HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高等植物の葉緑体と葉緑体膜の単離
Author(s)	宮尾, 光恵
Description	3章 単離・精製・活性測定 2. 光合成膜などの単離 a
Relation	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
Citation	低温科学, 67, 197-203
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39138
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-030.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

2．光合成膜などの単離
a．高等植物の葉緑体と葉緑体膜の単離

宮尾　光恵[1)]

高等植物の緑葉から無傷葉緑体を単離する方法，葉緑体膜（包膜とチラコイド膜）の単離法，および，チラコイド膜から光化学系II膜を調製する方法を紹介する．

Isolation of intact chloroplasts, thylakoids and photosystem II membranes from higher plants

Mitsue Miyao

Intact chloroplasts and subchloroplast membranes can be purified from a variety of plant species by applying standard procedures with slight modification. This article summarizes procedures for isolation of intact chloroplast and subchloroplast membranes including envelope, thylakoid and photosystem II membranes.

2.a.1　概論

高等植物の緑葉から無傷葉緑体，包膜，チラコイド膜を単離・精製する方法は，1980年代にはほぼ確立された．その多くは，ホウレンソウ，コムギ，エンドウ，レタス等，光合成研究材料として「使いやすい」植物，すなわち，材料が大量にかつ容易に入手でき，葉が柔らかく，ポリフェノール，粘稠な貯蔵物質（例えば，フラクタン）等，精製を妨害する物質が少ない植物を対象としたものがほとんどであった．一方，近年の植物科学の進展にともない，アラビドプシスやイネ等のモデル植物，野生植物等，広汎な植物種が研究材料として用いられるようになってきている．材料が異なっても，先人の確立した「古典的な」単離精製法は適用可能であり，多くの場合破砕方法と破砕液の組成を若干改変するだけで純度の高い標品を得ることができる．本章では，ホウレンソウまたはエンドウを材料とした古典的な方法を紹介するとともに，他の植物種への適用法を概説する．なお本章では，葉肉細胞から葉緑体と葉緑体膜（チラコイド膜，包膜，光化学系II膜）を単離する方法を扱う．C_4植物維管束鞘細胞および藻類の葉緑体単離法は文献1）を，クラミドモナスからの葉緑体，チラコイド膜単離法，シアノバクテリアのチラコイド膜単離法は第3章を参照されたい．

葉緑体および葉緑体膜の単離は，組織の破砕，遠心分離法による分画，密度勾配遠心分離法による精製の3段階に大別できる．全般的な注意事項は以下の通りである．

① すべての操作を0-4℃で行う．また，すばやく作業する．使用する溶液，器具類を予冷し，氷中あるいは氷上で作業を行う．遠心分離機の側で作業するのが望ましい．

② 弱光下で作業する．作業場所は暗い方が望ましいが，日光が差し込まない部屋（光強度5 μmol $m^{-2}s^{-1}$程度）であれば，作業場所の天井照明を消す程度（光強度1 μmol $m^{-2}s^{-1}$以下）で充分である．試料を氷中で保存するときは，必ず遮光する（光を通さないアイスバケットに入れるかアルミホイルで覆う）．

③ 懸濁液が薄い（葉緑体や葉緑体膜の濃度が低い）と，光傷害や物理的損傷を受けやすくなる．組織破砕液，試料懸濁液ともに，不透明の濃い緑色になるようにする．最終的な精製標品は，できるだけ濃く懸濁する．

④ 試料の遠心沈殿は，水彩絵筆を使って穏やかに懸濁する．この時，沈殿に直接かからないように懸濁溶液を添加する（溶液がかかると沈殿がダマになって遠心管壁からはがれ，均一に懸濁できない）．溶液で濡らした絵筆で沈殿の表面をなでるようにして，少しずつ沈殿を懸濁する．

⑤ 無傷葉緑体は0-4℃で保存しても徐々に包膜が破壊される．また，凍結融解で包膜が破壊される．他の葉緑体膜標品は，0.4-0.8 Mショ糖（高濃度の方が望ましい）を含む溶液に濃く懸濁すれば活性を保持したまま凍結保存できる．液体窒素中で保存するか，液体窒素で急速凍結したのち－80℃で保存する．使用時は水浴で速やかに融解し，融解したら氷中に移す．ショ糖は生体膜とタンパク質の安定作用をもつが，融解に要する時間を短くする効果もある．無傷葉緑体の凍結保

