HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光合成細菌の光合成膜
Author(s)	原田, 二朗; 浅井, 智広; 大岡, 宏造
Citation	低温科学, 67, 205-208 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39140
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 2. 光合成膜などの単離 b
File Information	67-031.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

2．光合成膜などの単離
b．光合成細菌の光合成膜

原田　二朗[1)]，浅井　智広[2)]，大岡　宏造[2)]

紅色細菌から単離されるクロマトフォアは安定性が高く，光合成研究の歴史の中ではごく初期の頃から，光化学反応，電子伝達反応，リン酸化反応の機構を調べるために用いられてきた．一方，緑色硫黄細菌やヘリオバクテリは光化学反応系が非常に不安定であるため，比較的容易で迅速に調製できる膜標品を研究に用いる場合が多い．光合成膜は，アンテナ複合体や反応中心複合体をはじめ，膜タンパク質複合体を精製する際には必ず調製しなければならない．ここでは紅色細菌，緑色細菌，およびヘリオバクテリアの光合成膜標品の調製法について説明する．

Preparations of membranes from anoxygenic photosynthetic bacteria.

Jiro Harada, Chihiro Azai, Hirozo Oh-oka

Photosynthetic membranes contain integrated protein complexes essential for energy conversion system. Reaction centers and their related electron transfer components reside in invaginated membranes in purple bacteria, while they do in cell membranes in green bacteria and heliobacteria. Procedures to isolate these membranes are described briefly in order to investigate photosynthetic activities and/or purify membrane-associated complexes followed by further studying their structures and functions in details.

2.b.1　紅色細菌

紅色細菌を光合成条件（嫌気光照射条件）にて培養を行うと，細胞内に様々な形状の膜を発達させる．*Rhodobacter*(*Rba.*) *sphaeroides*[1)]，*Rhodospirillum*(*Rsp.*) *rubrum*[2)]，*Allochromatium vinosum*[3)] には袋状の，*Rsp. molischianum*[4)] や *Rhodopseudomonas*(*Rps.*) *palustris*[5)] ではラメラ状の構造体が観察される．細胞破砕後に袋状の小胞膜 vesicle が得られるが，これを一般的にクロマトフォアと呼んでいる．ここで得られたクロマトフォアは，細胞膜に存在していたときと異なり，膜の内外が反転していることに注意すべきである（細胞質側を向いていた面が外側に来る）[6,7]．クロマトフォアの大きさは，約600 Åであり，膜の厚さは約 55 Åである[1)]．

2.b.1.1　培養条件における光合成系の変化

紅色細菌の反応中心複合体は培養条件によって影響を受け，特に光強度によって大きく変化する[8,9]．図1は異なる光強度にて培養したとき，*Rba. sphaeroides* の細胞の可視吸収スペクトルの変化を示す．光強度が弱くなるにつれて，LH2 の極大吸収波長（B 850 と B 800）での吸収が増大する．またアンテナ複合体の種類や色素組成を変化させる紅色細菌も存在する[10,11]．*Rps. palustris* とその近縁種は強光のときは LH2 を，弱光のときは LH4 を合成し，同時に BChl *a* やカロテノイドの組成も変化することが報告されている[12,13]（図2参照）．それゆえ培養時の光強度を変化させることにより，目的に応じたクロマトフォアの調製が可能である．

2.b.1.2　クロマトフォアの調製

クロマトフォアは，新しく培養した菌体から調製する

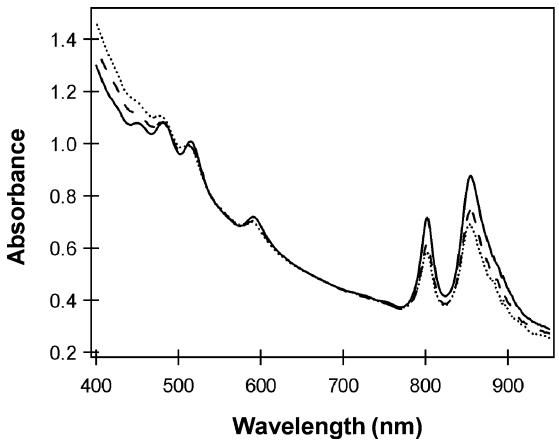

図1：*Rba. sphaeroides* の菌体の吸収スペクトル
異なる光強度にて培養した時の吸収スペクトルを示す．OD_{660} を 0.5 に合わせて規格化した．実線：3 μE/sec/m²，破線：30 μE/sec/m²，点線：200 μE/sec/m²．

