



Title	CF0CF1 , 光リン酸化
Author(s)	紺野, 宏記; 久堀, 徹
Citation	低温科学, 67, 249-258 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/2115/39153
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 g
File Information	67-038.pdf



[Instructions for use](#)

3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量

g. CF_0CF_1 , 光リン酸化

紺野 宏記¹⁾, 久堀 徹¹⁾

葉緑体 ATP 合成酵素 (CF_0CF_1) は, 光合成に必要な ATP を合成する酵素で, ミトコンドリアや細菌の ATP 合成酵素と同じく, プロトンの電気化学的勾配を利用している. その特徴は, 他の ATP 合成酵素とは異なり, 酸化還元調節を受ける点にある. 本章では CF_0CF_1 の取り扱い, 酸化還元調節の生化学的研究法, チラコイド膜や大腸菌反転膜を利用した ATP 合成活性の測定法等を紹介する.

Chloroplast ATP synthase (CF_0CF_1) and its activity

Hiroki Konno, Toru Hisabori

F_0F_1 -ATP synthase catalyzes ATP synthesis driven by the electrochemical potential of proton gradient across the energy transducing membranes formed by photosynthetic or respiratory electron transfer reaction. The chloroplast ATP synthase, CF_0CF_1 is unique due to its thiol modulation property. In this chapter, the basic method for the preparation of CF_0CF_1 from spinach leaves, the methods for the measurement of ATP hydrolysis activity, proton transfer activity and photophosphorylation activity are described.

3.g.1 葉緑体 ATP 合成酵素の特徴

葉緑体 ATP 合成酵素 (CF_0CF_1) は, 光合成の電子伝達系によって水が分解され還元力である NADPH が生成される過程でチラコイド膜の内外に形成されるプロトンの電気化学的勾配 ($\Delta\mu H^+$) を駆動力として ATP 合成を行っている. すなわち, この酵素は光エネルギーを化学エネルギーに変換する鍵酵素である. 同様の酵素は, ミトコンドリア内膜や細菌細胞膜に存在する呼吸鎖でも働いており, これらは呼吸基質 (多くの場合, 糖) の分解によって生成する NADH から酸素までの電子伝達反応によってエネルギー産生膜系で形成される $\Delta\mu H^+$ を利用して ATP を合成する (酸化リン酸化). 触媒活性を担う F_0F_1 の基本構造は, すべての生物種由来のものにおいて維持されており, ATP 合成および加水分解の分子機構も基本的に同じである. しかし, CF_0CF_1 だけは, 光合成反応によって形成される $\Delta\mu H^+$ を駆動力としているため (光リン酸化), 駆動力を供給できない夜間には ATP 合成の逆反応である ATP 加水分解反応が起こり, エネルギー的に不利な状況に陥る危険がある. このような環境条件に対応するため, CF_0CF_1 には光合成の電子伝達系が駆動しない暗条件下で酵素活性を抑制するための様々な活性調節機構が存在し, これが上記のような逆反応を抑えていると考えられている. そのひとつは,

$\Delta\mu H^+$ による調節 ($\Delta\mu H^+$ activation) である. CF_0CF_1 は暗所下で不活性な状態にあり, 光照射により一定量の $\Delta\mu H^+$ が形成されると活性化する. この $\Delta\mu H^+$ activation に伴って, γ と ϵ サブユニットが構造変化することが知られている^{1,2)}. すなわち, γ と ϵ サブユニット間の相互作用により暗所では溶液中に露出していないそれぞれのサブユニット上の Lys 残基が, $\Delta\mu H^+$ によって誘導される構造変化により溶液中に露出して, Lys の修飾試薬であるピリドキサルリン酸によって修飾されるという実験結果がある. しかし, この実験ではタンパク質分子において具体的にどのような構造変化が誘導されるかが明らかになっていないので, $\Delta\mu H^+$ activation の分子機構そのものは現在でも不明のままである. CF_0CF_1 に $\Delta\mu H^+$ activation による構造変化を誘導しなければ, 葉緑体から調製したチラコイド膜に ATP を加えても ATP 加水分解活性や H^+ 輸送活性はまったくみられないので^{3,4)}, この現象が酵素活性の調節機構のひとつと考えることが出来る. もうひとつの調節機構は, チオール調節とよばれている. 葉緑体 ATP 合成酵素の γ サブユニットには他の生物種由来の ATP 合成酵素にはみられない 37 アミノ酸長の挿入配列があり, この挿入配列上のふたつの Cys 残基間によるジスルフィド結合の形成・解離により酵素活性が調節されている⁵⁻⁷⁾ (図 1). そこで, この挿入配列を, 調節領域とよぶ. γ サブユニットの分子内に形成されるこのジスルフィド結合の還元は, 光照射により光合成電子伝達系が働きフェレドキシンが還元さ

1) 東京工業大学資源化学研究所

<i>S. oleracea</i>	188 - LLPLSPKGEICDINGKCVDAAEDELFRLLTTKEGKLTVERDMIKTETPAFSPILEFE - 245
<i>A. thaliana</i>	188 - LLPLSPKGEICDINGTCVDAAEDEFFRLTTKEGKLTVERETFRTPADFSPILOFE - 245
<i>C. reinhardtii</i>	188 - LLPMTPMGELCDVDGKCVDAADDEIFKLLTTKGGEFAVEREKTITETEALDPSLIFE - 245
<i>Syn. SP. PCC6803</i>	189 - LFPLSPQG-----LEAPDDEIFRLITRGGKFQVEREKVEAPVESFPQDMIFE - 237
<i>Syn. SP. PCC6301</i>	189 - LLPLDPQG-----LASSDDEIFRLITRGGSFVVEREKLTSEVAPLPRDMIFE - 237
<i>T. elongatus</i>	189 - LLPLDPQG-----LETADDEIFRLITRGGSHLEVNREKVTSTLPALPSDMIFE - 237
<i>E. coli</i>	187 - LLPLP-----ASDDDDLKHKSWDYLYE - 210
<i>Bacillus PS3</i>	187 - LLPLT-----DLAENKQRTVYEF - 207

