



Title	シトクロム
Author(s)	永島, 賢治
Citation	低温科学, 67, 223-225 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/2115/39149
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 c
File Information	67-034.pdf



[Instructions for use](#)

3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量

c. シトクロム

永島 賢治¹⁾

紅色光合成細菌の反応中心への電子供与体として働く水溶性シトクロム *c* を中心に、その基本的性質や精製法および定量法などを解説する。

Soluble cytochromes *c* and HiPIP in purple photosynthetic bacteria

Kenji V. P. Nagashima

Biochemical natures and methods for isolation and quantification of soluble electron donor proteins working for reduction of photo-oxidized reaction centers in purple photosynthetic bacteria are described.

3.c.1 紅色細菌における水溶性電子供与体の種類と性質

ヘムを結合したタンパク質のうち、そのヘムの中心にある鉄原子がイオン価を変える ($\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$) ことで可逆的に電子の授受を行うものを一般的にシトクロムと呼ぶ¹⁾。結合するヘム構造の違いにより *a*, *b*, *c*, *d* 型に大別され、生理機能の違いやアミノ酸配列の違いによってさらに細分化される大きなタンパク質ファミリーを形成している。このうち、本項では反応中心への電子供与体として働く水溶性の *c* 型シトクロムを対象に記述することとする。

葉緑体・シアノバクテリアの光化学系 I や非酸素発生型光合成細菌では低分子量の電子伝達タンパク質が反応中心への電子供与体として働く。このような電子供与体として古くからよく知られ研究に用いられてきたものに紅色光合成細菌のシトクロム *c*₂ がある²⁾。シトクロム *c*₂ は紅色細菌の α グループの種に共通して見られる電子伝達タンパク質で、呼吸鎖においてもシトクロム酸化酵素への電子供与体として働く。SDS-PAGE で見た分子量は1万ダルトン前後でヘムを一つ結合しており、酸化還元中点電位は300 mV をやや上回る。還元型の吸収スペクトルでは α 吸収帯のピークが549-551 nm に現れる。 β グループおよび γ グループの紅色光合成細菌ではシトクロム *c*₂ は見られず、代わりにシトクロム *c*₈ が合成される。シトクロム *c*₈ は分子量が8千前後でシトクロム *c*₂ に比べやや小さいが、酸化還元中点電位と吸収ス

ペクトルはシトクロム *c*₂ とよく似ている。ただしシトクロム *c*₈ が反応中心への主要な電子供与体となっていることを示す報告は無く、これらの細菌では高電位鉄イオウタンパク質 (HiPIP) が生理的な電子供与体となっているようである³⁾。他に分子量20-30キログルトン (kDa) でヘムを二つ含むシトクロム *c*₄ も反応中心への電子供与体として働くことが示唆されている³⁾。また、 α グループの一部の細菌 (*Rhodobacter* 属および *Rhodovulum* 属の一部) ではシトクロム *c*₃ またはシトクロム *c*_{2m} と呼ばれる膜結合型のシトクロムが合成され、シトクロム *c*₂ と同様の働きをしていることが知られている⁴⁻⁶⁾。これら膜結合型シトクロムはシトクロム *c*₂ と高いアミノ酸配列相同性を示すが、N末端側に膜を一回横切る疎水性領域が付加している点が特徴で、分子量は20から50 kDa と幅がある。

3.c.2 精製法

シトクロム *c*₂ および類似の機能を持つ各種電子伝達タンパク質はいずれもペリプラズム空間に含まれる水溶性の低分子量タンパク質である。可視光領域に特有の吸収帯を持ち実験操作中も容易に視認できるため単離・精製は比較的簡単である。一般的な精製の流れを図1に示す。精製に用いる菌体は光合成条件下で指数増殖後期または定常期まで培養したものを用いる。電子伝達タンパク質は定常期に達しても直ちに分解されることはないが、定常期を過ぎて数日放置した菌体を用いると収率が落ちるようである。集菌から細胞破碎・分画までの流れは光合成膜標品 (クロマトフォア) を調製する操作と共通である。細胞破碎の方法として図ではフレンチ・プレ

