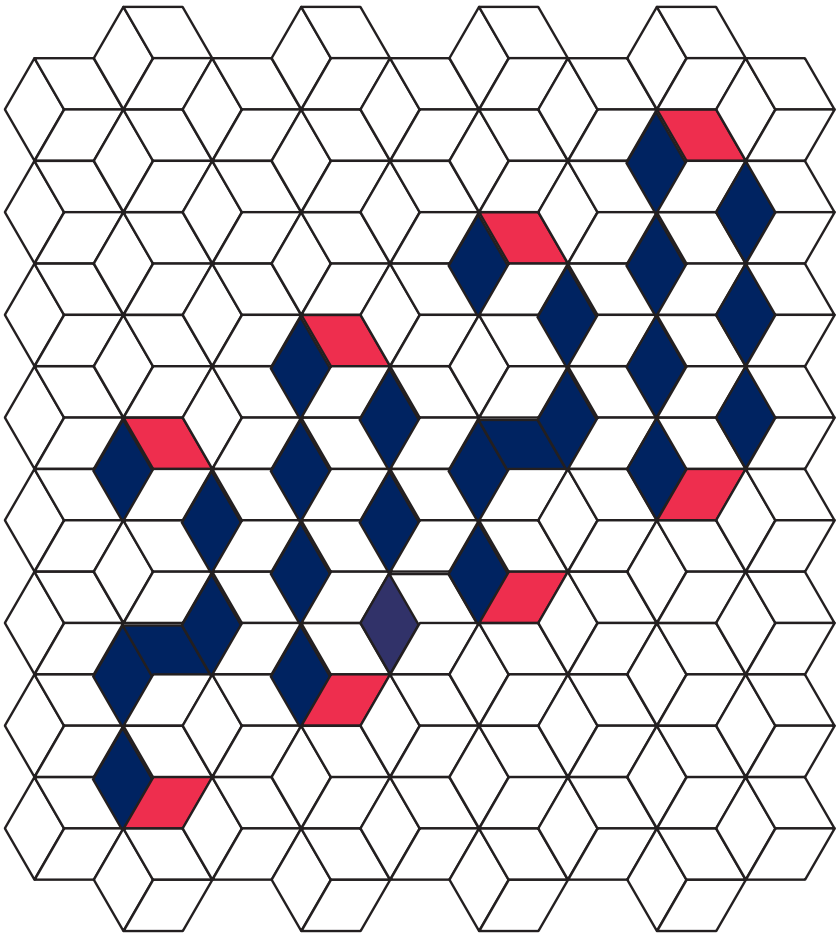
2020年1月31日発行

ISSN 0916-3492
JREPEH

Jasco Report

Vol. 62 No. 1 2020



日本分光

低温蛍光スペクトルによる光合成解析

早稲田大学　教育・総合科学学術院　園池　公毅

Analysis of photosynthesis by low temperature fluorescence spectra

Kintake Sonoike, Faculty of Education and Integrated Arts and Sciences, Waseda University

Abstract

Chlorophyll fluorescence spectra determined at liquid nitrogen temperature are useful for the evaluation of photosynthetic machinery in plants, algae and cyanobacteria. Since two photosystems (Photosystem I and II) emit fluorescence in different wavelength ranges at 77 K, information about photosystem stoichiometry (ratio of Photosystem I/Photosystem II) or state transition (energy distribution between Photosystem I and II) can be obtained from the low temperature spectra. In this article, theoretical background of the measurements, as well as the actual arrangements of instruments and preparation of the samples necessary for the precise determination of photosynthesis are reviewed.

Keywords: chlorophyll fluorescence, energy transfer, low temperature spectroscopy, photosynthesis, photosystem stoichiometry, state transition

1.　はじめに

光合成は、光エネルギーを利用して二酸化炭素を有機物に固定する反応であり、地球生態系のほぼすべての生物をエネルギー的にも物質的にも支えている。光合成は、地球上で最大の生化学反応であるため、地球の環境自体が光合成の出現の影響を大きく受け、地球は現在のような酸素に富んだ大気をもつに至った。現在進行中の気候変動の影響を予測するうえでも、光合成の環境応答の研究の重要性は言を俟たない。光合成のメカニズムそのものは、基本的な部分については1980年代までにほぼ明らかになったといってよい。一方で、近年、光合成の反応は、変動する環境に応答して、極めて精妙な調節を行なっていることが明らかになってきている。