図1：葉緑体 ATP 合成酵素 γ サブユニット上にみられる調節領域
 青：調節領域 赤：チオール調節を行うシステイン残基

れた際、その一部の電子を用いて還元されるチオレドキシシン (Trx) によって行われる。CF₀CF₁ の酵素活性 (ATP 加水分解活性) は、この還元によって2~3倍上昇する⁸⁾。チオール調節および $\Delta\mu\text{H}^+$ activation はそれぞれ単独で働くものではなく、互いに関わりあいをもちながら活性を調節する機構と考えられる。すなわち、上述のピリドキサルリン酸による Lys 残基の標識実験の結果に従えば、 $\Delta\mu\text{H}^+$ の形成によって γ と ϵ サブユニットが構造変化することで γ サブユニット上の調節領域が表面に露出する。次に、フェレドキシンにより還元されたチオレドキシシンが、 γ サブユニット上に露出した調節領域のジスルフィド結合を還元する。このように、 $\Delta\mu\text{H}^+$ activation は Trx によるジスルフィド結合の還元を起こすために必要と考えられている。また、調節領域のジスルフィド結合が還元されると、より低い $\Delta\mu\text{H}^+$ でも ATP 合成が可能となることも知られている⁹⁾。

もうひとつの調節機構は、内在性の阻害サブユニットとして知られている ϵ サブユニットが担っている。 ϵ サブユニットの ATP 加水分解活性に対する阻害効果は細菌由来の ATP 合成酵素においてもみられるが、CF₁ 由来の ϵ サブユニットはその阻害効果が顕著で、これも暗所下で ATP の加水分解を効率よく抑制する機構のひとつと考えられている。しかし、このような CF₀CF₁ の活性調節機構の詳細は、CF₀CF₁ の取り扱いの制約および結晶構造がまだ完全に明らかにされていないことなどの理由から、いまだに不明な点が多い。特に、CF₀CF₁ もその可溶性画分である CF₁ も、シロイヌナズナの全ゲノムが解読され遺伝子構成が全て明らかになった現在でも、いまだに活性をもった組み換え体タンパク質を得ることが出来ないため、分子レベルでの研究が細菌由来の

ATP 合成酵素の研究に比べて立ち後れている。筆者らは、次善の策として好熱菌 *Bacillus PS3* (TF₀TF₁) 由来の α 、 β サブユニットと葉緑体由来の γ サブユニットを再構成させたキメラ $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体を用いた研究をおこなった¹⁰⁻¹²⁾。本章の前半では、ホウレンソウからの CF₁ ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$)、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 、 $\alpha_3\beta_3$ の調製法や ATP 加水分解活性の測定法などを紹介する。また、ホウレンソウより調製した葉緑体由来の $\alpha_3\beta_3$ と組み換え体 γ を再構成させ、 γ サブユニットへの変異導入がチオール調節に与える影響を調べた一連の研究において用いた方法およびそれによって得られた結果を紹介する。葉緑体 ATP 合成酵素のような酸化・還元応答する酵素では、タンパク質の酸化還元状態と酵素活性の変化の対応付けが重要である。そこで、SH 基の修飾試薬である 4-acetamido-4'-maleimidyl-stilbene-2, 2'-disulfonate (AMS) を用いて、 γ サブユニットの還元状態を SDS-ゲル電気泳動の移動度の変化によって確認する方法もあわせて紹介する。後半では、葉緑体チラコイド膜を用いた ATP 合成活性の測定および大腸菌反転膜小胞を用いた ATP 合成酵素のプロトンポンプ活性の測定法について述べる。

3.8.2 CF₁ の調製と ATP 加水分解活性の測定

ATP 合成酵素は光リン酸化反応や酸化的リン酸化反応を行う酵素として 1950 年代に発見され、当初からアメリカの E. Racker の研究室を中心に活発に研究が行われた¹³⁻¹⁵⁾。従って、その精製方法は早くから確立されており、現在でも基本的には同じ方法が用いられている。CF₁ は分子を構成する基本サブユニットが、 α 、 β 、 γ 、

δ , ϵ の5種類からなる複雑な分子複合体であり、可溶性画分として膜から抽出した場合、ATP 合成活性を失っているが、様々な条件下で ATP 加水分解活性を測定することが出来る。ここでは、もっとも簡便に CF_1 を得ることの出来るふたつの方法を紹介する。

3.g.2.1 CF_1 の調製法 (クロロホルム抽出法)

ATP 合成酵素の F_1 部分の抽出方法として一般的に用いられるのが、クロロホルム抽出法である¹⁶⁾。これは、疎水的な膜タンパク質成分を脂質膜とともにクロロホルム層に集めて親水性タンパク質成分のみを回収する方法である。含ハロゲン有機溶媒の取り扱いと処理が若干面倒であるが、高純度の CF_1 を大量・簡便に抽出することが可能である。

[実験方法]

1. 葉緑体破碎液 (300 mM sucrose, 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM NaCl) をあらかじめ調製し、氷冷しておく。
2. 市販されているハウレンソウの葉 (中ろくを除いたもの) 100 g に対して 200 ml の葉緑体破碎液を加え、調理用ミキサーを用いて破碎する (ブレンダーミキサーを用いても構わないが、いずれの場合も葉の断片がいくらか見える程度で破碎操作をやめる)。筆者らは、通常、一回の抽出操作について1~1.5 kg のハウレンソウ緑葉を使用している。
3. 破碎した葉を4層のガーゼでろ過し、ろ液を遠心 (5,000×g, 10分間) する。遠心操作は、4°Cで行う。
4. 遠心後の沈殿を2 mM Tricine-KOH (pH 8.0), 10 mM NaCl に懸濁して、4°Cで60分間スターラーを用いて攪拌する。沈殿の懸濁には、絵の具用の絵筆を用いるとよい。この低張操作によって葉緑体の包膜を破壊し、チラコイド膜標品を得る。
5. この懸濁液を、15,000×gで10分間遠心し、得られる沈殿を10 mM Na-pyrophosphate (pH 7.4) に懸濁し、4°Cで10分ほどインキュベートしてから遠心処理して沈殿を得る。この操作を二度繰り返して、チラコイド膜表面に結合している Rubisco を除去する。
6. 2度目の遠心後の沈殿を、あらかじめ室温に保温しておいた500 mM sucrose, 40 mM Tricine-KOH (pH 8.0), 2 mM EDTA^{#1}, 4 mM ATP, 10 mM DTT

