

# 食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	トウモロコシの葉緑体を用いた光応答電流の発生機構の解明
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	糟野 潤（先端理工学部・講師）研究代表者 古本 強（農学部・教授）
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1) 光応答電流 (2) 葉肉細胞 (3) 維管束鞘細胞 (4) メディエータ (5) 電子伝達阻害剤 (6) バイオセンサ

## 1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

光合成生物（紅色細菌、ホウレンソウの葉緑体など）とメディエータを固定した電極に光を照射すると、光合成生物から電極へ電子が移動して電流が流れる。同反応は、生物太陽電池のみならず、電子伝達鎖内の電子移動反応を妨害する農薬類を検出するためのバイオセンサにも適用できる。したがって、光応答電流の発生機構を明らかにすることは生物太陽電池やバイオセンサへの応用に重要な知見を与えると期待できる。

本申請研究では、サイクリック電子伝達経路をもつ維管束鞘細胞葉緑体（BSC葉緑体）とリニア電子伝達経路をもつ葉肉細胞葉緑体（M葉緑体）を抽出できるトウモロコシに注目し、二種類の電子伝達機構と光応答電流の関係を明らかにすることを目的とした。

本研究で使用する作用電極は、外部電子受容体である DCBQ とカーボンペーストを重量比で 1 : 200 になるように混ぜたものをカーボンペースト電極上に固定し、その表面に抽出した葉緑体サンプルを滴下して風乾し、透析膜とナイロンネットで固定して作製している。光合成素子としてトウモロコシの葉緑体を使用した報告例はないため、最適なメディエータを明らかにするとともに、メディエータなど各種最適な測定条件を調査した。メディエータに関しては、ホウレンソウで得られた研究成果を参考にし、キノン誘導体である 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone (DCBQ) を選択し、電子伝達阻害剤が光応答電流に及ぼす影響についても調査した。代表的な阻害剤である 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) および KCN を一定量添加し、添加前後に得られる光応答電流の値を比較して、メディエータがどの部位から電子を受け取っているのかを考察した。また、バイオセンサ等への応用を考慮し、各葉緑体の耐久性についても調べた。葉緑体を抽出した日に得られる光応答電流値を基準とし、抽出日からの経過日数と光応答電流の関係を評価した。

## 2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

外部電子受容体である DCBQ とカーボンペースト粉末の重量比を 1:200 で作製したカーボンペースト電極に、トウモロコシの葉緑体の抽出液を一定量塗布して風乾し、透析膜で固定したものを作用電極として用いた。この作用電極と参照電極の Ag/AgCl {3.3 M (= mol dm<sup>-3</sup>) KCl} 電極および対極の白金線の三電極を、pH 8.0 の緩衝溶液 (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic-acid (HEPES), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic-acid (MES), tris-(hydroxymethyl)aminomethane (Tris 塩酸) あるいはリン酸緩衝液) に浸した電極式セルをファラデーゲージ内に設置し (図 1)、0.5 V vs. SSE を作用電極に印加し続けながらある波長以下の光をカットできる 5 種類の色フィルターを介して光を照射し、電流-時間 (*I-t*) 曲線を記録した。

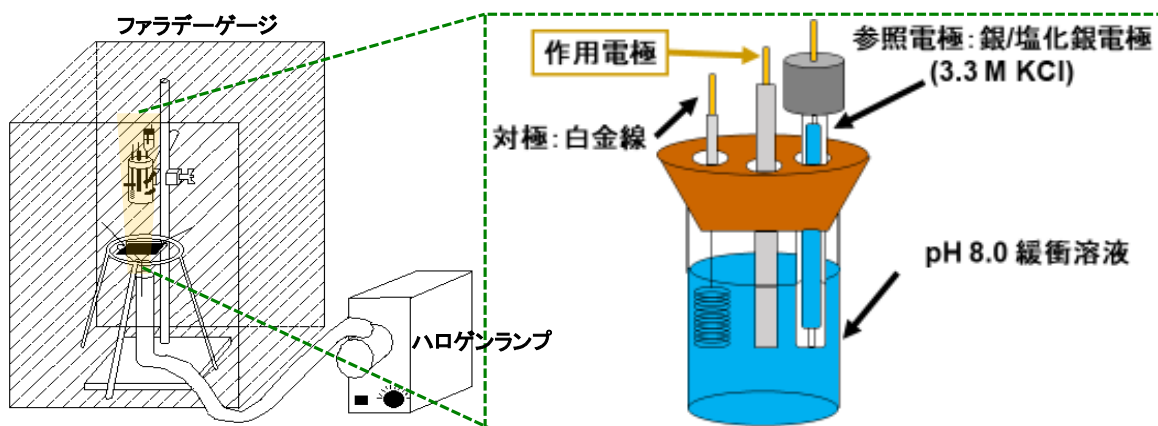


図 1. 本研究で用いた三電極式電解セルとファラデーゲージ内のセットアップ図.

