



Title	フェレドキシンとフェレドキシン : NADP+還元酵素の調製と生化学的解析
Author(s)	榊原, 由紀子; 長谷, 俊治
Citation	低温科学, 67, 215-221 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/2115/39148
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量 b
File Information	67-033.pdf



[Instructions for use](#)

3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量

b. フェレドキシンとフェレドキシン：NADP⁺還元酵素の調製と生化学的解析

榊原由紀子¹⁾, 長谷 俊治¹⁾

フェレドキシンは鉄硫黄クラスターを含む電子キャリアータンパク質で、光合成電子伝達反応では光化学系 I から受け取った電子をフェレドキシン：NADP⁺酸化還元酵素に供与し、NADP⁺をNADPHへ還元する反応を駆動している。本章では、植物組織の抽出物からや組換え体としてのこれらの酵素タンパク質を調製する方法とそれらを用いて活性を測定する方法を紹介する。

Purification and biochemical analysis of ferredoxin and ferredoxin: NADP⁺ reductase

Yukiko Sakakibara, Toshiharu Hase

Ferredoxin is an electron carrier protein with FeS cluster and transfers electron from photosystem I to ferredoxin: NADP⁺ reductase, which catalyzes reduction of NADP⁺ to NADPH in the photosynthetic electron transfer system. In this chapter, we describe purification methods of these two proteins from plant tissues and recombinant *E. coli* cells, and a typical assay method for the activity of ferredoxin: NADP⁺ reductase by using Fd as an electron carrier.

3.b.1 フェレドキシン (Fd) とフェレドキシン：NADP⁺還元酵素 (FNR) の種類

光合成において水の光分解により取り出された電子の励起により生じる強い還元力は、電子伝達系を介して化学還元力に変換される。この還元力は最終的には炭素、窒素、硫黄等の無機物の還元同化や、糖、アミノ酸、脂肪酸、核酸等の生体物質の合成に必要な素材を供給する代謝系の駆動力として用いられる。この植物の独立栄養機能を支える様々な光合成の生体反応は、電子キャリアータンパク質である Fd を電子供与体とするレドックスカスケードとして、葉緑体内でエネルギー・代謝のネットワークを形成している¹⁾。Fd が関与するレドックスカスケードの中で最も主要な経路は FNR への電子供与過程であり、FNR は NADP⁺ を還元し NADPH に変換する。この光合成電子伝達系による NADPH の生成過程を NADP⁺ の光還元反応と呼ばれる。

Fd は分子サイズが 12 kDa の酸性タンパク質で、酸化還元中心として [2Fe-2S] クラスターを持つ。生理的条件下では、2 原子の鉄イオンのうち一方のみが 2 価と 3 価の間を変換するので 1 電子キャリアーとしてはたらく。その酸化還元電位は -400 mV 前後と低く、還元型 Fd

は強い還元剤となる。FNR は分子サイズが 35 kDa 程度の弱い酸性から中性付近の等電点をもつタンパク質であり、FAD を含むフラビン酵素である。この FAD の酸化還元電位は -350 mV と Fd のそれと同程度か若干高く、エネルギー論的には Fd からの電子を受け取るのに適した電位関係にある。Fd から 1 電子ずつの 2 回の電子授受により FAD が 2 電子還元され、還元型 FNR は NADP⁺ を NADPH に変換する。FNR の立体構造や酵素反応機構については多くの知見が集積しており、フラビン酵素の典型として扱われている²⁾。Fd と FNR との分子間電子伝達反応の際には電子伝達複合体を形成するが、その複合体の構造が解かれており、両者のタンパク質・タンパク質間相互作用の詳細が明らかになっている^{3,4)}。

高等植物では Fd と FNR はそれぞれ数種類の分子種として存在している。これらのイソ酵素タンパク質は大きく光合成型と非光合成型に大別され、光合成型の分子種はこれまで述べたように葉緑体内での NADP⁺ の光還元反応が主要な生理的役割である。一方、非光合成型 Fd や FNR は根のプラスチドと葉緑体の両方に存在し、生理的な反応は NADPH を還元力とした FNR による Fd の還元であり、NADP⁺ の光還元とは逆方向であると信じられている⁵⁾。光合成型、非光合成型のグループの中でも、さらにイソ酵素タンパク質として存在する場合があることが報告されているが^{6,7)}、その生理的役割にどの