1）立命館大学理工学研究科
2）大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

ことが最も好ましい（菌体を凍結保存する場合には，緩衝液A（50 mM Tris-HCl (pH 7.8)，150 mM NaCl）で2回，洗浄しておくことを勧める）．調製時に用いる緩衝液はおもにTris-HCl緩衝液やリン酸緩衝液であるが，紅色細菌の種類や実験目的に応じて変える必要があり，過去の文献を参考にすべきである．クロマトフォアは内側に可溶性チトクロームを含む場合が多く，実験目的によっては不都合となる．菌体を10 mM EDTAを加えた緩衝液に懸濁して氷冷放置（1～2時間）し，EDTAを含まない緩衝液で洗浄することによりクロマトフォアからほぼ完全に除くことができる．

菌体を破砕する方法には，フレンチプレスと超音波処理がある．フレンチプレスによる破砕はクロマトフォアの収量が高く，おもにタンパク質精製に用いられる．超音波処理は少量の菌体からクロマトフォアを調製することができ，光化学反応や酵素活性を測定する場合に便利である．ここでは*Rps. palustris*からクロマトフォアを調製する方法を説明する．標品調製は4 °C（あるいは氷中）で行う．

[手順]

[1] 培養後，8,000×g，15分間の遠心で集菌する．1 Lの培養液から湿重量で10 g程度の菌体が得られる．*Rps. palustris*は培養時に水素ガスを発生するため，培養瓶を完全に培地で満たすと破損する危険がある．培養瓶の上層部に1/10程度の気層を空けておく必要がある．

[2] a．フレンチプレスによる破砕：菌体を約3倍量の緩衝液Aに懸濁する（懸濁液の粘性が高くて扱いにくい場合には，緩衝液にDNase (10 μg/ml) を添加する）．20000 psiでの処理を2回行う．

b．超音波処理による破砕：菌体を適当量の緩衝液Aに懸濁する．懸濁液を氷水で冷却しながら，超音波発生装置の最大出力（250 W，10 kHz）にて70～120秒間処理する（熱発生を極力抑えるために不連続な超音波処理を行うこと）．

[3] 破砕溶液を8,000×g，15分間遠心することにより未破砕細胞を除いた後，85,500×g，60分の超遠心により沈殿画分を回収する．沈殿画分を緩衝液Aで懸濁し，再度，85,500×g，60分の超遠心を行い，上清を除く．この作業を2回繰り返す．最後に沈殿画分を少量の緩衝液Aで懸濁し，クロマトフォア標品とする．この際，絵筆等を用いて塊を残さないように少しずつ沈殿を懸濁するとよい．膜タンパク質精製を目的とする場合には最初の超遠心後の沈殿画分を回収するだけで十分であり，次の可溶化過程に用いる．

図2には，*Rps. palustris*から調製したクロマトフォアの可視吸収スペクトルを示している．200 μE/sec/m² による培養では周辺アンテナ系のほとんどがLH2を形成しているが，光強度が下がるにつれてLH4の比率が多くなる．得られたクロマトフォア標品のバクテリオクロロフィル *a* の濃度は，アセトン/メタノール混合液(7/2, v/v) にて抽出後，吸収スペクトルにて定量する（ε_{772} = 75 $mM^{-1}\cdot cm^{-1}$）．クロマトフォアを凍結保存する時は，融解後にクロマトフォアが凝集するのを避けるために10%のショ糖を緩衝液に加えておく．また遮光して氷中保存した場合，*Rsp. rubrum*の光リン酸化活性を例としたとき，1ヶ月以上安定であることが報告されている．

2.b.2 緑色細菌

緑色細菌は緑色イオウ細菌と緑色糸状性細菌（非イオウ細菌）からなり，両者は系統的には大きく離れた二つのグループである．紅色細菌に見られるような発達した膜系をもたず，光合成反応中心は細胞膜に存在する．反応中心の種類や電子伝達系など，生化学的，生理学的に両者は大きく異なるが，クロロゾームという巨大な膜外アンテナ系をもつ点で共通している[14]．

