



Title	フィコビリンの単離と分析
Author(s)	石塚, 量見; 池内, 昌彦
Citation	低温科学, 67, 355-358 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	<a href="http://hdl.handle.net/2115/39166">http://hdl.handle.net/2115/39166</a>
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 5. 色素の分析 e
File Information	67-051.pdf



[Instructions for use](#)

## 5. 色素の分析

### e. フィコビリンの単離と分析

石塚 量見<sup>1)</sup>, 池内 昌彦<sup>1)</sup>

フィコビルンはシアノバクテリアや灰色藻, 紅藻, クリプト藻などの真核藻類における主要な光合成の集光色素であり, タンパク質と共有結合している。本項では光合成色素としてのフィコビリンの性質, 分析・単離法およびフィコビリタンパク質について述べる。

#### Phycobilins

Takami Ishizuka, Masahiko Ikeuchi

We summarized technical protocols for preparation, separation and identification of phycobilins extracted from cyanobacterial cells.

#### 5.e.1 概論：フィコビルン色素の構造と吸収

フィコビルン phycobilin は藻を表す phyco と胆汁を表す bile の合成語である。フィコビルンはシアノバクテリアや灰色藻, 紅藻, クリプト藻などの真核藻類に広く分布する開環テトラピロールで, タンパク質と結合してフィコビリタンパク質を形成し, 主要な光合成色素として重要な役割を果たしている。フィコビリタンパク質は通常, フィコビリソーム (3章4e項参照) という超複合体を構成するが, フィコビリソームをもたないクリプト藻や *Prochlorococcus* 類においても光合成の集光色素としてはたらいっている。

これまでに知られている光合成の集光色素としては, 4種のフィコビルン (フィコシアノビルン, フィコエリスロビルン, フィコピオロビルン, フィコウロビルン) がある (図1)。これらは互いによく似た開環テトラピロールで, すべてプロトヘムを開裂して生成するビルベルジンIXを出発物質として合成される (図2)。それぞれの吸収スペクトルはテトラピロール分子内の共役二重結合の長さに依存する。A環の二重結合とD環の二重結合がともに還元されたものはフィコシアノビルンで, 出発のビルベルジンよりも数十 nm ほど短波長の吸収ピークを示す。フィコシアノビルン以外の色素はピロール環の間の二重結合が還元されることで, 共役二重結合が短くなっており, より短波長の光を吸収することができる。これらの色素はクロロフィル a の2つのピークの間を

補う吸光特性をもつため, 光の波長特性が大きく変化する水環境に生息する藻類に広く分布する。なお, フィコビルン以外のビルン色素としては, フィトクロムに結合するフィトクロモビルンやビリベルジンもあるが, ここでは触れない。

フィコビルン色素はすべてアポタンパク質に共有結合しており, これをフィコビリタンパク質という。これらは大きく, フィコシアニン, アロフィコシアニン, フィコエリスリン, フィコエリスロシアニンに分けられるが, 互いに相同で, グロビンスーパーファミリーに属する。また, フィコビリソームのコアメンブレンリンカーの色素結合ドメインも同様の構造をとっている。

用語解説: 色素タンパク質の部分を表す用語は一部混乱しているので, ここで整理する。一般に, 複合タンパク質はアポタンパク質と補欠分子族 prosthetic group から成り, 色素タンパク質の場合は, この補欠分子族が色素である。しかし, フィコビリタンパク質のように色素分子がアポタンパク質に共有結合している場合は, ホロタンパク質を色素 (広義) と呼び, 補欠分子族の部分を発色団 (広義) と呼ぶことも多い。発色団は元来は分子内の光吸収にかかわる部分を表す用語で, 共役二重結合など色素分子内の特定の領域を指すこともある (狭義)。

