



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	プラストシアニン
Author(s)	日比野, 隆; 田中, 義人; 高倍, 昭洋
Description	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 d
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, 227-232
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39150
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-035.pdf



3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量

d. プラストシアニン

日比野 隆¹⁾, 田中 義人¹⁾, 高倍 昭洋²⁾

プラストシアニンは光合成電子伝達反応において、シトクロム *f* から電子を受容し、光化学系 I へと電子を供与する銅タンパク質である。本章では、植物およびラン藻のプラストシアニンの抽出・精製法、定量および活性測定法について紹介する。

Purification and Analysis of Plastocyanin in Photosynthetic Organisms

Takashi Hibino, Yoshito Tanaka, Teruhiro Takabe

Plastocyanin is a blue-copper protein, which accepts electron from cytochrome *f* and donates to photosystem I reaction center. In this chapter, we introduce protocols for purification of plastocyanin from photosynthetic organisms and methods for kinetic analysis of redox reaction. Structural and functional properties of plastocyanin have been described.

3.d.1 PC の分子的性質

プラストシアニン（以下 PC と略す）は、分子量約 10 kDa の銅タンパク質である。植物では葉緑体に存在しており、酸化型 PC は鮮やかな青色を呈する。葉緑体中の存在量はクロロフィルの 1/200~1/300 で、光合成単位あたり 1 分子の割合に相当する¹⁾。PC は、種子植物からラン藻にいたるまで多くの光合成生物種で存在が報告されている。植物の PC は等電点 (pI) が酸性だが、一部のラン藻の PC には pI が中性や塩基性のものがあり、イオン交換カラムを用いて精製を行う場合には注意が必要である。いくつかの生物種について報告されている pI の値を表 1 に示す。

PC の X 線結晶構造解析によって、PC の表面には 2 つの重要な部位が存在することが明らかにされている（図 1）。一つの部位は電子移動反応に関与する疎水的な部分（サイト 1）であり、もう一つは反応相手であるシトクロム *f* や光化学系 I と静電的に相互作用して複合体を形成する部分（サイト 2）である²⁾。サイト 1 は、疎水性アミノ酸の中にヒスチジンが存在する。サイト 2 は、多くの PC で保存されているチロシンの周りをいくつかの電荷をもつアミノ酸が取り囲む構造をとっている。サイト 2 は生物種によって多様であり、植物ではアスパラギン酸やグルタミン酸残基からなる二ヶ所のパッチから構成されているが、ラン藻では負電荷の数が少なく、一方

のパッチではむしろ正電荷が多く分布する。このため、植物では pI が酸性なのに対して一部のラン藻では中性や塩基性になる³⁾。

3.d.2 PC の電子伝達反応⁸⁾

植物の PC は疎水結合と静電的結合の両方でシトクロム *f* と一時的に複合体を形成し、電子伝達反応が起こる。溶液の反応系では、反応の $t_{1/2}$ は 200 マイクロ秒程度である⁹⁾。PC による光化学系 I 反応中心の還元反応は、衝突によるもの（タイプ I）、複合体の形成を経るもの（タイプ II）、複合体形成の際に相互作用表面の構造変化を伴うもの（タイプ III）に分けられる¹⁰⁾。タイプ I およびタイプ II はラン藻の PC にみられ、タイプ III は主に植物にみられる。タイプ III の反応は二相性を示し、最初の速い反応は数マイクロ秒で進行するが、遅い反応は、その 100 倍程度の時間で進行する。

表 1：様々な生物種の PC の等電点および酸化還元電位⁷⁾

	等電点	酸化還元電位 (mV)
種子植物		
ハウレンソウ	4.2	370
緑藻		
<i>Monoraphidium braunii</i>	3.7	350
ラン藻		
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	5.5	358
<i>Anabaena</i> sp. PCC7119	8.8	355