例えば、光合成色素の機能についても、古くからの固定的な認識は通用しなくなっている。光合成色素として光エネルギー変換を担う主要な色素はクロロフィル*a*であるが、β-カロテンや、各種のキサントフィルなどのカロテノイド色素も、光合成の反応に関わっており、少し前の高等学校の教科書などでは「補助色素」としてクロロフィルが捕集できない波長域の光の吸収に役立っているとされてきた。しかし、現在では、カロテノイドの主要な役割は光捕集のためのアンテナ機能ではなく、強光条件などのストレス環境において余分なエネルギーを熱として放散したり、生じた活性酸素を除去したりすることにより、光合成を保護することであることが明らかとなってきている。このような外部環境の変化に応答するメカニズムは、例えば生化学的にタンパク質レベルにまで還元して解析しようとするとその機能が失われることが多く、何らかの非破壊的な解析手法が求められる場合が多い。そのような際には、細胞レベルあるいは個体レベルでの測定が可能な分光学的手法が有用である。本稿では、そのような分光学的手法の一つである低温蛍光スペクトルに焦点を当てて、光合成研究への応用例を紹介する。

2.　光合成色素の分光学

有機溶媒中のクロロフィル*a*は、主に赤色と青色の波長域に大きな吸収を持ち、緑色の光については比較的吸収が弱いため、見た目に緑色を呈する。青色の波長域の吸収極大は435 nm付近、赤色の波長域の吸収極大は665 nm付近であるが、生体内においては、赤色部の吸収は、タンパク質との相互作用によって5～20 nm長波長側にシフトする。光合成を駆動する光化学反応中心複合体は、多いものでは数十種のタンパク質が100以上の色素を結合しており、それらの色素とタンパク質の相互作用（配位結合）の強さは色素分子の位置や配位するアミノ酸の種類によって異なるため、色素分子によってそのエネルギーレベルとそれを反映する吸収極大の位置が異なる。結果として、吸収特性の異なる色素を結合した色素タンパク質複合体の吸収バンドの幅は、有機溶媒中の色素の吸収バンドの幅と比較して広くなり、これは、植物が効率的により広い波長領域の光を吸収することに寄与すると考えられる。

植物の光合成の電子伝達反応を駆動する光化学系反応中心複合体には、光化学系Ⅰと光化学系Ⅱの二種類があり、これらが直列に働いて電子を受け渡す。光化学系Ⅰと光化学系Ⅱの間でもクロロフィルのエネルギーレベルには差があり、一般的に単離した光化学系Ⅰ反応中心複合体の吸収スペクトルが685 nm付近に極大を示すのに対して、光化学系Ⅱ反応中心複合体の吸収スペクトルは675－680 nm付近に極大を示す。しかし、両者の極大波長の違いはそれほど大きくないた

め、二つの光化学系が共に存在する細胞や葉において二つの吸収を区別して解析するのは難しい。

クロロフィルが吸収したエネルギーは、光合成に使われるほか、熱として放散されたり、蛍光として放出されたりする。室温では、光化学系Ⅱ反応中心複合体は685 nm付近に蛍光を発するが、光化学系Ⅰ反応中心複合体の蛍光は非常に弱く700 nm付近になだらかなピークを示すだけであるため、二つの光化学系を区別して解析することはやはり難しい（図1、黒線）。しかし、光化学系Ⅰ反応中心複合体の蛍光は、強い温度依存性を示し、低温になるほど蛍光強度は増大し、また蛍光波長も長波長側にシフトする。液体窒素温度（77 K）においては、陸上植物の光化学系Ⅰは735 nm付近に蛍光極大を示す一方、光化学系Ⅱは685 nmと695 nmに蛍光極大を示すことから、十分に分離して解析することが可能である（図1、赤線）。また、クロロフィル当たりの蛍光収率も、液体窒素温度では、二つの光化学系の間で同じオーダーになるため、二つの光化学系が共に存在する細胞や葉においても、低温蛍光スペクトル測定によって両者を解析することが可能となる。以下では、日本分光の分光蛍光光度計FP-8500（図2）を用いて光合成系に関する情報を得る方法について解説する。