1）独立行政法人農業生物資源研究所　光環境応答研究ユニット

存にも高濃度のショ糖を加える．

2.a.2　材料の前処理と葉の破砕

2.a.2.1　材料の前処理

葉のデンプン含量が高いと，分画遠心法で単離した葉緑体や葉緑体膜にデンプンが混入し完全には除去できない．またデンプン粒は葉緑体より密度が高いため，無傷葉緑体を遠心分離する際，葉緑体内のデンプンが包膜を突き破ってしまう．ホウレンソウ，タバコ，ジャガイモ，アラビドプシス等，デンプンを葉内に蓄積する植物では，破砕に先立ってデンプン含量を低下させる処理を行う．市販のホウレンソウは，植物体を水道水で充分に洗ったのち，3-4 cm の深さに水を張ったバケツに入れサランラップをかけて低温室に一晩置くか，湿らせた新聞紙に包んでビニール袋に入れて冷蔵庫で保存する．どちらの場合も 2-3 日は保存できる．タバコ，ジャガイモ，アラビドプシスはいわゆる「デンプン葉」で，葉のデンプン含量が高い．タバコ成熟葉の場合，植物体を 2-3 日弱光下（実験室内；光強度 5 μmol $m^{-2}s^{-1}$ 程度）に置くとデンプンをかなり減らすことができる．イネ，コムギ等，単子葉植物の多くは「糖葉」で，デンプンは葉身ではなく葉鞘に蓄積される．葉身のみを使用すればデンプンの混入は比較的少ない．また，破砕前日に植物体を暗所に移動すればデンプンをかなり減らすことができる．

2.a.2.2　破砕溶液の組成

基本的組成は，浸透圧調節剤，pH 緩衝剤，塩類である．浸透圧調節には，無傷葉緑体の場合 0.33 M ソルビトール，チラコイド膜の場合 0.3-0.4 M ショ糖を用いる．植物材料の性質，単離標品の使用目的に応じて保護物質を添加する．例えば，EDTA は重金属の除去，牛血清アルブミン（BSA）は膜の安定化と遊離脂肪酸の除去，フィコール（Ficoll），ポリエチレングリコール（PEG），デキストランは膜の安定化と粘度の調節のために用いられる．酸化防止剤としてジチオスレイトール（dithiothreitol, DTT），2-メルカプトエタノール，アスコルビン酸，イソアスコルビン酸等の還元剤が用いられる．ホウレンソウ等の一般的な光合成研究材料であれば，特別な保護物質は必要ない．

留意が必要なのは植物組織のポリフェノール含量で，ポリフェノールが酸化されると試料が褐変し，葉緑体や葉緑体膜の凝集（アグリゲート）を引き起こす（水溶性タンパク質もアグリゲートを形成し，SDS で可溶化できなくなる）．タバコはポリフェノール含量が高いが，葉の破砕から遠心分離による葉緑体の沈殿までの操作をすばやく行えば，ホウレンソウと同じように取り扱うことができる（組織破砕液の遠心上清は褐変するが，葉緑体は褐変しない）．それでも試料が褐変する場合は，破砕液に 5-20 mM の還元剤（DTT，アスコルビン酸）を添加する．ポリフェノールとアルカロイドの吸着剤である水溶性ポリビニルピロリドン（polyvinylpyrrolidone, PVP；例えば，PVP-400, Sigma）を 1-2 %（w/v）添加してもよい．多くの場合還元剤だけで褐変は抑えられる．

2.a.2.3　葉の破砕と濾過

大概の葉は市販の家庭用ミキサー（容量 0.5-1.5 リットル）で破砕できる．材料が少ないときは，ワーリングブレンダー（Waring 社；ステンレス製カップに上から刃を入れて破砕するタイプ）で小さいカップに入れて破砕する．材料が極少量のときはガラスホモジナイザーを使う．硬い葉や茎の破砕にはワーリングブレンダーあるいはポリトロン（Kinematica 社）を使用する．

破砕液をまず 2 層のガーゼ，引き続き 16 層のガーゼで濾過し，葉の破砕断片を除く．濾過が遅くなったらガーゼを交換する．特に最初のガーゼ 2 層は詰まりやすいので，複数セット用意して頻繁に交換する．組織破砕液には液胞由来のプロテアーゼが含まれるため，組織の破砕から破砕液の遠心分離作業は特にすばやく行う．

[実験方法：家庭用ミキサー（容量 1 リットル）による葉の破砕]