1) 大阪大学蛋白質研究所

表1：高等植物のFdとFNRのイソ酵素タンパク質

Fd, FNRの分子種	発現部位, 特徴	酸化還元電位 (mV)
トウモロコシ		
FdI	葉 (葉肉細胞), 光誘導	-421
FdII	葉 (維管束鞘細胞), 光誘導	-412
FdIII	根と葉, 非光誘導	-321
L-FNR1	葉, チラコイド膜に局在	-340
L-FNR2	葉, チラコイド膜とストロマに分布	
L-FNR3	葉, ストロマに局在	
R-FNR	根と葉, 可溶性	-350
イロイヌナズナ		
Fd1	葉	-425
Fd2	葉	-435
Fd3	根と葉	-337
LFNR1	葉, チラコイド膜に多い	
LFNR2	葉, ストロマに多い	
R-FNR1	根と葉,	
R-FNR2	根と葉, 根での主要成分	

ような分業があるのか、まだ明確にはなっていない。これらのFdとFNRの分子種のリストと特徴を表1に示した。一般に非光合成型Fdの酸化還元電子は-350 mV前後であり光合成型Fdより50 mVから80 mV程度高く、NADPH/FNRにより還元される反応には光合成型Fdより熱力学的には有利になっている。

3.b.2 植物からの調製

3.b.2.1 Fd

Fdは比較的安定な可溶性タンパク質である。植物の緑葉を適当な緩衝液中で破砕力の強いブレンダーでホモゲナイズすれば容易に抽出・可溶化され、pHを中性付近に保つことに留意すればほとんど変性は起こらない。残渣や沈殿物を遠心で除いた後、上清に陰イオン交換樹脂を加えるとFdは強く結合する。一方、多くの共雑タンパク質は結合しないので、このバッチ法による大まかな処理はその後の精製ステップに好都合である。著者らの精製方法を以下に示す。これは2日-3日で完了する。

[実験方法]

1. ホウレンソウ緑葉2 kgを氷冷した2 Lの破砕緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)を用いてワーリングブレンダー(一般のミキサーでも良いが、一度に処理できないので、数度に分ける)で完全に破砕する。ガーゼやミラクロス等でろ過し、大きな残渣は除く。
2. 容量が500 mLから1 Lの遠心管に移し、5000 x gで10分間冷却遠心し、上清を得る。以下の操作は水上

か低温室で行うが、すばやいかラム操作等であれば室温でも可能である。

3. 破砕緩衝液で平衡化したDEAEセルロース樹脂(DE-52など)200 g(湿重量)をバッチ法で上清に加えて攪拌し、適当なサイズのブフナーロートに2重層にしたミラクロスを敷いて樹脂をろ過により集める。
4. Fdが吸着した樹脂を取り出して破砕緩衝液に懸濁し、適当な大きさのカラムに詰める。同じ緩衝液で樹脂を洗浄した後、Fdを溶出液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl)で溶出する。Fdは褐色のバンドとして植物由来の色素類と共に溶出されるので、着色した画分を集める。
5. 70%飽和硫酸で塩析を行い、10000 x g, 15分間の遠心で上清を得る。相当量の沈殿が出る。上清に回収されたFdは50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 70%飽和硫酸で平衡化したDE-52(50 g湿重量の樹脂をカラムに詰めたもの)に重層する。この条件でFdは樹脂に結合する。
6. 結合したFdは50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaClで溶出し、赤褐色画分を得る。この画分を50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaClに透析(外液は50倍以上)する。ここまでが1日目の工程。
7. DEAEを結合官能基としてもつイオン交換樹脂で中圧に耐えるもの(DEAE トーヨーパールやResource Q)を用いてカラムクロマトグラフィー(200 ml程度のカラム容量)を行う。50 mM Tris-HCl, pH 7.5緩衝液中でNaClの150 mMから500 mMの濃度勾配(総体積500 mL)で溶出する。Fdは明瞭な赤褐色バンドとして回収できる。

8. Fd 画分を疎水カラムクロマトグラフィー (Phenyl トーヨーパールや Phenyl Sepharose, 50 mL カラム 体積) で精製を進める。Fd 画分に同体積の 100%飽和 硫酸液を加えて 50%とし, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50%飽和硫酸で平衡化したカラムに掛け, 硫酸濃度 50%から 0%への逆濃度勾配 200 ml で溶出する。Fd は純度が十分高い状態で得られ, 大抵の生化学的実験 はこの精製段階のものを用いることができる。ここま でが 2 日目の工程。通常 20-30 mg の精製標品が得ら れる。