M 葉緑体を用いて測定した光応答電流の結果を図 1 に示す。光を照射すると正電流が流れ、光照射をやめると元のバックグラウンド電流に落ち着いた。この正電流は M 葉緑体あるいは DCBQ のどちらか一方が存在しないときには観察されなかったことから、M 葉緑体中の電子伝達鎖から DCBQ が電子を受け取って還元され、その DCBQ 還元体が電極上で再酸化されることによ

って生じたことが分かった。光を長時間照射すると光阻害による葉緑体の活性低下が生じるため、まず初めに光の照射時間と葉緑体の活性低下率の関係を調査した。同じ条件で作製した作用電極を用いて 5 回繰り返し光照射をし、1 回目と 5 回目で得ら

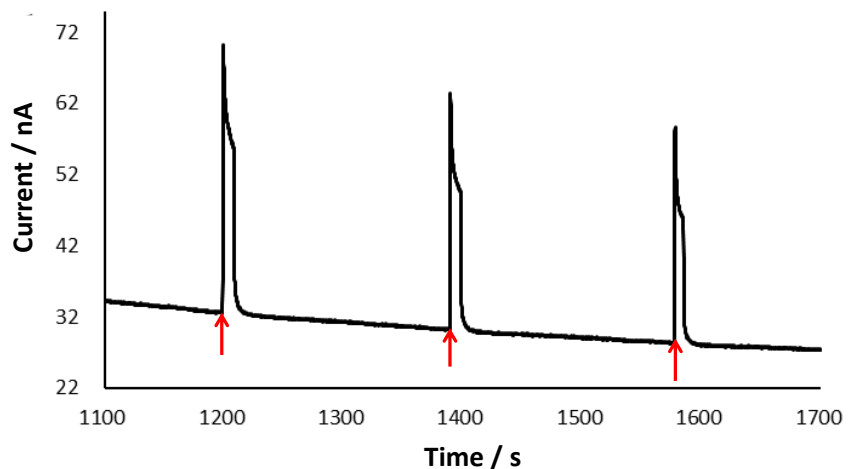


図 2. M 葉緑体を用いて測定した光応答電流 (光照射時間: 10 秒) .

れた光応答電流の値を比較したところ、光照射時間が 10 分間のときは 40%、10 秒間のときは 85% まで減少した。有害物質の影響を調査することを考慮し、今後の測定はすべて 10 秒間の光照射時間で行った。

次に、M 葉緑体と DCBQ を固定した作用電極に 3 回繰り返し光照射して得られた光応答電流の平均値を DCBQ の混合比に対してプロットしたところ、M 葉緑体中の電子伝達鎖から電極への電子移動反応はミカエリス・メンテン式に従うことが分かった。得られたプロットをミカエリス・メンテン式に基づいて解析したところ、M 葉緑体で得られた光応答電流のミカエリス定数 ( $K_m$ ) の値は 0.02 であった。また、M 葉緑体の代わりに BSS 葉緑体を用いて同様に測定して得られた  $K_m$  値は 0.01 と見積もられた。ハウレンソウの葉緑体で得られた  $K_m$  値は 0.035 であったことも考え合わせると、外部電子受容体である DCBQ とトウモロコシ (特に BSS 葉緑体) との親和性がハウレンソウよりも高いということがわかった。

DCBQ とカーボンペーストの混合重量比を 1:200 に固定し、電極表面の塗布する M 葉緑体の量を種々変えて光応答電流を測定した。光応答電流は M 葉緑体中のクロロフィル量に依存して増加し、3 mM よりも濃い領域では少しずつ減少した。これは、葉緑体の塗布量が増えて層が厚くなり、電極近傍まで光が届きにくくなったためであると考えられる。したがって、以降の実験では M 葉緑体のクロロフィル量を 2.5 mM に固定して光応答電流を測定した。