1) 名城大学大学院総合学術研究科

2) 名城大学総合研究所

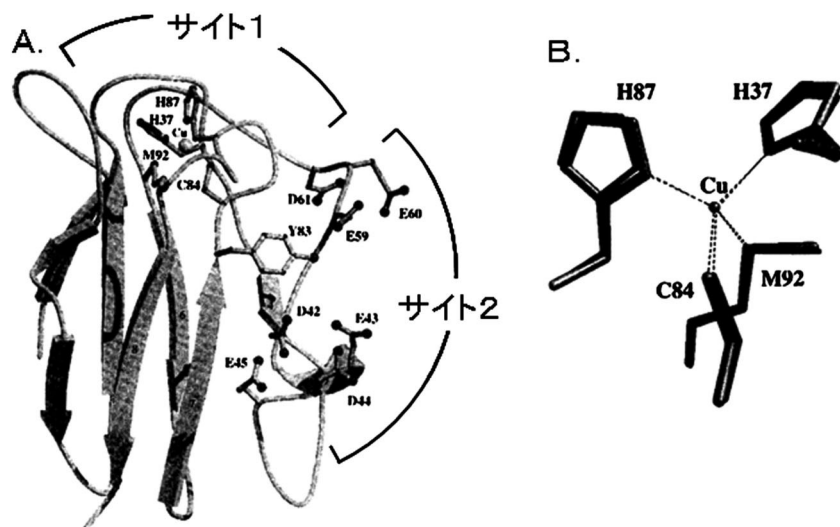


図1：X線構造解析から得られた高等植物（Silene）PCの立体構造²⁾

A. リボンモデル（Molscript³⁾ および Raster3D⁴⁾ によって作画した）。B. 銅原子と結合するアミノ酸残基の配置（MIDAS⁵⁾ により作画した）。

3.d.3 チラコイド内腔へのPCの輸送

植物のPC遺伝子は核ゲノムにコードされており、PCアポタンパク質は細胞質で合成されて葉緑体チラコイド内腔まで輸送される。PCアポタンパク質はN末端部分に65–70個程度のアミノ酸残基からなる通過ペプチド（transit peptide）を持っており、Toc、Tic輸送システムによって葉緑体包膜を通過した後、N末端部分が切断されて中間サイズのPCとなる。中間サイズとなったPCは、バクテリア内膜の輸送体と相同性のあるsecA、secYE輸送体によってチラコイド膜を通過後、2回目の切断をうけて成熟型PCとなると考えられている¹¹⁾。図2にPCの通過ペプチドのアミノ酸配列を示す。通過ペプチドのC末端側には疎水性アミノ酸のクラスターがみられる。この構造は大腸菌の外膜タンパク質の通過ペプチドとよく似ており、PCを大腸菌のペリプラズマに蓄積させて抽出・精製するのに利用できる¹²⁾。精製した成熟型PCアポタンパク質はin vitroで銅が組み込まれることが知られている¹³⁾。

3.d.4 植物からのPCの抽出法

PCは、硫安分画や種々のクロマトグラフィーなど、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法を組み合わせて精製できる。PCを含む画分は、1 mM程度のフェリシアン化カリウムを加えることにより青色を呈するので、濃度が高ければ目視で確認できる。PCの純度は、278 nmの吸収と酸化型PCの吸収極大である597 nmの吸光度

の比 (A_{278}/A_{597}) で見積もる。精製した高等植物のPCでは A_{278}/A_{597} は1.0に近い値になるが、藻類やラン藻ではそれより高いこともあり、2.0を超える例も報告されている。PCは比較的安定なタンパク質で抽出・精製の操作を室温で行っても収率はあまり低下しないが、精製が進んだ段階での操作は低温で行うことが望ましい。精製したPCは、40% (v/v) グリセロールを含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で-20°C以下で凍結保存すれば、数年間は安定である。

3.d.4.1 葉緑体からのPCの抽出¹⁴⁾

PCは葉緑体チラコイド内腔でラメラ膜に比較的弱く結合しており、種々の処理で容易に可溶化することができる。したがって、多量のPCを必要としない場合、葉緑体を調製してから抽出することにより、不純物の少ない粗抽出液から精製を始めることができる。

- (1) 根と葉を除いたホウレンソウの葉1 kg に対して冷やした緩衝液 (0.4 M ショ糖, 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.0) 2 L の割合で加え、ミキサーで破碎する。
- (2) 4 層のガーゼでろ過した後、ろ液を 3,000 xg で 15 分間遠心し、得られた沈殿を葉緑体画分とする。
- (3) 葉緑体画分を 1 L の冷やした脱イオン水に懸濁した後、9 L のアセトン (-20°C) を少量ずつよく攪拌しながら加える。
- (4) しばらく静置してから容器を傾けて上清を捨てた後、3,000 xg で 5 分間遠心して得られた沈殿を風乾する。
- (5) 乾いた沈殿を 1 L の 10 mM リン酸緩衝液

