HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	系II複合体の精製法
Author(s)	沈, 建仁; 榎並, 勲
Description	3章 単離・精製・活性測定 4. タンパク質複合体の単離 b
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, 275-283
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39156
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-041.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

4．タンパク質複合体の単離
b．系II複合体の精製法

沈　　建仁[1)]，榎並　　勲[2)]

チラコイド膜から各種界面活性剤を用いて，タンパク組成や酸素発生活性の異なる光化学系II複合体（以下系IIとする）を単離精製することができる．以下，これまでに精製されたいろいろな植物種からの系IIの単離方法を紹介する．

Isolation of photosystem II

Jian-Ren Shen, Isao Enami

Photosystem II complexes with a variety of protein composition and oxygen-evolving activities can be isolated from various organisms by detergent solubilization of thylakoid membranes. In this chapter, procedures for isolation of various PSII from different organisms were described.

4.b.1　系II標品の種類と生物種間での違い

系IIの反応中心複合体はシアノバクテリアから高等植物まで保存されているが，酸素発生反応に関与する表在性タンパク質や集光性アンテナ複合体の組成は生物種により異なる．これまでに，高等植物[1)]，緑藻[2)]，ユーグレナ[3)]，珪藻[4)]，紅藻[5)]，シアノバクテリア[6)]から系II標品が精製されている（図1）．生物種の違いによって，系IIの精製方法も異なる．それは，異なる生物種において，系IIの存在環境や集光性アンテナタンパク質が異なるからである．たとえば，高等植物ではチラコイド膜がスタッキングしてグラナチラコイドを形成し，系IIは主にこのグラナに，系Iはストロマチラコイドに存在するのに対して，シアノバクテリアではチラコイド膜がスタッキングしておらず，系IIと系Iの存在場所ははっきり分離していない．また，高等植物では膜貫通型の集光性アンテナタンパク質（LHCII）が系IIの周りを囲んでいるが，シアノバクテリアではLHCIIの代わりに，水溶性で膜の表面に結合しているフィコビリゾームが系IIのアンテナとして働いている．さらに酸素発生反応に関与している表在性タンパク質として，図1に示すように，高等植物ではPsbO（33 kDa），PsbP（23 kDa），PsbQ（17 kDa）が働いているが，シアノバクテリアでは主にPsbO，PsbU（12 kDa），PsbV（チトクロム *c*-550）が機能している[1,6)]．紅藻では，シアノバクテリア型の3種の表在性タンパク質に加えてPsbQ'（20 kDa）が結合し[5)]，珪藻では，さらにPsb31（23.5 kDa）を加えた5種の表在性タンパク質の存在が知られている[4)]．また，高等植物と緑藻やユーグレナの表在性タンパク質の種類は同じでも，結合様式は異なることが報告されている[2,3)]．このような違いから，異なる生物については異なる系IIの精製方法が必要になる．以下，これまでに精製された各種系IIの精製法について述べる．

1）岡山大学大学院自然科学研究科
2）東京理科大学理学部

4.b.2　高等植物の系IIの精製

4.b.2.1　系II膜断片

高等植物では，系IIがグラナチラコイドに集中して存在し，系Iがストロマチラコイドに存在するので，この性質を利用し，チラコイド膜をTriton X-100で可溶化し，遠心によって系Iを除去することで系II膜断片を分取する．最もよく使われる方法はBertholdら[1)]が発表したもので，BBY粒子あるいはBBY標品と呼ばれる．精製の手順は本章の2 aに述べられているので省略するが，得られたBBY標品にはLHCIIが結合しており，反応中心あたり約250 chlが結合し，chl *a*/*b* 比は2.0程度である．chl *a*/*b* 比がこれより大きい場合は系Iの混入が考えられるので，Triton X-100可溶化の条件を再検討する必要がある．系IIの各種機能研究には，500 μmole O_2/mg chl/hr以上の酸素発生活性を持つBBY標品が望ましい．これよりも活性が低い場合は，Triton X-100の濃度を低くする，処理の時間を短くする，あるいは新鮮な材料（ホウレンソウなど）を使うなどの工夫が必要である．