クロロフィル量を固定し、一定の波長領域の光をカットする色フィルターと光応答電流の関係について調べた。HOYA 株式会社製の色フィルター ( $\lambda < 370$  nm の光をカットする L37,  $\lambda < 520$  nm の Y52,  $\lambda < 580$  nm の O58,  $\lambda > 660$  nm の R66,  $\lambda < 695$  nm の R695) をそれぞれ用いた時に得られる光応答電流の結果を図 4 に示す。色フィルターがカットする光の波長が長波長になればなるほど、観察される光応答電流の値は小さくなった。クロロフィルや光補修タンパクが有する光吸収の波長が 300~500 nm あたりに存在することから、光電子移動反応の観察には L37 あるいは Y52 の色フィルターを用いることが有用であることが示唆された。ここで、メディエータであるキノン誘導体も 300~500

nm あたりに吸収波長を有している。光の強度によっては、葉緑体の有無にかかわらずメディエータ自身の光励起による電子移動が観察される可能性がある。本研究では、メディエータが原因となりうる光電子移動反応が観察されない光強度も調査し、葉緑体が共存して初めて光応答電流が流れる条件も明らかにした。

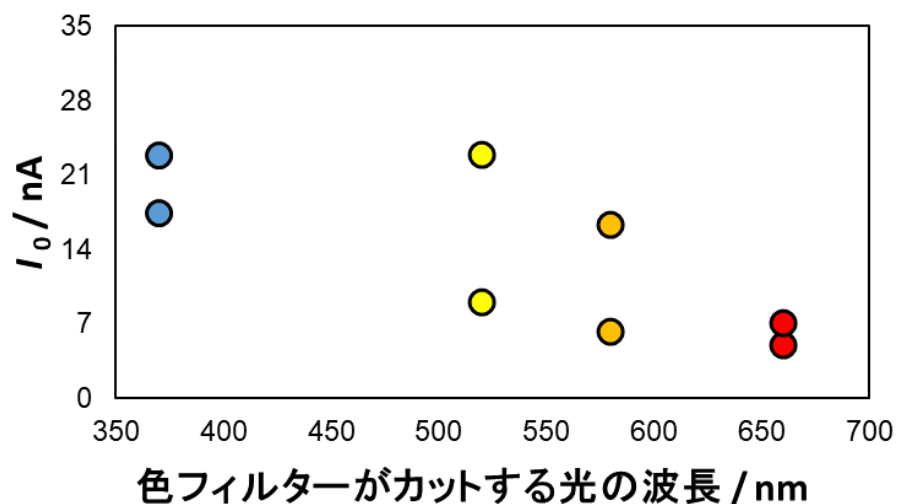


図 3. 色フィルターがカットする光の波長と光応答電流の関係。

次に、4種の緩衝剤（HEPES, MES, Tris 塩酸, リン酸）でそれぞれ調製した pH 8 の緩衝溶液を用いて光応答電流を測定した。M 葉緑体を用いて得られた結果を図 4 に示す。リン酸緩衝溶液および HEPES 緩衝溶液で得られた値と比較すると、およそ 3 倍の光応答電流が MES 緩衝溶液では観察された。1 回目と 3 回目の光照射で得られた光応答電流の値から

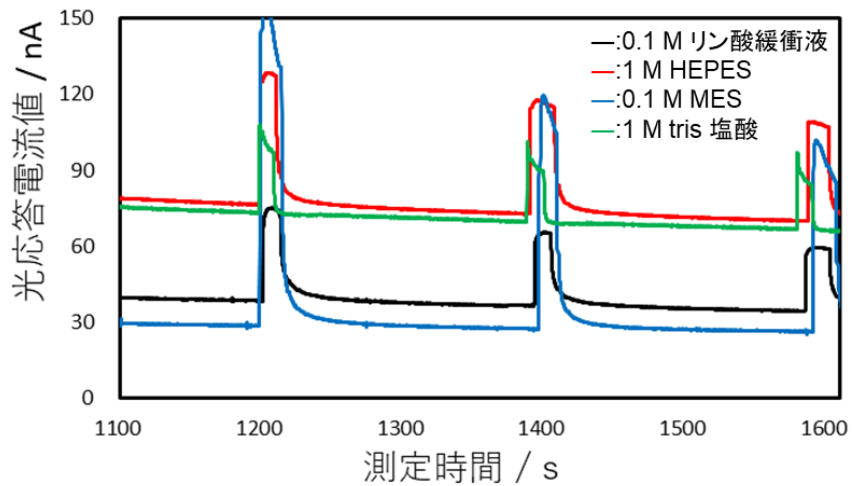


図 4. 種々の緩衝溶液（HEPES, MES, Tris 塩酸およびリン酸）で測定した光応答電流.