Silene: MATVTS SAAVAIPFA GLKASSTTRA ATVKVAVATP RMSIKASLKD
 Synecho: MSKKFLTLA

Silene: VGVVVAATAA AGILAGNAMA AEVLLGSSDG GLAFVPSDLS IASGEKITFK

Synecho: GLLLVVSSEF LSVSPAAAAAN ATVKMGSDSG ALVFEPSTVT IKAGEEVKMW

Silene: NNAGFPHNVV FDEDEVPAAGV DVTKISMPEE DLANAPGEEY SVTLTEKGT

Synecho: NNKLSPHNIV FAADGVDAD- TAAKLSHK-- GLAFAAGESF TSTFTEPGTY

Silene: KEYCAPHAGA GMVGKVTVN

Synecho: TYYCEPHRGA GMVGKVVVE

Silene: 高等植物 *Silene pratensis*

Synecho: ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803

図2: PCの通過ペプチド (transit peptide) のアミノ酸配列

Silene pratensis (GenBank Accession No. X02965), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GenBank Accession No. X54105) の翻訳産物のアミノ酸配列を元に作成した。矢印の部分でプロセッシングが起こる。疎水性ドメインと考えられる部分を下線で示した。

(pH 7.0) に懸濁し 1 時間放置する。3,000×g で 10 分間遠心して得られる上清を粗抽出液とする。

3.d.4.2 ホウレンソウの葉からの PC の抽出¹⁵⁾

- (1) ホウレンソウの葉 6 kg に 18 L のアセトン (−30°C) を加え、ワーリングブレンダーで破碎した後、15 分間静置する。
- (2) 破碎物を 5,000×g で 10 分間遠心し、沈殿を室温で乾燥させ、アセトンパウダを得る。
- (3) 得られたアセトンパウダを 12 L の蒸留水に懸濁した後、5,000×g で 10 分間遠心し、不溶物を除去する。得られた上清を粗抽出液とする。

3.d.4.3 PC の精製¹⁵⁾

- (1) PC 粗抽出液を 55%–90% 飽和濃度で硫酸分画する。
- (2) 得られた沈殿をできるだけ少量の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、同じリン酸緩衝液で 24 時間透析する。
- (3) 透析した PC 溶液に少量のフェリシアン化カリウムを溶かして PC を完全に酸化させ、10 mM リン酸緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel カラム (4.5×20 cm) に吸着させた後、カラムに結合しない画分が溶出されるまで 10 mM リン酸緩衝液で洗う。

(4) 10–200 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で濃度勾配をかけて PC を溶出する。

(5) $A_{278/597}$ を測定し、PC を多く含む画分を集め、10 mM リン酸緩衝液で透析する。

(6) DEAE-Sephacel カラムによる分画をもう一度行い、 $A_{278/597}$ が 1 に近い画分を集め、10 mM リン酸緩衝液で透析する。

(7) 十分な純度の PC が得られない場合は、10 mM リン酸緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 column (2.5×120 cm) を用いてさらに精製するとよい。

3.d.5 ラン藻からの PC の抽出・精製¹⁶⁾

藻類やラン藻のなかには PC をもたず、シトクロム *c* がシトクロム *f* と光化学系 I との間の電子伝達を行うものがある^{17,18)}。PC とシトクロム *c* の両方の遺伝子をもつラン藻の場合には、培地の Cu^{2+} 濃度が低下すると PC の蓄積量が低下するので、培地の Cu^{2+} 濃度を高くして (4 μM CuSO_4 程度) 培養すると PC の収量が増加することがある¹⁹⁾。

3.d.5.1 ラン藻からの PC の抽出

- (1) 定常期 ($A_{600}=1.6–1.8$) の培養液を 14,000×g

で遠心する(1 L の培養液から約 1-2 g の菌体を得られる)。得られた沈殿 250 g に対して 1 L の冷やした抽出緩衝液 (1 mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド), 1 mM ベンズアミジン, 1 mM ϵ -アミノカプロン酸, 20 mM リン酸緩衝液, pH 7.0) を加えて懸濁し, 暗所 4 °C で 1 時間よく攪拌する。