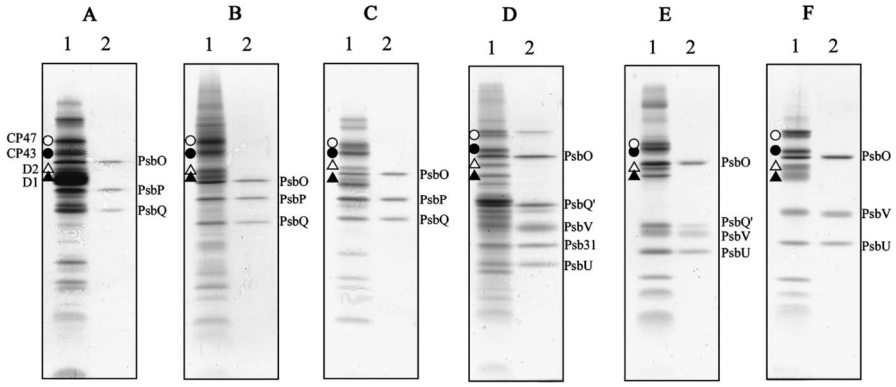

図1：各種生物から単離された系II標品（レーン1）とその表在性タンパク質（レーン2）．表在性タンパク質は系II標品を1.0 M Tris（pH 8.0）で処理し遊離させたもの．A．ホウレンソウ；B．緑藻クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）；C．ユーグレナ（*Euglena gracilis*）；D．珪藻（*Chaetoceros gracilis*）；E．紅藻（*Cyanidium caldarium*）；F．シアノバクテリア（*Thermosynechococcus vulcanus*）．（文献19より改変）．

4.b.2.2　系IIコア標品

BBY標品をヘプチルチオグルコシド（HTG, *n*-heptyl-β-thioglucoside）によって可溶化し，LHCIIの一部を除去して，3つの表在性タンパク質（PsbO，PsbP，PsbQ）を保持した系II標品を精製することができる[7]．酸素発生能を保持し，表在性のPsbOのみを保持した系IIコア標品は，オクチルグルコシド（OG, *n*-octyl-β-D-glucoside）[8]，オクチルチオグルコシド（OTG, *n*-octyl-β-D-thioglucoside）[9]，あるいはドデシルマルトシド（DDM, *n*-dodecyl-β-D-maltoside）[10]を用いてBBY標品を可溶化し，ショ糖密度勾配遠心法により精製する．以下HTG-系II標品と，DDMを用いた系IIコア標品の精製について紹介する．

ホウレンソウのHTG-系II標品の精製[7]

［実験方法］

1．ホウレンソウのBBY標品を4 ℃，35,000 x *g*，20 min遠心し，Buffer A（1 M sucrose，30 mM Mes（pH 6.5），10 mM NaCl，40 mM $MgCl_2$）に濃く懸濁する．
2．Buffer Aに溶かしておいた10%（w/v）HTGストック溶液を，最終濃度が2.1-2.3% HTG，2 mg chl/mlになるよう添加し，0 ℃，暗所，ゆっくり攪拌しながら10分間処理する（処理中のHTG濃度はmajor LHCIIが除去されるが，表在性のPsbP，PsbQは除去されず，酸素発生活性を十分保つよう予め少量のサンプルを用いてテストして決める）．
3．2倍量のBuffer B（0.5 M sucrose，30 mM Mes（pH 6.5），10 mM NaCl）を添加し，0 ℃，暗所，5分間インキュベートする．
4．4 ℃，35,000 x*g*，10 min遠心する．LHCIIは沈殿するので廃棄し，上清を回収する．
5．回収した上清に，最終濃度15%（w/v）になるよう50%（w/v）のPEG 1,450ストック溶液を添加し，十分攪拌した後，4 ℃，35,000 x*g*，20 min遠心する．
6．沈殿はHTG-系II標品になるので，0.4 M sucrose，30 mM Mes（pH 6.5），3 mM $CaCl_2$，10 mM NaClに濃く懸濁し，分析に用いるか液体窒素に保存する．

このように得られたHTG-系II標品にはmajor LHCIIはなくなるが，CP29などのマイナーLCHIIは残っており，chl *a*/*b*比が7-10，アンテナサイズは70-100 chl程度で，酸素発生活性は800-1,000 μmole O_2/mg chl/hrになる．chl *a*/*b*比が低かったり活性が低い場合は処理時のHTG濃度を再検討する．

