

生化学の手法 13.1 光合成の研究

生化学の研究において用いられるほとんどのテクノロジーが、さまざまなところで応用されている。このことは、光合成の研究で利用される以下の手法においても当てはまることである。

分光法

分光法においては、分子による電磁波の吸収を測定する。この吸収を測定する装置は分光光度計と呼ばれ、広い範囲の波長域をスキャンすることができる。電磁波の試料による吸収のグラフは吸収スペクトルと呼ばれる。

光合成研究において、さまざまな植物成分による電磁波の相対的な吸収が、光の捕捉への寄与を決定するために測定された。この研究により、大部分の光の吸収は、クロロフィルとカロテノイドによることが明らかにされた。いくつかの植物色素の吸収スペクトルを図 13D に示す。予想されたように、クロロフィルは 500 nm から 599 nm (緑から黄緑)の光をほとんど吸収しない。クロロフィルは、400 nm から 500 nm (紫から青)の光と 600 nm から 700 nm (橙から赤)の光を強く吸収する。

光合成の速度に対する波長の効果を測定すると、作用スペクトルが得られる。図 13D に注目してほしい。典型的な葉の作用スペクトルは、特定の波長(たとえば 650 nm と 680 nm)における光合成がそれぞれクロロフィル *a* とクロロフィル *b* により吸収された光を用いていることを示している。吸収されない光は生葉において葉緑体から葉緑体へと反射されるために、生葉は純粋な色素よりも効率的に光を吸収する。内部における反射が起こるときには、そのごく一部分ではあるが反射された光が吸収される。その結果として最終的には、葉に当たる多くの波長の光が葉に吸収される。

1950 年代に、Robert Emerson が光合成を研究するためにより正確な作用スペクトルを得た。可視領域の光を照射して生成する

酸素分子の数を測定したところ、690 nm よりも長波長側の光には光合成を促進する効果がないことを見いだした。しかしながら、赤色光に加えて青色光が与えられると、光合成速度(すなわち酸素の発生速度)は明らかに上昇した。この現象はエマーソン増強効果と呼ばれ、のちに二つの分離可能な光化学系(PSI と PSII)の理論を支持するものとなった。

他のタイプの分光法は、電子スピン共鳴(ESR)法として知られている。不対電子をもつ分子の場合、急速に変動する磁場においてそれらの不対電子のエネルギーを測定できる。それぞれの電子は独自の電場をつくるので、外部磁場に対して平行な状態と非平行な状態に分かれる(電子は常に分子の環境に影響される)。ESR スペクトルは、二つの状態のエネルギー準位の差を表している。ESR は多くの生化学の領域で有効な手法であるが、とくに光合成の研究において役立っている。たとえば、光合成の反応中心における光子吸収成分が1対のクロロフィル分子であることの決定に重要な役割を果たした。

光化学

光化学は、光の吸収により開始される化学反応を研究する学問分野である。光化学反応においては、イオンやラジカルが形成されるときに化学結合が開裂される。励起された分子もまた、異性化されたり酸化剤に変換される。いくつかの手法を用いて光化学的な反応をモニターすることができる。その場合、生成物の形成や蛍光およびりん光の発光を測定する。

光合成研究における最も代表的な光化学の利用例は、水分解クロックの発見につながった研究である(p. 393 の図 13.12)。Pierre Joliot と Bessel Kok は、藻類や葉緑体が暗期のあとで短時間の光照射にされたときに生じる酸素発生を測定することにより、

