レドックス重合による葉緑体電子伝達系の ポリアクリルアミド固定

落合英夫, 柴田 均, 松尾 哲, 橋ノ口賢二, 湯川政雄

(島根大学農学部農芸化学科)

昭和 52 年 8 月 22 日 受 理

Immobilization of Chloroplast Photosystems within Polyacrylamide Gel Formed by the Redox Polymerization

Hideo OCHIAI, Hitoshi SHIBATA, Tetsu MATSUO,

Kenji HASHINOKUCHI and Masao YUKAWA

Laboratory of Biochemistry, College of Agriculture,
Shimane University, Matsue

Chloroplast electron flow system was successfully immobilized inside polyacrylamide gel formed by the redox polymerization. The immobilization system consisted of acrylamide monomer (15%, final concentration), N,N'-methylene-bisacrylamide (0.8%), ammonium persulfate (0.02%), ascorbate (0.06%), bovine serum albumin (1%), D-mannitol (0.01%) and the broken chloroplasts, type C, in 0.05 M Tris buffer containing 0.4 M sucrose and 0.01 M NaCl (STN buffer). Incubation of the reaction mixture at 10°C for 2 hr yielded the gel keeping Photosystem I activity as 11.3% of the native chloroplasts (control) and Photosystem II activity as 11.2% of the control. The immobilized chloroplast gel retained activities of Photosystem I and Photosystem II even after being allowed to stand for several weeks in the STN buffer at 4°C. The optimum pHs of the immobilized Photosystem I and Photosystem II were the same as those of the untreated chloroplasts: pH 8.6 for Photosystem I and pH 6.2 for Photosystem II. However, the Photosystem II activity of the gel was completely lost in 2 days on standing above pH 8. The thermo-stabilization of Photosystem I and Photosystem II was also attained by the immobilization. Under anaerobic condition, electric current was observed on illumination onto the chloroplast photo-cell system which was composed of the gel, methyl viologen as an electron acceptor, glucose plus glucose oxidase as an oxygen dissipating system and sodium azide in the STN buffer.

(Received August 22, 1977)

緒 言

葉緑体等を“Bioreactor”として用いることによって、水より、たとえば水素を光生化学的に生産しようとする企画は無公害エネルギーの開発という立場から現在世界的な研究課題としてとりあげられている^(1,2)。しかしながら現在までのところ、植物生細胞より単離調製された

略号: TN 緩衝液; 0.01 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液。STN 緩衝液; TN 緩衝液に 0.4 M ショ糖を加えたもの。DPIP; 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール。DCMU; [3-(3',4'-ジクロロフェニル)] 1,1-ジメチル尿素。

葉緑体電子伝達系は——これは光化学系 I (PS-I) と光化学系 II (PS-II) とより成立っている——とりわけ PS-II が *in vitro* ではきわめて不安定であるために反応を長時間持続させることは困難とされてきた。したがって、葉緑体電子伝達系を活性の高い状態で安定であり、かつ取扱い易い形に固定化する方法の検討が各国で意欲的に進められてきている。最近 Hall らはグルタルアルデヒド固定した葉緑体と *Chromatium* のヒドロゲナーゼとの混合系を用い、嫌気条件下での光照射によって 6 時間半近く連続的に水素を発生しえたと報じている⁽³⁾。しかし、この際のグルタルアルデヒド処理された葉緑体

の実体はやはり懸濁液であって、真の固定化された形で実験に供されたのではなかった。一方、著者らはレドックス重合法を適用することによって葉緑体電子伝達系を比較的活性の高い状態で、かつ長時間の貯蔵に耐えうるポリアクリルアミドゲルとして包括固定することに成功し、その一部はすでに発表した⁽⁴⁾。ここでは固定化法の詳細と得られた固定化葉緑体の性質、ならびにこの固定化葉緑体を用いて水の光酸化を行い、電気エネルギーをとり出すことに成功した実験結果等についてのべる。合わせて固定化葉緑体利用に関する問題点について考察したい。