- (2) 懸濁液を Manton-Gaulin high pressure continuous system (7000 psi) あるいは French pressure cell (Aminco, Silver Spring, MD, 140 MPa) に 3 回通して細胞を破壊し, 3,000×g で 2 分間遠心して未破壊の菌体を除去する。
- (3) 得られた上清に終濃度 50 mM になるように固体の NaCl を溶かし, 1 分間超音波処理した後, 12,000×g で 20 分間遠心する。
- (4) 得られた上清をよく攪拌しながら, 1/10 容の 0.1 M 硫酸ストレプトマイシン水溶液 (pH 7.0) を加え, 1 時間穏やかに攪拌した後, 2 時間静置する。12,000×g で 20 分間遠心して不溶物を除去し, 得られた上清を粗抽出液とする。
- (5) 粗抽出液を 50%–98% 飽和濃度で硫酸分画する (pH を 7.0 付近に保つ)。
- (6) *Synechocystis* PC のように酸性タンパク質の場合は, 植物のときと同様に, DEAE-cellulose カラムを用いて精製する。また, *Nostoc* PC のように塩基性タンパク質の場合は carboxymethyl-cellulose カラムを用いて精製する。

3.d.6 大腸菌で発現させた PC の抽出・精製²⁰⁾

PC の遺伝子を pET3d などの発現ベクターに組み込み, 大腸菌で発現させる。PC 遺伝子のチラコイド通過ペプチドに対応する塩基配列を残したコンストラクトを作成し, 大腸菌のペリプラズマに PC を蓄積させる。

3.d.6.1 大腸菌のペリプラズマに蓄積させた高等植物 PC の抽出

- (1) 組み換え体の大腸菌は適当な抗生物質を含む LB 液体培地で 30 °C で培養し, $OD_{600}=0.6$ となったところで終濃度 0.5 mM となるように IPTG (isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside) を加え, 16 時間培養する。培養中, 4 時間おきに終濃度が 25 μ M になるように培地に $CuSO_4$ を加えると PC の収量が増加する。
- (2) 菌体を 8,000×g で 10 分間遠心して回収する。
- (3) 菌体を 20% sucrose, 2 mM EDTA を含む 20

mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し, 10 分間置いた後, 8,000×g で 10 分間遠心し, 菌体を回収する。

- (4) 菌体を低張液 (0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CuSO_4$ を含む 1 mM Tris-HCl, pH 7.5) に穏やかに懸濁し, ペリプラズマに蓄積している PC を細胞から遊離させる。8,000×g で 10 分間遠心し, 菌体残渣を除き, 得られた上清を粗抽出液とする。

3.d.6.2 PC の精製

- (1) 得られた上清を 60%–100% 飽和濃度で硫酸分画し, 沈殿を少量の 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) に溶かす。その溶液を Sephadex G-25 カラムに通して脱塩する。
- (2) 脱塩した溶液を 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-Sephacel カラム (5×10 cm) に吸着させた後, 0–0.5 M NaCl の濃度勾配で PC を溶出する。
- (3) PC を含む画分を濃縮し, 50 mM NaCl を含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.5×120 cm) にのせ, 同じ緩衝液で PC を溶出する。
- (4) PC を含む画分を集め, Tris 緩衝液で平衡化した TSK-gel DEAE-5PW カラムに吸着させ, 20–300 mM NaCl の濃度勾配をかけた 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) で PC を溶出する。 $A_{278}/_{597}$ が 1.2 に近い画分を集めて濃縮し, 凍結保存する。

3.d.7 定量法

3.d.7.1 分光測定法

酸化型 PC は青色を呈し, 597 nm に主吸収帯をもち (図 3), 還元型 PC は可視部に全く吸収を持たない。高等植物 PC に含まれる銅原子の 597 nm におけるモル吸光係数は $4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である²¹⁾。純化した PC 水溶液にフェリシアン化カリウムを加えて酸化型にしたとき, アスコルビン酸ナトリウムを加えて還元型にしたときの 597 nm の吸光度の差から PC の濃度を計算する。

3.d.7.2 電子伝達反応を利用した定量法

葉緑体から光化学系 I 複合体を調製し, 光照射によってアスコルビン酸から PC と光化学系 I を経て $NADP^+$ が還元される反応, または還元されたメチルビオローゲンが酸素を消費する反応を測定する²²⁾。既知量の精製した PC による反応と比較することにより, 試料中の PC 量を定量することができる。また, シトクロム *c* の光酸化反応が PC に依存することを利用して PC を定量する