#### 5.e.2 フィコシアニンの共有結合の検出例

(図1)で示したように, 開環テトラピロールはシステイン残基と共有結合している。この結合はタンパク質を変性させるだけでは切断されない。したがって, 開環テ

1) 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

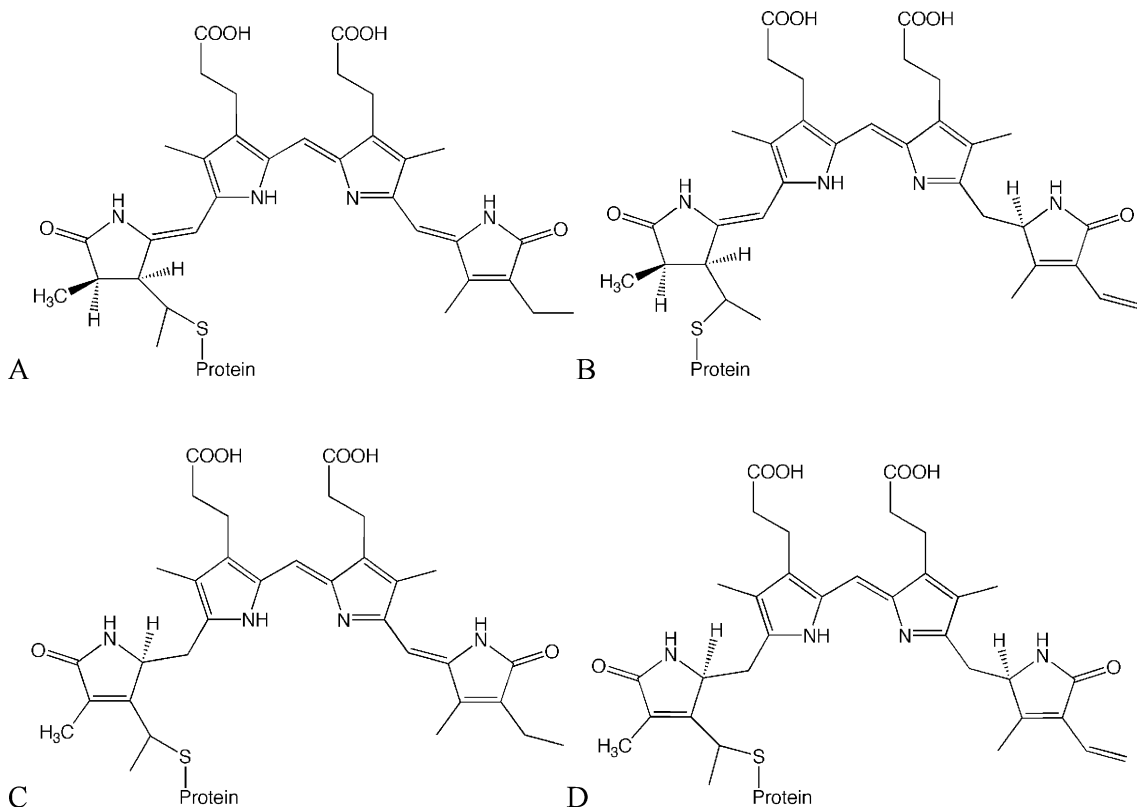


図1：フィコビルン色素。A：フィコシアノビルン，B：フィコエリスロビルン，C：フィコビオロビルン，D：フィコウロビルン。それぞれ，タンパク質のCys残基に共有結合している分子構造を示す。なお，フィコエリスロビルンは紅藻のフィロエリスリンではD環でもタンパク質に共有結合している。また，フィコウロビルンも紅藻では，D環でもタンパク質に共有結合している。

トラピロールを結合したタンパク質は SDS-PAGE で着色したバンドとして検出が可能である。フィコシアニン を SDS-PAGE したゲルの例を示す (図2)。フィコシアノビルンを結合する，フィコシアニン  $\alpha$  (CpcA)，フィコシアニン  $\beta$  (CpcB)，アロフィコシアニン  $\alpha$  (ApcA)，アロフィコシアニン  $\beta$  (ApcB) のバンドがそれぞれ青いバンドとして認識される。