^{#1} CF_1 と CF_0 の結合には Mg^{2+} イオンが重要な役割を果たしている。このため、EDTA のようなキレート剤を加えると、両者は解離しやすくなる。クロロホルムで膜を変性させなくても、EDTA の添加によって CF_1 は CF_0 から外すことが出来るので、この方法だけで温和に精製する方法もあるが、収率が低くなる。

で、2.5~3 mg chlorophyll/ml になるように懸濁する。
7. この溶液に1/2容量のクロロホルムを加え15秒間激しく攪拌する。攪拌後、4,000×gで5分間遠心して、手早く黄緑色の上清をクロロホルム層から分離して回収する。この上清を70,000×gで30分間 (20°C) 遠心する。得られた上清に70%飽和となるように硫酸を加えて4°Cで保存する。

以上の操作によって、SDS-PAGEの結果 (図2-A, レーン1) に示すように、ほぼ夾雑物のない CF_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) を得ることが出来る。必要に応じて、ゲル濾過法などによりさらに精製する。

3.g.2.2 ショ糖を用いた精製法 (スモールスケール)

CF_1 は、葉緑体チラコイド膜の表在性タンパク質としてかなりの部分を占めているが、 CF_0 との結合は分子間相互作用によるもので、それほど強固ではない。このため、溶液の組成を適当に変化させるだけでも簡単にチラコイド膜から遊離させ、回収することができる¹⁷⁾。

[実験方法]

1. ハウレンソウの緑葉10gに、チラコイド膜抽出液 (0.3 M Sucrose, 1 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 20 mM Tricine-NaOH (pH 8.0)) を20 ml 加え、ミキサーで軽く破碎する。残渣をガーゼで除き、濾液を3000 rpmで10分間遠心して沈殿を得る。
2. 沈殿にチラコイド膜抽出液10 ml を加えてパスツールピペットを用いてよく懸濁し、10,000×gで2分間遠心する。
3. 上清を除き、沈殿に10 mM Na-pyrophosphate (pH 7.5) を10 ml 加えてパスツールピペットで懸濁した後、10,000×gで2分間遠心する。この操作を3回繰り返す。
4. 得られた沈殿に0.3 M sucrose, 10 mM Tricine-NaOH (pH 8.0) を2.5 ml 加え、十分に懸濁してから室温で30分間放置する。
5. この溶液を20,000×gで30分間遠心して上清を回収するだけで、ほぼ夾雑物を含まない CF_1 標品が得られる。

3.g.2.3 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の精製¹⁸⁾

3.g.2.1 で紹介した方法で抽出した CF_1 は、基本的には $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ のサブユニット構成であるが、 δ サブユニットは部分的に外れていることや、 ϵ サブユニットが ATP 加水分解活性を強力に阻害していることなど、酵素の均一性にはやや難点がある^{#2}。そこで、触媒活性を維持した

^{#2} 得られる標品の電気泳動の染色バンドの濃度から判断する限

最小単位である $\alpha_3\beta_3\gamma$ の調製方法が確立されている。

[実験方法]

1. ホウレンソウより調製した CF₁ (10~30 mg, 硫酸沈殿として保存した場合には脱塩操作をあらかじめ行い, 25 mM Tris-Cl (pH 8.0) 溶液とする) を, 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 2 mM ATP, 5 mM DTT であらかじめ平衡化した DEAE-Sephacel (GE ヘルスケア) カラム (1×10 cm) にロードし, CF₁ をカラムに吸着させる。
2. 20 ml の上記の緩衝液で吸着しないタンパク質を完全に溶出させた後, 50~100 ml の 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 2 mM ATP, 5 mM DTT, 30% (v/v) glycerol, 20% (v/v) ethanol, 0.1 M NaCl を付加し, ϵ サブユニットを $\alpha_3\beta_3\gamma$ より解離させる。この操作で一部の δ も解離する。
3. 20 ml の 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 2 mM ATP でカラムを洗浄し, glycerol や ethanol を除去した後, 20~50 ml の 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 2 mM ATP, 0.4 M NaCl でカラム内に吸着している $\alpha_3\beta_3\gamma$ を溶出させる。 $\alpha_3\beta_3\gamma$ を含む分画を 12% SDS-PAGE で確認し, その分画に 70% となるように硫酸を加えて, 使用時まで 4°C で保存する。この方法で調製した $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ 複合体の SDS-PAGE の実験例を図 2 A, レーン 2 に示す。この標品では, δ サブユニットがまだ完全に除去できていない。

3. 3. 2. 4 $\alpha_3\beta_3$ の精製¹⁹⁾

葉緑体由来の ATP 合成酵素では, α および β サブユニットは, 再構成可能な組み換え体タンパク質を得ることが出来ないが, γ サブユニットだけは既に発現系が構築されており, 変異導入実験も行われている。そこで, アメリカの Richter らは, 葉緑体 ATP 合成酵素から $\alpha_3\beta_3$ 部分だけを調製する方法を確立し, これに組み換え体 γ を再構成している^{19,20)}。

[実験方法]

1. 15~20 mg の $\alpha_3\beta_3\gamma$ に ATP/MgCl₂ を終濃度で 5.5 mM/5 mM となるように加える。この溶液をスターラーでゆっくりと攪拌しながら, 室温で 10 M LiCl をゆっくりと加え, LiCl の終濃度を 2 M となるようにする (タンパク量は 1 mg/ml となるようにする)。