実験材料と方法

1. 葉緑体標品の調製 葉緑体の材料としては市販の新鮮なハウレンソウを用いた。葉軸を除いたハウレンソウの葉を裁断してから、2倍量の冷STN緩衝液(pH 7.2)を加えて日本精機HE型ホモジナイザーにて30秒間処理し、その汁液をナイロンクロスで濾過する。濾液は冷却下4000×gで10分間遠心し、得た沈殿を毛筆をもって慎重にSTN緩衝液に再懸濁してから、700×gにて5分間遠心した。その上澄画分をもう一度ナイロンクロスにて濾過してから4000×g、10分間遠心し、得た沈殿をSTN緩衝液におだやかに懸濁して固定化の試料とした。この試料は主にラメラ膜画分を含むもの(タイプC破碎葉緑体)⁽⁵⁾であるが、なお他の顆粒の混在も考えられる。しかし、細胞質内および葉緑体のストロマ内に存在する可溶性たんぱく質の混在は、ほとんどないと見られる。なお、クロロフィルの定量はMacKinneyの方法によった⁽⁶⁾。

2. 活性測定法 固定化葉緑体ゲル(以下ゲルと記す)およびレファレンスとしての葉緑体懸濁液の光電子伝達活性は、それぞれPS-I、PS-IIについて求めた。なおゲルの場合、ゲルを再びビーズ状に破碎し懸濁状態として活性測定に供した。PS-I活性の測定はEpelらの方法⁽⁷⁾を改変して行った。葉緑体懸濁液の場合の反応システムは以下のものである: 110 μM アスコルビン酸ナトリウム, 17 μM DPIP, 110 μM メチルピオローゲン, 110 μM ナトリウムアジド, 0.67 μM DCMU および葉緑体懸濁液 0.1 ml (約 50 μg クロロフィル) これをSTN緩衝液(pH 8.6)で全量 9.0 ml とした。ゲルの場合の反応システムは上記において葉緑体懸濁液の代りに1.2 gのゲルを用い、STN緩衝液で全量 9.0 ml とし

た。反応はYSI 54 ARC 溶存酸素計を用いて20°Cの恒温下、攪拌しつつある試料に光照射(30,000 lux)したさいの酸素吸収量を求め、光照射しない場合の酸素吸収量をブランクとして差引いた。またゲルの活性測定の場合は、ゲルを100°C、10分間加熱処理して用いた場合の測定値もブランク値として用いた。

PS-II 活性は電子受容体として100 μM DPIPを用いゲル0.3 gまたは葉緑体懸濁液0.1 mlにSTN緩衝液(pH 7.2)を加えて全容3 mlとして一定時間光照射し、DPIPの光還元量を610 nmでの吸光度の減少の測定から求めた⁽⁸⁾。ゲル測定の場合は反応後反応液を吸引濾過し、濾液の吸光度の減少値を求めた。このさいDPIPはポリアクリルアミドゲルに吸着されるので、光照射のみを行わない時の、その濾液が示す吸光度をブランク値とした。合わせてDPIPを電子受容体とするヒル反応による酸素発生量の測定も行った。なお用いた測定条件下では、ゲルの量あるいは光照射時間はいずれもそのPS-I、PS-II活性の測定値とは直線関係にあった。グルコースオキシダーゼはNBCの製品(1500単位/グラム)を用いた。

実験結果

1. 固定化方法とその条件

一般に酵素たんぱく質の固定化方法としては、担体重合法、架橋法および包括法の3種がある。包括法はさらに格子型包括法とマイクロカプセル型包括法とに分けられる^(9a)。これらの方法にはそれぞれに長所短所があるので、固定化されるべき対象と利用方法に応じて固定化方法も選択されなければならない。著者らの場合固定化される試料が、葉緑体のラメラ膜という約0.5 μ程度の大きさを持つ袋状構造体、複合酵素系であること、またエネルギー生産を目的としたシステムの構成等を考慮して、今回はポリアクリルアミドによる格子型包括法について検討した。一般にこのさいの反応試薬としては、アクリルアミドモノマー(最終濃度15%)、架橋剤としてのビスアクリルアミド(BIS, 0.8%)、重合反応促進剤としてのβ-ジメチルアミノプロピオニトリル(0.5%)および重合開始剤としての過硫酸カリ(0.1%)を用いている例が多い^(9b)。ところで葉緑体ラメラ膜のTN緩衝液懸濁液に上記の試薬を1種類ずつ上記の濃度になるように加え、10°Cで10分間インキュベーションした後、そのうちの一定量をとってPS-II活性を測定したとこ