ホウレンソウの系IIコア標品の精製[10]

［実験方法］

1．BBY標品を遠心し，Buffer A（30 mM Mes（pH 6.5），10 mM NaCl，3 mM $CaCl_2$）に懸濁し，1 mg chl/mlで，0.8% DDM，0 ℃，暗所，ゆっくり攪拌しながら30分間処理する．
2．処理したBBY標品を，0.03% DDMを含むBuffer Aで作成した0.3 M-0.7 M sucroseの密度勾配にのせ，4 ℃，160,000 x*g*，16 hr遠心する．
3．遠心の結果，図2のようにLHCII monomer，LHCII trimer，PSII monomer，PSII dimerの各バンドが分離するので，PSII monomer，PSII dimerの画分を回収する．
4．回収された画分をそれぞれ2倍量のBuffer Aで希釈してから，PEG 1,450を終濃度13%になるよう添加し，4 ℃，100,000 x*g*，20 min遠心し，沈殿をBuffer Aに懸濁し，分析に用いるか液体窒素に保存

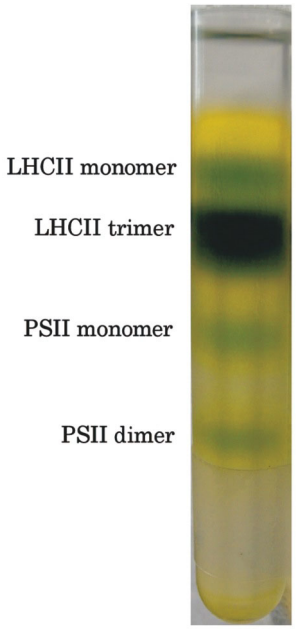

図2：ホウレンソウBBY標品をDDMで可溶化し，0.3–0.7 Mショ糖密度勾配にかけたときのパターン．

する．

このように得られた系IIコアにはLHCIIと表在性のPsbP，PsbQは結合していないが，PsbOは残っており，3–10 mM $CaCl_2$ の存在下で酸素発生活性が700–1,200 μmole O_2/mg chl/hrになり，chl a/b 比が10以上，アンテナサイズは35–50である．

4.b.2.3　系II反応中心複合体[11)]

酸素発生能を持たないが，光による初期電荷分離活性を持つ系II反応中心複合体は，D1，D2サブユニット，チトクロム b-559α, β サブユニット，PsbIによって構成され，BBY膜断片をTriton X-100によって可溶化し，DEAE 650Sを用いたイオン交換クロマトグラフィーで精製する．

[実験方法]

1．BBY膜断片を50 mM Tris-HCl(pH 7.2) バッファー中，1 mg chl/ml，4％(w/v) Triton X-100，0 ℃，1時間処理する．
2．処理液を4 ℃，100,000 xg，1 hr遠心し，上清をBuffer A（50 mM Tris-HCl（pH 7.2），0.05% Triton X-100，30 mM NaCl）で平衡化しておいたDEAE 650Sカラムにロードする．
3．Buffer Aで溶出液が無色になるまで洗浄する．これにより，すべてのLHCIIや表在性タンパク質，ほとんどのCP47，CP43が溶出される．
4．30–200 mM NaClの濃度勾配でカラムを溶出する．これにより，約95 mM NaClでの大きなピークと，約130 mM NaClでの小さいピークが溶出される．最初の大きなピークがD1，D2，チトクロム b-559α, β サブユニット，PsbIを含む反応中心であり，次の小さいピークはPsbOを含まないが，CP47，CP43を含むコア複合体である．なお，カラム操作は可能な限り4 ℃，暗所で行う．

このように得られた反応中心標品は，4–6分子のchl a と2分子のフェオフィチン a を持ち，光励起による初期電荷分離の活性を持つが，酸素発生活性はなく，Q_A，Q_B も結合していない．

4.b.3　緑藻の系IIの精製[2)]