緑色細菌から純度の高い光合成膜標品を調製するためには，クロロゾームを除く必要がある．細胞破砕後の膜画分から，ショ糖密度勾配超遠心法によりクロロゾームが脱離した光合成膜の調製が可能である[15]．本項では，好熱性の緑色硫黄細菌*Chlorobaculum tepidum*（*syn.*

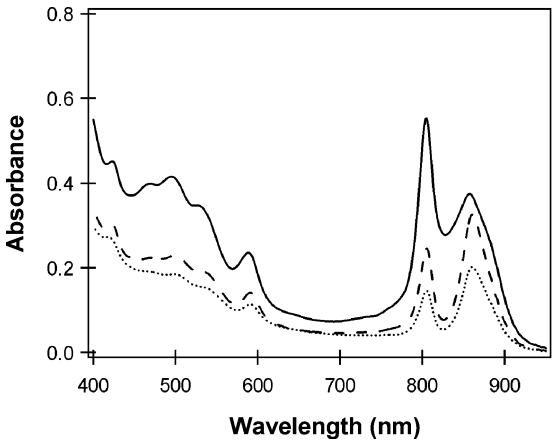

図2：*Rps. palustris*のクロマトフォアの吸収スペクトル
異なる光強度にて培養後，調製したクロマトフォアのスペクトルを示す．クロマトフォアのタンパク質濃度を30 μg/mlに合わせている．実線：3 μE/sec/m²，破線：30 μE/sec/m²，点線：200 μE/sec/m²．

Chlorobium tepidum）からの光反応活性を保持した光合成膜標品の調製を具体例として紹介する[16]．同様の方法で，*Chlorobaculum thiosulfatiphilium*（*syn*. *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*），*Chlorobaculum parvum*（*syn*. *Chlorobium vibrioforme* NCIB 8327）の膜標品の調製が報告されている[17,18]．また，弱光で培養した緑色糸状性細菌 *Chloroflexus aurantiacus* でも同様の方法を用いた調製例がある[19]．しかし，より強光で *Chloroflexus aurantiacus* を培養した場合にはクロロゾームが脱離しにくくなるため，ヨウ化ナトリムのようなカオトロピックイオンを少量加えて調製する方法が報告されている[20,21]．

2.b.2.1　光合成膜の調製

緑色硫黄細菌は絶対嫌気性の細菌で，反応中心をはじめとする光合成装置は極度に酸素に不安定なため，調製には嫌気的手法を用いる．下記手順において，ショ糖密度勾配遠心後は嫌気グローブボックス内で操作しなければならない．緑色硫黄細菌のクロロゾームは酸素存在下では吸収した光を消光する[22,23]．それゆえクロロゾームを除去するまでは発生した酸素ラジカルは容易に除去され，光合成膜の光反応活性は安定に保持されている．使用する緩衝液類は脱気・窒素ガス交換後，嫌気グローブボックス内で一晩以上放置して溶存酸素を十分に除き，調製当日に適当な還元剤を加えて使用する．遠心中は直接酸素に触れないようにキャップ付遠心管を用いるか，超遠心機用ローターを直接嫌気グローブボックス内に持ち込むなどの工夫が必要である．緑色糸状性細菌の光合成活性は酸素に対して寛容であり[14]，嫌気操作を行う必要はない．また操作は可能限り冷暗所で行うように努める．

[準備する緩衝液]

- 緩衝液A：50 mM Tris-HCl(pH 8.0)，1 mM EDTA，10 mM L-cysteine
- 緩衝液B：50 mM Tris-HCl(pH 8.0)，1 mM EDTA，2 mM DTT，20 mM β-D-glucose，glucose oxidase（2 U/ml），catalase（20 U/ml）
- 緩衝液C：50 mM Tris-HCl(pH 8.0)，1 mM EDTA，2 mM DTT
- 50%ショ糖緩衝液：50 mM Tris-HCl(pH 8.0)，1 mM EDTA，10 mM L-cysteine，50%ショ糖（w/v）

[手順]