1．使用する溶液類と器具類は予め氷中で冷やしておく．ミキサーは氷を入れて予冷する．
2．双子葉植物の葉は 5 cm 程度の大きさにちぎり，氷に入れたビーカーに入れて冷やす．単子葉植物の葉はハサミで長さ 3-5 mm 程度に裁断する．
3．ミキサーの氷を捨て予冷した破砕液ですすぐ（水が混じって浸透圧が低下するのを避けるため）．
4．ミキサーの刃の 3-4 倍の高さまで葉片を軽く入れ，そこに刃の高さ程度の破砕液（30-40 mL）を注ぎ，フラッシュ（一瞬破砕してすぐに停止する操作）を 3-4 回繰り返す．双子葉植物の葉であればこの操作で葉片は 1-3 cm 程度に破砕される．単子葉植物の場合は，葉片が破砕液になじんでかさばらなくなる．さらに葉片を加えて 2-3 回フラッシュする．これを 3-4 回繰り返す．フラッシュしても破砕液がかき混ぜられなくなったら，破砕溶液を少しずつ追加する．カップに入れた葉片がほぼ均一になったら，2 秒から数秒間破砕する．無傷葉緑体を単離する場合は 3 秒程度，チラコイド膜を単離する場合は 3 秒の破砕を 2-3 回繰り返す．

5．破砕液を速やかに濾過し，遠心分離する．三角フラスコにガーゼをセットした漏斗を立てておくと，すばやく濾過できる．

この方法で単子葉植物（イネ，コムギ）の葉も完全に破砕できる．用いる破砕溶液の量は，葉片 20–30 g に対して双子葉植物（ホウレンソウ，タバコ）で約 100 mL，単子葉植物（イネ，コムギ）で約 200 mL である．

2.a.3　無傷葉緑体の単離と精製

緑葉破砕液からまず分画遠心法で葉緑体を粗精製し，引き続き Percoll（GE Healthcare）密度勾配遠心分離法で精製する．かつてはショ糖密度勾配遠心法が精製に使用されていたが，ショ糖は包膜を透過し葉緑体の浸透圧が高くなるため，浸透圧を変えずに密度勾配を形成できる Percoll が用いられている．また，Percoll 密度勾配法では密度以外に試料表面の電荷も分離に影響する．この効果により，壊れた葉緑体と無傷葉緑体とを効率よく分離することができる[注1]．

得られた葉緑体標品の無傷度（intactness）は光学顕微鏡で簡単に観察できる．無傷葉緑体はきらきら光る緑の顆粒のように見える．脱イオン水で低張にして包膜を破壊すると，光らない暗緑色の粒になる．

無傷葉緑体は不安定で，氷中暗所で保存しても徐々に包膜が破壊される．包膜が壊れると小さなダマ状のアグリゲートができる．葉緑体懸濁液にダマができたら葉緑体の一部が壊れたと考えられる．

2.a.3.1　分画遠心による無傷葉緑体の粗精製

定法とされている無傷葉緑体単離法のほとんどは，収率は低くとも大量の出発材料から純度の高い標品を得ることを目的に開発された．ホウレンソウでは 2,000–2,500× g で 30–60 秒間遠心し，葉緑体を沈殿させる．この遠心をもう一度繰り返したのち，500–600× g で 10 秒程度遠心し夾雑物（未破壊の細胞，デンプン等）を沈殿させて除く「下切り」を行う．葉緑体を沈殿させる遠心条件をきつくする，あるいは，下切り条件を緩くすれば，純度は低下するが収率を上げることができる．ただし，葉緑体の沈殿条件をきつくしすぎると壊れた葉緑体も沈殿するため，無傷葉緑体がアグリゲートを形成しやすくなる．

破砕溶液，葉緑体懸濁溶液の一般的な組成は，0.33 M ソルビトール，1–5 mM $MgCl_2$，10–20 mM NaCl，pH 緩衝剤（MES, HEPES, Tricine；pH 6–8）である．炭酸固定活性を保持した無傷葉緑体の単離には 1 mM $MnCl_2$，1 mM EDTA，2 mM イソアスコルビン酸が必要とされている[1–3]．

[実験方法：Nakatani & Barber の方法[4]]

Mg^{2+} は生体膜の安定化（チラコイド膜ではグラナ構造の維持）に必要であるが，Mg^{2+} があると壊れた葉緑体やチラコイド膜がアグリゲートしやすくなる（おそらく DNA もアグリゲート形成に関与）．本法では，アグリゲート形成を抑えるため定法よりかなり低いイオン強度と Mg^{2+} 濃度で葉緑体を単離する．