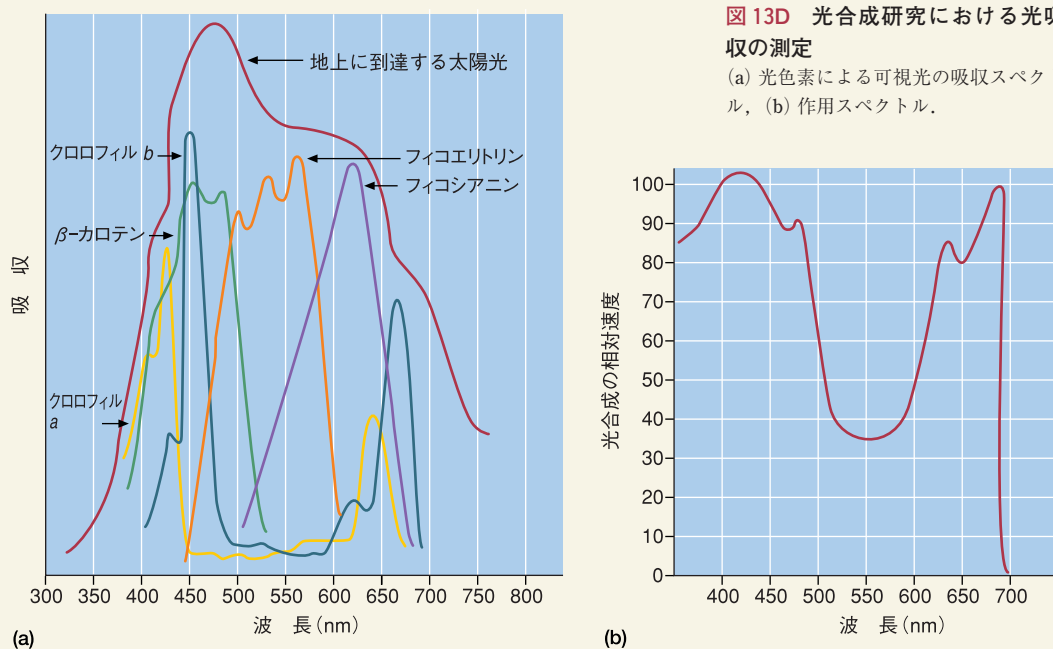


図 13D 光合成研究における光吸収の測定

(a) 光色素による可視光の吸収スペクトル, (b) 作用スペクトル。

PSIIを研究した(最近になって、PSIIの反応中心を封じ込めた膜の容器を用いた研究によってこれらの実験が繰り返された)。1969年に Joliot は、1回目と2回目の光照射では酸素は発生しないことを見つけた。3回目の照射で一気に酸素が発生した。その後の酸素発生は、振幅のあるパターンを示し、4回目の照射ごとに最大の酸素発生量を示すピークが観察された。1970年に Kok は、PSIIの酸素発生複合体には、五つの一過的な酸化状態 S_0 から S_4 が存在することを示唆した。1回目の光照射により P680 は $P680^*$ に変換される。 $P680^*$ を P680 に再変換する電子を供給するクロックは、 S_4 の状態に達すると酸素を放出する。現在では、暗期に反応中心が S_0 というよりはむしろ S_1 の状態になるために、3回目の照射で酸素は一気に発生すると信じられている。結果として、酸素発生は4回の照射ごとにピークを示すことになる。大量の光化学系複合体を測定すると、光の吸収がランダムに起こることの相殺作用によって振動は見えにくくなる。

X線結晶構造解析

X線結晶構造解析は、分子の構造を決定する有効な手段である(生化学的手法5.1)が、疎水的な分子の結晶化が困難であるために、その利用は限られていた。多くの重要な光合成の成分が膜に存在するので、この手法は光合成研究においてあまり有効ではなかった。しかしながら近年、低分子の両親媒性有機分子が膜タンパク質の抽出と精製に用いられ、共結晶化と呼ばれる方法が使われるようになってきた。この技術を使い、ロドシュドモナス属(紅色非硫黄細菌のグループ)の反応中心の構造が決定された。分光学的な手法で得られた知見とあわせて、X線結晶構造解析から得られた構造的な情報は、光合成電子伝達のしっかりとした全体像を提供した。

放射性トレーサー

生体内では同時にいくつもの反応経路が進行しているために、特定の化学経路を追跡することはなかなか困難である。しかしながら、もし生化学分子にトレーサー(その存在を追跡できる化合物)を利用して、タグや標識がついていれば、反応経路は研究しやすくなる。放射性同位元素は、標識された分子の代謝的な経路を追跡するのに非常に有効である。

放射性化合物の核は不安定である。すなわち、壊変して他の核になる。この過程は、放射光を測定する装置、たとえばガイガーカウンターやシンチレーションカウンター、あるいはオートラジオグラフィにより追跡することができる(生化学的手法2.1)。

最も古くから利用されたトレーサーに ^{14}C があり、Melvin Calvin と共同研究者らが1950年代に藻類の炭素固定を研究するために利用した。 CO_2 が糖質に取り込まれる経路を決定するために、Calvin のチームは独創的な装置を考案した(図13E)。反応中間体の標識は、炭素固定経路のはじめのいくつかの段階に限定されるようになっている。未標識の CO_2 は藻類のクロレラの培養液を含む透明容器に通気される。容器に光が照射され、光合成が十分に起こってから、閉じたコックが開かれ藻類は細いガラス管を通り沸騰メタノールの入ったビーカーへ流れるようになっている(藻類が沸騰メタノールのビーカーに入ると、藻類は死に、その代謝は停止する)。 $^{14}\text{CO}_2$ は管の途中で注入される。藻類が ^{14}C にさらされる時間は正確に設定できる。光合成は藻類が管を流れる間、細胞がメタノールで殺されるまで進行する。Calvin のチームは、アルコール抽出物をペーパークロマトグラフィとオートラジオグラフィを用いて分析した。そして、 ^{14}C にさらす時間を変えて、藻類で同化される炭素の経路を決定した。たとえば、 $^{14}\text{CO}_2$ に5秒間さらすと、大部分の ^{14}C は3-ホスホグリセリン酸として検出された。30秒後には、大部分の ^{14}C はヘキソースリン酸として検出された。

図13E CO_2 固定の研究のために用いられたカルビンの装置