9. もし, 精製度が不十分であれば (後述の純度検定に より), 共雑物の大部分は核酸である。ゲルろ過カラム クロマトグラフィーを行う。Superdex 75 あるいは同 等品を用いて, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl を展開緩衝液としてクロマトグラフィーを行 う。

トウモロコシのような硬い葉の場合は, 組織重量に対 して加える破碎緩衝液の量を増やして, ブレンダーの回 転を容易にする。ホリフェノール類が多量に含まれてい る組織では, 吸着剤であるポリビニルピロリドンを組織 重量の 10%程度まで加えると除去効果が顕著である。ま た, 必要な場合には, タンパク質分解酵素阻害剤 (カク テルとして市販されている) を加えて分解を抑える配慮 をする。適宜判断したらよい。

3.b.2.2 FNR

ハウレンソウ緑葉出発材料とする場合, FNR の大部 分はチラコイド膜に結合した状態を保ちながら植物葉を 破碎して, 得られる膜断片から精製する方法を述べる。 最初に FNR を可溶化する方法もあるが, 大量の共雑タ ンパク質から FNR を分画する操作をいくつも重ねる必 要があるのでやや面倒である。チラコイド膜からの調製 法は収量は落ちるが, 精製操作は簡単であり失敗はほと んど無い。

[実験方法]

1. ハウレンソウ 5 kg に対して氷冷した破碎液 (50 mM Tris-HCl, 300 mM Sorbitol) 5 L の割合で加え, ブレンダーを用いて弱く破碎する (緑葉の細かい断片 がつぶ状に残っている位が目安)。2 重層のミラクロス でろ過して大きい残渣は取り除き, 緑色のホモジェネ ートを得る。
2. Fd のときのステップ 2 と同様の遠心を行うが, 今度 は緑色の沈殿画分を回収する。
3. 沈殿を 60 mL の 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl に懸濁し, -20°C に冷却したアセトン 240 mL を加え

てよく混ぜる。アセトンの終濃度は 80% (v/v) 程度と する。タンパク質はほとんど沈殿するが, クロロフィル は可溶性画分に移る。

4. アセトン溶液を 10000 x g, 15 分間冷却遠心する。緑 色の上清を完全に取り除き遠心管の底に集まった沈殿 を得る。
5. 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl を 100 mL を加え て沈殿を溶解する。大部分は解けるが, 一部は残る。 残渣は 4. と同じ遠心操作で取り除く。
6. 上清を Fd のときのステップ 7 と同様のイオン交換 カラムクロマトグラフィーを行う。ただし, NaCl の濃 度勾配は 50 mM から 500 mM とする。フラビンの黄 色を呈する FNR 画分が目視で確認できる。もし, 色調 があいまいであれば後述の活性測定で溶出液をモニ ターする。NaCl 濃度が 150 mM 前後で溶出されるは ずである。
7. FNR 画分を 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 に透析する。 ここまで 1 日目の工程。
8. Fd セファロース樹脂を用いたアフィニティーカラム クロマトグラフィーを行う (50 mL カラム体積)。Fd セファロース樹脂を 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 で平衡 化し, 透析済みの FNR 画分を掛ける。NaCl の 0 mM から 500 mM の濃度勾配 200 mL で溶出する。FNR の精製標品を得る。ここまで 2 日目の工程。20 mg 程度 の標品が得られる。

3.b.2.3 Fd-セファロース樹脂の調製

FNR の精製には Fd 固定化樹脂を用いたアフィニ テークロマトグラフィーが有効である。Fd を固定化し た樹脂は一般には市販されていないが, 簡単に自作でき る。

[実験方法]

1. Fd の精製標品 30 mg 程度を 100 mM NaHCO_3 , 300 mM NaCl (pH は 8 程度になる) に十分透析する。Tris 緩衝液等, アミノ基類を含む物質は完全に除く。
2. BrCN で活性化したセファロース樹脂 (市販品) 10 g を 200 mL の 1 mM HCl に懸濁し, 樹脂に混在して いる安定剤等を完全に溶解する。
3. シンターガラス付のロートで懸濁した樹脂を弱く吸 引ろ過し, 樹脂の乾燥を避けながら, 1 L 以上の 1 mM HCl でよく洗浄する。
4. 透析済みの Fd をキャップの付いた広口ボトル (100 mL 程度) に入れ, 透析外液と同じ 100 mM NaHCO_3 , 300 mM NaCl を加えて 50 mL 前後にする。
5. この Fd 溶液に洗浄した樹脂をスパチュラで少量ずつ