1．葉片 30–40 g を 100 mL のA液（0.33 M ソルビトール，0.2 mM $MgCl_2$，20 mM MES，Tris 溶液で pH を 6.5 に調整；最終 Tris 濃度は約 0.5 mM）で破砕し，破砕液を濾過したのち，2,200× g で 30 秒間遠心する．ハンドブレーキ[注2] でロータを減速させ遠心に要する時間を 90 秒以内とする．
2．アスピレーターにつないだパスツールピペットで上清を速やかに取り除く．沈殿表面のどろどろした緑色のスラリーと緩い沈殿（破壊された葉緑体やチラコイド膜を含む）も除く．遠心管をキムタオルの上に数秒倒立させて，残った上清とスラリーを切る．
3．筆で沈殿をB液（0.33 M ソルビトール，Tris 溶液で pH を 7.5 に調整；最終 Tris 濃度は約 0.5 mM）約 40 mL に懸濁する．激しく懸濁すると包膜が破壊されるので，筆で沈殿の表面を軽くなでるように丁寧に少しづつ懸濁する．
4．懸濁液を 2,200× g で 20 秒間遠心する．ハンドブレーキでロータを減速させ遠心に要する時間を 60 秒以内とする．
5．沈殿をB液 1–2 mL に懸濁する．

ホウレンソウの場合，無傷葉緑体の割合（intactness）は最初の沈殿が 75%以上，2 回目の沈殿がほぼ 100%で，Percoll 密度勾配法で精製した標品とほぼ同等のポリペプチド組成の標品が得られる．この無傷葉緑体標品にはデンプンが混入するが，短時間の下切り遠心（500–600× g に達したらハンドブレーキで減速）で除くことができ

[注1] 緑葉を破砕すると，無傷葉緑体や壊れた葉緑体が DNA にからまるように吸着してアグリゲートを形成する．このアグリゲートの密度は無傷葉緑体とほぼ同じなため，ショ糖密度勾配遠心法では分離できない．Percoll 密度勾配遠心法の場合アグリゲートは無傷葉緑体より低密度の位置にバンドを形成する．

[注2] 遠心停止ボタンを押し，遠心機の蓋を開けて手でロータを減速させる．この時，雑巾あるいは小さいタオルを両手に持ち，左右対称になるように両手でロータを軽く押さえる．最初は軽く振れ，アンバランスが無ければ徐々に強く押さえる．ロータが止まる直前には手を離す．

る．Percoll 密度勾配遠心法で葉緑体を精製するときは2回目の遠心を省略できる．

本法はほとんどの双子葉植物と単子葉植物に適用可能であるが，ケイ酸含量の高いイネでは無傷葉緑体の収率は必ずしも高くない．これは，葉の破砕液中のケイ酸の結晶が包膜を物理的に破壊するためで，葉の柔らかい幼苗を用いた場合でも操作ステップ数を増やすと収量が激減するので注意が必要である．

2.a.3.2 Percoll 密度勾配遠心分離法による無傷葉緑体の精製

1979 年に報告された高倍らの方法[5] が，高純度で生理活性（炭酸固定活性）の高い葉緑体を精製するもっとも優れた方法である．100 mL の Percoll に PEG 6000（Sigma）を 5 g，BSA を 1 g，Ficoll 400 を 1 g 添加した溶液（PPBF）で密度勾配をつくる．炭酸固定活性を問題にしないのであれば，Percoll のみ（ソルビトールと pH 緩衝剤のみ，あるいは保護物質として 0.1%程度の BSA を含む）の密度勾配で充分である．無傷葉緑体の密度と大きさは均一でないため，連続密度勾配を使うと無傷葉緑体は幅の広いバンドを形成する．葉緑体がバンドを形成する Percoll 濃度を予め決めておけば，不連続（段階的）密度勾配で精製できる．

[実験方法 1 ：高倍らの方法[5]]

- 破砕溶液：0.33 M sorbitol, 2 mM Na_2-EDTA, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM NaCl, 2 mM isoascorbic acid, 50 mM MES-NaOH, pH 6.1.
- グラジエント・再懸濁（G-R）溶液：0.33 M sorbitol, 2 mM Na_2-EDTA, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM pyrophosphate, 5 mM isoascorbic acid, 5 mM gluthathione, 50 mM HEPES-NaOH, pH 6.8.
- Percoll 密度交配：11－90%（v/v）PPBF．他の組成は G-R 溶液と同じ．40 mL 遠心管（日立スイングロータ SW-27 用）に 35 mL の連続密度勾配を作製．