緑藻のチラコイド膜は，集光性アンテナタンパク質としてLHCIIをもつが，高等植物のようなグラナ・スタッキングはなく，2～多数のチラコイド膜が密着して帯を形成した構造をとる．ここでは，緑藻クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）から酸素発生活性のある系IIを精製する方法について紹介する．しかし，クラミドモナスのチラコイド膜を高等植物で用いられたTriton X-100やもっと温和な界面活性剤により可溶化した後，カラムクロマトグラフィーまたはショ糖密度勾配遠心により精製しても活性のある系IIは調製できないことが多い．長時間を要する精製過程で表在性タンパク質が遊離するなどの影響により失活すると考えられる．そこで，系IIのサブユニットの1つにHis-tagをつけ，Ni–カラムによるアフィニテイークロマトグラフィーによる迅速な精製法について紹介する．

[実験方法]

チラコイド膜

1．遺伝子工学的手法により系IIのサブユニットの1つであるCP47のC末端に6つのHisをつけたクラミドモナスを培養し，遠心により細胞を回収した後，Buffer A（40 mM Mes（pH 6.5），0.4 M sucrose，5 mM $MgCl_2$，10 mM NaCl）に濃く懸濁し，−80℃で凍結保存する．
2．凍結した細胞を解凍し，冷やしておいたビーズビーダー（Bead-Beater, Bio-spec Co.）の容器に入れ，直径100 μmのガラスビーズと1：1の割合で混ぜる．
3．氷で冷やしながら，15 sec ON，2 min OFFのサイクルを4回繰り返し，細胞を破壊する．
4．破壊液を4 ℃，1,000 xg，5 min遠心してガラスビー

ズと未破壊の細胞を除き，その遠心上清を 4 ℃，35,000 x*g*，10 min 遠心し，沈殿したチラコイド膜を回収し，Buffer B (20 mM Mes (pH 6.5)，100 mM NaCl，12.5% glycerol)に懸濁する．同 buffer で 2 回遠心洗浄した後，同 buffer に懸濁し，−80℃で凍結保存する．

系II標品

1．チラコイド膜を 1.5 mg chl/ml，1.2%　シュークロースモノラウレイト（SML, sucrose monolaurate)で可溶化し，暗所，氷中，穏やかに攪拌しながら 10 分間処理する．
2．処理液を 4 ℃，35,000 x*g*，10 min 遠心し，上清を 0.03% SML，15 mM イミダゾールを含む Buffer B で平衡化しておいた Ni カラム（ProBond™ Resin column）にロードする．
3．カラムを同じ濃度の SML とイミダゾールを含む Buffer で十分洗浄した後，250 mM　イミダゾール，0.03%　SML を含む Buffer B で系 II を溶出する．なお，カラム操作は可能な限り 4 ℃，暗所で行う．
4．溶出した系 II に，10%になるよう PEG 6,000 を添加し，4 ℃，410,000 x*g*，30 min 遠心して沈殿させる．
5．得られた系 II を Buffer C (20 mM Mes (pH 6.5)，0.4 M sucrose，20 mM NaCl) に懸濁し，液体窒素に保存する．

このように精製した系 II は，PsbO，PsbP，PsbQ の全表在性タンパク質を結合し，$CaCl_2$ 存在下で ferricyanide を電子受容体に用いたとき 2,300-2,500 μmole O_2/mg chl/hr の酸素発生活性を示す．一方，電子受容体として DCBQ (2, 6-dichloro-*p*-benzoquinone) を用いた場合には，$CaCl_2$ 存在の有無には関係なく，710-820 μmole O_2/mg chl/hr の酸素発生活性を示す．なお，この系 II は Q_A から Q_B への電子伝達が阻害された標品である．表在性タンパク質の結合様式は高等植物のものとは異なり，PsbO のみならず PsbP と PsbQ も直接系 II 膜タンパク質と結合する．

4.b.4　ユーグレナの系IIの精製[3)]

ユーグレナは，原始緑藻の 2 次共生により誕生したと考えられており，3 層の葉緑体包膜をもつ．チラコイド膜は，LHCII をもつがグラナ・スタッキングはなく，葉緑体の長軸に沿って 2 〜 3 層が重なり合って存在する．ここでは，これまで生理学，生化学的研究によく用いられてきた *Euglena gracilis* から系 II を精製する方法について紹介する．ユーグレナからは，クラミドモナスのように遺伝子工学的な手法を用いないで，野生株から系 II を精製することができる．

[実験方法]