ろ, それぞれ一種の試薬を加えた場合には PS-II 活性に対する阻害作用は見られなかったが, 試薬を混合してラジカル重合反応を起させた場合には, 完全にその活性が消失することが見出された. このことは, PS-II 電子伝達系はラジカル性重合反応には極端に弱いことを示すものである.

そこで著者らは電子伝達系を保護しつつ重合反応が可能な条件についていろいろな角度から検討を加えた結果, レドックス重合反応系⁽¹⁰⁾が特に優れていることが見出された. Fig. 1 はアクリルアミドモノマー, BIS, 過硫酸アンモン, アスコルビン酸よりなるレドックス重合反応系, さらにこれに安定化剤としてのウシ血清アルブミン (BSA) および D-マンニトールを加えて葉緑体ラメラ膜標品を 10°C, 10 分間インキュベーションした時の PS-II 活性を示している. コントロールに比してレドックス重合試薬を加えた場合で約 10%, さらに BSA を加えた場合に約 45%, BSA とマンニトールを加えた場合には約 65% にまでその活性が保持されうることが見

Fig. 1. Photosystem II Activities of the Spinach Chloroplast Suspension in the Presence of the Redox-polymerization Reagents: Acrylamide Monomer (15%, final concentration), N,N'-Methylene Bisacrylamide (0.8%), Ammonium Persulfate (0.02%), and Ascorbate (0.02%). ○.....○ suspension plus the reagents (I), ○---○ I plus bovine serum albumin (1%), ○---○ I plus bovine serum albumin and D-mannitol (0.01%), ●—● suspension plus ascorbate (0.02%) (control). The chloroplasts (700 μ g chlorophyll) were incubated for 10 min at 10°C with the reagents in the sucrose-Tris-NaCl buffer (pH 7.2, 2.5 ml in total volume). After the incubation, an aliquot (0.1 ml) of the reaction mixture was used for Photosystem II assay as described in the text.

Table I. System for Chloroplast Immobilization

Chloroplast suspension in STN buffer (pH 7.2) ^{a)}	4.0 ml
Monomers in STN buffer	4.0
37.5% Acrylamide monomer	
2.0% N,N'-Methylene bisacrylamide	
2% Ascorbate in STN buffer	0.3
1% Ammonium persulfate in STN buffer	0.2
10% Bovine serum albumin in STN buffer	1.0
0.5% D-Mannitol in STN buffer	0.2
STN buffer	0.3
	10.0 ml

^{a)} 0.05 M Tris buffer containing 0.4 M sucrose and 0.01 M NaCl.

出された.

Table I はこのような検討の結果見出された葉緑体電子伝達系固定の標準的反應組成を示すものである. この組成で 10°C, 2 時間嫌気条件下に放置すると完全に固定化が完了する. このようにして得られた固定化葉緑体ゲルは日本精機 HE 型ホモジナイザーにて 10 秒間破碎処理し, 直径 1 mm 程度のビーズとして濾集した. このビーズを約 100 倍量の冷 STN 緩衝液にて 3 度, のべ 1 時間おだやかに攪拌しながら洗浄した. このさい活性の保存のためには緩衝液で十分に洗浄しておくことが必要である. なおこのさいの活性はポリアクリルアミドゲルの半透膜性のため見かけの測定値は低く表れるのであるが葉緑体懸濁液での活性に比して PS-I では 11.3%, PS-II では 11.2% の活性収率であった: PS-I 活性 (μ moles 酸素吸収/mg クロロフィル・時間) 葉緑体懸濁液 1160, ゲル 131, PS-II 活性 (μ moles DPIP 還元/mg クロロフィル・時間) 懸濁液 180, ゲル 20.1.

