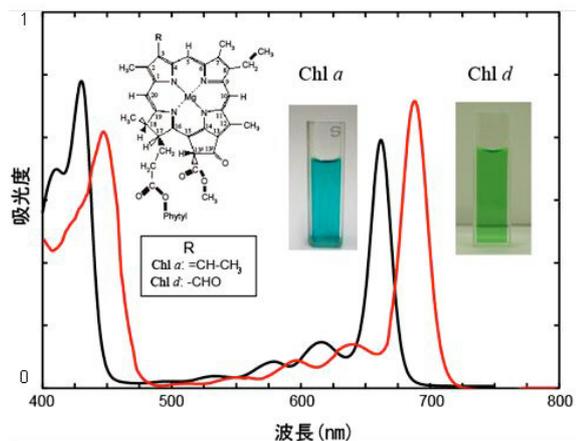


図1 Chl *a* と Chl *d* のアセトン中における吸収スペクトルと構造および色 (黒線: Chl *a*, 赤線: Chl *d*)

の反応中心色素を担っていることを 2007 年に当研究グループが報告した⁷⁾。Chl *d* が電荷分離を担うということは、PS II の energetics が Chl *d* のエネルギーに応じて変化していると考えられる。これらを明らかにするためには、植物で PS II 反応中心複合体 (RC, D1-D2-Cytb559 complex) が得られたのと同様に純度の高い標品を単離・精製し解析を行う必要がある⁹⁾。そこで本研究では、より高純度の PS II コア標品の精製方法を確立し、様々な方法を用いた解析を試みた。本稿ではその結果について報告する。

2. PS II 精製と吸収スペクトルの変化

図2に *Acaryochloris marina* MBIC11017 株からの PS II 単離精製の方法を示す。8 L の人工海水培地を用いて約 10 日間培養した *Acaryochloris* 細胞をガラスビー

§ 第1回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: tbky_kucyubunkai@hotmail.co.jp

Acaryochloris marina cell
 |
 Cell disruption with glass beads
 |40,000 x g, 20 min
 Sup. (*Acaryochloris marina* Thylakoid)
 |
 Adjust 1 mg Chl *d*/ mL
 |
 Solubilized with DM(Final 1%)
 |40,000 x g, 20 min
 Sup.
 |
 Sucrose gradient centrifugation(10- 25%)
 |109,000 x g, 7 hour
 Collect crude PS II fraction
 |
 Apply to the DEAE column
 |
 Collect PS II fraction(sample 1)
 |
 Apply to the Uno-Q1 column
 |
 Collect PS II fraction(sample 2)

図2 *Acaryochloris marina* の PS II の単離精製法

ズを用いて破碎し、遠心分画により未破碎の細胞およびガラスビーズを取り除いて得た画分をチラコイド膜とした。チラコイド膜を 1 mg Chl *d*/ mL に懸濁したものを終濃度 1% の *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DM) で可溶化し、遠心して得た上清を 10-25% のショ糖密度勾配遠心にかけて分離した PS II 画分を回収した。この画分を DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィー(標品 1)、そして再度 Uno-Q 陰イオン交換クロマトグラフィーにかける事で更に精製した(標品2)。

3. タンパク組成及び吸収スペクトルの変化

次に、上記に示した方法で精製した *Acaryochloris* PS II のタンパク組成を SDS-PAGE 法を用いて分析した(図3)。標品1の PS II では、PS II を構成するタンパクの D1 (■印)、D2 (▲印)、Cytochrome *b*559 α -subunit(★印)および、アンテナクロロフィルタンパク質の1つである CP47 のバンド(●印)が確認された(図3, lane 1)。このプロファイルから CP43 が精製途中に外れた CP47-RC 複合体であることがわかる。この PS II 画分を再度陰イオン交換カラムに供し、更に精製したサンプル(標品. 2)のタンパク組成を見ると、CP47のバンドはわずかに存在が確認されたが、D1,D2 タンパク質と比較して大分少なくなっており、より PS II RC 複合体に近い標品が得られた事が明らかになった(図3, lane 2)。