つ懸濁しながら加える。すべての樹脂が Fd 溶液と混合し、キャップをして低温を保ちながらシェーカーでボトルごと緩く攪拌する。数時間から終夜攪拌でほとんどの Fd は樹脂に共有結合する。

6. ボトルを静置すると樹脂が沈む。上澄みの色 (Fd の赤褐色) がほとんど無色になれば固定化完了である。膨潤した樹脂の体積 1 mL あたり 1-2 mg の Fd が固定化し、樹脂は赤褐色を呈する。1 M Tris-HCl, pH 7.5 を終濃度 100 mM になるよう加えて、樹脂の未反応の官能基をブロックする。
7. Fd が固定化した樹脂をカラム (50 mL 体積) に詰めて、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl でよく洗浄して、遊離の Fd は完全に除く。Fd 樹脂はこの状態で少なくとも数ヶ月は安定に低温保存できる。

3.b.3 大腸菌組換え酵素タンパク質として調製

近年では、植物の Fd や FNR の遺伝子を大腸菌を宿主とする組換え DNA の方法で発現させて、生化学や物理化学実験に十分な数十から数百 mg を調製している場合も多い。ここでは [2Fe-2S] クラスターや FAD をもったホロ型の Fd や FNR の組換え体の発現と精製方法について述べる。

3.b.3.1 遺伝子のコンストラクト

以下の 3 点に留意する。

- 1) cDNA クローニングや RT-PCR で得られた遺伝子は、葉緑体への移行シグナルをもった前駆体をコードする場合が多い。この延長ペプチド部分はあらかじめ取り除く必要がある。成熟体の N 末端構造が未知であれば他の構造が判明している Fd や FNR から推定する。
- 2) 発現ベクターには特に制限はないが、古くは pTrc ベクター、近年では pET 系ベクターや pQE ベクターが使われている。精製に便利のようにタグを付けるとの考え方もあるが、FNR の C 末端の Tyr は酵素活性に必須あり⁸⁾、また FNR の N 末端領域⁹⁾ や Fd の C 末端領域⁴⁾ は両者の相互作用に何らかの役割を果たしている可能性があるため、安易にタグをつけることは避けた方がよい。
- 3) 組換え体の発現量が低く、大腸菌発現系の大量調製の利点が生かせない場合がある。これまでの経験から 2 つの解決方法が工夫されている。翻訳開始 Met から直後の下流のコドンの第 3 番目の塩基が G あるいは C が多い場合は発現量が少なくなる傾向がある。N 末端

側から 10 残基くらいまでを目安に 3 番目に GC が多ければ、アミノ酸変異を伴わないように 3 番目の塩基が AT であるコドンに改変する。これだけで発現量が大幅に増加する場合がある¹⁰⁾。もう一つは大量に発現している大腸菌タンパク質の遺伝子のコドン頻度を考慮して、組換えタンパク質の遺伝子を完全に化学合成する方法である⁶⁾。Fd 遺伝子の場合には 300 塩基程度であるので化学合成はそれほど手間を必要としない。

3.b.3.2 ホロ型の酵素タンパク質の発現条件

大腸菌の細胞中では大量に発現するが、補欠分子族の持たないアポ型となり、封入体に取り込まれる場合もある。人工的にホロ型に再構成することも報告されているが¹¹⁾、手間がかかるので、できればホロ型で発現させる方が好都合である。大腸菌の生育温度や遺伝子の転写誘導剤の濃度などの、一般的な発現条件を検討することで改善する場合も多い。20°C から 37°C の温度範囲で、誘導剤である IPTG の濃度が 0 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.5 mM と変化させて、いくつかの組み合わせを試せばよい。組換えタンパク質の発現速度が遅くなる低温での培養が、タンパク質のフォールディングが効率よく行われる可能性が高いと思われるが、われわれの経験からは Fd や FNR のホロ型変換の効率には必ずしもこのような傾向があるわけではない。温度は高温側で誘導剤の濃度が低い方がよい場合や、反対に低温側で高濃度の誘導剤の方がよい場合もある。大量にホロ型が発現すれば Fd の場合は菌体の色調が赤色に、FNR の場合は緑黄色を呈するので、目視でホロ型としての発現量を簡便に見積もることができる。ホロ型の発現量の条件検討にはそれほど手間はかからない。