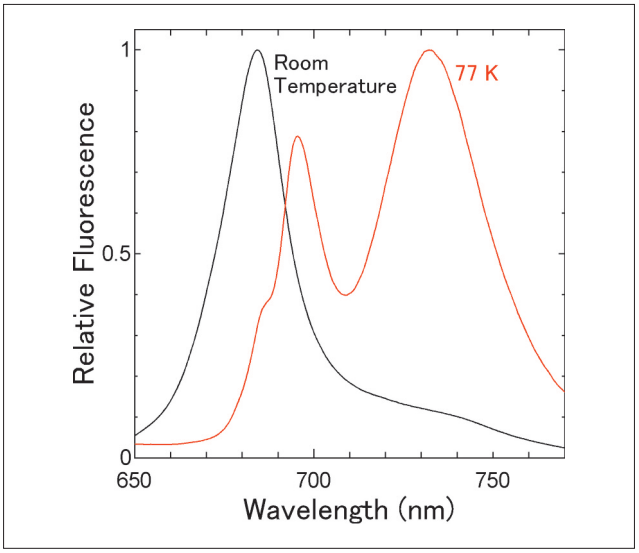


図1　Fluorescence spectra of spinach thylakoid membranes determined at room temperature (black) or at 77 K (red).

図2　Appearance of the fluorometer, FP-8500.

3. 低温蛍光スペクトルの解析例

3-1　光化学量比調節の解析

光合成の反応は、二種類の光化学系が直列に働いて進むため、異なる光環境、すなわち環境の光の光量やスペクトルが異なれば、二種類の光化学系の量比を調節して環境に馴化する必要がある。これを光化学量比調節という。上述のように液体窒素温度での低温蛍光スペクトルを測定すれば、この光化学系量比に関する情報を得ることができる。ただし、光化学系量比の情報といっても、光化学系の比率の絶対値を求められるわけではない。光化学系Ⅰと光化学系Ⅱでは、クロロフィルあたり、もしくは反応中心あたりのクロロフィル蛍光の収率は異なるので、それぞれの極大波長での蛍光の強度が1：1であっても、光化学系量比が1：1であることにはならない。しかし、環境への応答や遺伝子の変異により光化学系の量比が変化するような場合、その変化は蛍光強度のピーク強度比に反映される。例えば光化学系Ⅰと光化学系Ⅱの蛍光強度の比が1：1から1：2に変化したら、おそらく相対的な光化学系Ⅱ量が倍になった、という推定をすることはできる。ただし、多くの場合、光化学系Ⅱ量が倍になったのか、光化学系Ⅰ量が半分になったのかは区別できない。これは、4-3に後述するように、蛍光強度の絶対値の測定が難しいためである。

液体窒素温度における光化学系Ⅰの蛍光は、生物種にもよるが極大波長が715 nmから735 nmの間に位置する単一の蛍光ピークを示し、そのピークの高さを光化学系Ⅰの量の指標と考えることができる。一方で、光化学系Ⅱの蛍光は、685 nmと695 nmにダブルピークもしくはピークと肩を示すので、このどちらかの高さを量の指標にする。一般的には、685 nmのピークの方が、条件によらずに安定した蛍光を示すので、陸上植物の場合は、735 nmの蛍光ピークの高さ（F735）を685 nmの蛍光ピークの高さ（F685）で割ったF735/F685を光化学系量比の指標とすることが多い。クロロフィルの他にフィコビリンを光合成色素として持つシアノバクテリアや紅藻の場合は、685 nmの蛍光成分には、クロロフィル蛍光の他にフィコビリンの蛍光からの寄与もあるため、光化学系Ⅰの725 nmの蛍光ピークの高さ（F725）を695 nmの蛍光ピークの高さ（F695）で割ったF725/F695を、光化学系量比の指標とすることが多い。実際にはそれぞれのピーク波長における蛍光強度を用いる。

クロロフィル蛍光のバンド幅は比較的広いため、分光器の蛍光側のスリット幅は2 nm以下であれば問題ない。励起波長としては、クロロフィルのソーレー帯の吸収がある435 nm付近を使えばよい。励起側のバンド幅は、広くとっても問題ないので、信号／ノイズ比を考えると、大きくしておけばよい。フィコビリン色素を持つシアノバクテリアや紅藻の場合は、フィコビリンが吸収を持つ620 nm付近の光を励起光として使うこともできる。ただし、フィコビリン励起においては、後述するようにフィコビリンからクロロフィルへのエネルギー移動が変化した場合にはその影響を受けるので、光化学系量比の情報だけを得たい場合は、クロロフィル励起の方が望ましい。