これらの *Acaryochloris* PS II 画分の室温吸収スペクトルを示す(図4)。標品1(図3, lane 1)の PS II 画分の

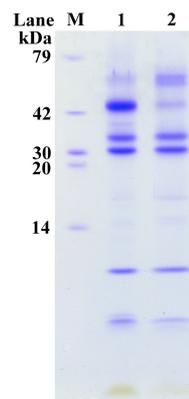


図3 *Acaryochloris marina* 単離 PS II の電気泳動プロファイル (M:分子量マーカー、lane 1: 標品1, lane 2: 標品2)

Qy 帯の吸収極大は 697 nm であり、670 nm 付近にピークの肩が観測された。標品2(図3, lane 2)では、Qy 帯の吸収極大が 696 nm になり、これまでの標品では液体窒素温度で吸収スペクトルを測定したときにのみ現れた 670 nm 近傍の吸収帯が、本標品において室温条件下ではっきりとしたピークとして観測された。この吸収帯は Chl *a*、Pheo *a* 由来であると考えられる。また、Pheo *a* の Qx バンドが 539 nm に明瞭に現れ、Soret 帯も大きく変化し、415 nm に Pheo *a* 由来のバンド、435 nm 付近に Chl *a* 由来のバンドが確認できた。また、長波長側でも 715 nm に吸収の肩が現れた。これらは二次微分においてピークとして明瞭に観測された。これらの新しい吸収帯の出現は、本方法で得られた単離 PS II の反応中心あたりの結合 Chl 数の減少によって室温でも観測出来る様になったためと考えられる。

3. *Acaryochloris marina* の光化学系 II の energetics

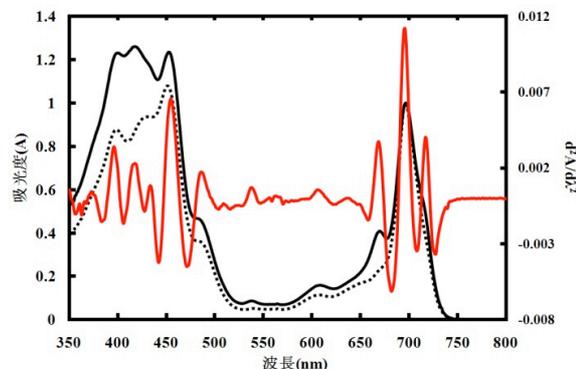


図4 *Acaryochloris marina* PS II 標品の室温吸収スペクトル (点線黒: 標品1、実線黒: 標品2、赤線: 標品2の二次微分スペクトル)

我々は、PS IIの反応中心色素、いわゆる‘スペシャルペアー’がChl *d*で構成されていることを吸収変化および光誘起差 FT-IR スペクトルから報告した⁷⁾。しかし、電荷再結合に起因する遅延蛍光がChl *a*領域に現れることや反応中心色素のカチオンバンドがChl *a*と同じ820 nmに観測されるとの報告もあり議論が分かれていた^{7,10)}。