り, 3.g.2.2 の方法で調製した標品のサブユニット数量比の方が, CF₁ 本来のそれに近いと思われる。

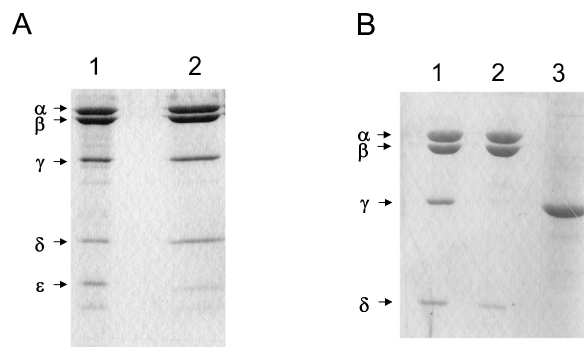


図 2: 葉緑体 ATP 合成酵素の部分複合体の調製

- A レーン 1, ホウレンソウからクロロホルム抽出法により調製した CF₁ ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 複合体).
 レーン 2, CF₁ から ϵ を除去する処理をした後の $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ 複合体.
- B レーン 1, $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$
 レーン 2, $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ 複合体から調製した $\alpha_3\beta_3$ 複合体.
 レーン 3, 大腸菌内で不溶性画分として発現した CF₁ γ を調製したもの.

2. 氷上で 1 時間, ゆっくりと攪拌を続ける。
3. 酵素溶液を細孔径 0.2 μ m のフィルターに通して微粒子を除去し, 十分に冷却した 30 mM potassium phosphate (pH 7.0), 1 mM MgATP, 0.3 M LiCl で平衡化した Hydroxyapatite (BioRad 130-0420) カラム (1.5×15 cm) にロードする (サンプルの容量はカラム体積の半分程度まで)。
4. 30 mM potassium phosphate (pH 7.0), 1 mM MgATP, 0.3 M LiCl 溶液 150 ml でカラムからタンパク質を溶出し, α サブユニットと β サブユニットの両方を含む分画を 12% SDS-PAGE で確認した後, この分画を 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 10% glycerol, 1 mM MgATP, 2 mM DTT に対して, 4°C で 15 時間透析する。
5. この段階で得られる標品には, γ サブユニットを含む $\alpha_3\beta_3\gamma$ が共存している。そこで, 20 mM HEPES-NaOH (pH 6.5), 1 mM MgATP, 1 mM EDTA で平衡化した DEAE-cellulose (Sigma D 3764) カラム (2~3 ml) に数 mg のタンパク質を含む上記画分 ($\alpha_3\beta_3$ および $\alpha_3\beta_3\gamma$ が含まれている) をロードし, カラム体積の 3~5 倍量の 120 mM NaCl, 20 mM HEPES-NaOH (pH 6.5), 1 mM MgATP, 1 mM EDTA を流して, 解離している β サブユニットを溶出させる。次に, 3~5 倍量の 170 mM NaCl, 20 mM HEPES-NaOH (pH 6.5), 1 mM MgATP, 1 mM EDTA で $\alpha_3\beta_3$ を溶出させる。さらに, 400 mM NaCl, 20 mM HEPES-NaOH (pH 6.5), 1 mM MgATP, 1 mM EDTA で $\alpha_3\beta_3\gamma$ を溶出する。

6. 得られた $\alpha_3\beta_3$ 及び $\alpha_3\beta_3\gamma$ はそれぞれ 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 20% glycerol, 1 mM MgATP に対して 4°C で 15 時間透析する. 透析後のサンプルを濃縮し使用時まで -80°C で保存する. 上記の方法で調製した $\alpha_3\beta_3\gamma$ 及び $\alpha_3\beta_3$ 複合体の SDS-PAGE の結果を図 2 B, レーン 1 および レーン 2 に示す. これらの標品では, δ サブユニットがまだ完全に除去できていない.

3.g.2.5 葉緑体 $\alpha_3\beta_3$ とリコンビナント γ の再構成^{19,20)}

CF₁ γ は大腸菌を用いた組み換え体タンパク質の大量発現系が既に構築されているので, アミノ酸変異を行った γ サブユニットの作成は容易である. 筆者らの CF₁ γ 変異体は, ドイツ Heinrich-Heine 大学の Strotmann 教授の研究グループから供与されたハウレンソウ CF₁ γ サブユニット単独発現系をもとに作成した. 変異 γ のプラスミドの作成及び大腸菌内での発現条件の詳細は文献を参照されたい¹⁰⁻¹²⁾.

[実験方法]

1. 組み換え体 γ (図 2 B, レーン 3) は大腸菌体内で封入体として発現してしまうので, 50 mM NaHCO₃-NaOH (pH 9.5), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% glycerol, 4 M urea に溶解させる. この溶液を 50 mM NaHCO₃-NaOH (pH 9.5), 0.3 M LiCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% glycerol に対して 4°C で 24 時間透析する. 透析後の試料をタンパク質濃度 1 mg/ml となるように濃縮し使用時まで -80°C で保存する.
2. 精製した $\alpha_3\beta_3$ を 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 20% glycerol, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM DTT で 100 μ g/ml となるように希釈し, 氷上で γ を含む上記の溶液をモル比で 3 γ :1 $\alpha_3\beta_3$ となるように $\alpha_3\beta_3$ 溶液に滴下する. $\alpha_3\beta_3$ 及び γ を混合させた溶液を穏やかに攪拌し 20°C で 2 時間インキュベートする.
3. 再構成した $\alpha_3\beta_3\gamma$ はゲルろ過 HPLC (Tosoh, SW-G3000_{XL} カラム) によって分取する.