1) 首都大学東京 大学院 理工学研究科 生命科学専攻 細胞エネルギー研究室

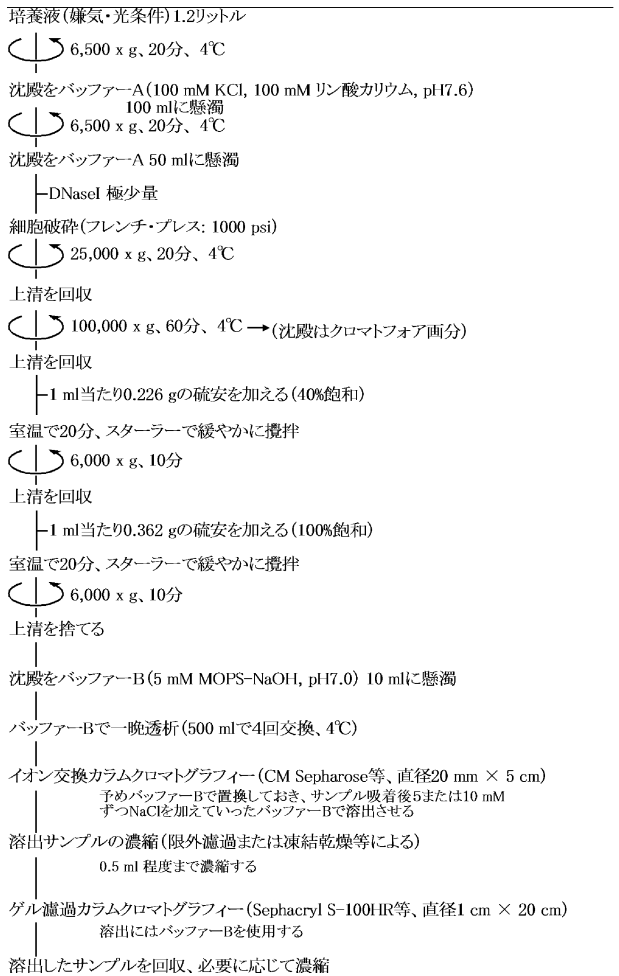


図1: 紅色光合成細菌からの水溶性電子伝達タンパク質の単離手順

スを用いているが超音波破碎などでもかまわない。いずれにせよ超遠心分離により膜標品を沈殿させた上清を粗抽出液として精製を進める。また、細胞をリゾチームで処理してスフェロプラスト化し、その結果得られるペリプラズム画分を粗抽出液としても良い。この場合リゾチームが良く効いているかどうか時々確認することが望ましい。確認は処理溶液1量に対し蒸留水を10倍量程度加え光学顕微鏡で観察して行く。この時、細胞がスフェロプラスト化していれば細胞が丸く膨潤している様子が観察できるはずである。

粗抽出液はまず硫酸沈殿法により大まかに画分する。電子伝達タンパク質の大部分は40%–100%硫酸分画として得られる。100%硫酸による沈殿物を緩衝液に懸濁し、透析により硫酸を除去する。透析後のサンプルはイオン交換カラムクロマトグラフィーにかける。シトクロム c_2 および類似の水溶性電子伝達タンパク質の等電点は塩基性側にあることが多く、中性域のバッファーを

使った場合 DEAE 等の陰イオン交換カラムには吸着しないことがある。下にいくつかの紅色細菌でのイオン交換カラムクロマトグラフィーの選択について例示するが、まずはサンプルの一部をカラムに乗せてみて吸着するかどうか確認してから全量をアプライすると良い。