培養後，12,000×g，10 分の遠心により集菌する．約 10 L の培養液から，湿重量で 10–15 g の菌体が得られる．菌体 10 g（湿重量）あたり 20–30 ml の緩衝液Aに懸濁後，フレンチプレス（20,000 psi）に 3 回通すことにより細胞を破砕する．23,500×g，20 分間の遠心により未破砕細胞や元素イオウを除き，40,000×g，60 分間の遠心により大きな膜断片を除く．2 回目の遠心後に回収された上清中には，クロロゾームと光合成膜，および可溶性タンパク質が含まれている．上清をショ糖密度勾配（40，42.5，45，47.5，50%（w/v）の段階勾配．嫌気グローブボックス内において緩衝液Aと 50%ショ糖緩衝液を用いて準備する）にロードし，200,000×g で 17–19 時間の超遠心後，45%ショ糖付近にある淡緑色の層を光合成膜画分として回収する（図 3）．すぐ上層にある濃緑色の層は，おもに脱離したクロロゾームである．回収した光合成膜画分はバイアル瓶に移して脱気・窒素ガス交換後，嫌気グローブボックス内に持ち込む．緩衝液Bで約 4 倍に希釈した後，室温で 15 分間穏やかに撹拌する（緩衝液Bに含まれる Glucose oxidase/Catalase により溶存酸素は除去される）．最後に 160,000×g，60 分間の遠心により沈殿画分を回収し，少量の緩衝液Cに懸濁して光合成膜標品とする．約 10 L の培養液から，OD_{810}＝50–100 の標品が 100–200 μl 得られる．

図 4 は *Chl. tepidum* から調製した光合成膜標品の吸収スペクトルである．比較のために細胞懸濁液，粗精製膜標品の吸収スペクトルも示している．緑色硫黄細菌の光合成膜は，反応中心複合体のアンテナ色素である BChl *a* に由来する 810 nm の吸収ピークをもつ．標品の純度は，ショ糖密度勾配遠心後，いかにクロロゾームの層を採らずに膜画分を回収できるかで決まる．クロロゾームが混入した場合，図 2 の粗精製膜標品の吸収スペクトルで見られるような，750 nm 付近に比較的大きな吸収ピークが現れる．しかしほとんどのクロロゾームは，既に光合成反応中心複合体から脱離しているため光反応

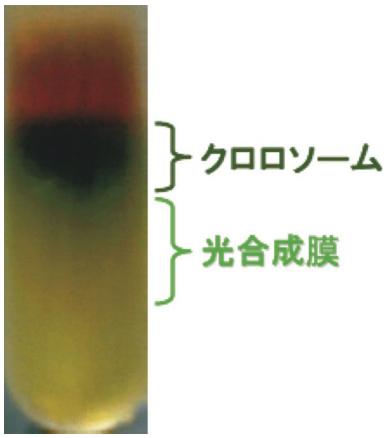

図 3：*Chl. tepidum* の光合成膜調製時のショ糖密度勾配遠心

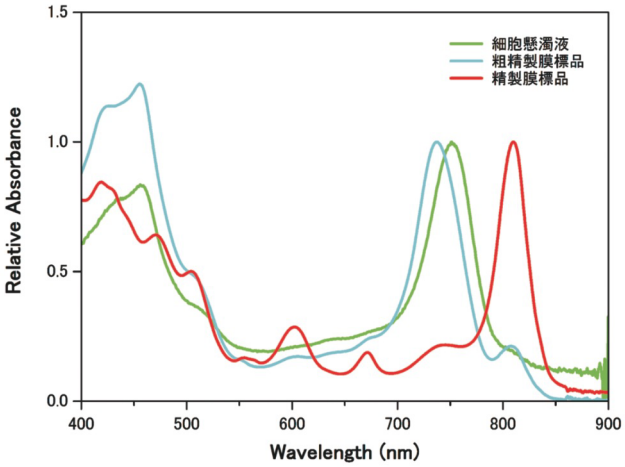

図4：*Chl. tepidum* の光合成膜標品の吸収スペクトル．緑線：細胞懸濁液（Cell suspension），青線：粗精製膜標品（Crude membrane），赤線：光合成膜標品（Purified membrane）．各標品は長波長側の吸収ピークで規格化して示した．粗精製膜標品は，細胞破砕後，110,000×*g*，1時間の超遠心により得られた沈殿画分を緩衝液Cに懸濁したものである．