チラコイド膜

1．遠心により回収した細胞を，Buffer A (50 mM Mes (pH 6.0)，25%　glycerol，5 mM $CaCl_2$) に濃く懸濁する．
2．濃く懸濁した細胞を，冷やしておいたビーズビーダー（Bead-Beater, Bio-spec Co.）の容器に入れ，直径 100 μm のガラスビーズと 1：1 の割合で混ぜる．
3．氷で冷やしながら，15 sec ON，2 min OFF のサイクルを 5 回繰り返し，細胞を破壊する．
4．破壊液を 4 ℃, 1,000 xg, 3 min 遠心してガラスビーズと未破壊の細胞を除いた遠心上清を 4 ℃，10,000 x*g*，10 min 遠心し，沈殿したチラコイド膜を回収し，Buffer B (50 mM Mes (pH 6.5), 25% glycerol) に懸濁する．

LHCII を結合した系II標品

1．チラコイド膜を 1 mg chl/ml，2% DDM，0.5% デオキシコール酸（DOC）で可溶化し，暗所，4 ℃，穏やかに攪拌しながら 10 分間処理する．（系 II と系 I の分離には，0.5% DOC の存在が必要である．）
2．処理液を 4 ℃，8,000 x*g*，10 min 遠心した後，その上清を 4 ℃, 37,000 xg, 10 min 遠心する．この遠心により，上清に系 I が除かれ，沈殿に LHCII を結合した系 II が得られる．この沈殿を Buffer B (20 mM Mes (pH 6)，10 mM NaCl）に懸濁する．
3．この懸濁液を，70% sucrose を含む Buffer B の上にのせ，4 ℃，270,000 xg，30 min 遠心する．その上清に 2 倍量の Buffer B を加え，4 ℃, 100,000 xg，10 min 遠心し，その沈殿として LHCII を結合した系 II を得る．

LHCII を除いた系II標品

1．LHCII を結合した系 II を 2.6% HTG を含む Buffer C (40 mM Mes (pH 6.5)，1 M sucrose，400 mM NaCl，5 mM $CaCl_2$）に終濃度で 5 mg chl/ml になるように懸濁し，暗所，0 ℃，10 分間，可溶化処理した後，4 ℃，35,000 x g，15 min 遠心する．
2．その遠心上清に，2 倍量の Buffer D（40 mM Mes (pH 6.5)，0.5 M sucrose，400 mM NaCl，5 mM

$CaCl_2$）を加え，暗所，0 ℃，5 分間インキュベートした後，4 ℃，35,000 xg，15 min 遠心し，沈殿として会合した LHCII を除き，上清を回収する．

3．回収した上清を 10 倍量の Buffer E（40 mM Mes（pH 6.5），0.4 M sucrose）に対して透析する（1 時間後に透析外液を交換し，さらに 2 時間透析）．

4．透析後，4 ℃，35,000 xg，15 min 遠心し，回収した上清に 10% PEG 6000 を加え，35,000 xg，15 min 遠心した沈殿を Buffer F（20 mM Mes（pH 6.5），0.4 M sucrose，20 mM NaCl）に懸濁し，液体窒素に保存する．

こうして得られた LHCII を除いた系 II 標品には，まだ若干の LHCII が結合しており，ホウレンソウ HTG-系 II 標品に類似した標品である．PsbO，PsbP，PsbQ の全表在性タンパク質が結合し，phenyl-*p*-benzoquinone を電子受容体に用いたとき，約 700 μmole O_2/mg chl/hr の酸素発生活性を示す．活性に Ca や Cl イオンの要求性はみられず，酸化側，還元側ともに正常であると考えられる．ユーグレナ系 II の特徴は，PsbO のみを再結合した系 II で Ca イオンによる酸素発生活性の促進がみられない点である．なお，表在性タンパク質の結合様式は，高等植物型ではなく緑藻型である．

4.b.5 珪藻の系 II の精製[4)]