• *Rubrivivax gelatinosus*

反応中心への電子供与体として複数の水溶性電子伝達タンパク質の存在が知られている。これらのタンパク質はいずれも陽イオン交換樹脂 (CM Sepharose) に吸着する。吸着したタンパク質のうちまず HiPIP が 30 mM の塩強度で緑がかった茶色いバンドとして回収される。55 mM の塩強度で赤いシトクロム c のバンドが動き出す。移動の速いバンドと遅いバンドの二つに分かれる。移動の速いほうがシトクロム c_8 で、遅いほうがシトクロム c' である。

• *Rhodobacter sphaeroides*

DEAE Sepharose などの陰イオン交換樹脂を用いて精製する。この場合カラムに乗せる前に予め少量のアスコルビン酸で還元型にしておくと樹脂への吸着が安定し、70–80 mM の塩強度でシトクロム c_2 が溶出する。光合成培養した場合、他のシトクロムは極めて微量である。

• *Blastochloris viridis*

CM Sepharose などの陽イオン交換樹脂を用い、10–20 mM の塩強度でシトクロム c_2 を溶出させる。カラムに乗せる前に予め少量のフェリシアナイドで酸化型にしておくと樹脂への吸着が安定する。他のシトクロムはほとんど見られない。

これらのタンパク質には目で見える色が付いているので、カラムへの吸着や移動を確認することは容易である。また、カラム操作の過程で緩衝液中に終濃度 1 mM 程度のアスコルビン酸またはフェリシアナイドを加えておくと酸化還元状態が安定しバンドがシャープになるようである。溶出させたサンプルは、必要に応じて限外濾過やポリエチレングリコール等で濃縮し、ゲル濾過カラム (Sephacryl S-100 など) にかける。分子量の異なるタンパク質を除去する。この操作は脱塩も兼ねる。以上の操作で得られる電子伝達タンパク質の収量は、*B. viridis* のシトクロム c_2 の場合で11の培養から 40 μ mol 位である。これらのタンパク質は比較的安定であり、常温での測定で半日程度、氷上での保存で1週間程度(ただし暗中)なら吸収スペクトルに変化は見られない。長期に渡って保存する場合は–80°Cで冷凍保存、あるいは凍結乾燥することが望ましい。

なお、電子伝達タンパク質には水溶性のものだけでな

く膜に緩く結合しているものや吸着しているものも少なくない。こうしたタンパク質を精製するためには膜標品との分離の際に高イオン強度の緩衝液または低濃度の界面活性剤を含む緩衝液を使用する。タンパク質が静電的相互作用で膜に吸着している場合は前者が、疎水性相互作用の場合は後者の緩衝液が必要である。例として *Rvi. gelatinosus* の場合では 0.1% オクチルグルコシドを添加することで 2 へム型のシトクロムであるシトクロム c_4 が得られる。このシトクロムは陽イオン交換カラムでは 40 mM の塩強度で溶出する。

3.c.3 精製したシトクロムの定量と検定

紅色細菌に見られる各種電子伝達タンパク質の酸化型および還元型での吸収スペクトルを図 2 に示す。濃度を求める際は HiPIP の場合 430 nm での吸光係数を 4 mM^{-1} とし、シトクロム c では酸化還元差スペクトルでの α 帯 (550 nm 付近) の吸収変化に対し 19 mM^{-1} とするのが一般的である。シトクロム c' では γ 帯 (430 nm 付近) での酸化還元差に対し 30 mM^{-1} の吸光係数を適用する。ただしこれらの吸光係数はあくまでも目安であり、種によって吸収帯の形は微妙に異なるのが普通である。シトクロムの場合、より正確なへム濃度を求める方法としてはピリジン-ヘモクロム法がよく利用される。1 ml のサンプル溶液に 200 mM NaOH と 40% のピリジンを含む混液 1 ml を加え攪拌した後、酸化(フェリシアニド添加)還元(ジチオナイト添加)差スペクトルを測定する。 c 型へムの場合、 α 帯の吸収ピークは 550 nm に現れ、吸光係数は 24 mM^{-1} とされている⁷⁾。