炭酸固定活性の保持を目的としないのであれば，破砕溶液と G-R 溶液の $MnCl_2$, EDTA, ピロリン酸，イソアスコルビン酸，グルタチオンは除いても構わない．

1．連結管を用いて Percoll 連続密度勾配を作製し，氷中あるいは冷蔵庫で 0－4 ℃に冷却する．
2．ホウレンソウ葉片 35 g を 120 mL の破砕溶液で破砕，濾過し，2,500× g で 70 秒間遠心する．
3．沈殿を破砕溶液 5 mL に懸濁し，Percoll 密度勾配に 2 mL ずつ重層する．
4．スイングロータを用い，7,000 rpm（8,820× g）で 15 分間遠心する．
5．形成される 2 本の緑色バンドのうち，上（低密度側）がチラコイド膜と壊れた葉緑体を含むバンド，下（高密度側）が無傷葉緑体のバンドである．注射器で無傷葉緑体のバンドを吸い取り 3 倍容の G-R 溶液で希釈する．
6．2,500× g, 70 秒の遠心で無傷葉緑体を沈殿させる．Percoll が残っているため，沈殿はゆるく，また遠心管の底を滑りやすい．駒込ピペットかアスピレーターで沈殿を吸い込まないように注意しながら上清を除く．
7．Percoll 密度勾配中の BSA 濃度が高いため，無傷葉緑体に大量の BSA が付着している．BSA を除くには，沈殿の再懸濁と遠心操作を 2-3 回繰り返す．

[実験方法 2 ：不連続（段階的）密度勾配を用いる方法[6]]

密度勾配の作製が容易な簡便法である．2 種類の Percoll 層の界面に無傷葉緑体が集積するため高濃度の葉緑体を回収できる．

- 葉緑体懸濁溶液（A 液）：0.33 M sorbitol, 30 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）
- Percoll 密度勾配：50%および 80% Percoll, 0.1% BSA, 0.33 M sorbitol, 30 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）．50 mL 遠心管に 80% Percoll を 10 mL 入れ，その上に 50% Percoll を 20 mL 重層する．

1．Nakatani & Barber の方法[4] で調製したホウレンソウ無傷葉緑体粗画分（2 回目の遠心沈殿）を 0.1% BSA を含む A 液に懸濁し，Percoll 密度勾配に重層する．
2．スイングロータを用い，8,500× g で 15 分間遠心する．ロータをゆっくり加速・減速させれば，アングルロータも使用できる．
3．チラコイド膜と壊れた葉緑体は Percoll 層上部にとどまり，無傷葉緑体は 50%と 80% Percoll の界面にシャープなバンドを形成する．パスツールピペットで無傷葉緑体バンドを回収し，A 液で 3-5 倍に希釈する．
4．2,500× g で 60 秒間遠心し，沈殿を A 液に懸濁する．
5．再遠心し，沈殿を A 液に再懸濁する．

[実験方法 3 ：一段階簡易精製法[6]]

粗葉緑体標品を Percoll 液に重層し，遠心により無傷葉緑体のみ Percoll 層を通過させ沈殿させる方法である．壊れた葉緑体は Percoll 層上部にとどまる．Nakatani & Barber の方法[4] で粗精製した無傷葉緑体を用

いれば，充分に純度の高い葉緑体が得られる．収率が高いので，少量の材料からの無傷葉緑体の精製に適用できる．また，様々な処理を施した葉緑体標品から無傷葉緑体のみを回収する際に用いられる（例えば，プロテアーゼであるサーモリシン（thermolysin）処理[7]；包膜表面に露出したタンパク質の同定や包膜表面に付着したタンパク質の除去に用いられる）．

・葉緑体懸濁溶液（A液）：0.33 M　sorbitol，30 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）
・Percoll 密度勾配：40% Percoll, 0.1% BSA, 0.33 M sorbitol，30 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）．

1．遠心管に 40% Percoll を入れ，その上に粗精製した無傷葉緑体画分（クロロフィル濃度 1-2 mg/mL）を重層する．
2．スイングローターで 3,000× g，5 分間遠心する．ローターをゆっくり加速・減速させればアングルローターも使用できる．
3．得られた無傷葉緑体の沈殿をA液に懸濁する．
4．2,500× g で 60 秒間遠心し，沈殿をA液に懸濁する．
5．再遠心し，沈殿をA液に懸濁する．