求めた減衰率は、0.1 M MES 緩衝溶液を用いたときが約 26% と最も大きい値が得られた。一方、HEPES 緩衝溶液を用いたときの減衰率は約 7% と最も低い値となった。これはおそらく、M 葉緑体の膜構造を HEPES が安定化しているためであると考えられる。光応答電流の安定性およびバックグラウンド電流の値から、有害物質の影響を観察しやすいと考えられる 0.1 M リン酸緩衝溶液を以降の有害物質検出の検討に用いた。

以上の結果から明らかになった最適な光照射時間、葉緑体の塗布量およびメディアータとカーボンペーストの混合比などの条件を用いて繰り返し光照射を 3 回行った後、電子伝達の阻害剤である 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) を 0.001~1 mM になるよう緩衝溶液に添加して十分攪拌し、電流値が落ち着いてから再び 3 回光照射を行った。DCMU の添加前後で得られた平均の電流値を比較して DCMU の阻害率を DCMU の濃度に対してプロットしたものを図 5 に示す。

M 葉緑体、BSC 葉緑体ともに DCMU 濃度が 0 mM のとき、すなわち DCMU を添加していないときでも約 20% 程度の光応答電流の減少が減衰率として観察された。これを基準点とすると、M 葉緑体で得られる光応答電流は阻害率が 50% 程度と DCMU による阻害を受けた一方で、BSC 葉緑体の光応答電流はいず

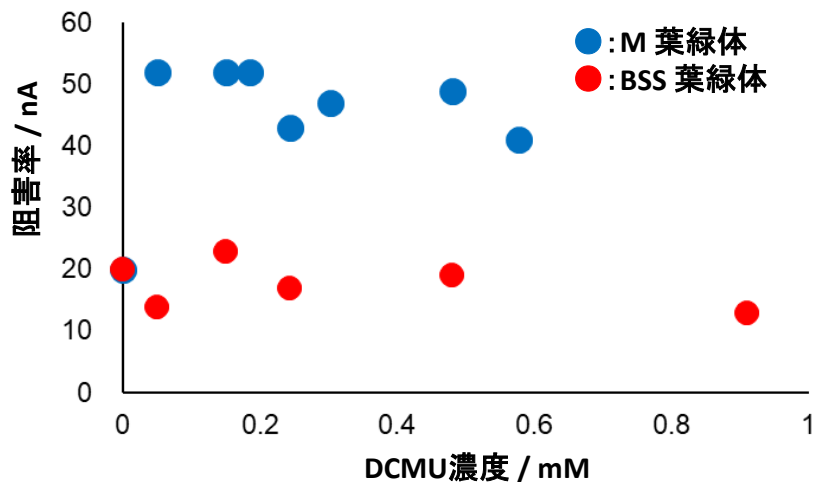


図 5. DCMU が M 葉緑体および BSC 葉緑体の光応答電流に及ぼす影響. (DCMU 濃度：0.001~1 mM)

れの DCMU 濃度であっても阻害率はほぼ減衰率と変わらなかった。DCMU は  $Q_B$  キノン電子受容体部位に比較的高い特異性をもって結合し、 $1 \mu M$  で PSII の還元側での電子伝達反応を可逆的に阻害し、 $10 \mu M$  以上の高濃度で PS II の酸化側での電子伝達反応も阻害する阻害剤である。DCMU が図 6 に示す電子伝達系内の第二キノン受容体である  $Q_B$  に比較的高い特異性をもって結合し、光化学系 II (PSII) の電子伝達反応を可逆的に阻害することから、電子伝達経路に  $Q_B$  を持たない BSC 葉緑体で得られる光応答電流に変化がなかったものと考えられる。すなわち、光応答電流の一部は  $Q_B$  からの電子移動に起因していることが示唆された。

本研究では DCMU 以外にも 5 種類の阻害剤が光応答電流に及ぼす影響についても調査した。KCN はプラストシアニンの電子伝達を阻害すると報告されており、M 葉緑体で約 20% の阻害が観察されたことから、DCBQ は  $Q_B$  のみならずプラストシアニンからも一部電子を受け取っていることが示唆された。脱共役剤である carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) および除草剤の一つであるジクワットは、M 葉緑体、BSC 葉緑体ともに阻害効果は観察されなかった。この結果から、光化学系 II に含まれる P680 や光化学系 I に含まれるフェレドキシンは DCBQ を還元しないことが示唆された。阻害率の値に差はあるものの、いずれの阻害剤を用いても、電解セルに含まれる緩衝剤の種類が影響を及ぼしたため、今後詳細な検討が必要である。

