

Synechococcus sp. を用いた光合成微生物電池

(第2報 *Synechococcus* と2-Hydroxy-1,4-naphthoquinoneの
カップリング部位)

BIOFUEL-CELLS CONTAINING PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISM

Synechococcus sp.

(Part 2. Coupling Site of 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone
to *Synechococcus*)

柳下立夫*¹
Tatsuo YAGISHITA

堀米孝*¹
Takashi HORIGOME

田中和子*²
Kazuko TANAKA

Abstract

The effects of various inhibitors on the current outputs of the biofuel cells containing *Synechococcus* sp. and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone(HNQ) have been examined to identify a possible site in the electron transfer chain to donate electrons to HNQ. The addition of carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazine(CCCP), which inhibits the electron transfer at the reducing site of photosystem II, to the anode solution of the fuel cell caused the suppression of light-induced current from the fuel cells, indicating the current is derived from photosynthetic oxidation of water. The output current of the fuel cells in the light was partially suppressed in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea(DCMU), and completely suppressed in the presence of phenylmercury acetate (PMA). These results suggest that HNQ receives electrons at ferredoxin (Fd) or Ferredoxin-NADP⁺-reductase(FNR), and in the presence of DCMU which remains Q_A protein in reduced state HNQ may accept electrons at the site between P680 and Q_A protein.

Key words: Biofuel cells, Mediator, Inhibitors, Cyanobacterium, (*Synechococcus* sp.)

1. 緒言

植物などの光合成系は効率のよい光捕集系をもち、そして光励起に続く電荷分離を速やかに行っている。近年、この植物や光合成細菌などの光合成系を利用して太陽エネルギーを電気エネルギーに変換する新しいデバイスの研究が広く行われている。現在、葉緑体やチラコイド膜などの種々の光合成系を用いたデバイスが検討されているが⁽¹⁾⁽²⁾、その中で生きている光合成微生物と mediator の組み合わせを用いたデバイス(光合成微生物電池)⁽³⁾⁽⁷⁾は出力電流の大きさと安定性の面で現在のところ最も有望と考えられる。また、光合成微生物電池は生きている光合成微生物を用いている

ので、光エネルギーを電気エネルギーに変換するだけでなく、光を遮断して暗くした場合でも光合成微生物内に蓄えられていたグリコーゲンなどの代謝によって得られるエネルギーを電気エネルギーとして取り出すことも可能である。

光合成の電子伝達系は種々の酸化還元物質から成り、電子は酸化還元電位の低い物質から高い物質へ伝達される。微生物電池において、mediator は電子伝達系に作用して電子を受け取り、電極に電子を渡して光エネルギーや代謝エネルギーを電気エネルギーに変換している。そして、酸化還元電位のより低い部位に mediator が作用すれば、より有効に電気エネルギーに変換することが可能である。本報告では、*Synechococcus* と HNQ のカップリング部位についての知見を得ることを目的として、各種の阻害剤存在下における電池の出力電流の挙動を測定し、*Synechococcus* の酸素発生速度(光照射下)と酸素吸

原稿受付 平成5年4月21日

*1 東京農工大学工学部 (〒184小金井市中町2-24-16)

*2 理化学研究所 (〒351-01和光市広沢2-1)