3.b.3.3 精製方法

基本的には植物組織抽出物を出発材料とする場合と類似している。菌体の色が Fd や FNR の補欠分子族の色調として見えるくらい高発現しているのであれば、植物組織での発現量に比べ組換え体の場合の方が、総タンパク質量あたりの含量が相当多いので、精製は容易である。大腸菌体の破碎と抽出物に含まれる大量の核酸類の除去に留意すれば、あとは特に問題点はない。

Fd を発現している大腸菌の場合は、菌体重量の 3 倍量程度の 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.5%メルカプトエタノール, 1 mM PMSF で菌体を懸濁し、超音波破碎で細胞を処理する。超音波により菌体から出てくる核酸が断片化されるので、破碎液の粘度が十分に低下すれば、良好に破碎できたことを目安となる。10000 x g で 15 分間の冷却遠心で上清をとり、バッチ法の DE-52 処理を行う。Fd は樹脂

に吸着した画分から回収される。これ以降の操作は植物組織の場合と同じであるが、精製初期のステップでは Fd 画分には核酸が相当量混入してくるので、両者を分けることができるクロマトグラフィーの溶出条件等を工夫する。

FNR を発現している大腸菌の場合は、菌体重量の 3 倍量の 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.5% (v/v) メルカプトエタノール, 1 mM PMSF で菌体を懸濁し、超音波破碎で細胞を処理する。10000 x g で 15 分間の冷却遠心で上清をとり、バッチ法の DE-52 処理を行う。FNR は未吸着の画分に回収される。核酸の大部分は吸着するのでこのバッチ操作で効果的に核酸除去が可能となる。FNR 画分は 30%–60%飽和硫酸による塩析処理をし、60%沈殿物を 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 に透析して、それ以降のイオン交換クロマトグラフィーや Fd アフィニティークロマトグラフィーは植物組織由来の場合と同様に行う。もし、FNR の発現量が非常に多い場合は、一回の Fd アフィニティークロマトグラフィーでは Fd 樹脂の吸着容量を越えることもあるので、数回に分けて行う。FNR の量が多ければ、Fd アフィニティークロマトグラフィーをさけて、疎水クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーでも精製は可能である。

3.b.4 吸収スペクトルと純度評価

可視部に吸収極大のある補欠分子属を含む酵素タンパク質の純度は、補欠分子属由来の極大波長とタンパク質の吸収極大波長である 280 nm 付近における吸光度の比を指標として評価する機会が多い。Fd と FNR もこのような純度評価が一般的で適用されている。

両方の酵素タンパク質とも精製した状態では酸化型であり、図 1 にこれらの典型的な吸収スペクトルを示した。Fd は 460 nm, 420 nm, 330 nm 付近に [2Fe-2S] クラスター由来の吸収極大が認められ、420 nm 付近の吸収極大のミリモル分子吸光係数は 9.6 mM⁻¹cm⁻¹ であり、この値を用いて定量できる。精製標品の 420 nm と 275 nm 付近の極大波長での吸光度比は 0.45–0.55 の範囲にくる。この値にかなりの幅があるのは、ポリペプチド鎖に含まれる芳香族アミノ酸（主にトリプトファンとチロシン）の残基数によりタンパク質由来の吸収の大きさが変動するからである。個々の Fd の分子種で精製標品の値を知っておくと便利である。FNR は FAD 由来の吸収極大が 455 nm, 385 nm 付近にある。455 nm のミリモル分子吸光係数は 10.7 mM⁻¹cm⁻¹ である。精製標品の 455 nm

