

## 論文の内容の要旨

題目 微量光合成色素の計測化学的研究

氏名 仲村 亮正

光合成反応中心複合体は高効率の光→化学エネルギー変換系であり、反応機構・複合化過程の解明は人工的な光エネルギー変換デバイス設計に有用と考えられるが、分子レベルの描像には未知な部分が多い。反応中心では微量のクロロフィル(Chl)*a* 誘導体が重要な機能を担う。光化学系(PS) I 反応中心 P700 の近傍に Chl *a* の C13<sup>2</sup> 位異性体 Chl *a*' が存在することは従来の研究からわかっているが、分子数も機能も未解明で、生合成の有無も明らかではない。光合成系に存在する微量の Chl *a* 異性体は Chl *a* の転化により生体外で生成しやすいため、従来は正確な分析が困難だった。本論文は、微量光合成色素の定量手法を確立し、Chl *a*' の分子数・存在部位・機能・生合成経路の解明を目的としたもので、全 6 章から成る。

第 1 章では光合成明反応全般について概説し、本研究の目的と意義を述べた。

第 2 章では以降の研究の基礎となる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる微量光合成色素の分析法について検討した。まず、逆相 HPLC で Chl *a*'、フェオフィチン(Ph<sub>eo</sub>)*a*、PS I 二次電子受容体フィロキノン(Ph<sub>Q</sub>)を分離できる条件を確立し、それを用いて抽出時の Chl *a* の変性を検討した。その結果、従来の抽出法では Chl のエピマー化が進み、得られる Chl *a*'/Chl *a* 比は生体内の値を反映していないと結論した。アセトン/メタノールに光化学系標品を加えて抽出する方法では抽出時の Chl のエピマー化もほとんど進まないことを示し、主要な機能分子を変性なく定量的に抽出できる条件を確立した。

第 3 章では好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus*, ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803, 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*, ホウレンソウから種々の PS I 標品を調製し、第 2 章の HPLC・色素抽出条件で Chl *a*' と二次電子受容体 Ph<sub>Q</sub>(PS I あたり 2 分子)を定量し、分光学的に定量した反応中心 P700 量との比較から、PS I における Chl *a*' の分子数および存在部位を確定した。

まず、種々の PS I 標品中の P700 濃度を正確に定量するため、界面活性剤が P700 の明暗差スペクトルにおよぼす影響を検討し、800 nm 近辺の P700<sup>+</sup> に由来する吸収帯は界面活性剤の影響を受けないことを明らかにした。

次に Ph<sub>Q</sub>, Chl *a*' の同時 HPLC 定量と、分光法による P700 定量を行った。ラン藻 *T. elongatus*, *S. PCC6803* のチラコイド膜、PS I 三量体から抽出した色素の HPLC 分析、P700 濃度との比較から Chl *a*'/PS I = 1 という量論比を得た。ホウレンソウの PS I-LHC I でも同様の結果となった。*C. reinhardtii* では、ラン藻やホウレンソウで見られた Ph<sub>Q</sub> が HPLC 検出できなかったものの、Chl *a*'/P700 比はほぼ 1 となった。改良 HPLC 条件で PS I-LHC I を分析したところ、極性の高い Ph<sub>Q</sub> 誘導体(Ph<sub>Q</sub>')が P700 あたり 2 分子存在すると判明し、*C. reinhardtii* の PS I では Ph<sub>Q</sub>' が二次電子受容体となっている可能性を初めて指摘した。

Chl *a'*の存在部位を解明するため、*S. PCC6803*のPS I 三量体、ホウレンソウのPS I-LHC Iから強い界面活性剤処理により周辺サブユニット、アンテナ Chl *a*を除いたPS I コア標品を調製し、色素組成を検討したところ、Chl *a'*/P700 比は1となった。以上から、*S. PCC6803*, ホウレンソウでも1分子のChl *a'*がPsaA/B複合体コア部分に存在するとわかった。

Chl *a'*の存在部位をより明らかにするため、凍結乾燥チラコイド膜を水飽和ジエチルエーテルで処理し、アンテナ色素を減らした試料の色素組成を調べた。ジエチルエーテルの水飽和度を増していくと、ホウレンソウチラコイド膜のChl *a*/P700 比は、Chl *a'*/P700 比が約1のまま15程度まで減少した。以上の結果から、1分子のChl *a'*がP700のごく近傍に存在すると判明した。これらの結果は、P700がChl *a*とChl *a'*のヘテロ二量体であるという最近の*T. elongatus* PS I 三量体のX線結晶構造解析の結果と完全に一致し、種々の光合成生物のもつPsaAタンパク質アミノ酸配列の比較から、すべての酸素発生型光合成生物のP700が1分子のChl *a'*を含むと結論した。

第4章では光化学系形成過程におけるChl *a'*/Chl *a*比の変化を逆相HPLCで調べ、Chl *a'*の生合成を検討した。生合成の中間段階で生じるC17<sup>3</sup>イソプレノイド側鎖の異なるChl類(側鎖がGG, DHGG, THGG, Pの分子)の分離条件を検討し、Chl *a*, Chl *b*のGG~P誘導体とChl *a'*を分離でき、これらを高感度に検出可能なHPLC条件を初めて開発した。オオムギ黄化葉の緑化過程における色素組成と絶対量の変化を追跡したところ、光照射によってChl類の合成が始まり、15分でChl *a'*の蓄積が確認された。Chl *a'*, Chl *a*蓄積量の追跡から、光化学系形成の初期ではChl *a'*とChl *a*の合成速度が異なることを見出した。Chl *a'*/Chl *a*比は光照射15分から1時間にかけて増加し、成熟葉中の定常値の約2倍で最大となった後、アンテナ色素Chl *b*の増加とともに定常値へ向けて漸減するという特徴的な変化を示すことが明らかとなった。以上の結果からChl *a'*の生合成が初めて実証された。

第5章では、順相HPLCによる光化学系形成過程の追跡から、第4章の逆相HPLC分析では不明だったPheo *a*の生合成とChl *a'*のGG~THGG異性体の有無を検討した。Pheo *a*, Chl *a'*, Pchl, Chl *a*のGG, DHGG, THGG, P異性体、計16種類を短時間に分離できる順相HPLC条件を初めて確立した。この条件を用いて短時間光照射した黄化葉の色素組成を計測し、Chl *a'*, Pheo *a*のGG-THGG異性体を検出することに初めて成功した。Chl *a'*のGG-P異性体の存在比はChl *a*とほぼ同じだったが、Pheo *a*ではGG-P異性体の存在比がChl *a*とは異なることがわかった。Pheo *a*, Chl *a'*のGG-P異性体の存在比から、Pheo *a*, Chl *a'*の生合成経路について論じた。

第6章では以上の結果を総括し、今後の展望について述べた。