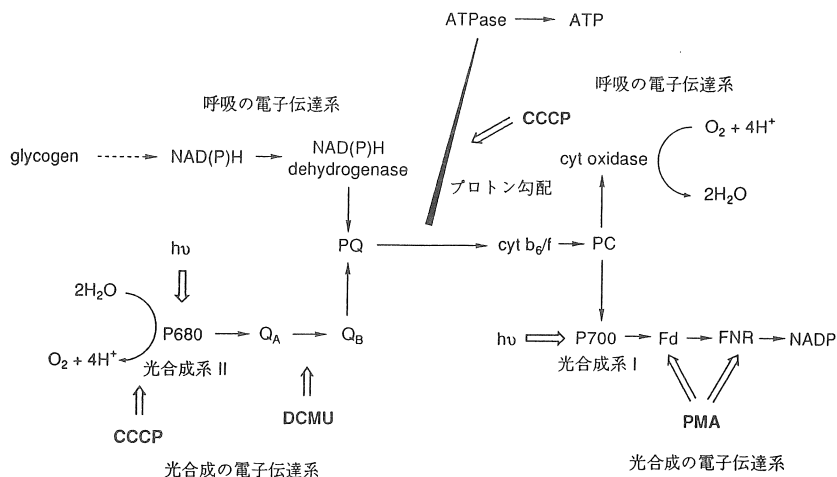


図1 光合成および呼吸反応の電子伝達系における阻害剤の作用部位

収速度（光遮断下）に及ぼす阻害剤の影響の結果と比較した。

2. 阻害剤の阻害部位

図1に、本研究で用いた阻害剤が作用する光合成と呼吸の電子伝達系の部位を示す。光合成の電子伝達系は光合成系IおよびII、そしてcytochrome b₆/f (cyt b₆/f) 複合体から成り、光合成系Iは700 nmに最大吸収を持つP700、光合成系IIは680 nmに最大吸収を持つP680と呼ばれる光反応中心をそれぞれ持っている。光があたると光合成系IIにおいて水の分解が起こり、酸素が発生する。そのときに生じた電子は図1に示す電子伝達系を通り、最終的に nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) へと伝えられ、還元型の NADPH になる。一方、呼吸の場合は光合成微生物内に蓄えられていたグリコーゲンが代謝されて NAD(P)H が作られ、そして NAD(P)H から図1に示す電子伝達系を通り、O₂ が還元されて水になる。Plastoquinone (PQ) から plastocyanine (PC) までの電子伝達系は光合成および呼吸で共通している。そして、PQ から cyt b₆/f への電子伝達と共役してプロトン勾配が形成され、このプロトン勾配によって得られたエネルギーを利用して adenocine triphosphatase (ATPase) によって adenocine triphosphate (ATP) ができる。そして光合成の電子伝達系で生成された NADPH および ATP は CO₂ を固定化するために使われる。

Carbonyl cyanide - *m* - chlorophenyl-hydrazone (CCCP) は 1 μM でプロトン勾配を解消し、それによって高

エネルギーリン酸化合物の adenosine - 5' - triphosphate (ATP) の合成を阻害するが、より高濃度においては光合成系IIの還元部位における電子伝達を阻害し、水の光分解を止める⁽⁸⁾。3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) は光合成の電子伝達系上の Q_A 蛋白 (Q_A) から Q_B 蛋白 (Q_B) までの電子伝達を阻害する⁽⁹⁾。Phenylmercury acetate (PMA) は ferredoxin (Fd) または ferredoxin - NADP⁺ - reductase (FNR) を不活性化する⁽¹⁰⁾。

3. 実験

3-1. *Synechococcus* の培養

Synechococcus sp. の培養、集菌方法、そしてクロロフィル量の定量方法は以前に報告した方法と同様である⁽⁷⁾。

3-2. 電池の構成

電池セルの構造と溶液組成、電池の操作方法は以前に報告した方法に従った⁽⁷⁾。3種類の阻害剤、CCCP、DCMU および PMA はエタノールに溶解し、アノード溶液に添加した。電池に加えたエタノールの量は 0.4 ml 以下であり、この量のエタノールをアノード溶液に加えても電池出力の挙動に影響を及ぼさないことを予め確かめた。

3-3. *Synechococcus* の酸素発生速度および 酸素吸収速度の測定

光照射下における *Synechococcus* の酸素発生速度および光遮断下における酸素吸収速度はクラーク型酸素電極を用いて 25℃において測定した。反応溶液は 1 mM NaHCO₃ または 1 mM 2,5 - dimethyl - *p* - benzoquinone (DMQ) を含んだ 15 μg Chl. / ml *Synechococcus* 懸濁液である。