珪藻は，紅藻が二次共生して誕生した不等毛植物門に属する単細胞藻で，葉緑体包膜は 4 層からなる．細胞は珪酸質の被殻に包まれているのが特徴で，その殻の形態から中心目珪藻（殻にある胞紋（条線）が中央部から外に向かって放射配列するもの）と羽状目珪藻（殻の条線が中央部の軸に対して左右対称に配列するもの）に分類されている．3 重のチラコイドラメラからなり，集光性アンテナタンパク質として膜貫通型のフコキサンチン・クロロフィル *a*/*c* 結合タンパク質（FCP）が存在する．光合成色素として，クロロフィルの他にフコキサンチン，デイアデイノキサンチン，デイアトキサンチンが大量に含まれるため，細胞が黄色〜褐色に見える．珪藻は，熱帯雨林の光合成量に匹敵する炭素同化を行い，水域圏における生態系，炭素循環において最も重要な藻類であるにもかかわらず，これまで光合成の生化学的研究は皆無の状態であった．その大きな要因は，細胞が珪酸質の固い殻に覆われているため細胞破壊が難しいと考えられてきたことにある．しかし，最近，中心目珪藻については，凍結融解により活性を保持した状態で，容易に細胞破壊できることが見出された[4,12)]．そこで，ここでは，海産性の中心目珪藻 *Chaetoceros gracilis* から系 II を精製する方法について紹介する．

[実験方法]

チラコイド膜

1．培養した珪藻 *Chaetoceros gracilis* 細胞を PELLICON（MILLIPORE）を用いて回収した後，4 ℃，3,000 xg，3 min 遠心し，沈殿を少量の DNase I と 1 mM PMSF を加えた Buffer A（1 M betaine，50 mM Mes（pH 6.5），5 mM $MgCl_2$）に約 1.8 mg chl/ml になるように懸濁する．

2．その細胞懸濁液を含むサンプル管を液体窒素に入れ，凍結する．

3．10分後に液体窒素から取り出し，室温で 10 分以内に融解させる．

4．凍結融解したサンプルを，0 ℃，暗所で 30 分間インキュベートし，DNA を分解する．

5．4 ℃，3,000 xg，3 min 遠心した上清を，40,000 xg，10 min 遠心する．

6．その遠心沈殿を Buffer B（1 M betaine，50 mM Mes（pH 6.5），1 mM EDTA）に懸濁し，チラコイド膜とする．

こうして調製したチラコイド膜は，200-300 μmole O_2/mg chl/hr の酸素発生活性を示す．なお，珪藻には強力な金属プロテアーゼが存在するので，DNase 処理後の buffer には 1 mM EDTA を入れておいた方がよい．

系 II 標品

1．チラコイド膜を 1 mg chl/ml，1 % Triton X-100 で可溶化し，暗所，0 ℃，穏やかに攪拌しながら 5 分間処理する．

2．可溶化処理したチラコイド膜を 4 ℃，40,000 xg，10 min 遠心し，上清をさらに 50,000 xg，20 min 遠心する．

3．その遠心上清をさらに 4 ℃，146,000 xg，20 min 遠心する．

4．その遠心上清に 10% PEG 6000 を加え，4 ℃，40,000 xg，10 min 遠心し，沈殿（系 II）を Buffer B に懸濁し，液体窒素に保存する．

こうして精製された系 II は，大量の FCP が結合している粗系 II で，ホウレンソウの BBY 標品に相当する標品であり，500-900 μmole O_2/mg chl/hr の酸素発生活性を示す．なお，珪藻系 II には，紅藻タイプの PsbO，PsbQ'，PsbV，PsbU の 4 種の表在性タンパク質に加え，新規の Psb31 の表在性タンパク質が結合している[13)]．

4.b.6　紅藻の系IIの精製[5,14)]

紅藻は，光合成色素としてクロロフィルの他にフィコエリスリン，フィコシアニン，アロフィコシアニンのフィコビリン色素をもち，集光性アンテナタンパク質としてフィコビリゾームが存在する．約4,000種が知られているが，ほとんどは海産で淡水産は少数である．葉緑体は2枚の包膜に包まれ，一重チラコイド膜からなる．ここでは，酸性温泉産の単細胞紅藻シアニジウム（*Cyanidium caldarium*）から系IIを精製する方法について紹介する．シアニジウムはpH 1-3の強酸域に生育するにもかかわらず，その細胞内pHは強力なプロトンポンプの働きにより中性pHに保持されている[15)]．