シトクロムは電気泳動後のゲル上で特別な処理をせずとも特異的に染色できる。特に c 型シトクロムの場合にはへムがジスルフィド結合を介してペプチドと強固に繋がっているため SDS-PAGE 後でも特異的な検出が可能である。3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMBZ) をメタノールに 6.3 mM となるように溶かした溶液を A 液、0.25 M 酢酸ナトリウムを氷酢酸で pH 5.0 に調整した溶液を B 液とし、これらを A : B = 3 : 7 に混合する。泳動後のゲルをこの混合液に浸し、緩やかに振とうしながら 1 時間以上暗中に置いた後 30 mM となるように過酸化水素を加えるとシトクロム c のみが青緑色のバンドとして検出できる⁸⁾。洗いにはイソプロパノールと B 液を 3 : 7 の量比で混合した溶液を使用する。この処理の後で CBB による通常のタンパク質染色も可能であるので、精製したシトクロム c の精製度の評価も容易であろう。

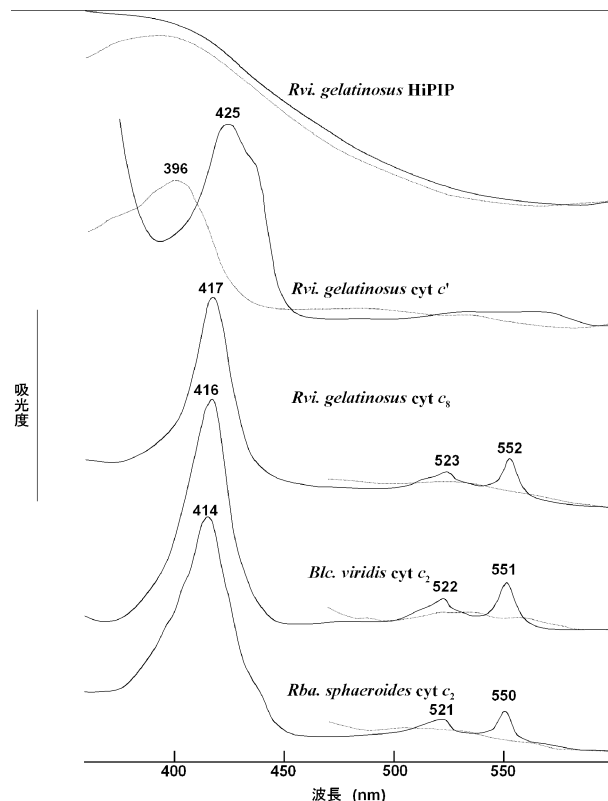


図 2: 各種電子伝達タンパク質の吸収スペクトル
実線は還元型、点線は酸化型でのスペクトルを表す。

参考文献

- 1) G. Palmer, & J. Reedijk, Eur. J. Biochem. **200** (1991) p. 599.
- 2) T. E. Meyer, & T. J. Donohue, Anoxygenic Photosynthetic bacteria, eds. R. E. Blankenship, M. T. Madigan, & C. E. Bauer, Dordrecht, Kluwer, 1995, p.725.
- 3) 永島賢治, 光合成研究 **17** (2007) p.29.
- 4) F. E. Jenney, & F. Daldal, EMBO J. **12** (1993) p.1283.
- 5) H. Myllykallio, D. Zannoni, & F. Daldal, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (1999) p.4348.
- 6) Y. Kimura, J. Alric, A. Verméglio, S. Masuda, Y. Hagiwara, K. Matsuura, K. Shimada & K. V. P. Nagashima, J. Biol. Chem. **282** (2007) p.6463.
- 7) E. A. Berry, & B. L. Trumpower, Anal. Biochem. **161** (1987) p.1.
- 8) P. E. Thomas, D. Ryan, & W. Levin, Anal. Biochem. **75** (1976) p.168.