3-4. *Synechococcus* のクロロフィル a の 蛍光の測定

Synechococcus のクロロフィル a の蛍光は分光蛍光光度計 (F-4010, 日立製作所) で測定した。励起光は 535 nm であり, 685 nm の蛍光を測定した。反応溶液は 10 μM DCMU および 0.16 M HNQ を含んだ 0.5 ml *Synechococcus* 懸濁液 (3.0 μg Chl. / ml) である。

4. 結果

4-1. 光照射下における出力電流および *Synechococcus* の酸素発生速度に及ぼす 阻害剤の影響

光合成による水の分解から発生した電子がどこから HNQ へ供与されるかを調べるために, 3 種類の阻害剤, CCCP, DCMU および PMA 存在下における *Synechococcus* の酸素発生速度および電池の出力電流の変化を比較した。酸素発生速度に及ぼす阻害剤の影響を調べ, それぞれの阻害剤が電子伝達系の電子伝達に阻害効果を現わす濃度を求めた。この濃度の阻害剤を電池のアノード溶液に添加すると, *Synechococcus* 内で行なわれている電子伝達系の電子伝達が阻害剤の阻害部位で止るため, もし HNQ がその阻害部位よりも後の部位から電子を供与されているならば, 阻害剤を入れることによって出力は低下する。一方, HNQ がその阻害部位よりも前の反応から電子を奪っているならば, 阻害剤を加えても出力には何の影響も見られないはずである。

4-1-1. CCCP

阻害剤が無い場合における酸素発生速度は 93 μmol O₂ (mg chlorophyll)⁻¹ h⁻¹ であった。阻害剤として CCCP を加えた場合, 水の光分解を阻害するのに必要な濃度よりも低濃度で ATP の合成が阻害されて CO₂ 固定ができないうちに電子伝達および酸素発生が止るので, CO₂ が電子受容体の場合は酸素発生速度の変化

から CCCP による水の光分解の阻害の程度を見ることができない。それゆえ, 人工的な電子受容体として 1 mM DMQ を加えた。DMQ は電子伝達系の PQ から電子を受け取るので, DMQ の添加によって光合成系 II から PQ, そして DMQ までの電子伝達が行われる。DMQ 存在下における *Synechococcus* の酸素発生の初期速度は 253 μmol O₂ (mg chlorophyll)⁻¹ h⁻¹ となり, DMQ を添加しない場合に比べて酸素発生速度は速くなった。これは, 光合成反応の律速段階である PQ の部位での電子伝達速度が DMQ の添加によって速くなったためである^{(11),(12)}。

図 2 に *Synechococcus* の酸素発生速度に及ぼす CCCP の影響を示す。光照射直後には CCCP の影響は見られないが, 時間が経過するにつれて阻害効果が現われた。そして, 光を照射してから 90 秒後には, 酸素発生速度は 1 μM CCCP を加えた場合 81 % に, 10 μM の場合は 24 % にそれぞれ低下した。

一方, 電池の出力電流は CCCP を加えると徐々に低下するが, 約 20 分後には定常値を示した。このときの値から求めた阻害剤の影響を CCCP の濃度の関数として図 3 に示した。(DCMU, PMA が出力電流に及ぼす影響についても同様に阻害剤の濃度の関数として示す。) 出力電流は 1 μM CCCP の存在下で 90 % になったが, 10 μM では 20 % 以下まで低下した。さらに CCCP の濃度を高くすると電流値は光遮断下における電流値を下回った。酸素発生速度の低下と出力電流の減少の特性がほぼ一致していることは, 光照射下における電流の大部分が水の光分解によって生じる電子によるものであり, グリコーゲンの分解によって発生した電子には由来しないことを示している。