［実験方法］

チラコイド膜

1．シアニジウム細胞を1 mM　benzamidine，1 mM PMSF，少量のDNase Iと5 mM $MgCl_2$を含むBuffer A（25% glycerol，40 mM Mes（pH 6.1），10 mM $CaCl_2$）に濃く懸濁する．
2．懸濁した細胞を，冷やしておいたビーズビーダー（Bead-Beater, Bio-spec Co.）の容器に入れ，直径100 μmのガラスビーズと1：1の割合で混ぜる．
3．氷で冷やしながら，10 sec ON，4 min OFFのサイクルを18回繰り返し，細胞を破壊する．
4．破壊液を4 ℃，1,000 xg，3 min遠心してガラスビーズと未破壊の細胞を除いた遠心上清を4 ℃，104,200 xg，30 min遠心し，沈殿の上層のゆるい部分をBuffer Aに懸濁し，チラコイド膜とする．

系II標品

1．チラコイド膜（1.2 mg chl/ml）に終濃度1.2% DDMを加え，0 ℃，暗所，40分間，穏やかにスターラーで攪拌しながら可溶化処理する．
2．可溶化したチラコイド膜を4 ℃，104,200 xg，30 min遠心し，上清をBuffer B（25% glycerol，40 mM Mes（pH 6.1），3 mM $CaCl_2$，0.03% DDM）で平衡化したDEAE TOYOPEARL 650Mの陰イオン交換カラムにかける．
3．カラムを0.09 M NaClを含むBuffer Bで，280 nmの吸収がほとんど無くなるまで充分洗浄する．
4．0.23 M NaClを含むBuffer Bで系IIを溶離する．なお，カラム操作は可能な限り4 ℃，暗所で行う．
5．系IIに2倍量のBuffer Aを加えてから，15% PEG 1,450を加える．
6．4 ℃，40,000 x g，20 min遠心して系IIを回収し，Buffer Aに懸濁する．

系II単量体と二量体

1．系II（1.5 mg chl/ml）に0.5% DDMと0.7% SMLを加え，0 ℃，暗所，20分間，可溶化処理を行う．
2．この可溶化した系IIを，Buffer Bで平衡化したDEAE TOYOPEARL 650Sにかけ，0.05-0.15 M NaCl勾配を用いて，系II core monomerとdimerを溶離する．
3．系II　core　monomerとdimerは2倍量のBuffer Aで希釈後，PEGを加えて遠心し，沈殿をBuffer Aに懸濁する．なお，カラム操作は可能な限り4 ℃，暗所で行う．

こうして精製したPSIIは，PsbO，PsbQ'，PsbV，PsbUの4種の表在性タンパク質を結合し，3,000-4,000 μmole O_2/mg chl/hrの高い酸素発生活性を示す．このPSII core dimerを用いて，結晶化にも成功している[14)]．

4.b.7　シアノバクテリアの系IIの精製[6,16,17)]

シアノバクテリアではチラコイド膜がスタッキングしておらず，高等植物のように系Iと系IIを簡単に分離し，系IIの膜断片標品を単離することはできない．そのため，主に酸素発生能を持った系IIコア標品として精製・使用される．中でも好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus, T. vulcanus* 由来の系IIコアは安定で扱いやすく，精製しやすい．一方，常温性の *Synechocystis* sp. PCC 6803は変異体の作製が簡単にでき，光合成能を失っても従属栄養成長ができるので，光合成の機能研究に多く使われている．以下 *T. vulcanus* と *Synechocystis* sp. PCC 6803由来系IIコアの単離・精製方法について述べる．

4.b.7.1　*T. vulcanus* の系IIコア標品の調製[6,16)]

T. vulcanus 細胞は52-55℃で培養し，30-50 L培養液を遠心で集めた後，チラコイド膜，粗系II，系IIコアの順に精製する．

［実験方法］

チラコイド膜

1．細胞を1 LのBuffer A（0.4 M mannitol，40 mM KH_2PO_4（pH 6.8））に懸濁し，EDTA（final 1 mM），lysozyme（1.2 mg/ml）を添加し，35℃で振とうしながら2時間処理する．
2．10,000 xg，5 min遠心し，沈殿を1 LのBuffer Aに

懸濁し，再度遠心する．

3．沈殿を少量の Buffer A に懸濁し，35℃に温めておいた 1 L の 20 mM Hepes-NaOH（pH 7.0）バッファーを一気に入れ，浸透圧ショックを与えることによって細胞を破砕する．