*Acaryochloris marina*のPS Iに関してはスペシャルペアーはChl *d*の二量体であり、その吸収極大は740 nm (P740)に位置していることが報告されている(二つのChl *d*のうち一つはChl *d'*と思われる)^{11,12)}。その酸化還元電位は約439 mVであり、Chl *a*型のP700の酸化還元電位とほとんど違いが無いことを当研究グループが報告している¹²⁾。このことから、*Acaryochloris marina*のPS Iのenergeticsは酸化側のP740の電位は変化させず、初期電子受容体のA₀あるいはP740の励起状態の酸化還元電位を正にシフトすることにより、Chl *d*のChl *a*と比較して約100 mV低い電位を補償していると考えられる。一方、PS IIはその生化学的単離精製の困難さ故、energeticsの解析が遅れていたが、本方法により高純度かつ電荷分離活性の高い標品が得られたことから、酸化還元電位の測定が可能になった。室温、pH 7で初期電子受容体Pheo *a*の電位を光照射による吸収変化を観測することにより測定した結果、Mn₄CaO₅クラスターが無い場合、約-478 mVであり、同条件で測定したChl *a*型の*Synechocystis* sp. PCC 6803の電位が-602 mVであったことから*Acaryochloris*において約+120 mV初期電子受容体の電位がシフトしていることを明らかにした¹³⁾。同様に第二次電子受容体であるQ_AについてもQ_Aが還元されることによる蛍光変化を利用して電位を測定した。その結果、Mn₄CaO₅クラスターが無い場合、約+64 mVであり、同条件で測定したChl *a*型の*Synechocystis* sp. PCC 6803の電位は+5 mVであった¹⁴⁾。ちなみにMn₄CaO₅クラスターが有る場合、*Synechocystis* sp. PCC 6803の初期電子受容体、第二次電子受容体の電位はそれぞれ-525 mV、-142 mVとなった。この結果から、Mn₄CaO₅クラスター存在時の*Acaryochloris marina*の初期電子受容体、第二次電子受容体の電位は-401 mV、-76 mVであると推定され、それぞれの電位が-77 mV、+140 mVシフトした。このことから、*Acaryochloris marina*の初期電子受容体の酸化還元電位はChl *a*とChl *d*の差に相当する分シフトしており、水分解を担

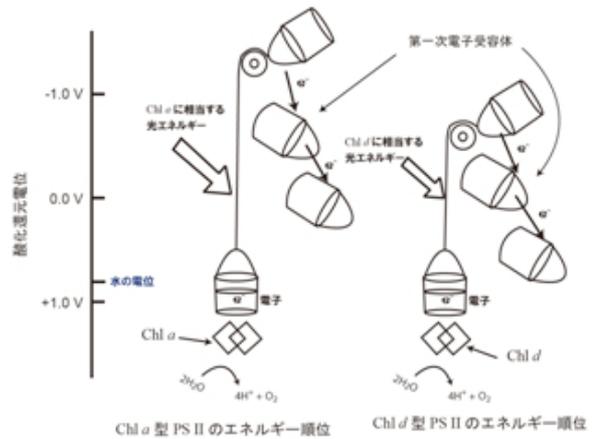


図5 Chl *a*型PS IIとChl *d*型PS IIのエネルギー準位の比較

う酸化側の還元電位はChl *a*とChl *d*において差がないことが明らかとなった。このことは、光照射による水酸化の解析から*Synechocystis* sp. PCC 6803と*Acaryochloris marina*のスペシャルペアーの電位差は0.1 V以内であるとのドイツのグループの報告とよく一致した¹⁵⁾。初期電子受容体のChlの種類に対応した酸化還元電位のシフトからスペシャルペアーを担うChlはChl *d*であり、水分解を担う酸化側の電位は変えずに還元側の電位を変化させてChl *d*の小さいエネルギーを補償していることを明らかにした。また、第二次電子受容体Q_Aの電位もスペシャルペアーのChl種の変化に応じてシフトしていたことから、初期電子受容体と第二次電子受容体の電位差も光化学系IIの電子伝達・energeticsを考える上で変化させてはならないことも明らかとなった¹⁴⁾。これを図5にまとめる。

5. おわりに

本標品を用いて、*Acaryochloris marina*のPS IIの性質、とりわけenergeticsを明らかにした。これから明らかになったことは、水分解を担う重要な酸化側の電位は変えてはいけないという光合成酸素発生系において普遍的な原理であることであった。PS Iにおいても酸化側の電位はChl *a*型と変わらなかったことは興味深い。本研究ではPS IIに存在するChl *a*の機能とその局在位置は電位の解析からは明らかにできなかった。これらについても時間分解吸収・蛍光および光誘起差 FT-IR等により明らかにして行き、Chl *d*を主要色素として持つ*Acaryochloris marina*の光化学系の性質を明らかにして、Chl *a*型の光化学系との比較から