2. 固定化葉緑体の諸性質

Fig. 2 は得られたゲルを STN 緩衝液中に浸漬し, 4°C の冷暗所に保存した場合の PS-I, PS-II 両活性の経時的变化を追跡した結果である. 活性は調製直後の活性を 100 としたときの相対値として表わした. 葉緑体懸濁液の PS-I 活性は一旦脱共役などのため上昇するが, 2 週間目には消失する. PS-II 活性は 1 週間の保存で消失する. これに対して, 固定化された葉緑体の PS-I 活性は 1 か月後においても低下は認められず, また PS-II 活性は 2 週間で 66%, 3 週間で 34% の相対活性を保持しており固定化によっていずれも大幅に安定化されうることが示された. とくに PS-I 活性の安定化には注目すべきものがあり, TN 緩衝液中に保存したものの PS-I 活性

は実に 1 年後においても 22.4% の活性を保持していた。

Fig. 3 は葉緑体電子伝達系の pH 活性曲線である。PS-I 活性の最適 pH は懸濁液もゲルも pH 8.6 付近にあり, PS-II の最適 pH はこれも両者とも pH 6.2 付近に見出された。このことは葉緑体の電子伝達系という複

Fig. 2. Changes in the Photosystem Activities of the Chloroplast Suspension and of the Immobilized Chloroplast Gel during Storage. ○—○ Photosystem I activity of the suspension, ●—● Photosystem I activity of the gel, △—△ Photosystem II activity of the suspension, ▲—▲ Photosystem II activity of the gel. Both the suspension and the gel were stored in the sucrose-Tris-NaCl buffer (pH 7.2) at 4°C, and the remaining activities of Photosystem I and Photosystem II were examined. The activities are described in terms of relative value to those of freshly prepared samples (0 day).

Fig. 3. pH-Activity Curves of the Chloroplast Suspension and of the Immobilized Chloroplast Gel. ○—○ Photosystem I activity of the suspension, ●—● Photosystem I activity of the gel, △—△ Photosystem II activity of the suspension, ▲—▲ Photosystem II activity of the gel. Photosystem II activities were determined by measuring oxygen evolution through the $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2,6\text{-dichlorophenol indophenol}$ Hill reaction at 20°C. The activity was expressed as relative activity (%) to that at optimum pH. Buffer solution used: sucrose-Tris-NaCl-maleic acid.

合酵素系のポリアクリルアミド固定においては, 最適 pH の移動は起らないことを示すものである。Fig. 4 は 700~20,000×g 画分の葉緑体標品を用いて固定化したゲルに対する pH の効果を調べたものである。ゲルをそれぞれの pH の緩衝液中, 4°C で 3 日間 (PS-I), および 2 日間 (PS-II) 保存した後, これを濾取し一旦 STN 緩衝液 (pH 7.2) で洗浄したのち活性測定した時の, 調製直後の活性に対する相対活性値の変化を示している。PS-I 活性は保存に際して pH による影響をほとんど受

Fig. 4. pH-Stability Curves of the Immobilized Chloroplast Gel. ●—● Photosystem I activity, ▲—▲ Photosystem II activity. The immobilized chloroplast gel was incubated in the buffer of indicated pH at 4°C for 3 days for Photosystem I assay or for 2 days for Photosystem II assay. The gel was filtered, washed with sucrose-Tris-NaCl buffer (pH 7.2) and used for the assay at 20°C. The activity is shown in % of that of freshly prepared gel measured at pH 7.2.

Fig. 5. Thermo-stability of the Immobilized Chloroplast Gel. ○—○ Photosystem I activity of the suspension, ●—● Photosystem I activity of the gel, △—△ Photosystem II activity of the suspension, ▲—▲ Photosystem II activity of the gel. The sample was treated in the sucrose-Tris-NaCl buffer (pH 7.2) at various temperature for 10 min. After the treatment, the gel was allowed to stand for 10 min at 20°C and used for the assay at pH 7.2.

