

光合成光化学系Ⅱにおける環状電子移動と光阻害反応初期過程*

黒岩 繁樹**

広島大学大学院生物圏科学研究科

Cyclic electron flows and the initial reaction process
of the photoinhibition in the photosystem II

Shigeki KUROIWA

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739, Japan*

要 旨

I. 序 論

光合成光化学系Ⅱ (PSⅡ) は高等植物チラコイド膜上に存在する蛋白質超複合体であり、光励起によって水から電子を奪う、光合成の初発反応の場である。PSⅡから放出された電子によって、最終的には還元力を持つ NADPH が生成される。また、電子を受け渡す過程で生じた H^+ 濃度勾配を利用して ATP が作られ、チラコイド膜上における光エネルギーの化学エネルギーへの変換が完了する。

PSⅡと類似した構造と機能を持つと予想されている、光合成細菌 (Rps. viridis および Rb. sphaeroides) の光化学反応中心の X 線結晶構造解析の成功により、PSⅡ反応中心の構造および電子伝達機構が推定された。PSⅡは反応中心を構成する D1蛋白質と D2蛋白質の周囲にチトクロム b-559 (Cyt b-559), アンテナクロロフィル結合蛋白質である CP43, CP47 など 20 種類以上の蛋白質が結合している。PSⅡ内の通常の直線状電子移動経路では、クロロフィル 2 量体である反応中心 (P680) が、光による電荷分離を起こして $P680^+$ となり、電子がフェオフィチン a, Q_A , さらに Q_B へと受け渡される。 Q_A , Q_B の本体はどちらもプラストキノン A (PQ_A) である。 Q_B は 2 個の電子と 2 個の H^+ をそれぞれ得た後、チラコイド膜中の PQ_A と入れ替わり、光合成光化学系Ⅰへと電子が受け渡される。それと同時に、 $P680^+$ によってチロシン残基である第 1 電子供与体 (Y_Z) が酸化され、生じた Y_Z^+ はさらに PSⅡ内の水分解系と呼ばれる部分を通して水を酸化する。

PSⅡは強い光にさらされると光合成能が落ちる。これを光阻害という。近年、光阻害の機構に関する研究、特に PSⅡ反応中心を構成する D1蛋白質の分解過程に関する研究が注目を集めてきた。しかし、D1蛋白質の分解にいたる前の初期過程及びその反応を防ぐための機構に関する研究は少なかった。この論文は、光阻害条件下での防御的な役割が予想される PSⅡ内環状電子移動と光阻害反応の初期過程との関連について行った研究をまとめたものである。

広島大学総合科学部紀要Ⅳ理系編、第22巻 (1996)

* 広島大学審査学位論文

口頭発表日: 1996年2月8日、学位取得日 1996年3月26日

** 現在の所属: 広島大学総合科学部研究生

II. 環状電子移動

電荷分離で生じた電荷を PS II 内で再結合させる電子移動を環状電子移動という。これは、水分分解系が損傷して電子の供給が停止した場合や、チラコイド膜が還元型 PQ_A で充満して PS II からの電子の放出が停止した場合、PS II 内で電子をバイパスして反応性の高いラジカルを消去し PS II を防御していると予想される。

本研究では PS II 内環状電子移動の性質と機構に関して研究するために、光阻害時のモデル系として PS II の水分分解系を除去した試料を用いて、レーザーフラッシュフォトリシス法で反応中心 P680 と Q_A の酸化還元に伴う吸光度時間変化を観測した。その結果、水分分解系の代わりとして人工電子供与体 Mn^{2+} を加え、直線状電子移動のみ起こる条件にすると消滅する電子移動過程 ($P680^+$ 再還元過程と Q_A^- 再酸化過程でともに観測される半減期 $100\sim 200\ \mu s$ の成分) を観測した。これらが環状電子移動であると考えられる。

これらの $P680^+$ 再還元過程、 Q_A^- 再酸化過程における環状電子移動量はともに酸化還元電位依存性 ($E_m \cong 430\ mV$) を示し、高電位側で増加した。これは PS II 蛋白質複合体に存在する Cyt b-559 の高電位型 (HP) の酸化還元電位とよく対応する。

Cyt b-559 は複数の電位型に変化するヘム蛋白質であり、従来から環状電子移動経路として機能しているのではないかという報告があった。しかし Cyt b-559 の酸化還元過程は、光照射に伴い還元と酸化が同時に起こるため、明確な還元及び酸化の速度定数を解析するのは極めて困難であった。今まで見積もられてきた Cyt b-559 経由の環状電子移動は半減期 $35\sim 100\ ms$ であり、直線状電子移動における $Q_A^- \rightarrow Q_B$ 電子移動が $100\sim 200\ \mu s$ の半減期で起こるのと比較してかなり遅く、その生理的意義は現在に至るも議論を呼んでいる。

さらに、それぞれの $100\sim 200\ \mu s$ 成分の量は大きく pH の影響を受け、pH 6.5 を変化の midpoint として、高い pH では増加した。ところが、Cyt b-559 HP の酸化還元電位は pH 依存性ではないため、この現象は pH の影響を受ける別の因子の存在を示していた。

その因子として非ヘム鉄を挙げられる。非ヘム鉄は Q_A , Q_B 間に存在する機能の不明な鉄イオンであるが、その酸化還元電位 ($E_m \cong 400\ mV$, pH 7.0) が $-60\ mV/pH\ unit$ で pH 変化することが報告されている。非ヘム鉄から Cyt b-559 への電子移動を考えた場合、pH 6.5 のとき非ヘム鉄の電位は Cyt b-559 HP の電位である $430\ mV$ と等しくなる。そのため、これ以下の pH では、その電子移動が抑えられ、これ以上の pH では、その電子移動が増大すると考えられる。これを裏付けるように、環状電子移動量は非ヘム鉄を持つ試料の方が、それを除去した試料の 2 倍近い pH 変化を示した。これらの事実から環状電子移動と Cyt b-559 及び非ヘム鉄との関わりが明らかになった。