3.g.2.6 ATPase 活性の測定^{21,22)}

CF₁ の ATP 加水分解活性は, リンモリブデン酸比色定量法やマラカイトグリーンを用いた比色定量法によって遊離した Pi を定量することで高感度に測定することができる. 本項では, ATP 再生系を用いた ATP 加水分解活性の測定法を紹介する. ATP 再生系を用いた測定法では, 系の中の ATP 濃度を一定に保ち, 酵素の ATP 加水分解活性を実時間で追うことができるので, 速度論的な解析を行う際に非常に有用である. CF₁ などの場合には, 酸化状態と還元状態で活性が大きく異なるので,

タンパク質の酸化還元状態をそろえておくためにあらかじめ DTT 及びチオレドキシン (Trx-*f*) (還元型にするため) または CuCl₂ (酸化型にするため) で, 30°C, 30 分間インキュベートしておく.

[実験方法]

1. 37°C で保温した 930~950 μ l の反応溶液 (50 mM Tricine-KOH (pH 8.0), 2 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 50 mM Na₂SO₃, 50 mM KCl, 5 mM phosphoenolpyruvate (PEP), 50 μ g/ml pyruvate kinase (PK), 50 μ g/ml lactate dehydrogenase (LDH), 0.2 mM NADH) に, 酸化・還元処理した酵素液 (50~70 μ l) を加え反応を開始させる.
2. この反応系では, ATP 加水分解によって生じた ADP は PK によって速やかに ATP に戻り, その時に生じるピルビン酸が LDH によって乳酸に還元されるときに 1 分子の NADH が消費される. 従って, ATP 加水分解活性は NADH の 340 nm における吸光度の減少から直接算出することが可能である. 反応溶液 1 ml の場合次の計算式によって, 比活性を算出する.

$$\text{比活性(U/mg)} = \Delta A_{340} / \text{min} \times 10^6 / 6220 \times \text{protein}(\mu\text{g})$$

3.g.2.7 AMS による γ の還元状態の確認^{23,24)}

CF₁ を初めとするチオール酵素は, 酸化条件下では分子内ジスルフィド結合を形成し, それによって起こる構造変化が酵素活性を低くあるいは完全に抑えている. このタンパク質分子内でのジスルフィド結合を可視化する方法として, 4-acetamido-4'-maleimidyl-stilbene-2,2'-disulfonate (AMS) のような SH 修飾試薬を用いてタンパク質を標識し, 標識に起因する分子量およびタンパク質の荷電状態の差を利用して, 電気泳動的に酸化状態と還元状態のタンパク質を識別する方法がある. この方法を用いると, 系の中に混在する酸化型と還元型の割合を決定することや, 修飾可能な SH 基の数を推定することが可能である. ここでは, CF₁ γ の調節領域を含む TF₁ の $\alpha_3\beta_3\gamma$ ($\alpha_3\beta_3\gamma_{\text{TCT}}$) 複合体を用いて γ の還元状態を確認した結果を紹介する²⁵⁾.

[実験方法]

1. 前項と同様に, CF₁ γ の調節領域上のジスルフィド結合を還元するため, CF₁ あるいは $\alpha_3\beta_3\gamma_{\text{TCT}}$ 複合体を 100 μ M DTT, 5 μ M Trx-*f*, 50 mM HEPES/KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂ で 30°C, 10 分間インキュベートする. 酸化処理する場合には, DTT と Trx-*f* の代わりに, 50 μ M CuCl₂ を用いる.

2. 酸化・還元処理した $\alpha_3\beta_3\gamma_{TrCT}$ 複合体に同量の 10% TCA を加え、氷上で 10 分間インキュベートする。この溶液を 15,000×g で 10 分間遠心して沈殿を得る。沈殿に 200 μ l の氷冷したアセトンを加えて懸濁した後、15,000×g で 5 分間遠心する。この操作を二度繰り返す。

3. 遠心後の沈殿からアセトンを乾燥によって除去した後、10 μ l の 1% SDS, 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 15 mM AMS^{#3} を加え室温で 30 分間強く攪拌して沈殿を完全に溶解する。この溶液に 10 μ l の SDS-PAGE sample buffer (2-メルカプトエタノールを含まない溶液) を加え、9.0% SDS-PAGE で酸化・還元処理による γ の移動度の違いを調べる。

この方法は、分子量が 4 万までの比較的小きなタンパク質の酸化還元状態を見るのに簡便で有効な方法である。図 3 には、 γ 上のジスルフィド結合の還元の程度に比例して ATP 加水分解活性が上昇する様子を調べた結果を示す。

3.g.3 CF₀CF₁ を用いた光リン酸化活性の測定と大腸菌反転膜によるプロトンポンプ活性の測定

ホウレンソウ緑葉から単離した葉緑体を用いた光リン酸化活性の測定は、50 年以上前に Arnon によって報告されている。非循環的な電子伝達による光リン酸化活性を測定するためにはパーコール法などで無傷葉緑体を調製する必要があるが、循環的な電子伝達による活性は、包膜を欠いたチラコイド膜標品でも容易に測定することが出来る。一方、CF₀CF₁ が ATP を加水分解すると同時に ATP 合成の時とは逆にチラコイド膜ルーメン側にプロトンを輸送するプロトンポンプ活性を測定するためには、適当な蛍光色素を用いる必要があり、クロロフィルを大量に含む葉緑体チラコイド膜では実測が難しい。本項では、ホウレンソウ葉緑体による光リン酸化活性の測定法、大腸菌反転膜小胞を用いたプロトンポンプ活性の測定法を紹介する。

3.g.3.1 ホウレンソウ葉緑体チラコイド膜の調製

基本的には、CF₁ を調製するときと同じ方法でいわゆるチラコイド膜標品を得るが、光リン酸化活性を測定する場合には、使用する緩衝液条件をより穏和なものにする。理由はよく分からないが、緩衝液には、Tris よりも Tricine を用いた方が高い比活性が得られる。

