



Title	光化学系I反応中心の鉄-硫黄クラスター
Author(s)	大岡, 宏造; Oh-oka, Hirozo
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 f
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, 245-247
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/39152">https://hdl.handle.net/2115/39152</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-037.pdf



## 3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量

### f. 光化学系 I 反応中心の鉄-硫黄クラスター

大岡 宏造<sup>1)</sup>

鉄-硫黄クラスターとは鉄原子および酸不安定な硫黄原子から構成される酸化還元中心のことである。通常、タンパク質内のシステイン残基の側鎖である SH 基に鉄原子が配位する構造をもち、[2Fe-2S] 型、[3Fe-3S] 型、[4Fe-4S] 型が存在する。光合成反応系においてはさまざまな電子伝達体として機能している。ここでは光化学系 I 反応中心に存在する鉄-硫黄クラスターについて述べる。

### Iron-Sulfur Centers in Photosystem I.

Hirozo Oh-oka

Iron-sulfur clusters are redox centers which consist of iron and acid-labile sulfur atoms. They are held within proteins by chelating iron atoms with SH groups of cysteine residues, forming [2Fe-2S]-, [3Fe-3S]-, and [4Fe-4S]-type ones. In photosynthesis, iron-sulfur clusters function as various electron transfer components. Three electron acceptors, centers X and A/B, in the photosystem I are described here.

#### 3.f.1 センターXとセンターA/B<sup>1),2)</sup>

葉緑体チラコイド膜の光合成電子伝達系を構成する鉄-硫黄クラスターには、シトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体の Rieske センター、光化学系 I 反応中心のセンターXとセンターA/B、最終的に光化学系 I 反応中心から電子を受け取るフェレドキシンが存在する。Rieske センター、フェレドキシンは [2Fe-2S] 型、センターXとセンターA/Bは [4Fe-4S] 型のクラスターを持つ。

鉄-硫黄クラスターは可視部の 350-500 nm にあまり特徴のない、なだらかな吸収をもつので、個々のクラスター型を可視部の吸収極大波長のみから特定することは困難である。ヘムやフラビンなど、他のクロモホアに由来する吸収が重なると、標品中に存在するクラスターそのものを見落としてしまうことがあるので注意が必要である。クラスター型を同定するための分光学的手法として ESR (電子スピン共鳴 electron spin resonance) がある<sup>3)</sup>。Fe<sup>3+</sup> や Cu<sup>2+</sup> などの遷移金属イオンや有機ラジカルは、電子軌道に不対電子をもつ常磁性物質としての性質を示す。ESR では常磁性物質をある磁場の中に置くことにより、不対電子の共鳴現象に由来する信号を検出することが可能である。鉄-硫黄クラスターの ESR スペクトルは極低温下 (5-20 K) で観測するため、液体ヘリウムを用いて冷却するための低温装置が必要となる。詳しくは第4章を参照されたい。

光化学系 I 反応中心のセンターXはヘテロダイマーを構成する PsaA/PsaB コアタンパク質質間に配位し、酸化還元電位は約-700 mV で、ESR スペクトルの *g* 因子は 2.04, 1.88, 1.78 を示す。センターA/Bは分子量約 9000 の PsaC タンパク質に配位し、クラスターを配位するアミノ酸配列はバクテリア型 (2[4Fe-4S]型) フェレドキシンのクラスター配位に特徴的なモチーフ (Cys-X-X-Cys-X-X-Cys-X-X-Cys-Pro) と同一である。センターA (*g*=2.05, 1.94, 1.86) の酸化還元電位は-530 mV、センターB (*g*=2.07, 1.92, 1.89) は-580 mV であり、両クラスターが同時に還元されるとスピン間相互作用を示す。このスピン共役は 2[4Fe-4S]型フェレドキシンにおいて観測される現象であり、センターA/Bは同一タンパク質内に存在する、互いに近接したクラスターであることを意味している。

#### 3.f.2 PsaC (F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>) タンパク質の調製

PsaC タンパク質は光化学系 I 反応中心複合体のサブユニットであるが、一旦、複合体から解離すると水溶性タンパク質として存在する。複合体の立体構造からも明らかのように、PsaC タンパク質は膜表在性である。

##### 3.f.2.1 *n*-ブタノール処理による解離<sup>4)</sup>

Triton X-100 等で可溶化、調製してきた反応中心標品溶液に等量の氷冷した *n*-ブタノールを重層し、ヴォルテックスミキサーで激しく攪拌する。18000×*g*, 5分間の遠心後、薄い褐色を呈した下部の水層部分には PsaC

1) 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

タンパク質および PsaD, PsaE タンパク質が含まれる。これらのタンパク質は反応中心複合体に結合した表在性タンパク質であり、解離後は水溶性タンパク質として扱える。しかしながら解離した PsaC タンパク質は酸素に対しては極端に不安定になり、鉄-硫黄クラスターはすぐに破壊される。その後の分光学的解析には不向きであるが、再構成実験<sup>9)</sup>に用いるためのアポタンパク質調製法としては簡便である。

### 3.f.2.2 メタノール/アセトン処理による精製<sup>6)</sup>

#### [準備する溶液・緩衝液]

- 緩衝液A：25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl
- 緩衝液B：50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM dithiothreitol (DTT), 300 mM NaCl
- 緩衝液C：50 mM cyclohexyl-aminopropane sulfonic acid (CAPS) -NaOH (pH 9.8), 2 mM DTT, 300 mM NaCl
- 100% 飽和硫安緩衝液：50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DTT, 100% 飽和硫安
- 4M 臭化ナトリウム溶液：50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 M NaBr
- 1 M MgCl<sub>2</sub> 溶液