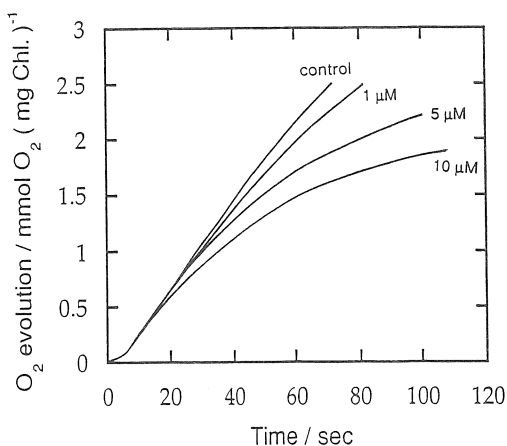


図2 CCCP 存在下における *Synechococcus* の
酸素発生量の経時変化

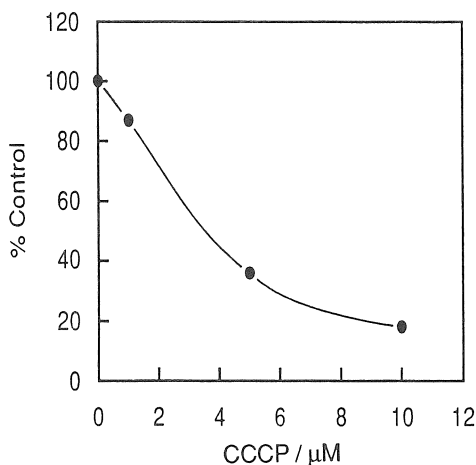


図3 光照射下における出力電流に及ぼす CCCP の影響

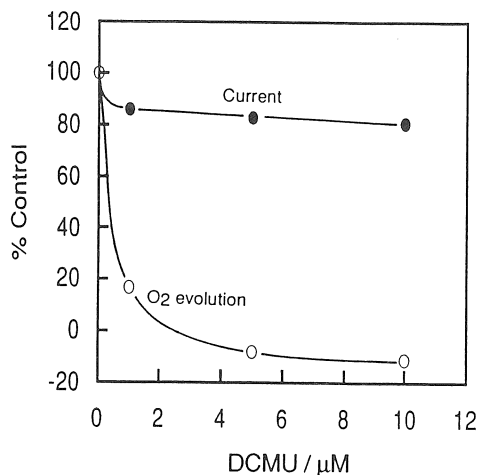


図4 光照射下における *Synechococcus* の酸素発生量および出力電流に及ぼす DCMU の影響

4-1-2. DCMU

酸素発生速度および出力電流に及ぼす DCMU の影響を図4に示す。酸素発生速度は DCMU を加えると徐々に遅くなったが、約1分後には一定の値となった。このときの酸素発生速度から求めた DCMU の影響と DCMU の濃度との関係を図4に示す。酸素発生は $1\mu\text{M}$ DCMU の存在下で完全に止り、さらに濃度を高くすると逆に酸素の吸収が見られた。この酸素の吸収は呼吸によるものと考えられる。

一方、 $1\mu\text{M}$ DCMU を加えると出力電流は 80 % に

減少したが、DCMU をさらに加えても出力電流にほとんど影響を及ぼさなかった。 Q_A から Q_B の電子伝達を完全に止める濃度の DCMU を加えても 80 % 以上の出力電流が維持されていることは、HNQ は DCMU 存在下において Q_A よりも上流に主に作用して電子を受け取っている可能性を示している。

光合成系 II のクロロフィル a から蛍光が発せられることはよく知られている⁽¹³⁾。このクロロフィル a の蛍光は光合成反応に使用されなかった光エネルギーが再放出されたものであり、DCMU を加えて電子伝達を阻害するとこの蛍光の強度が増加する⁽¹³⁾。DCMU 存在下におけるクロロフィル a の蛍光が HNQ の添加でどのように変化するかを調べた結果を図5に示す。クロロフィル a の蛍光は $10\mu\text{M}$ DCMU によって増加するが、HNQ を加えると減少する。図5は 0.16mM HNQ を加えたときの蛍光の減少を示している。この HNQ の添加による蛍光の減少は、DCMU によって阻害された光合成系 II の電子伝達系が HNQ を電子受容体として再び動きだしていることを意味しており、DCMU の出力電流に及ぼす影響から得られた結果と一致する。