^{#3} AMS は使用時に調製する。

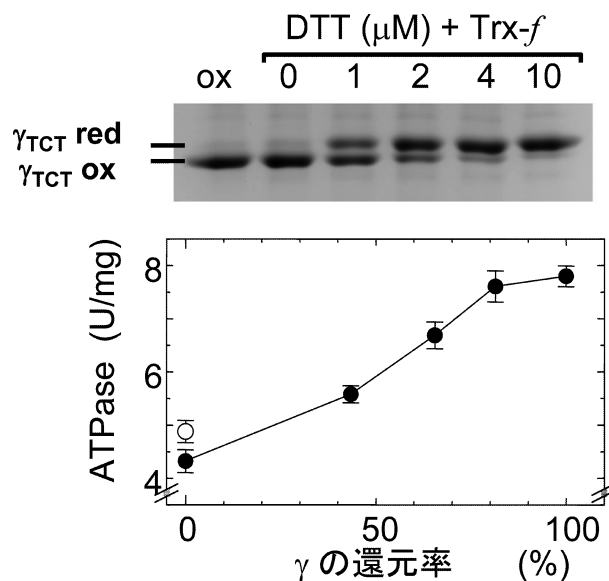


図 3 : AMS による γ の還元と酵素の活性化

A 調節領域を含む $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体 ($\alpha_3\beta_3\gamma_{TrCT}$) の γ サブユニット部分の酸化還元レベルを DTT および Trx-f によって変化させ、AMS 修飾によって可視化した。

B A の標品の ATPase 活性を測定し、 γ サブユニットの還元レベルに対してプロットしたもの
実験の詳細は、文献 25 を参照。

[実験方法]

- 市販のホウレンソウの緑葉 30 g に対して、あらかじめ氷冷した 60 ml の破碎用緩衝液 (20 mM Tricine-NaOH (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 400 mM sucrose) を加え、ミキサーで 15~20 秒間破碎する。
- 破碎液を 4 層のガーゼで濾過して残渣を除き、3,800×g (5,000 rpm) で 5 分間遠心して沈殿を得る。
- 以降の操作は、出来るだけ氷上あるいは低温で行う。この沈殿に破碎用緩衝液 60 ml を加え絵筆を用いて丁寧に懸濁し、同様に遠心して沈殿を得る。
- 氷冷した低張緩衝液 (20 mM Tricine-NaOH (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) 60 ml を沈殿に加え、氷上でスターラーで 60 分間攪拌し、葉緑体を破壊する。
- 葉緑体溶液を 10,000×g で 5 分間遠心し、沈殿を回収した後、低張緩衝液で 2 回懸濁と遠心を繰り返して洗浄する。最終的に得られたチラコイド膜標品の沈殿を 4 ml の低張緩衝液に懸濁し、定法に従ってクロロフィル定量を行い、終濃度 0.5 mg Chlorophyll/ml になるように低張緩衝液で希釈して、チラコイド膜標品とする。

3.g.3.2 光リン酸化活性の測定

上記のようにして調製したチラコイド膜は、表在性タ

ンパク質であるフェレドキシンやフェレドキシン-NADP還元酵素(FNR)を失っており、通常は光照射してもチラコイド膜内外にプロトン勾配を形成しない。そこで、光化学系I周辺だけで循環的な電子伝達を可能にする脂溶性化合物であるPhenazine methosulphateを用いて擬似的に電子伝達反応を行わせ^{26,27)}、チラコイド膜内外のプロトン勾配を形成させることで、CF₀CF₁のATP合成活性を測定する。従来は、ATP合成活性の基質に用いるリン酸に³²P標識のものを用いることで、合成された[³²P]-ATPを定量していたが、取り扱いの煩雑さから敬遠されることが多く代替法としてLuciferin-Luciferase法を用いることが多い²⁸⁾。ただし、後者の場合には、系の中に含まれるadenylate kinase活性(2ADP→ATP+AMP)により生じるATPと光リン酸化で合成されたATPを区別できないので、阻害剤の使用などに特別な注意が必要である。

[実験方法]

1. あらかじめ、光リン酸化反応液(57.5 mM Tricine-NaOH(pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 62.5 mM Phenazine methosulphate)を調製し、光を遮断して氷冷しておく。Phenazine methosulphate^{#4}は光感受性なので、可能な限り遮光して保存する。
2. 容量4 mlの透明なガラスバイアル瓶に、光リン酸化反応液2.4 ml, 3.g.3.1で調製したチラコイド膜標品0.6 mlを入れ、両者を混合する。このバイアル瓶をスターラーの上にセットし、厚さ5 cmの水フィルター(透明なガラス瓶に水道水を入れたもの)を介して、150 Wのクールランプで光照射することで室温で反応を行う。最終的な試料溶液中のクロロフィル濃度は、0.1 mg/mlとする。
3. 光照射開始後、一定時間(通常は5分くらい)経過した後に、バイアル瓶にADPとリン酸を添加し、ATP合成反応を開始する。用いるADPとリン酸の濃度はそれぞれ1ないし2 mMである。
4. 反応開始から一定時間経過後にバイアル瓶から50 μlの試料を採取し、手早く氷冷した2 μlの10% PCA溶液と混合して反応を停止する。
5. 一連の反応停止処理が終了するまで停止した試料は氷上に放置し、その後、20,000×gで10分間遠心して、上清を回収する。上清20 μlに対して50 μlの2 M Tris-acetate(pH 7.7)を混合し中和する。

^{#4} 現在は光安定性の高い1-Methoxy phenazine methosulphateもSigma社から市販されており、これを用いることもできる。

6. 中和処理した試料に含まれるATP量を、後述のLuciferin-Luciferase法によって定量する。

7. バックグラウンド測定

ここで紹介したATP合成の測定法では、先に述べたように系内にadenylate kinaseが含まれていた場合に、その働きによって生じたATPをATP合成酵素が合成したATPと識別することが出来ない。Adenylate kinaseはdiadenosine penta phosphateによって特異的に阻害することが出来るが、試薬が高価であることや高濃度に添加しないとその活性を必ずしも完全には抑えることが出来ないことなどの理由から、バックグラウンド測定にはあまり適していない。CF₀CF₁によるATP合成は、チラコイド膜内外に形成されるΔμH⁺を利用するので、これを脱共役剤で解消する、もしくは、CF₁に特異的な阻害剤であるテントキシンを使用した方が確実に阻害することが可能であり、これによって試料中のATP量の変動におけるATP合成の寄与を簡単に評価することが可能である。通常は、上記の2の操作の際に、50~100 μMのFCCP(脱共役剤)をあらかじめ加えておくことで、ATP合成を完全に阻害することが可能である。テントキシンの場合には、チラコイド膜標品に対して5 μMになるように添加し30分ほど室温で放置することでCF₁の活性を完全に阻害することが出来る。