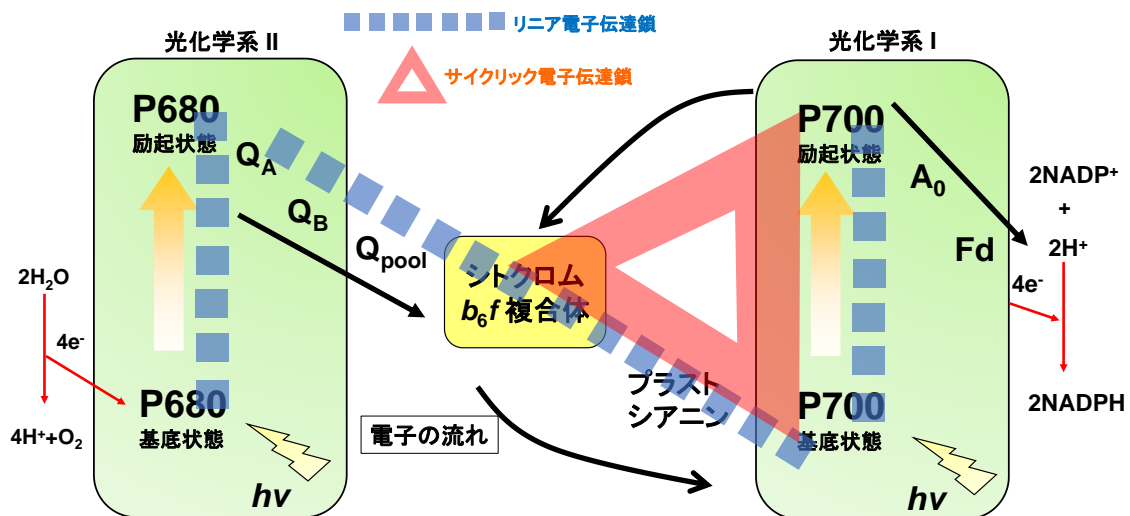


図 6. 電子伝達鎖内の光-電気エネルギー変換の反応機構.

### 3. 研究成果の社会的還元について

本研究プロジェクトの研究成果について（１）社会的な意義や影響（２）社会にどのように発信したのか、を平易にご説明ください。

（１）本申請研究で選択した光合成材料は、C4植物の中でもM葉緑体とBSC葉緑体を分けて抽出することができ、光-電気エネルギー変換のメカニズムや光応答電流の発生機構を深く考察できる。一方、光応答電流の測定結果から、「水の酸化反応からATP生成に至るリニア電子伝達とATP生産に特化したサイクリック電子伝達の二つが植物の葉の中で果たす役割をどのように分けているのか」ということが疑問とされている生化学の分野へ電気化学分野の視点から有用な知見を与えている。本年度に得られた研究成果は、電気化学と生化学の融合という視点から、生物太陽電池とバイオセンサへの基盤となることが期待される。

（２）2021年度は学会発表1件および新春技術講演会、2022年度は学会発表2件および新春技術講演会でそれぞれ発表を行った。研究成果をInternational Journal of Electrochemical Science誌に投稿して査読中である。

### 4. 収支報告

（非公開）

### 5. 研究発表等（研究代表者及び研究分担者）

学会発表・発表論文・著書・学外資金獲得状況 等

○記載項目例

発表論文：著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）

学外資金獲得状況：獲得年、研究費名、代表 or 分担、研究課題名、獲得金額

<学会発表>

・トウモロコシの葉緑体を用いた光応答電流におよぼす有害物質の影響，田中勇毅・横山健吾・本村恵人・古本 強・糟野 潤，日本分析化学会第70年会

・トウモロコシの葉緑体を用いた光応答電流におよぼす有害物質の影響，田中勇毅・本村恵人・古本 強・糟野 潤，第12回光合成学会年会・公開シンポジウム

・トウモロコシの葉緑体を用いた外部電子受容体を介した光電子移動反応，田中勇毅・本村恵人・古本 強・糟野 潤，日本分析化学会第71年会