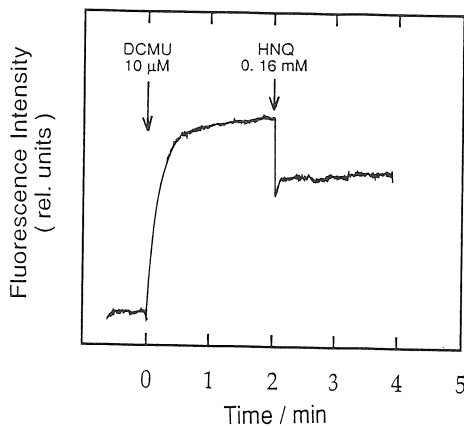


図5 DCMU 存在下におけるクロロフィル a の蛍光に及ぼす HNQ の影響

4-1-3. PMA

図6に酸素発生速度および出力電流に及ぼす PMA の影響を示す。酸素発生速度は CCCP の場合と同様に光照射直後には PMA による阻害を受けないが、徐々に阻害効果が現われた。光を照射してから1分後には $5\mu\text{M}$ PMA 存在下で 50 %、 $10\mu\text{M}$ の場合には 80 % 阻害されたが、更に時間が経過するにつれて酸素発生は徐々に減少する傾向を示した。それに対応して

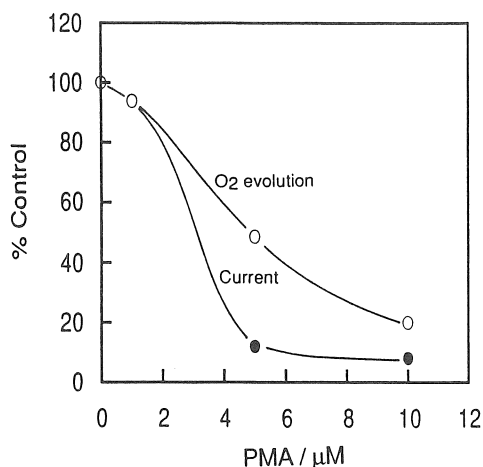


図6 照射下における *Synechococcus* の酸素発生量および出力電流に及ぼす PMA の影響

出力電流も PMA 添加後徐々に減少したが、約 20 分後にはほぼ定常値を示し、5 μM PMA の添加で出力電流はほとんど抑制された。この結果は、Fd または FNR から HNQ に電子が渡されていることを示している。

4-2. 光遮断下における *Synechococcus* の酸素吸収速度および出力電流に及ぼす阻害剤の影響

CCCP, DCMU および PMA を加えたときの光遮断下における *Synechococcus* の酸素吸収速度および出力電流の変化をそれぞれ図 7～図 9 に示す。阻害剤を添加しない場合の酸素吸収速度は 20 $\mu\text{mol O}_2$ (mg chlorophyll)⁻¹ h⁻¹ であった。阻害剤として CCCP を用いた実験においては DMQ を添加しているので、PQ から DMQ に電子が伝達されて酸素まで電子が渡されないため、酸素吸収速度は 8 $\mu\text{mol O}_2$ (mg chlorophyll)⁻¹ h⁻¹ と低くなった。酸素吸収速度に及ぼす阻害剤の影響は、それぞれの阻害剤存在下において光を遮断してから定常値に達したとき (約 5 分後) の値から求めたものである。酸素吸収速度は 1 μM の CCCP の存在によって約 20 % 増加した (図 7)。これは電子伝達系の電子伝達を抑制していたプロトン勾配が CCCP によって解消することにより電子伝達速度が速くなったためである。一方、出力電流は CCCP を加えても変化が見られなかった。この結果は、光遮断下における HNQ への電子供与が CCCP が作用する部位、すなわち PQ よりも前の反応で起きていることを示している。