には寄与せず，クロロゾームの蛍光や夾雑物などが目的の実験に影響しない程度の混入であれば問題ない．

2.b.3　ヘリオバクテリアからの光合成膜の調製

ヘリオバクテリアも絶対嫌気性の光合成細菌であり，酸素に対して非常に不安定な光合成膜調製のためには嫌気的手法が必要である[24]．しかし紅色細菌がもつようなアンテナ複合体LH1/LH2や緑色細菌のクロロゾームのような巨大アンテナ系を持たない．複雑に発達した内膜系をもたず，光合成反応中心は細胞膜のみに存在する．それゆえ細胞膜標品の調製は簡便であり，培養液1Lから得られた湿重量1–2 g程度の菌体から，光化学反応の活性測定に必要な量を調製することができる．

[手順]

湿重量1–2 gの菌体に対し5–6 mlの緩衝液（50 mM Tris-HCl（pH 8.0），2 mM DTT，1 mM EDTA）に懸濁後，菌体をフレンチプレス（20,000 psi，3回）で破砕する．12,000×g，10 minの遠心で未破砕細胞を除き，180,000×g，60 minの超遠心により細胞膜画分を得る．使用する緩衝液は嫌気的に調製する必要があり，菌体破砕や遠心操作以外は嫌気グローブボックス内で行う．

文献

1）G. Cohen-Bazire, Bacterial Photosynthesis, ed. H. Gest, A. S. PietroL & P. Vernon, Yellow Springs, Artioch Press, 1963
2）T. Oda & T. Horio, Exp Cell Res **34** (1964) P.414.
3）J. A. Bergeron, Brookhaven Symp. Biol. **11** (1958) P. 118.
4）G. Drews, Arch. Mikrobiol. **36** (1960) P.99.
5）G. Cohen-Bazire & W. R. Sistrom, The Chlorophylls, ed. L. P. VernonG & R. Seely, New York, Academic Press, 1963
6）R. C. Prince, A. Baccarini-Melandri, G. A. Hauska, B. A. Melandri & A. R. Crofts Biochim. Biophys. Acta **387** (1975) P.212.
7）A. Hochman, I. Fridberg & C. Carmeli, Eur. J. Biochem. **58** (1975) P.65.
8）W. R. Sistrom, Control of Antenna Pigment Components: The Photosynthetic Bacteria, ed. R. K. Clayton & W. R. Sistrom, New York, Plenum, 1978, p.841.
9）M. Itoh, K. Matsuura, K. Shimada & T. Satoh, Biochem. Biophys. Acta **936** (1988) P.332.
10）A. Hiraishi, Int. J. Syst. Bacteriol. **47** (1997) P.217.
11）M. B. Evans, A. M. Hawthornthwaite & R. J. Cogdell, Biochim. Biophys. Acta **1016** (1990) P.71.
12）J. Harada, T. Mizoguchi, S. Yoshida, M. Isaji, H. Oh-oka & H. Tamiaki, Photosynth. Res. **95** (2008) P.213
13）T. Mizoguchi, M. Isaji, J. Harada & H. Tamiaki, Photochem. Photobiol. Sci. **7** (2008) P.492.
14）N. U. Frigaard & D. A. Bryant, Arch. Microbiol. **182** (2004) P.265.
15）K. Schmidt, Arch. Microbiol. **124** (1980) P.21.
16）H. Oh-oka, M. Iwaki & S. Itoh, Biochemistry **37** (1998) P.12293.
17）U. Feiler, W. Nitschke & H. Michel, Biochemistry **31** (1992) P.2608.
18）B. Kjaer, N. U. Frigaard, F. Yang, B. Zybailov, M. Miller, J. H. Golbeck & H. V. Scheller, Biochemistry **37** (1998) P.3237.
19）P. van Vliet, D. Zannoni, W. Nitschke & A. W. Rutherford, Eur. J. Biochem. **199** (1991) P.317.
20）R. G. Feick, M. Fitzpatrick & R. C. Fuller, J. Bacteriol. **150** (1982) P.905.
21）R. G. Feick & R. C. Fuller, Biochemistry **23** (1984) P. 3693.
22）N. U. Frigaard & K. Matsuura, Biochim. Biophys. Acta. **1412** (1999) P.108.
23）M. F. Hohmann-Marriott & R. E. Blankenship, Biochim. Biophys. Acta. **1767** (2007) P.106.
24）H. Oh-oka, Photochem. Photobiol. **83** (2007) P.177