#### [実験方法] SDS-PAGE 後の蛍光検出

フィコビルン色素は開環テトラピロールで共役二重結合系は溶液中ではそれほど安定ではなくモル吸光係数はホロタンパク質と比べて数分の1以下となる。したがって，SDS-PAGE 後の変性タンパク質の検出にはしばしば  $Zn^{2+}$  誘導性の蛍光を利用する<sup>1,2)</sup>。 $Zn^{2+}$  は安定な金属イオンとして開環テトラピロールの各ピロール環の窒素原子に配位することで，ピロール環をつなぐ共役二重結合系の平面性をよくするため，モル吸光係数や蛍光収率を大きく改善する。

1. ポスト染色法：簡便な方法である。SDS-PAGE 泳動後，ゲルを 1 mM 酢酸亜鉛溶液に 30 分間浸して振盪する。もし，白沈を生じる場合は酢酸などの酸性溶

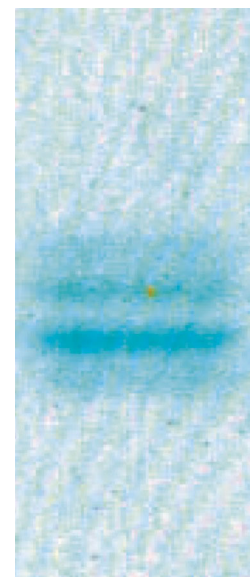


図2：SDS-PAGE で分離したフィコビルタンパク質の青いバンド。上から順に，フィコシアニン  $\beta$ ，アロフィコシアニン  $\alpha$ ，フィコシアニン  $\alpha$ ，アロフィコシアニン  $\beta$  のバンドに対応する。

液で洗浄して，白沈を除く必要がある。また，後述する FMBIO などの高精度検出器を使用するときは，酢

酸蒸気でミラーが劣化するので、さらに水洗して酢酸を除く必要がある。最近の論文では、ブロットングしたメンブレンで酢酸亜鉛処理をしていることも多い。

2. ゲル中に添加する方法：濃縮ゲル，分離ゲル，泳動溶液各々に 1 mM 酢酸亜鉛を加えて SDS-PAGE を行う。この場合は、通常は沈殿は生じないので、そのまま蛍光検出できる。この場合は PVDF 膜などにブロットする必要もない。この方法は結果の再現性も高くおすすめである。
3. 蛍光検出法：2次元ゲル蛍光検出装置を使用する。筆者らが使用している FMBIO II (日立製，現在は FMBIO II は生産終了で FMBIO III が販売されている)は，検出感度が非常に高い。励起光は 532 nm レーザー光，検出は 605 nm を使用する。なお，フィコシアノビリンの SDS 溶液中の励起波長は 577 nm，蛍光波長は 623 nm であるが，固定された FMBIO のレーザーと検出の波長設定で十分検出できる。なお，DNA 検出用 UV イルミネーターでも検出は可能であるが，感度は高くない。

### 5.e.3 フィコシアニンの発色団の同定 (酸性変性)

開環テトラピロールは各々の共役二重結合系の違いにより異なった吸収ピークを持つ。例えば，フィコシアノビリンは赤色域，フィコエリスロビリルン，フィコビオロビリルンは緑色域，フィコウロビリルンは青色域に吸収ピークを持つ。また，開環テトラピロールはプロトン化すると各開環テトラピロール間で吸収ピークの違いが明確になることが知られている。このため，開環テトラピロールは酸性溶媒に溶かして吸収スペクトルを測定し，その吸収ピークと形から種類を判断することが多い。図3はフィコシアノビリルンを結合したタンパク質を酸性尿素で変性させた吸収スペクトルである。吸収ピークは 661 nm で，このスペクトルのピーク位置と形はA環とシステイン残基が結合したフィコシアノビリルンを反映している。しかし，酸性変性は開環テトラピロールのおおまかな構造しか反映しないので，詳細な構造を知るには結晶解析や，質量分析，NMR などを用いる必要がある。