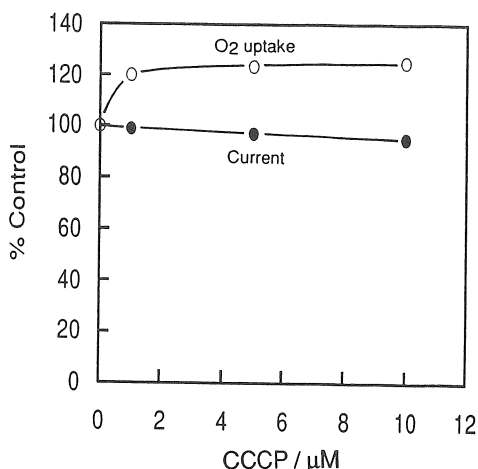


図7 光遮断下における *Synechococcus* の酸素吸収速度および出力電流に及ぼす CCCP の影響

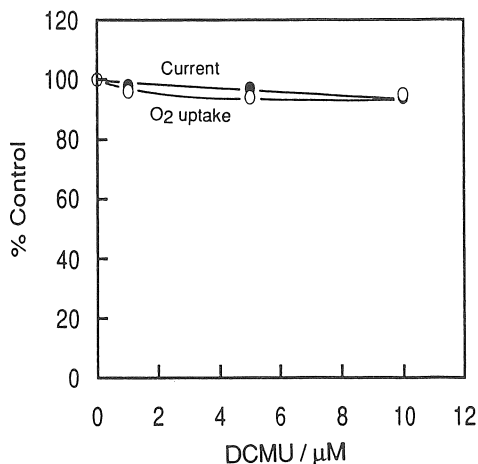


図8 光遮断下における *Synechococcus* の酸素吸収速度および出力電流に及ぼす DCMU の影響

DCMU を加えても酸素吸収速度、出力電流ともにほとんど変化が見られなかった (図 8)。一方、5 μM の PMA の存在によって出力電流は完全に阻害されたが、酸素吸収速度は高濃度の PMA を加えても 60 % 以上の活性を維持した (図 9)。

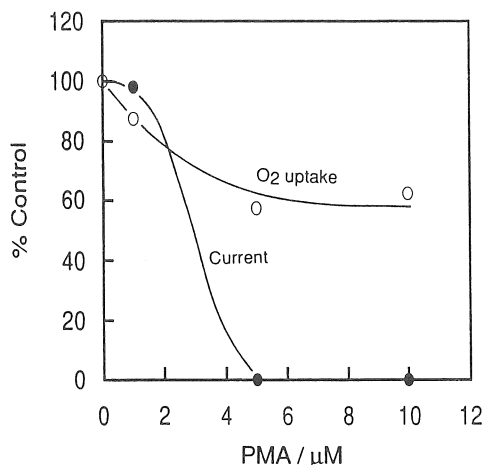


図9 光遮断下における *Synechococcus* の酸素吸収速度および出力電流に及ぼす PMA の影響

5. 考察

5-1. 光合成の電子伝達系から HNQ への電子供与部位

各種阻害剤の存在下において得られた結果から、*Synechococcus* の電子伝達系と HNQ の作用部位を一義的に特定することは難しい。DCMU の添加によって電流が部分的に抑制されたことは、P680 と Q_A の間の部位から HNQ が電子を奪っていることを示している。しかしながら、PMA の添加によって電流が完全に抑制されたことは、Fd または FNR 以降の部位において HNQ への電子供与反応が起きていることを示唆する。この相違は以下に述べることによって生じたと考えられる。阻害剤が存在しない場合には HNQ は主に Fd または FNR から電子を受け取っているが、DCMU によって Q_A より上流の電子伝達系の構成物質が還元状態となって電子のプールができると、そこから HNQ へ電子供与が可能になり、そのため電流は完全に阻害されなかったと考えられる。一方、PMA によって Fd または FNR の部位での電子伝達を阻害すると光合成系 II と光合成系 I は還元状態になり、DCMU によって阻害された場合と同様に光合成系 II の電子伝達系の途中の部位から HNQ への電子供与の可能性も考えられる。しかしながら、還元状態の光合成系 I は酸素によって再酸化され易いため⁽¹⁴⁾、光合成系 II から光合成系 I、そして酸素へ電子伝達されて HNQ に電子が渡らず、電流は発生しなかったと考えられる。