けないが、PS-II 活性は pH 8 以上で保存すると 2 日間で完全に失活する。この傾向は 700~4000×g 画分の葉緑体より調製したゲルでも見られている。Fig. 3, Fig. 4 の結果からゲルの保存さらに使用に際しては、pH を 7 近辺に保つことが必要である。

Fig. 5 は熱安定性を調べた結果である。一般に葉緑体とくに PS-II 電子伝達系は極端に熱に弱く、45°C、5 分の熱処理で完全に失活する。固定化葉緑体ゲルを STN 緩衝液 (pH 7.2) 中それぞれの温度で 10 分間熱処理し、その後 20°C にもどして活性測定を行なったが、ゲルの PS-I は 50°C、10 分間の熱処理後も全く活性の低下はなく、また PS-II は同じ処理でなお 15% の残存活性を示

Fig. 6. Schematic Diagram of a Chloroplast Photo-cell. 1: ammeter, 2: external resistance, 3: diaphragm, 4: anode (copper), 5: cathode (copper). Tank 1 contained the immobilized chloroplast gel of 2.0 g, 0.26mM methyl viologen, 0.13mM sodium azide, 37mM glucose, glucose oxidase of 75 units and the sucrose-Tris-NaCl buffer (pH 7.2) in a total volume of 7.5 ml. Tank 2 contained the same reagents except the gel. The tank 1 was illuminated with the water-filtrated light of a projector lamp (30,000 lux) under constant stirring.

Fig. 7. Light-dependent Electric Current in the Chloroplast Photo-cell.

した。このように葉緑体電子伝達系は、ポリアクリルアミドゲル包括固定によって熱安定性も得られることが見出された。

なお 1 つの実験として Fig. 6 に示すような電気回路を組み、タンク 1、タンク 2 にそれぞれ Fig. 6 に示す組成の反応液 (全量 7.5 ml) を入れた。グルコース、グルコースオキシダーゼの大量剰を共存させたのは反応系を常に嫌氣的に保つためである。このさいタンク 1 ではおだやかな攪拌によって常にゲルビーズが容器全体にひろがるようにして光照射した。Fig. 7 に示されているように光照射に依存して電流の発生することが認められた。このさい電子伝達系の阻害剤 DCMU を共存させると電流の発生は起らないし、またグルコース、グルコースオキシダーゼ、あるいはゲルのいずれか 1 つを省いても電流の発生は見られない。このことは光照射された固定化葉緑体によって水が光酸化され、とり出された電子が PS-II および PS-I の全光化学系を通してメチルビオローゲンに渡されこの還元型メチルビオローゲンが嫌気条件下アノードに電子を移す回路が成立したことを示すものである。

考 察

“葉緑体等による水素生産システムの確立”の検討を進めるにあたって、まず葉緑体電子伝達系の固定化による安定化をいかなる方法で行うかが第一要件であろう。事実この電子伝達系は熱、酸素などに極端に弱いために、試みられた多くの実験結果は大抵、活性収量、保存性、再現性などに乏しい憾みがあった⁽¹¹⁻¹³⁾。しかし、著者らはアスコルビン酸を重合促進剤とするアクリルアミドのレドックス重合を行えば、低温でも反応が進行してポリアクリルアミド固定の目的が達せられることを見出した。事実、こうして調製された固定化葉緑体は保存に対して相当に安定であり、またこのゲルへの光照射によって嫌気条件下ではあったが、光照射に依存して電気エネルギーをとり出し得たことは、葉緑体を用いるエネルギー開発、水素生産への具体化の可能性を大きく拓くものである⁽¹⁴⁾。

しかし、もちろんまだ実用化のためには、たとえば著者らが今回の実験で用いているショ糖や BSA に代るべき安価な試薬の開発が必要であるし、そのような条件下でのレドックス重合による活性の回収率をさらに向上させるための研究が必要である。ラメラ膜標品にハウレン

ソウより調製したフェレドキシンおよびフェレドキシン—NADP⁺還元酵素を添加すると、この混合系は PS-II, PS-I を介して光化学的に NADP⁺ を還元しうることが知られている。著者らはこの H₂O → NADP⁺還元系を固定化しようと上述のレドックス重合反応法を適用してみたが、フェレドキシンが重合反応によって完全に失活するために成功しなかった。したがって、NADP⁺還元には別種の固定化方法の開発が必要である。現在著者らは、ポリビニルアルコールによる包括固定によってこれが可能であることを見出し研究中である。