### 5.e.4 メタノリシス：フィコシアノビリルンの単離

開環テトラピロールはアポタンパク質のシステイン残

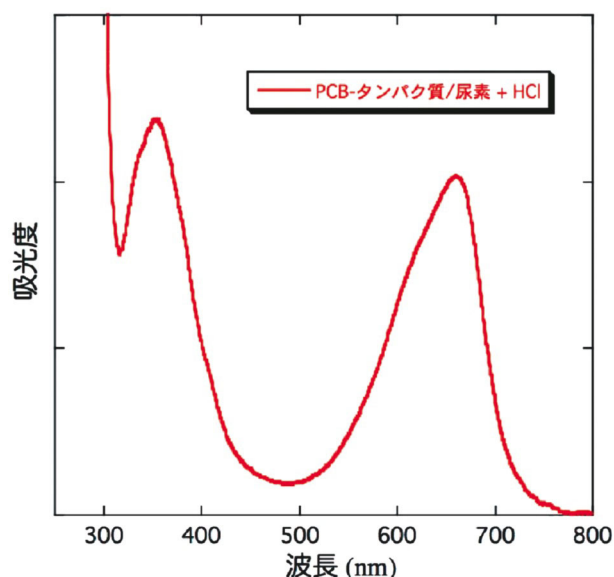


図3：タンパク質に結合したフィコシアノビリルンの酸性変性後の吸収スペクトル。

基にチオエーテル結合によって強固に結合している。したがって，発色団を単離してその構造を決定することは重要であるが，容易ではない。これまでにいくつかの抽出例が報告されているが<sup>3)</sup>，ここでは Cornejo らの方法<sup>4)</sup>を参考にした *Synechocystis* のフィコシアニンからフィコシアノビリルンを単離する例を記述する。この方法は，メタノールを用いてフィコビリルンとシステイン残基の間の共有結合を解離させるものでメタノリシスと呼ばれる。

#### [実験方法] メタノリシス

1. *Synechocystis* の細胞を 100 mM NaCl, 20mM HEPES-NaOH, pH7.5 に懸濁し，破碎する。
2. 細胞破碎液 (約 50 mL) を 100000 x g, 30 min 超遠心する。フィコシアニンは上清に回収される。
3. 上清に終濃度 1% TCA (トリクロロ酢酸) を加え，1 h, 4°C, 暗所で，スターラーバーで穏やかに攪拌する。
4. 30000 x g, 20 min 遠心してフィコシアニンを回収する。
5. メタノール洗浄：沈殿にメタノールを加え，超音波処理し，30000 x g, 20 min 遠心し，不純物を含む上清を除く。この洗浄を 2 回行う。
6. 沈殿を約 1/10 容のメタノールに懸濁し，HgCl<sub>2</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>) を加え，20 h, 42°C, 暗所で保温する。HgCl<sub>2</sub> は開環テトラピロールがシステイン残基から外す反応を促進する。
7. 保温した標品を 10000 x g, 10 min 遠心して上清を



図4：メタノリシスで抽出したビリジ色素の薄層クロマトグラフィーによる分離例。矢印はフィコシアノビリジンを示す。

回収する。タンパク質から遊離したフィコシアノビリジンは上清に抽出される。青色で抽出を確認できる。

8. 上清にメルカプトエタノール (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) を加えて、30000 x g, 10 min 遠心し上清を回収する。この操作で  $\text{Hg}^{2+}$  を還元し沈殿物として除くことができる。遠心チューブの底に白色の沈殿を確認できる。なお、メタノリシスで、 $\text{HgCl}_2$  を使用しない場合この操作は必要ない。筆者らの経験では、 $\text{HgCl}_2$  を入れなくてもメタノリシスは十分行われる。この上清をフィコシアノビリジ粗標品とする。