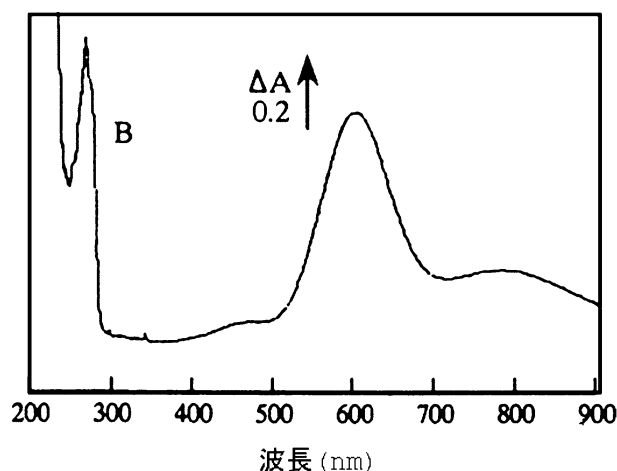


図3：高等植物 (Silene) の酸化型 PC の吸収スペクトル
597 nm に主吸収帯をもち、他に 770 nm と 460 nm に吸収を示す。

こともできる²³⁾。これらの方法は、不純物による影響が少ないので粗抽出液中の PC の定量に適している。

3.d.7.3 EPR 測定

酸化型 PC の、150 K における EPR スペクトルを図4に示す。g_{||} の4本に分かれたシグナルは葉緑体の EPR を測定しても得られるので²⁴⁾、このシグナルの大きさを既知量の精製した PC のものと比較することにより、葉緑体内の PC の量を知ることができる。g_{||} シグナルは、Cu(II)と、これに結合する Cys 残基との間の非局在化に由来すると考えられており²⁵⁾、銅原子周辺の構造を分析するのにも用いられる。

3.d.8 活性測定法

3.d.8.1 シトクロム *f* と PC との間の電子伝達反応の測定²⁶⁾

測定は、ストップフロー分光光度計を用いて行う。シトクロム *f* は使用直前にフェリシアン化カリウムで酸化させるか、あるいはジチオスレイトールで還元させた後、Sephadex G-25 (2×30 cm) を通して過剰な酸化剤および還元剤を除去する。0.3 μM シトクロム *f* 溶液 (0.19 M NaCl, 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.0) に対して8倍から100倍濃度の PC を用い、シトクロム *f* の422 nm の吸光度変化を室温 (20°C) でモニタする。反応速度はシトクロム *f* の偽一次反応として解析する。

3.d.8.2 PC と光化学系 I との間の電子伝達反応の測定²⁷⁾

光化学系 I 反応中心 P700 の光酸化とそれに続く暗所での PC による再還元を測定する。二波長分光光度計を用いて、750 nm をレファレンス光、697 nm を測定光と

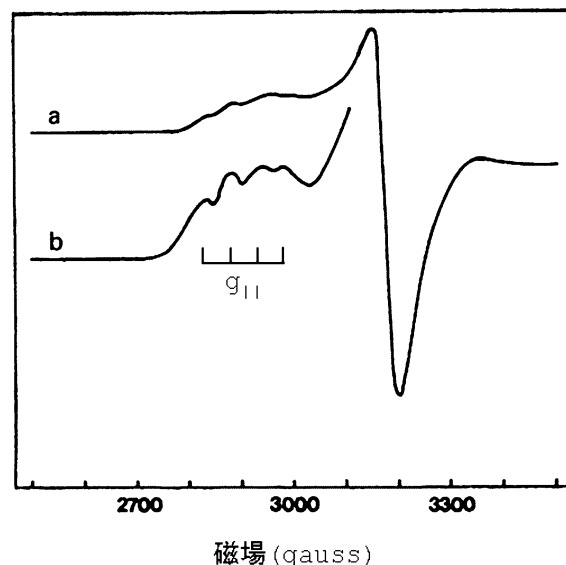


図4：高等植物 PC (Silene) の EPR スペクトル
a：スペクトル全体。b：g_{||} シグナルの近傍を縦軸のスケールを3倍にして示した。

し、吸光度変化をモニタする。タングステンランプなどの光源から550 nm 以上の光および赤外線をカットして反応光とし、フォトマルの手前で測定光以下の波長の光をカットする。0.25 μM P700 に相当する光化学系 I 複合体、3 μM PC の溶液 (2.5 mM アスコルビン酸を含む 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) を用い、P700 の還元反応を解析する。光化学系 I 複合体の調製によって持ち込まれる界面活性剤 (Triton X-100 など) の溶液中の濃度は0.001%以下となるようにする。光源として Nd:YAG レーザーからの532 nm の閃光を用い、ダイオードレーザーで830 nm の吸光度変化を測定する方法も報告されている²⁸⁾。