さらに励起フラッシュごとに $P680^+$ 再還元過程と Q_A^- 再酸化過程を測定した。最初の光励起で $P680^+$ 再還元過程では Y_2 から $P680^+$ への電子移動過程が観測され、 Q_A^- 再酸化過程では Q_A^- から酸化型非ヘム鉄 (Fe^{3+}) への電子移動過程が観測された (ともに半減期数 μs)。それ以降の光励起でともに $100\sim 200\ \mu s$ 成分が出現した。このことから、最初の光励起で Y_2^+ と還元型非ヘム鉄 (Fe^{2+}) が蓄積することによって、初めて $100\sim 200\ \mu s$ 成分の環状電子移動が生じることも示された。

III. 光阻害反応初期過程

次に環状電子移動量と、エネルギー伝達および電子伝達機能に関係すると考えられる分子の数、特に β -カロテン (β -Car)、 PQ_A の数に注目して、PS II 光阻害反応初期過程について研究した。D1 蛋白質分解以前の光阻害反応の初期段階での各機能分子の損傷または離脱過程を解析するため

には、蛋白質分解に伴って各機能分子が失われる影響を除かなければならない。そのために、蛋白質分解酵素阻害剤存在下で光照射処理を行った試料を用いて環状電子移動量の時間変化を測定するとともに、光照射処理した試料を陰イオン交換樹脂に吸着させて、反応系から離脱した機能分子類や、すでに分解が開始した反応中心複合体を洗い落とし、光阻害によるD1蛋白質分解開始直前の反応中心中の各機能分子の数をHPLCを用いて測定した。なお光照射処理では赤色光 (λ 600 nm, $960 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) を用いた。これによって、カロテノイドが光で直接損傷する影響を除外できる。

光照射処理によって試料中の β -Car, PQ_A 以外の機能分子数の減少は少なく、また半減期100~200 μs 成分の環状電子移動量と β -Car数は、約1分の半減期で減少を示した。この時間領域では Q_A , Q_B の本体である PQ_A の数の減少は見られなかった。これらのことから、 β -Carは環状電子移動経路に位置していると考えられる。

β -Carの損傷はフェリシアナイド存在下の酸化的環境中では特に激しい。赤色光の領域では β -Carの吸収は見られないため、 β -Carが光で直接損傷したとは考えにくい。無酸素状態でも損傷はくい止められないことから活性酸素によって損傷したとは考えられない。これらのことから β -Carは P680^+ によって酸化された結果、損傷したと考えられる。

また、反応中心複合体当たり8個存在する β -Carのうち6個分が半減期約1分で減少し、残り2個分が半減期約16分で減少したことから、反応中心内部に存在する2個の β -Carに先だってアンテナクロロフィル結合蛋白質であるCP43, CP47中の6個の β -Carが損傷する可能性が高いと結論づけられた。このことは、驚くべきことに P680^+ の正電荷が反応中心を取り巻く蛋白質上の β -Carへ移動していることを示唆している。

先に示したように環状電子移動とCyt b-559 HPは強い関連性を持つが、Cyt b-559の各電位型の割合に関する最近の報告では、水分解系を破壊したPS IIに対して光照射処理を行うと、Cyt b-559 HPが半減期0.7分で減少し、最終的には、低電位型(LP, $E_m \approx 45 \text{ mV}$)に変換するとある。この変換過程は本研究で示された β -Car及び環状電子移動量の挙動とかなりよく一致しており、 β -Carが損傷することによってCyt b-559の電位がHPからLPに変化することが予想される。また、 β -CarはCyt b-559の光酸化に必要であるとの報告も存在する。

一方、 PQ_A は残りの β -Car数が約2個になった時点で離脱が開始するケースが多い。このことは反応中心蛋白質複合体中の β -Carが損傷を受け始めることによって Q_A 離脱のトリガーが入る可能性を示している。さらに、無酸素条件下の場合は PQ_A の数はほとんど減少しないことから、酸素の存在が PQ_A の離脱に必須であることが確認された。また、D1蛋白質分解の引き金として、 Q_A が2電子還元及び H^+ 化されてPS IIから放出されるというモデルがあるが、本研究ではpH 6.0における光阻害はpH 7.5における光阻害と大きな変化はなく、 H^+ 化モデルに関して疑問を提起する結果となった。

IV. 結論

以上の結果から、100~200 μs 成分の環状電子移動とCyt b-559 HP, 非ヘム鉄及び β -Carとの関わりが明らかになった。環状電子移動はPS IIが光阻害を受けて酸化になった状態(水分解系が損傷し、Cyt b-559 HPが光酸化を受けて Y_Z^+ が蓄積した場合)で生じる。その経路として P680^+ の正電荷が β -Carへ移動し、そこへ非ヘム鉄上の電子がCyt b-559 HPを経由して移動することで、 Q_A^- と P680^+ の電荷を再結合させるというモデルが得られた。それでも処理しきれない過剰な正電荷が生じた場合、 β -Carは正電荷を反応中心を取り巻く蛋白質上の β -Carへ逃し、正電荷と電子のバランスを保って反応中心を保護するという電荷の緩衝剂的機能を担っていることが示

唆された。しかも、反応中心を取り巻く蛋白質上の β -Carが破壊され、反応中心複合体内部の β -Carまで損傷する状況になれば、それが引き金となって酸素を必要とする何らかの反応が生じ、 Q_A が放出されるということが示された。このように、 β -Carは光阻害反応初期過程およびその防御機構において中心的な役割を果たしていると考えられる。