3-2　ステート遷移の解析

上述のように、光合成生物は、光環境に応答して光化学系量比を調節するが、この調節は、タンパク質の新規合成などを伴うため、通常その応答が完了するまでに単細胞生物の場合でも12時間程度の時間を要する。より短時間で二種類の光化学系のバランスを保つためには、ステート遷移と呼ばれる調節システムが知られている。光化学系Ⅱは、陸上植物ではLHCⅡと呼ばれるクロロフィルタンパク質複合体が光のエネルギーを集めるアンテナとして働き、シアノバクテリアや紅藻においては、フィコビリソームと呼ばれる色素複合体がアンテナとして働く。環境が変化したときに、このアンテナから光化学系の反応中心へのエネルギー移動を調節するのがステート遷移である。

光化学系Ⅱにエネルギーを渡していたアンテナが、環境が変化した際に光化学系Ⅰにエネルギーを渡すようになれば、光化学系Ⅰの量を増やさずとも、その活性を上げることができる。これには、タンパク質の新規合成は不要であるため、通常は環境が変化してから15分程度でステート遷移の応答は完了する。光化学系Ⅰに選択的に吸収されるような光が照射している条件（この条件で誘導される状態をステート1と呼ぶ）では、光化学系のバランスを取るためにステート遷移によってエネルギーは光化学系Ⅱに流れるようになるため、光化学系Ⅱからの蛍光は強くなる（図3）。逆に、光化学系Ⅱに選択的に吸収されるような光が照射している条件（この条件で誘導される状態をステート2と呼ぶ）では、光化学系のバランスを取るためにステート遷移によってエネルギーは光化学系Ⅰに流れるようになるため、光化学系Ⅱからの蛍光は弱くなる。この蛍光の変化を利用して、ステート遷移の過程を解析することができる。ただし、陸上植物では、アンテナであるLHCⅡの色素はクロロフィル*a*と*b*であり、光化学系の反応中心複合体とは、その吸収はそれほど変わらないこともあり、ステート遷移の影響は一般にそれほど大きくない。しかし、紅藻やシアノバクテリアのアンテナであるフィコビリソームに含まれるフィコビリンは、クロロフィルとは全く異なる領域の光を吸収するため、ステート遷移は光合成系に極めて大きな影響を与える。

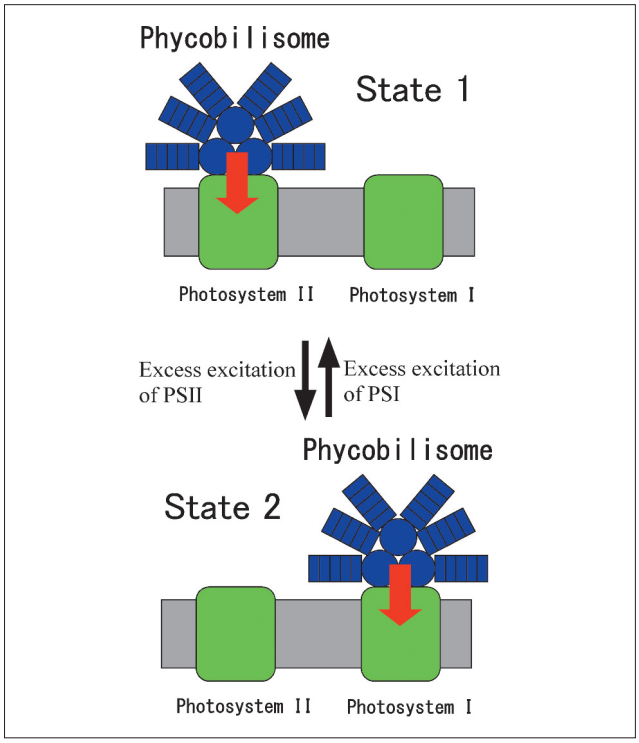


図３　Mechanism of state transition in cyanobacteria.