Percoll 層の厚さと遠心条件は，使用するローター，出発材料の量と精製度に応じて適宜調節する．スケールダウンも可能で，1.5 mL のディスポーザブルチューブの場合，40% Percoll 1 mL に粗精製葉緑体 0.4 mL を重層し，5,000× g で 2 分間遠心する（ホウレンソウ，タバコ）．無傷葉緑体の沈殿の量，無傷葉緑体と Percoll 層上部の壊れた葉緑体との分離を目で確認しながら，最適条件を決める．

2.a.4　葉緑体包膜の単離

葉緑体包膜の密度はミクロゾームやミトコンドリア外膜の密度とほぼ同じなので，精製した無傷葉緑体を出発材料として用いる．まず葉緑体を高張処理し包膜を剝離させる．葉緑体を 0.6 M ショ糖あるいは 0.8 M マンニトールを含む溶液に懸濁すると，透過性の差から内包膜のみが収縮して内包膜と外包膜の間隔が広がる．この状態で機械的な力を加えたり凍結融解を繰り返すと内包膜と外包膜は別々の小胞となる．剝離した包膜をショ糖密度勾配遠心分離法でチラコイド膜とストロマから分離する．引き続きをショ糖密度勾配遠心分離法で内包膜と外包膜に分離する．

[実験方法：包膜の単離法[8,9]]

チラコイド膜に比べて包膜は非常に少ない．ショ糖密度勾配上に試料を重層し遠心する沈降法（沈降速度法，沈降平衡法）では，包膜より重くかつ大量に存在するチラコイド膜が包膜を「追い越して」沈降する．このため，包膜バンドへのチラコイド膜の混入は避けられない．一方，高濃度のショ糖を加えた試料の上に密度勾配を重層し遠心すると（浮遊遠心法），密度勾配中を包膜が先行して浮上するため，チラコイド膜の混入の少ない包膜を得ることができる．

1．エンドウの無傷葉緑体を 0.6 M ショ糖を含む緩衝液 TE（10 mM Tricine，pH 7.5，2 mM EDTA）にクロロフィル濃度が 1-3 mg/mL になるように懸濁する．
2．懸濁液を 0 ℃で 10 分間静置したのち－20℃で凍結させる．
3．1.5 時間後室温に移し融解させる．エンドウではこの操作で約 70%の葉緑体が破壊される．ホウレンソウでは凍結融解を 2 回繰り返す．顕微鏡で葉緑体の破壊率を調べ，50-75%が破壊されるまで凍結融解を繰り返す．
4．破壊された葉緑体懸濁液にショ糖を加え最終的に 1.3 M とし，15 mL ずつ遠心管に分注する．これに 1.2 M ショ糖を含む TE を 9 mL，さらに 0.3 M ショ糖を含む TE を 6 mL 重層する．
5．スイングローターで 113,000× g，14 時間遠心する．包膜は密度勾配中を浮上し，0.3 M と 1.2 M ショ糖の界面に黄色の層を形成する．破壊されなかった葉緑体，チラコイド膜，ストロマ成分は 1.3 M ショ糖中にとどまる．無傷葉緑体 1 mg クロロフィルあたりタンパク質量で 40-70 μg の包膜が得られる．

[実験方法：内包膜と外包膜の分離精製法[8,9]]

上記の方法で調製した包膜標品を，ショ糖密度勾配中の沈降平衡遠心法で内包膜と外包膜に分離する．また以下に示すように，高張液中で破壊した葉緑体から分画遠心法で包膜を粗精製し，これから内包膜と外包膜を分離すると精製時間を短縮できる．

1．凍結融解法で破壊した葉緑体の懸濁液に 2 倍容の TE を加えショ糖密度を 0.2 M に下げ，これを 4,500× g で 15 分間遠心しチラコイド膜を沈殿させる．
2．上清を 40,000× g で 30 分間遠心し，得られた沈殿（粗包膜画分）を 0.2 M ショ糖を含む TE に懸濁する．

3．懸濁液を 0.6–1.2 M ショ糖連続密度勾配に重層し，スイングロータで 113,000× *g*，14 時間遠心する．密度勾配中にできる 2 本の黄色のバンドのうち，上が外包膜のバンド，下が内包膜のバンドである．