参考文献

- 1) S. Katoh, Photosynth. Res. **76** (2003) P.255.
- 2) H. Sugawara, T. Inoue, C.-M. Li, M. Gotowda, T. Hibino, T. Takabe, & Y. Kai, J. Biochem. **125** (1999) P. 899. (1999).
- 3) P. J. Kraulis, J. Appl. Crystallogr. **24** (1991) P.946.
- 4) E. A. Merritt & M. E. P. Murphy, Acta Crystallogr. **D50** (1994) P.869.
- 5) T. E. Ferrin, C. C. Huang, L. E. Jarvis, & R. Langridge, J. Mol. Graphics **6** (1988) P.13.
- 6) M. Hippler, F. Drepper, W. Haehnel, & J.-D. Rochaix, J. Biol. Chem. **275** (2000) P.17590.
- 7) M. A. De la Rosa, Photosynth. Res. **75** (2003) P.97.
- 8) M. Hervas, J. A. Navarro, & M. A. De la Rosa, Acc.

- Chem. Res. **36** (2003) P.798.
- 9) A. B. Hope, *Biochim. Biophys. Acta* **1456** (2000) P.5.
- 10) M. A. De la Rosa, J. A. Navarro, A. Diaz-Quintana, B. De la Cerda, F. P. Molina-Heredia, A. Balme, P. S. Murdoch, I. Diaz-Moreno, R. V. Duran, & M. Hervas, *Bioelectrochemistry* **55** (2002) P.41.
- 11) A. Di Cola, E. Klostermann, & C. Robinson, *Biochem. Soc. Trans.* **33** (2005) P.1024.
- 12) T. Hibino, B. H. Lee, & T. Takabe, *J. Biochem.* **116** (1994) P.826.
- 13) T. Hibino, A. Douwe de Boer, P. J. Weisbeek, & T. Takabe, *Biochim. Biophys. Acta* **1058** (1991) P.107.
- 14) 加藤栄, 「光合成研究法」, 共立出版, 1981, p.318.
- 15) T. Takabe, S. Niwa, & H. Ishikawa, *J. Biochem.* **87** (1980) P.111.
- 16) J. A. Navarro, M. Hervas, & M. A. De la Rosa, *Photosynthesis Research Protocols*, ed. R. Carpentier, Humana Press, 2004, p.75.
- 17) G. Sandmann, H. Reck, E. Kessler, & P. Boeger, *Arch. Microbiol.* **134** (1983) P.23.
- 18) G. Sandmann, *Arch. Microbiol.* **145** (1986) P.76.
- 19) M. Hervas, F. Navarro, J. A. Navarro, S. Chavez, A. Diaz, F. J. Florencio, & M. A. De la Rosa, *FEBS Lett.* **319** (1993) P.257.
- 20) B. H. Lee, T. Hibino, T. Takabe, P. J. Weisbeek, & T. Takabe, *J. Biochem.* **117** (1995) P.1209.
- 21) J. A. M. Ramshaw, R. H. Brown, M. D. Scawen, & D. Boulter, *Biochim. Biophys. Acta* **303** (1973) P.269.
- 22) G. A. Hauska, R. E. McCarty, R. J. Berzborn, & E. Racker, *J. Biol. Chem.* **246** (1971) P.3524.
- 23) M. Plesnicar & D. S. Bendall, *Biochim. Biophys. Acta* **216** (1970) P.192.
- 24) R. Malkin & A. J. Bearden, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **222** (1973) P.846.
- 25) E. I. Solomon & M. D. Lowery, *Science* **259** (1993) P.1575.
- 26) S. Niwa, H. Ishikawa, S. Nikai, & T. Takabe, *J. Biochem.* **88** (1980) P.1177.
- 27) T. Takabe, H. Ishikawa, S. Niwa, & S. Itoh, *J. Biochem.* **94** (1983) P.1901.
- 28) M. Nordling, K. Sigfridsson, S. Young, L. G. Lundberg, & O. Hansson, *FEBS Lett.* **291** (1991) P.327.