特にシアノバクテリアは原核生物であるため、細胞内の光合成電子伝達系が呼吸鎖と一部の電子伝達体を共有している。これを用いて、細胞を暗所においておくことによりステート2の状態を誘導することができる。また、光化学系Ⅱの阻害剤であるDCMUを加えて光を照射すると、ステート1の状態を誘導できる。従って、これらの2つの状態で低温クロロフィル蛍光スペクトルを比較すれば、ステート遷移に関する情報を得ることができる。ステート2誘導条件で光化学系Ⅱの蛍光が相対的に弱くなり、ステート1誘導条件で光化学系Ⅱの蛍光が相対的に強くなれば、ステート遷移の能力があると結論できる。従って、2つの条件で低温クロロフィル蛍光スペクトルに差があるかどうかを見ることによりステート遷移を見積もることができる。

測定手順は、基本的に細胞の前処理が違うだけで、光化学系量比を測定する場合と全く一緒である。ステート2を誘導するためには、細胞を試料セルに入れた後、暗所において10分程度室温で放置し、その後暗所で液体窒素により凍結すればよい。この際に、呼吸の末端酸化酵素の阻害剤であるKCNを1 mM程度添加すると、より確実にステート2を誘導することができる。ステート1を誘導する場合には、細胞に最終濃度10 μMのDCMUを加えてから、試料セルに入れ、励起光を1分程度照射して、そのまま光をあてながら液体窒素に入れて凍らせればよい。この際、可能であれば、ガラスの一部が透明になったデュワー瓶があると、凍結するぎりぎりまで光を当て続けることができるので安心である。励起光の光源は特に何でもよいが、強い青色光を使うとオレンジカロテノイドプロテイン（OCP）というタンパク質による別の調節メカニズムが働く可能性があるので、比較的弱い光を使った方が安心である。

4.　測定における注意点

4-1　必要な装置構成

日本分光のFP-8500は、本来、可視領域の蛍光を測定するための装置であり、例えば副標準ハロゲン光源によってスペクトル補正をする場合の推奨補正範囲は350 nm～700 nmとなっている。従って、735 nm付近に極大をもつ光化学系Ⅰの低温蛍光を測定することはできないので、波長拡張を行なう必要がある。波長拡張アッセンブリをオプションにより追加し、光電子増倍管を長波長領域まで感度をもつ浜松ホトニクスのR928に変更すれば、800 nmまでの補正スペクトルを得ることができるので、光化学系Ⅰの蛍光にも十分に対応可能となる。

液体窒素温度での測定には、液体窒素冷却ユニットPMU-830をオプションとしてつければよい。一般に、液体窒素による冷却の方法としては、試料セル自体を液体窒素の中に入れて測定する方法と、試料セルの金

属部分の下部を液体窒素に入れて熱伝導により試料セルを冷却する方法がある。方法としては一長一短があり、前者の液体窒素の中に試料セルを入れる方法では、光路が液体窒素を横切ることになるため、泡や上部から入り込んで浮遊する霜の結晶の動きがノイズの原因となる可能性がある。一方、熱伝導により冷却する場合には、液体窒素より上に光路が位置することになるため、霜が試料セルに付着していくことが避けられず、一般に時間とともにベースラインの変化がみられる。

これらの問題を回避する方法として、金属製の試料セルの中の試料に石英棒を直接接触させた状態で石英棒の下部ごと液体窒素に入れる方法もある。石英棒の上部に二叉分岐する光ファイバーを取り付けて、片方から励起光を入射し、もう一方から蛍光を取り出せば、光路は石英棒と光ファイバーのみから構成され、ノイズやベースライン変化の原因となりがちな液体窒素や空気を光路から除外できる。ただし、この方法を市販の蛍光光度計に応用することは難しく、個別の分光部品などを用いた分光器の自作が必要になる。

液体窒素冷却ユニット PMU-830の場合は、試料セル全体を液体窒素中に入れる方法を取っているため、泡を最小限にするために液体窒素を入れるデュワーの真空度が重要である（図4）とともに、霜の混入を防ぐために試料室付近に乾燥窒素を流して湿度を下げて測定する必要がある。また、PMU-830の試料セルは、固体試料や粉体試料が想定されているため、生物試料のように水もしくは緩衝液に懸濁された試料を扱うと、石英製の試料管であっても、液体窒素で冷却する際にかなりの確率で試料管の破損が起こる。このため、破損のおこらないプラスチックチューブを試料管として使えるように図5に示すようなアダプターを作製する必要がある。ただし、プラスチックの種類によっては、液体窒素温度で無視できない蛍光を出すものがあるので、用いるプラスチックチューブの選択には注意が必要である。