2.a.5　チラコイド膜の単離

チラコイド膜は組織破砕液から分画遠心法で単離する．純度の高いチラコイド膜が必要であれば，精製した無傷葉緑体標品から分画遠心法あるいはショ糖密度勾配遠心法でチラコイド膜を精製する．破砕溶液とチラコイド膜懸濁溶液の基本組成は，0.3–0.4 M ショ糖，50 mM pH 緩衝剤（HEPES または Tricine；pH 7.5–7.8），5 mM $MgCl_2$，10 mM NaCl である．5 mM Mg^{2+} はグラナの積み重なり構造の維持に，10 mM Cl^- は酸素発生活性の維持に必要である．

[実験方法：チラコイド膜の単離]

1．濾過した組織破砕液を 3,000× *g* で 8–10 分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．
2．沈殿を懸濁溶液に懸濁し，300× *g* で 30–60 秒間遠心する．
3．遠心上清を 3,000× *g* で 8–10 分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．
4．沈殿を懸濁溶液に懸濁し，300× *g* で 30–60 秒間遠心する．

遠心条件は，使用するロータ，出発材料の量，必要とするチラコイド膜の純度に応じて適宜調節する．大きいロータを使ってチラコイド膜を大量に調製するときは，ロータの減速が遅いため，ステップ 2 と 4 の「下切り」遠心条件を緩くする（設定回転数に達したら遠心停止スイッチを押す）．なお，チラコイド膜の沈殿の上に形成される濃緑色のスラリーと「下切り」遠心のどろっとした濃緑色の沈殿は，核 DNA によって形成される様々な膜を含むアグリゲートである．

[実験方法：無傷葉緑体からのチラコイド膜の単離]

低張処理あるいは凍結融解処理で葉緑体を破壊する．破壊した葉緑体懸濁液を 3,000–10,000× *g* で 10 分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．遠心上清はストロマ画分として回収する．ストロマ画分を 10,000× *g* で 10 分間遠心すればチラコイド膜の破片を，100,000× *g* で 1 時間遠心すれば包膜を沈殿として除去できる．

1．無傷葉緑体の沈殿を 5 mM $MgCl_2$，50 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）に懸濁し，氷上で 10 分間静置する．
2．10,000× *g* で 10 分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．
3．沈殿を 0.4 M ショ糖，5 mM $MgCl_2$，10 mM NaCl，50 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）に懸濁し，再遠心する．
4．懸濁，遠心を 1–2 回繰り返しチラコイド膜を洗浄する．

2.a.6　チラコイド膜の分画：光化学系 II 膜の単離

様々な方法でチラコイド膜からグラナチラコイドとストロマチラコイドを単離するすることができる[10]．ストロマチラコイドは Yeda プレス処理，超音波処理でグラナから切り離され小胞となる．また低濃度の界面活性剤処理で小胞または膜断片となる．チラコイド膜にこれらの処理を施し遠心分離すれば，純度の高いストロマチラコイドが単離できる．一方グラナは機械的処理に強く，プレス処理を施すとグラナのマージン（margin；膜の接着部分の周縁）で膜が分断されるが，グラナの積み重なり構造はほとんど破壊されない．このグラナの膜の接着を剝がすと margin の切断部位で膜が閉じて，膜の表裏が逆転した裏返り膜（inside out 膜）となる．裏返り膜は水性二層分配法で精製できる．また，チラコイド膜を高濃度の界面活性剤 Triton X-100 で処理し分画遠心すると，グラナチラコイドを単離できる．この標品は光化学系 II に富むことから，慣用的に光化学系 II 膜と呼ばれている．

2 種類の光化学系 II 膜単離法がほぼ同時期に開発された．相違点は Triton 処理の際共存させる陽イオンが 2 価（Mg^{2+}）[11] か 1 価（$Na^+ + K^+$）[12] かという点のみである．開発者の名前から，単離した標品はそれぞれ BBY 粒子，K&M（桑原・村田）粒子と呼ばれた．光化学系 II 複合体の単離を目指して開発された方法だったため「粒子」という名称が付けられたが，その後グラナ部分に相当する膜標品であることがわかり（文献 10）参照），光化学系 II 膜という名称に改められている．使用する陽イオンの種類によらず，得られる光化学系 II 膜の性質と組成はほぼ同じである．2 価イオンを用いるとグラナ構造の膜の接着が強まるため光化学系 II 膜の収率が高くなるが，光化学系 I が存在する margin 部分が混入しやすく，また膜どうしも凝集しやすい．一方，1 価カチオンを用いるとグラナの接着が弱く光化学系 I の混入も少ないが，光化学系 II 膜の収率が若干低い．筆者は，材料が大量に入手できるホウレンソウでは K&M 法を，コムギと