さらに今回は葉緑体の材料として市販のハウレンソウを用いたが、これは必ずしも適当な試料とはいえない。すなわち、常時新鮮に大量利用できる植物材料の吟味も是非行なわなければならない。そして最後に、連続的光照射条件下という特殊な環境の下での活性の保持条件の吟味が今後進められてゆかねばならない。

なおこのレドックス重合反応系は、一般に活性化エネルギーの低下によって低温でも反応が速やかに進むという利点があるので、熱に弱い葉緑体電子伝達系の固定のみならず広く熱に不安定な酵素系あるいは酵素の新固定化方法としても有用であろうと考えられる。

要 約

1. 一般にポリアクリルアミド固定に際して使用される重合試薬アクリルアミドモノマー、BIS、過硫酸カリ、β-ジメチルアミノプロピオニトリルなどはそれぞれ一種では葉緑体電子伝達系の PS-II 活性に対してほとんど影響を与えない。しかしこれらを混合して重合反応を起させると反応温度 10°C においてすら完全に PS-II 活性は消失する。したがってこれに代るべき改良重合法を検討した結果、アクリルアミドモノマー（最終濃度 15%）、BIS（0.8%）、過硫酸アンモン（0.02%）、アスコルビン酸（0.06%）、牛血清アルブミン（1%）および D-マンニトール（0.01%）の存在下で葉緑体標品を 10°C、2 時間処理することによって葉緑体懸濁液のコントロールに比して PS-I, PS-II とも 11% 強の活性収率で固定化されることを見出した。

2. この固定化葉緑体は STN 緩衝液（pH 7.2）中 4°C で暗所保存した場合 PS-I は数か月以上、PS-II は

2 週間後で 66%、3 週間後でも 34% その活性を保持していた。

3. この固定化葉緑体の最適 pH は懸濁液のそれと相違ない。安定は pH 7.4 以下にあり、とりわけ PS-II 活性は、pH 8 以上で 2 日間保存すると完全に失活する。

4. 固定化によって PS-II の熱安定性は若干向上し、PS-I では 50°C、10 分間の熱処理でも全く活性低下がないまでに安定化された。

5. 嫌気条件下、固定化葉緑体ビーズに光照射することによって水 → PS-II → PS-I → メチルビオローゼンの光化学反応系を通しての電流発生 of 可動性を確認した。

本研究は昭和 51 年度文部省科学研究費、岩谷直治記念財団よりの助成金に負うところが大きい。ここに記して謝意を表する。なお本研究の一部は 52 年 4 月、日本農芸化学会 52 年度大会にて発表した。

- (1) M. Gibbs, A. Hollaender, B. Kok, L. O. Kram-pitz and A. San Pietro: "Proceedings of the Workshop on Biosolar Conversion," Indiana Univ., 1973.
- (2) D. O. Hall: *FEBS Letters*, **64**, 6 (1976).
- (3) K. K. Rao, L. Rosa and D. O. Hall: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 21 (1976).
- (4) H. Ochiai, H. Shibata, T. Matsuo, K. Hashi-nokuchi and M. Yukawa: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 721 (1977).
- (5) D. O. Hall: *Nature (London)*, *New Biol.*, **235**, 125 (1972).
- (6) G. MacKinney: *J. Biol. Chem.*, **140**, 315 (1941).
- (7) B. L. Epel and J. Neumann: *Biochim. Biophys. Acta*, **325**, 520 (1973).
- (8) H. Shibata and H. Ochiai: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 471 (1973).
- (9) a) 千畑一郎編: "固定化酵素" 講談社, 東京, 1975, p. 9. b) *idem: ibid.*, p. 76.
- (10) W. Kern: *Makromol. Chem.*, **1**, 209 (1948).
- (11) L. Packer: *FEBS Letters*, **64**, 17 (1976).
- (12) M. Kitajima and W. L. Butler: *Plant Physiol.*, **57**, 746 (1976).
- (13) D. Hoffmann, R. Thauer and A. Trebst: *Z. Naturforsch., C: Biosci.*, **32c**, 257 (1977).
- (14) T. Yagi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2947 (1976).