#### [手順]

ハウレンソウの葉(3 kg)から調製してきた葉緑体を低張液(緩衝液A)で処理した後、22000×g、15分間の遠心によりチラコイド膜を回収する。2 mg Chl/mlとなるようにチラコイド膜を緩衝液Aで懸濁する。等量の4 M 臭化ナトリウム溶液を加えて30分間ゆるやかに攪拌した後、さらに等量の純水を加えて臭化ナトリウムの最終濃度を1 Mにする(臭化ナトリウム処理はチラコイド膜表面にゆるく結合したタンパク質を除去するのに有効な方法である)。12000×g、10分間の遠心により膜画分を回収し、再度2 mg Chl/mlとなるように純水を加えて懸濁する。10秒間隔で2分間、超音波処理を行い、純水を加えて4倍に薄める。その後1 M MgCl<sub>2</sub>溶液を5 mMなるように加え、12000×g、10分間の遠心により膜画分を回収する(膜断片はMgCl<sub>2</sub>の添加により凝集し、通常の遠心操作により沈殿物として回収することができる)。回収した膜画分は適量の純水に懸濁した後、凍結乾燥を行う。

凍結乾燥標品を-20°Cに冷却したメタノール/アセトン溶液(1:10, V/V; 0.1% β-メルカプトエタノールを含む)で処理し、窒素ガスを吹き付けることにより残渣を乾燥する。回収した残渣は乳鉢ですりつぶすことにより粉末状態にし、400 mlの緩衝液Bを加えて1時間ゆる

やかに攪拌する。22000×g、10分間の遠心により薄い黄褐色の上清を回収し、100% 飽和硫安緩衝液を最終的に20%となるように徐々に加えていく。20% 飽和硫安緩衝液(100%溶液に脱気・窒素ガス交換を行った水を加えて濃度を調整する)で平衡化しておいた Phenyl-Sepharose CL-4B カラム(2.2 x 10 cm)に吸着させ、3カラム容量の同溶液でカラムを洗浄する。緩衝液Bを用いて溶出した褐色画分を限外濾過(Amicon, YM-5)により濃縮し、緩衝液Cで平衡化しておいた Sephadex G-50 カラム(1.8 x 56 cm)にのせてゲル濾過を行うことにより最終精製標品を得る。メタノール/アセトン処理後の可溶性タンパク質の抽出、カラムクロマトグラフィー操作等はすべて嫌気グローブボックス(米国・Coy社製)内で行う。使用する溶液・緩衝液は脱気・窒素ガス交換を行ってから嫌気グローブボックス内に持ち込み、一昼夜放置後、残存酸素を完全に除くために還元剤である dithiothreitol (DTT)を加える。1 M DTT 溶液は、嫌気グローブボックス内に作り置きしておくことと便利である。また遠心は直接酸素に触れないようにキャップ付チューブを用いるとよい。その他、嫌気操作の詳細については本書別項を参照されたい。

### 3.f.3 鉄(Fe)の定量

一般にタンパク質に含まれる鉄-硫黄クラスターの型やその損傷程度を知りたい場合には、標品中の鉄あるいは硫黄含量から推定することが可能である。硫黄(S)定量にはメチレンブルー法<sup>7)</sup>があるが、クラスターの硫黄原子は酸不安定で定量性に欠ける。ここでは鉄(Fe)の定量法としてキレート試薬であるフェレン(ferene)を使用する方法について述べる<sup>8)</sup>。従来のo-フェナントロリン法については他の文献<sup>9)</sup>を参照されたい。

まず3種類の希釈系列の反応中心標品を準備する。各標品の溶液300 μlに、試薬A(4.5%ドデシル硫酸ナトリウム、1.5%飽和酢酸ナトリウム)と試薬B(273 mMアスコルビン酸、8.45 mM二亜硫酸ナトリウム、6.6%飽和酢酸ナトリウム)をそれぞれ300 μl加えて混合し、37°Cで15分間、静置する。最後に試薬C(36 mMフェレン)または純水を15 μl加えて593 nmの吸光度を測定し、両者の吸光度差から標品中のFe濃度を見積もる。この際、あらかじめ標準試料(Fe(NH<sub>4</sub>)(SO<sub>4</sub>)·6H<sub>2</sub>O)液を用いて検量線を作製しておく。反応中心あたりのFe原子の数は、標品のアンテナサイズ(スペシャルペアあたりのクロロフィル色素数)から算出することができる。

## 参考文献

- 1) J. H. Golbeck, *Biochim. Biophys. Acta* **895** (1987) P. 167.
- 2) Bacon Ke, *Photosynthesis*, ed. Bacon Ke, Dordrecht, Kluwer, 2001, p.199.
- 3) 桜井弘, 「ESR スペクトルの実際」, 廣川書店, 1989.
- 4) H. Oh-oka, Y. Takahashi, H. Matsubara & S. Itoh, *FEBS Lett.* **234** (1988) P.291.
- 5) K. G. Parrett, T. Mehari, P. G. Warren, & J. H. Golbeck, *Biochim. Biophys. Acta* **973** (1989) P.324.
- 6) H. Oh-oka, S. Itoh, K. Saeki, Y. Takahashi & H. Matsubara *Plan Cell Physiol.* **32** (1991) P.11.
- 7) P. E. Brumby, R. W. Miller & V. Massey, *J. Biol. Chem.* **240** (1965) P.2222.
- 8) M. Heinnickel, R. Agalarov, N. Svensen, C. Krebs & J. H. Golbeck, *Biochemistry* **45** (2006) P.6756.
- 9) R. W. Miller & V. Massey, *J. Biol. Chem.* **240** (1965) P. 1453.