5-2. 呼吸の電子伝達系から HNQ への電子供与部位

光遮断下における電池の出力電流は $5 \mu\text{M}$ の PMA の存在によってほとんど抑制された。呼吸の代謝の過程における PMA の阻害部位は分かっていないが、高濃度の PMA を加えても *Synechococcus* の酸素吸収速度は 40 % 程度しか阻害できなかったことから、PMA は呼吸の電子伝達系を完全に阻害することができないと考えられる。酸化還元電位の比較から呼吸の電子伝達系から HNQ への電子供与が可能な部位を推定すると、HNQ の pH 7.0 での酸化還元電位は -0.14 V 、 NAD(P)H は -0.32 V 、そして PQ は $+0.008 \text{ V}$ であるから、 NAD(P)H から、もしくは $\text{NAD(P)H dehydrogenase}$ を介して HNQ へ電子供与が熱力学的に可能である。しかしながら、生体外での NADH における HNQ の還元は非常に困難なこと、そしてジアフォラーゼが存在してもその還元速度は非常に遅いことから⁽¹⁵⁾、HNQ の電子供与体は NAD(P)H 以外である可能性も考えられる。現在のところ、HNQ の呼吸の電子伝達系への作用部位を特定することは困難であるが、微生物に直接作用する呼吸反応の阻害剤を見出すことができれば、HNQ の作用部位を特定できるであろう。

参考文献

- (1) M. Mimeault and R. Carpentier, Kinetics of photocurrent induction by a thylakoid containing electrochemical cell, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **22** (1989), 145.
- (2) A. A. Solov'ev, E. Yu Katz, V. A. Shuvalov and Y. E. Erokhin, Photoelectrochemical effects for chemically modified platinum electrodes with immobilized reaction centers from *Rhodospirillum rubrum*, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **26** (1989), 29.
- (3) T. Tamura, A. Sato, S. Ajiki, H. Sugino, M. Hara and J. Miyake, A photocell based on a high concentration of chromatophore, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **26** (1991), 117.
- (4) K. Tanaka, R. Tamamushi and T. Ogawa, Bioelectrochemical fuel-cells operated by the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **35B** (1985), 191.
- (5) K. Tanaka, N. Kashiwagi and T. Ogawa, Effect of light on the electrical output of bioelectrochemical fuel-cells containing *Anabaena variabilis* M-2:

- Mechanism of the post - illumination burst, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **42** (1988), 235.
- (6) 柳下立夫・堀米 孝・田中和子・小川晃男, 海産性藍藻を用いた光合成微生物電池の発電試験, 太陽エネルギー, **16-5** (1990), 17.
- (7) 柳下立夫・堀米 孝・田中和子, *Synechococcus* sp.を用いた光合成微生物電池 (第1報 電池出力に及ぼす照射光の波長, アノード溶液の pH および *Synechococcus* 内のグリコーゲン量の影響), 太陽エネルギー, **19-5** (1993) 47.
- (8) M. Kimimura, S. Katoh, I. Ikegami and A. Takamiya, Inhibitory site of carbonyl cyanide *m* - chlorophenyl - hydrazone in the electron transfer system of the chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **234** (1971), 92.
- (9) 加藤 栄, 宮地重遠, 村田吉男編, 光合成研究法 (1981), 415 - 417, 共立出版, 東京.
- (10) R. C. Honeycutt and D. W. Krogmann, Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate, *Plant Physiol.*, **49** (1972), 376.
- (11) 藤茂 宏, 光合成 (1988), 121 - 124, 東京大学出版会, 東京.
- (12) 藤茂 宏, 光合成 (1988), 14 - 17, 東京大学出版会, 東京.
- (13) Y. de Kouchkovsky and F. de Kouchkovsky, Study of the photosynthetic electron transfer reactions in chloroplasts and algae with the plastoquinone antagonist dibromothymoquinone, *Biochim. Biophys. Acta*, **368** (1974), 113.
- (14) M. L. Salin, Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast, *Physiol. Planta*, **72** (1987), 681.
- (15) H. P. Bennetto, J. L. Stirling and K. Tanaka, Reduction of 'Redox' mediators by NADH and electron transduction in bioelectrochemical systems, *Chemistry and Industry*, **21** (1985), 695.