#### [実験方法] 薄層クロマトグラフィーによる精製

1. シリカゲル薄層 (シリカゲル 60, TLC プレート 5553, メルク) を用意する。前処理は不要である。
2. 展開溶媒：飽和酢酸エチル。(酢酸エチル： $\text{ddH}_2\text{O}$  = 10：1 の混合液から酢酸エチル層を使用する)
3. フィコシアノビリジ粗標品を微量スポットして、密封容器で先端まで展開する。

図4の矢印で示したバンドがフィコシアニンから単離した遊離のフィコシアノビリジンである。この部分の薄層を掻き取りメタノールで抽出する。フィコシアノビリジンは中性メタノール溶媒中で 600 nm 付近に吸収ピークを持ち、これに塩酸を添加すると、一部のピロール環の窒素原子をプロトン化して吸収ピークは 685 nm 付近にシフトする(図5)。同じ酸性条件である図3のピークより約 20 nm 長波長シフトしているが、これはフィコシアノ

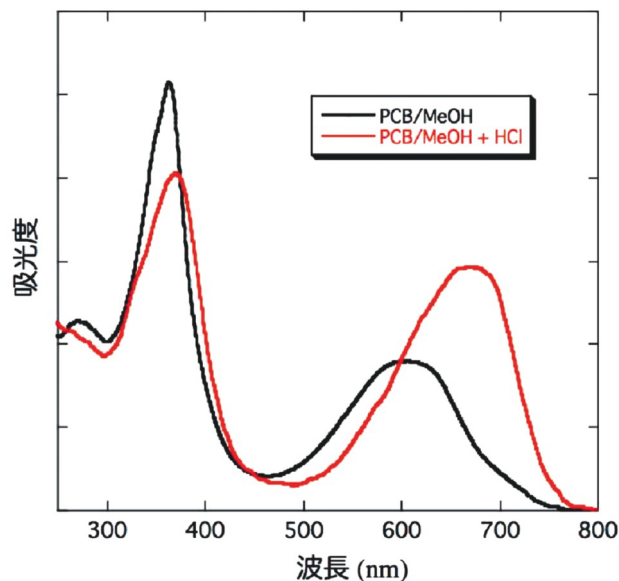


図5：フィコシアノビリジンの吸収スペクトル

ビリジがシステイン残基から遊離していることを示す。この長波長シフトはシステイン残基から遊離した部分が二重結合を再生し、共役二重結合系が長くなったことによる。ちなみに、フィコシアノビリジンを結合したタンパク質を中性メタノール溶媒で変性させ吸収スペクトルを測定すると、その吸収ピークは 580~590 nm になる。薄層クロマトグラフィーの結果(図4)は、本来のフィコシアノビリジンだけでなく数種類の副産物を生じていることも示している。一般的にメタノリシスは多くの開環テトラピロール副産物を生み出すことが知られている。色調が異なるものは異なる物質と判断できるが、例えば、開環テトラピロールのプロピオニル基がモノメチル化、ジメチル化されてしまっても、吸収スペクトルは変化しないことが知られている。したがって、精製品の評価には細心の注意が必要である。なお、開環テトラピロールは二重結合が多く酸化されやすく不安定なので操作は迅速に行う必要がある。

#### 参考文献

- 1) A. Auché, C. R. Soc. Biol. 64 (1908) P.297.
- 2) T. R. Berkelman, & J. C. Lagarias, Anal. Biochem. 156 (1986) P.194.
- 3) D. J. Chapman, W. J. Cole, & H. W. Siegelman, Biochim. Biophys. Acta. 153 (1968) P.692.
- 4) J. Cornejo, S. I. Beale, M. J. Terry, & J. C. Lagarias, J. Biol. Chem. 267 (1992) P.14790.
- 5) H. Falk, The chemistry of linear oligopyrroles and bile pigments, ed. Springer-Verlag 1989.