イネではBBY法を使っている．

[実験方法：桑原・村田の方法[12)]]

・破砕溶液：50 mM Na/K phosphate buffer (pH 7.4)，200 mM NaCl，0.1 M sucrose．
・チラコイド膜懸濁溶液（A液）：50 mM Na/K phosphate buffer(pH 6.9)，50 mM NaCl，0.3 M sucrose．
・20%（w/v）Triton X-100．
・光化学系II膜洗浄液（B液）：40 mM Na/K phosphate buffer（pH 6.9）．
・光化学系II膜懸濁液（C液）：25 mM MES-NaOH（pH 6.5），10 mM NaCl，0.3 M sucrose．

1．ホウレンソウ葉を破砕溶液で破砕，濾過し，3,000× g で10分間遠心する．
2．沈殿を破砕溶液に懸濁し遠心する．500× g に達したら遠心を停止する．
3．遠心上清を3,000× g で10分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．
4．沈殿をA液に懸濁し遠心する．500× g に達したら遠心を停止する．
5．上清（チラコイド膜）を回収し，クロロフィル濃度を決定する．
6．A液で希釈してチラコイド膜懸濁液のクロロフィル濃度を2 mg/mLとする．
7．チラコイド膜懸濁液をビーカーに入れスターラーでゆっくり撹拌しながら，Tritonとクロロフィルの比が25：1（w/w）になるように20%（w/v）Triton溶液を滴下する．Triton溶液を滴下し終えたら約1分間撹拌を続ける．この処理は4 ℃以下の低温室内あるいはビーカーを氷に入れて行う．
8．1,000× g で2分間遠心し，上清を回収する．
9．上清を35,000× g で10分間遠心し，沈殿をB液に懸濁する．沈殿はねばねばしていて懸濁しにくい．B液を少しずつ加えながら沈殿が完全に分散されるまで懸濁する（塊がほぼ無くなってから筆で100回懸濁液をかき混ぜると完全に分散できる）．
10．1,000× g で2分間遠心し，上清を回収する．
11．上清を35,000× g で10分間遠心し，沈殿をC液に懸濁する．ステップ9同様，沈殿が完全に分散されるまで懸濁する．
12．遠心とC液への懸濁を3回繰り返す．

光化学系II膜の回収率は，チラコイド膜のクロロフィル量の20-40%である．回収率が低いときはTritonとクロロフィルの比を20：1（w/w）に下げる．原報ではステップ11の沈殿が光化学系II膜標品とされているが，この沈殿には高濃度のTritonが残っている．遠心と懸濁を最低3回繰り返して（ステップ12）Tritonを除去する．Tritonを除去した光化学系II膜は安定で，クロロフィル濃度2-4 mg/mL，0 ℃で遮光保存すれば少なくとも1日間酸素発生活性はまったく低下しない．

参考文献

1）加藤栄，宮地重遠，村田吉男，「光合成研究法」，共立出版，1981．
2）R. G. Jensen & J. A. Bassham, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **56** (1966) 1095.
3）W. Cockburn, D. A. Walker, & C. W. Baldry, *Plant Physiol.* **43** (1968) 1415.
4）H. Y. Nakatani & J. Barber, *Biochim. Biophys. Acta* **461** (1977) 510.
5）T. Takabe, M. Nishimura, & T. Akazawa, *Agric. Biol. Chem.* **43** (1979) 2137.
6）N. Mizusawa, N. Yamamoto, & M. Miyao, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **48** (1999) 97.
7）K. Cline, M. Werner-Washburne, J. Andrews, & K. Keegstra, *Plant Physiol.* **75** (1984) 675.
8）K. Keegstra & A. E. Yousif, *Methods Emzymol.* **118** (1986) 316.
9）K. Cline, J. Andrews, B. Marsey, E. H. Newcomb, & K. Keegstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78** (1981) 3595.
10）宮尾光恵，蛋白質 核酸 酵素 別冊30号 (1987) 157.
11）D. A. Berthold, G. T. Babcock, & C. F. Yocum, *FEBS Lett.* **134** (1981) 231.
12）T. Kuwabara & N. Murata, *Plant Cell Physiol.* **23** (1982) 533.