このほか、光電子増倍管の感度が波長によって異なることなどによるスペクトルへの影響を補正するために、副標準ハロゲン光源を用いてスペクトル補正をすることが可能であるが、光化学系の解析という観点からだけすると、必要なのは絶対的なスペクトルではなく、スペクトルの変化であるため、副標準ハロゲン光源を用いることは必須ではない。

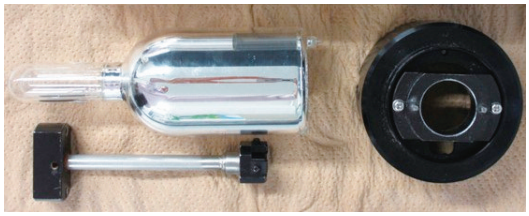


図4　The dewar vessel for the measurements (left upper side), the custom-made adaptors for the plastic sample tubes (left lower side and right).

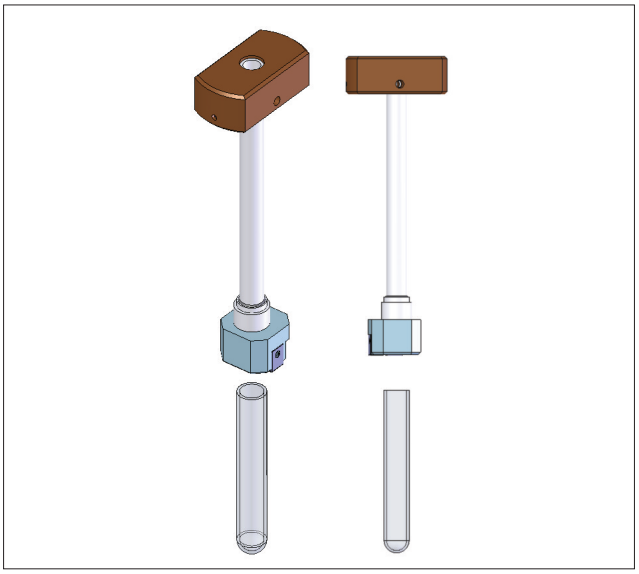


図5　The custom-made adaptor for the plastic sample tubes.

4-2　試料のクロロフィル濃度

同じ物質の吸収スペクトルの極大波長と蛍光スペクトルの極大波長の差をストークスシフトと呼ぶが、このストークスシフトは、液体窒素温度で測定したクロロフィル蛍光の場合、光化学系Ⅰと光化学系Ⅱの間で大きく異なる。光化学系Ⅰでは30 nm以上のストークスシフトが見られるため、吸収と蛍光の重なりはほぼ無視できるが、光化学系Ⅱのストークスシフトは10 nm程度であり、吸収スペクトルと発光スペクトルは大きく重なっている。従って、発光された蛍光が試料中で再びクロロフィルにより吸収される自己吸収の影響は光化学系Ⅱで大きく、光化学系Ⅰでは小さくなる。

このような自己吸収の影響は、クロロフィル蛍光スペクトルから二種類の光化学系量比の変化を見積もる場合に大きな問題となりかねない。例えば、まったく同じ試料（ここではホウレンソウから単離したチラコイド膜）の蛍光スペクトルであっても、測定時のクロロフィル濃度によって、二つの光化学系の蛍光強度の比率は大きく変化する。クロロフィル濃度が高い場合には、ストークスシフトが小さい光化学系Ⅱの蛍光が自己吸収によって過小評価されるため、見かけ上、光化学系Ⅱの相対量が小さくなる（図6）。この傾向は、チラコイド膜を単離せずに、直接、葉を測定した場合

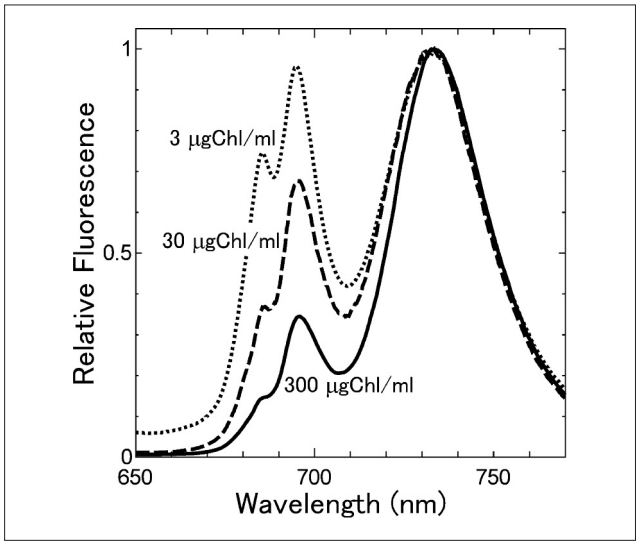


図6　Fluorescence spectra of spinach thylakoid membranes with different chlorophyll concentration.