3.g.3.3 ATPの微量定量法

光リン酸化反応によって生じるATPの定量法としては、以前は³²P標識のリン酸を用いることで、合成された[³²P]-ATPをイソブタノール-ベンゼンで抽出し定量していた。放射性同位体を利用すれば、反応系の夾雑化合物の影響をほとんど考慮せずに注目する反応を追跡することが可能である。しかし、最近では、放射性同位体が、その取り扱いの煩雑さから敬遠されることが多くなり、いくつかの代替法が使用されるようになってきた。例えば、HPLCの紫外可視検出器が非常に高性能になり、ATPやADPの微量定量法としてこれを用いることが可能である。実際、ATPとADPはC₁₈カラムによる逆相クロマトグラフィーや、酸化チタンカラムによるクロマトグラフィーで高速に分離可能であるが、両者の量比に大きな差がある場合にはピークがかぶることがあり定量が難しい場合がある。測定対象とするATP量が十分である場合には、HexokinaseとGlucose 6-phosphate dehydrogenaseを用いたカップリングアッセイを行うことにより、NADPHの生成量に変換することが可能であり、分光光度計でリアルタイムに測定することが出来る。

ATPの高感度定量法としてよく用いられる方法とし

室にセットし、ベースラインが安定するまで 42°C でインキュベートする (励起波長 410 nm, 蛍光波長 480 nm)。なお, 反転膜小胞の酸化・還元処理は AMS による γ サブユニットの還元状態の確認に記載した方法と同様の条件で行う。

4. スターラーで攪拌しているセルに直接, 0.5 mM ATP を投入することにより, 反応を開始させる。反応を開始し, 蛍光変化がプラトーに達したら, 1 μ g/ml FCCP を加えて反応を停止させる。実際の測定例として, 葉緑体 CF_0CF_1 の γ サブユニットの酸化還元調節領域を好熱菌 ATP 合成酵素に組み込んだキメラ F_0F_1 の H^+ 輸送活性と, そのチオール調節を図 4 に示した。

3.8.4 おわりに

CF_0CF_1 は, 光合成の炭酸同化に必要な化学エネルギーを, 光化学反応で形成される膜ポテンシャルを利用して合成し供給しているという意味で, 光エネルギーを化学エネルギーに変換するプロセスの重要な酵素である。50 年以上前に Arnon によって発見された光リン酸化反応³¹⁾ は, その後, Racker の研究室を中心に活発に研究が行われ, ATP 合成酵素の研究として発展した¹³⁻¹⁵⁾。研究の過程では, 同種の酵素であるミトコンドリア由来の ATP 合成酵素と細菌細胞膜由来の ATP 合成酵素が, その理解に大きく貢献しており, 1983 年には構成サ

ブユニットの全遺伝子配列が完了しているし^{32,33)}, 1994 年には呼吸鎖を構成する 5 つの複合体の中で最初に結晶構造が明らかにされている³⁴⁾。一方で, その分子機構の研究に関しては, Penefsky や Boyer らが速度論的な解析を熱心に行い³⁵⁻³⁸⁾, 1997 年には吉田・木下らの研究グループの手で, 触媒反応中に分子の軸部分を構成するサブユニットが回転していることが顕微鏡下で実際に映像としてとらえられ³⁹⁾, 分子モーターとして一躍注目されるようになった⁴⁰⁾。一方で, 本章でも触れたように, この酵素はエネルギー供給という重要な役割を担っていることから, 生理的に高度に調節されているようである。この調節機構については, 細胞の状態に合わせてどのように調節が行われるのか, その実体がまだ明らかにされておらず, これから大きく研究が進展する分野であろう。

分子モーターとしての性質が明らかになって以来, ATP 合成酵素は一分子レベルの研究の材料となり, 研究技術の観点からも非常に高度な物理化学的な測定の対象となっている。しかし, 一方で, 本章で紹介したように, CF_0CF_1 は葉緑体から容易に大量に調製することが可能であり, その ATP 加水分解活性やプロトン輸送活性も分光光度計や蛍光光度計だけで測定出来るなど, 大学の学生実習レベルでも容易に取り扱える便利な材料である。今回, 本章で紹介した方法が今後の植物生理学研究の一助になれば幸いである。

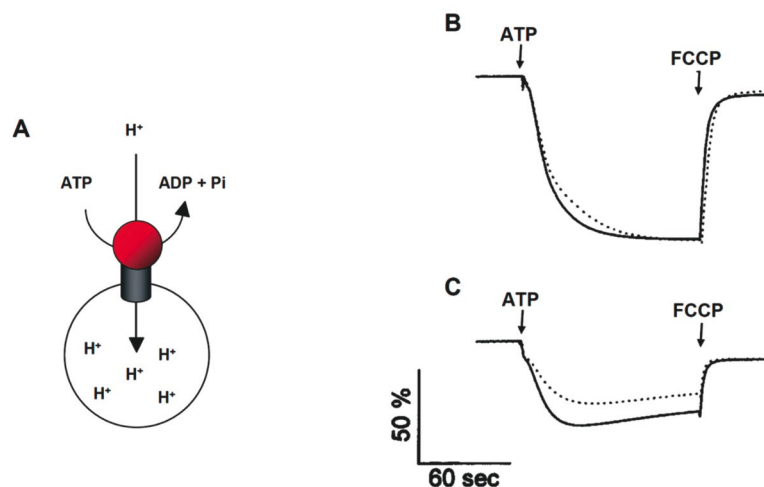


図 4: F_0F_1 による ATP 依存的 H^+ 輸送活性に対するチオール調節の影響

A, 大腸菌反転膜小胞を用いた H^+ 輸送活性測定の概略図。 F_0F_1 の H^+ 輸送活性による小胞内の pH の低下は蛍光性 pH 指示薬である ACMA の蛍光強度の減少により測定した。反転膜小胞は DTT, 2-ME, Trx-f (還元条件, 実線) または $CuCl_2$ (酸化条件, 点線) で 30°C, 10 分間インキュベートした。 F_0F_1 による H^+ 輸送反応 (B; TF_0TF_1 , C; キメラ F_0F_1) は ATP を加えることにより開始し, 脱共役剤である FCCP を加えることで停止させた。