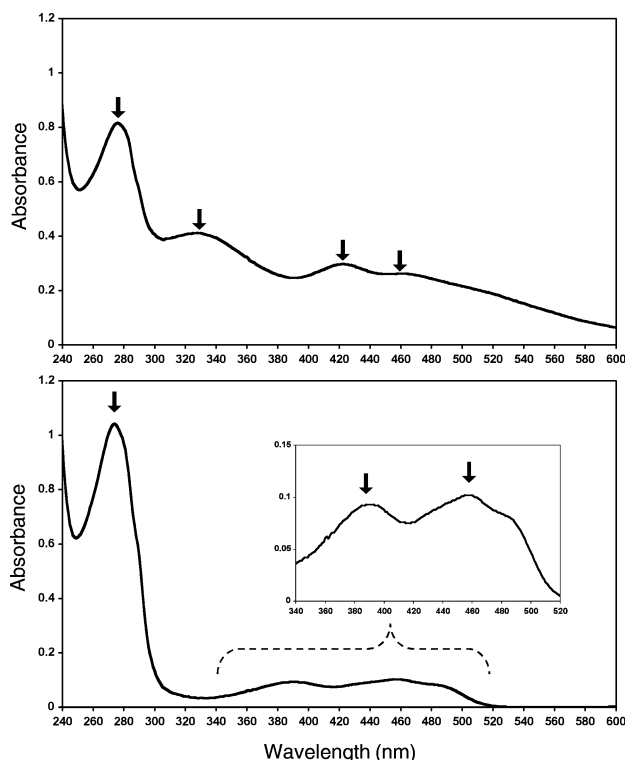


図 1: Fd と FNR の吸収スペクトル
トウモロコシ由来の Fd と FNR を大腸菌組換え体として精製した標品の可視紫外の吸収スペクトルを用す。Fd (上図) は 461 nm, 423 nm, 328 nm, 276 nm に吸収極大を、FNR (下図) は 457 nm, 391 nm, 274 nm に吸収極大を示している。

と 275 nm 付近の極大波長での吸光度の比は 0.11 から 0.12 の範囲にある。

純度を評価するために一般的な SDS ゲル電気泳動を用いることももちろん可能であるが、Fd の移動度は標準的なタンパク質のそれからは相当外れ、実際の分子サイズが 11–12 kDa であっても、ゲル上では 17–20 kDa 位の場所に移動する。また、精製標品であっても複数のバンドに分かれる場合もある。これは、Fd の異常な振舞いは、強酸性のタンパク質である Fd に結合する SDS の量が標準的なタンパク質より大幅に少ないためであると考えられる。FNR の場合はこの様なことはなく、分子サイズに応じた移動度を示す。

3.b.5 活性測定⁵⁾

FNR と Fd の活性は、NADPH を電子供与源、Cyt *c* を電子受容体として、Cyt *c* の還元を分光学的にモニターする方法が一般的である。FNR の NADPH と Fd に対する Km 値は数 μM から数十 μM 程度、FNR の分子活性は 1 秒間あたり数十から数百程度であるので、測定の際にこれらの数値を考慮すればよい。こ

ここでは Fd に対する Km 値を求めるための活性測定を実例として説明する。

[実験方法]

1. Fd と FNR を除いた反応液の組成 (終濃度) は以下のようにする。

50 mM Tris-HCl, pH 7.5

100 mM NaCl

100 μ M NADPH

5 mM Glucose-6-リン酸 (G6P)

1 unit G6P デヒドロゲナーゼ (市販品)

200 μ M Cyt *c*

2. これに 0-50 μ M にまたがる所定の濃度の Fd と数十 nM の FNR が加わり活性測定のための全成分がそろおう。FNR は生物種により分子活性が異なるので、活性測定に適した濃度を予備実験で求めておく。最大の活性を測定する場合に 1 分間で Cyt *c* の還元が完了する位を目安とする。

3. Cyt *c* の還元は 550 nm の吸光度の増加で追跡する。還元型 Cyt *c* の分子吸光係数は 29 mM⁻¹cm⁻¹ であるので、1 cm の光路長のセルでは濃度が濃すぎて測光が困難である。光路長が 2 mm のセルを用いると全還元されて吸光度が 1.2 程度になる。

4. 実際の測定にあたっては、反応の開始は NADPH の添加により反応をスタートさせ、550 nm の吸光度変化を連続的に記録する。反応液には NADPH の再生系が含まれているので、時間に比例して反応が直線的に進行する。