などには、さらに顕著である。クロロフィル蛍光による光化学系量比の測定においては、試料のクロロフィル濃度をそろえて測定することが必須である。

自己吸収の影響は、5 μgChl/ml以下のクロロフィル濃度のチラコイド膜ではほぼ無視できるが、希薄試料の測定では、反射光や散乱光、あるいは試料チューブなどの蛍光に由来するアーティファクトの問題が生じることが多いので注意を要する。反射光や散乱光によるアーティファクトが希薄試料において大きくなるのは、単に信号との比率としてだけではない。すなわち、測定対象の物質自体が反射光や散乱光を吸収するため、それらの物質の濃度が減少すると、アーティファクトは増大することになる。従って、吸収測定の場合とは異なり、測定対象の物質が存在しない溶媒だけのブランク試料の測定を行ってこれをベースラインとして補正することは、凍結試料の蛍光測定においては推奨できない。

4-3　クロロフィル蛍光極大の高さの比較

一般に、凍結試料を用いた分光測定においては、氷の結晶によって異方性が生じるため、そのシグナルの絶対値は試料の状況によって大きく変化してしまう。その場合にも、例えば光化学系量比の見積もりにおいて重要なのは光化学系Ⅰと光化学系Ⅱの蛍光の比率であるので、そのような測定においては得られた結果の再現性は比較的高い。しかし、何らかの理由で蛍光ピークの高さの絶対値を比較しようとした場合には、工夫が必要となる。

一般的には、このような場合、ローダミンなどの蛍光物質を内部標準として加え、その蛍光との比を取ることにより蛍光ピークの高さの絶対値を比較するが、ローダミン蛍光の波長領域はクロロフィル蛍光の波長領域よりもずっと短波長であるため、実際のクロロフィル蛍光測定の条件には合致しない場合が多い。このため、クロロフィル蛍光の波長領域により近い蛍光を出すGFP由来の蛍光タンパク質を内部標準として用いる方法なども提案されている。

氷の結晶の生成は、グリセロールを体積比で50–60%加えることによりガラス化すれば抑えることができる。ただし、液体窒素温度まで冷却する際に、ガラス状になった試料に亀裂が生じることがあり、理想的な解決策にはならない場合も多い。さらに原始的な方法としては、試料を回転させる方法がある。試料の測定を例えば4回行ない、1回ごとに試料チューブを90度回転させて測定すれば、異方性がある程度は平均化される。

5.　おわりに

低温蛍光スペクトル測定は、蛍光光度計にいくつかのオプション部品や特注の部品を用意する必要があること、試料の前準備に若干のノウハウが必要であることから、それほど広く使われている状況にはない。しかし、光合成の解析方法としては比較的単純であり、多くの情報が得られる便利な方法であることには間違いがない。本稿をきっかけに、低温蛍光スペクトルがより多くの研究の現場で利用されるようになることを期待したい。

6.　謝辞

ここに紹介した測定手法の開発は科学研究費補助金・新学術領域研究（新光合成16H06552、16H06553）のサポートを受けて行われた。

●文　献

園池公毅：低温科学, **67**, 507–524 (2009)

そのいけ　きんたけ
早稲田大学教授（教育・総合科学学術院）理学博士

筆者紹介　1983年　東京大学教養学部卒、1988年　東京大学大学院理学系研究科博士課程修了、1989年　理化学研究所特別研究生、1990年　東京大学理学部助手、1999年　東京大学新領域創成科学研究科准教授、2009年　早稲田大学教育・総合科学学術院教授。《現在の研究テーマ》光合成生物の環境応答メカニズムの研究　《主な著書》『光合成とはなにか』講談社2008年、『トコトンやさしい光合成の本』日刊工業新聞社2012年、『植物の形には意味がある』ベレ出版2016年