参考文献

- 1) M. Komatsu-Takaki, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) P.2360.
- 2) M. Komatsu-Takaki, *Eur. J. Biochem.* **214** (1993) P. 587.
- 3) P. Mitchell, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **41** (1966) P. 445.
- 4) T. Bakker-Grunwald, and K. van Dam, *Biochim. Biophys. Acta* **347** (1974) P.290.
- 5) D. W. McKinney, B. B. Buchanan, and R A. Wolosiuk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86** (1979) P.1178.
- 6) C. M. Nalin, and R. E. McCarty, *J. Biol. Chem.* **259** (1984) P.7275.
- 7) J. Miki, M. Maeda, Y. Mukohata, and M. Futai, *FEBS Lett.* **232** (1988) P.221.
- 8) M. S. Dann, and R. E. McCarty, *Plant Physiol.* **99** (1992) P.153.
- 9) U. Junesch, and P. Graber, *Biochim. Biophys. Acta* **893** (1987) P.275.
- 10) T. Hisabori, Y. Kato, K. Motohashi, P. Kroth-Pancic, H. Strotmann, and T. Amano, *Eur. J. Biochem.* **247** (1997) P.1158.
- 11) T. Hisabori, K. Motohashi, P. Kroth, H. Strotmann, and T. Amano, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) P.15901.
- 12) H. Konno, M. Yodogawa, M. T. Stumpp, P. Kroth, H. Strotmann, K. Motohashi, T. Amano, and T. Hisabori, *Biochem. J.* **352** (2000) P.783.
- 13) M. E. Pullman, H. S. Penefsky, A. Datta, and E. Racker, *J. Biol. Chem.* **235** (1960) P.3322.
- 14) H. S. Penefsky, M. E. Pullman, A. Datta, and E. Racker, *J. Biol. Chem.* **235** (1960) P.3330.
- 15) R. E. McCarty, and E. Racker, *J. Biol. Chem.* **243** (1968) P.129.
- 16) H. M. Younis, G. D. Winget, and E. Racker, *J. Biol. Chem.* **252** (1977) P.1814.
- 17) T. Hisabori, G. Kothen, and H. Strotmann, *J. Biochem. (Tokyo)* **114** (1993) P.324.
- 18) M. L. Richter, W. J. Patrie, and R. E. McCarty, *J. Biol. Chem.* **259** (1984) P.7371.
- 19) F. Gao, B. Lipscomb, I. Wu, and M. L. Richter, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) P.9763.
- 20) M. Sokolov, L. Lu, W. Tucker, F. Gao, P. A. Gegenheimer, and M. L. Richter, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) P. 13824.
- 21) D. L. Stiggall, Y. M. Galante, and Y. Hatefi, *Methods Enzymol.* **55** (1979) P.308, P.819.
- 22) D. Bald, H. Noji, M. T. Stumpp, M. Yoshida, and T. Hisabori, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) P.12757.
- 23) T. Kobayashi, S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi, and K. Ito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) P. 11857.
- 24) K. Motohashi, A. Kondoh, M. T. Stumpp, and T. Hisabori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001) P.11224.
- 25) T. Hisabori, H. Konno, H. Ichimura, H. Strotmann, and D. Bald, *Biochim. Biophys. Acta* **1555** (2002) P.140.
- 26) P. H. Homann, *Plant Physiol.* **57** (1976) P.387.
- 27) B. Schmidt, *Biochim. Biophys. Acta* **449** (1976) P.516.
- 28) A. Lundin, *Methods Enzymol.* **305** (2000) P.346.
- 29) Y. Zhang, and R. H. Fillingame, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) P.5473.
- 30) H. Konno, T. Suzuki, D. Bald, M. Yoshida, and T. Hisabori, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318** (2004) P. 17.
- 31) D. I. Arnon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68** (1971) P. 2883.
- 32) M. Futai, and H. Kanazawa, *Microbiol. Rev.* **47** (1983) P.285.
- 33) J. E. Walker, and N. J. Gay, *Methods Enzymol.* **97** (1983) P.195.
- 34) J. Abrahams, A. Leslie, R. Lutter, and J. Walker, *Nature* **370** (1994) P.621.
- 35) C. Grubmeyer, R. L. Cross, and H. S. Penefsky, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) P.12092.
- 36) R. L. Cross, C. Grubmeyer, and H. S. Penefsky, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) P.12101.
- 37) M. J. Gresser, J. A. Myers, and P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) P.12030.
- 38) P. D. Boyer, *Biochim. Biophys. Acta* **1458** (2000) P.252.
- 39) H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr., *Nature* **386** (1997) P.299.
- 40) M. Yoshida, E. Muneyuki, and T. Hisabori, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2** (2001) P.669.

略語一覧

ACMA	9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine
AMS	4- acetamido- 4'- maleimidylstilbene- 2,2'- disulfonic acid
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ATPase	adenosine 5'-triphosphatase
DTT	dithiothreitol
FCCP	carbonylcyanide-4- trifluoromethoxyphenylhydrazone
HEPES	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl) piperazine- <i>N</i> -2- ethanesulfonic acid
PCA	perchloric acid
TCA	trichloroacetic acid