5. Fd の各濃度で同様の測定を行い、直線の勾配から還元速度を算出する。Cyt *c* の酸化型と還元型との差スペクトルにおいて、550 nm の分子吸光係数は 19.5 mM⁻¹cm⁻¹ である。

6. Cyt *c* はウシやウマの心筋由来の市販品を用いる。この標品には相当量の共雑物が含まれているらしく、50 mM Tris-HCl, pH 7.5 に溶解すると Cyt *c* は還元型となる割合が多い。フェリシアンカリウムを少量加えて完全酸化型に戻し、カルボキシ (CM) セルロースなどの陽イオン交換樹脂に吸着し、50 mM Tris-HCl, pH 7.5 で十分洗浄したのち、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl で溶出する。吸着・溶出した Cyt *c* は 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 に透析する。この操作でほとんどの Cyt *c* が酸化型となった標品が得られる。-20°C で凍結保存できる。

7. 光路長が 1 cm の標準セルを用いる場合は Cyt *c* の濃度を 40 μ M に下げる。ただし、この濃度と同程度の

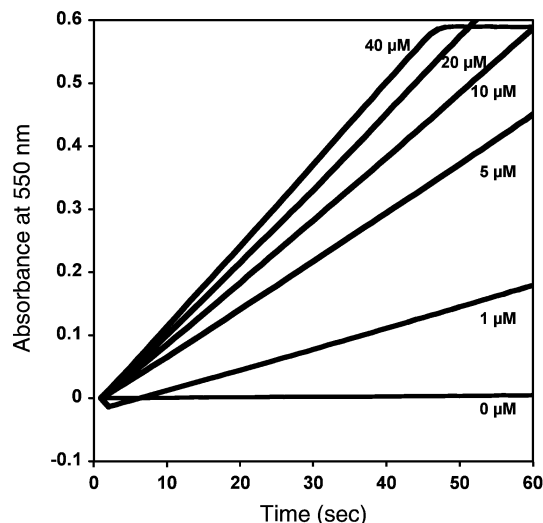


図2: NADPH/FNR/Fd による Cyt *c* の還元測定の一例
実験方法に記したアッセイ条件で、Fd 濃度を 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M と変化させて、Cyt *c* の還元を 550 nm の吸光度の時間変化でモニターしている。測定に当たっては、反応スタート時の吸光度をゼロになるよう記録している。

高濃度の Fd による測定は難しくなる。また、マイクロタイタープレートを用いても工夫をすれば簡便に測定出来る。

参考文献

- 1) T. Hase, P. Schurman, & D. B. Knaff, Photosystem I, ed. J. H. Golbeck, Dordrecht, Springer, 2006, p.477
- 2) P. A. Karplus, M. J. Daniels & J. R. Herriott, Science, **250** (1991) p.60
- 3) R. Morales, M-H. Charon, G. Kachalova, L. Serre, M. Medina, C. Gomez-Moreno & M. Frey, EMBO Reports, **1** (2000) p.271
- 4) G. Kurisu, M. Kusunoki, E. Katoh, T. Yamazaki, K. Teshima, Y. Onda, Y. Kimata-Arigo & T. Hase, Nat. Struct. Biol. **8** (2001) p.117
- 5) Y. Onda, T. Matsumura, Y. Kimata-Arigo, H. Sakakibara, T. Sugiyama and T. Hase, Plant Physiol. **123** (2000) p.1037
- 6) G. T. Hanke, Y. Kimata-Arigo, I. Taniguchi & T. Hase, Plant Physiol. **134** (2004) p.255
- 7) G. T. Hanke, S. Okutani, Y. Satomi, T. Takao, A. Suzuki & T. Hase, Plant Cell Environ. **28** (2005) p.1146
- 8) Z. Deng, A. Aliverti, G. Zanetti, A. K. Arakaki, J. Ottado, E. G. Orellano, N. B. Calcaterra, E. A. Ceccarelli, N. Carrillo & P. A. Karplus, Nat. Struct. Biol. **6** (1999), p.847
- 9) M. Maeda, Y. H. Lee, T. Ikegami, K. Tamura, M. Hoshino, M. Yamazaki, M. Nakayama, T. Hase & Y. Goto,

Biochemistry, **44** (2005) p.10644
10) T. Matsumura, Y. Kimata-Ariga, H. Sakakibara, T. Sugiyama, H. Murata, T. Takao, Y. Shimonishi & T. Hase, *Plant Physiol*, **199** (1999) p.491

11) K. Teshima, S. Fujita, S. Hirose, D. Nishiyama, G. Kurisu, M. Kusunoki, Y. Kimata-Ariga & T. Hase, *FEBS Lett.* **546** (2003) p.189