4．1 M $MgCl_2$ を終濃度 5 mM になるよう添加し，DNase I（1 mg/ml）を 200 μl 添加する．以降氷上に移して作業を行う．

5．4 ℃，15,000 x*g*，10 min 遠心し，沈殿を 1 L の Buffer B（30 mM Hepes-NaOH（pH 7.0），10 mM $MgCl_2$）に懸濁する．

6．4 ℃，1,000 x*g*，20 sec 遠心し，上清を回収し，4 ℃，15,000 x*g*，10 min 遠心する．

7．沈殿を 25% glycerol を含む Buffer B に懸濁し，チラコイド膜として－80℃に保存する．

粗系II標品（LDAO-PSII）

1．220 mg chl のチラコイド膜を 1 L の 30 mM Hepes-NaOH（pH 7.0），10 mM $MgCl_2$ に希釈し，遠心した後，沈殿を総量 110 g になるよう 5 % glycerol，30 mM Hepes-NaOH（pH 7.0），10 mM $MgCl_2$ のバッファーに懸濁する．

2．上記懸濁液の重さを計りながら 0.86 g lauryldimethylamine-N-oxide（LDAO, Fluka，～30%）を添加し，暗所，氷上，穏やかに攪拌しながら 5 分間処理する．

3．4 ℃，35,000 x*g*，1 hr 遠心し，沈殿を総量 140 g になるよう Buffer A（25% glycerol，30 mM Hepes-NaOH（pH 7.0），10 mM $MgCl_2$）に懸濁する．

4．1.45 g LDAO を添加し，暗所，氷上，穏やかに攪拌しながら 5 分間処理する．

5．4 ℃，100,000 x*g*，1 hr 遠心し，上清を回収し，Buffer A で 2 倍希釈してから再度 100,000 x*g*，1 hr 遠心する．

6．上清を回収し，PEG 1,450 を終濃度 15%になるよう添加し，4 ℃，100,000 x*g*，30 min 遠心する．

7．沈殿が粗系II標品（LDAO-PSII）であり，Buffer A に懸濁した後，－80℃に保存する．

以上の方法で調製した LDAO-系II標品は，チラコイドの chl 量を基とした収率が 10-20%，酸素発生活性が 1,000-2,000 μmole O_2/mg chl/hr になる．収率が 10% よりも著しく低い場合は，系IIが十分可溶化されなかったので，2 回目の LDAO 処理時の LDAO 濃度を 5-15% 程度上げてみる．逆に収率が著しく高い場合は 2 回目処理時の LDAO 濃度を下げる．

系IIコア標品

粗系II標品（LDAO-PSII）を DDM で可溶化し，陰イオン交換カラムを用いて系II単量体，二量体を分離し精製する．

1．LDAO-系 II を Buffer A（25% glycerol，30 mM Hepes-NaOH（pH 7.0），10 mM $MgCl_2$）中で，1 mg chl/ml，1 % DDM を添加し，暗所，氷中，穏やかに攪拌しながら 30 min 処理する．

2．30 mM Mes（pH 6.0），3 mM $CaCl_2$，0.03% DDM で平衡化しておいた Q Sepharose High Performance カラムにロードし，吸着させる．

3．吸光度が十分下がるまでカラムを 170 mM NaCl で洗浄する．これによって，ほとんどのフィコビリタンパク質と残存の系 I 三量体が溶出される．

4．170-300 mM NaCl の濃度勾配でカラムを溶出する．この時の溶出パターンを図 3 に示し，NaCl 濃度の低い方から系II単量体，系II二量体，系 I 単量体の順に溶出される．系II単量体の量は通常系II二量体の1/4～1/3 程度で，これよりも単量体が著しく多い時は，LDAO-PSII の調製において系II二量体の一部が単量体化した，あるいは細胞培養の段階で単量体が増えていたなどが考えられるので，LDAO の処理条件や細胞の培養条件を検討する必要がある．なお，カラム操作は可能な限り 4 ℃，暗所で行う．

5．系II単量体，系II二量体の画分を，2 倍量の Buffer B（30 mM Mes（pH 6.0），3 mM $CaCl_2$，10 mM

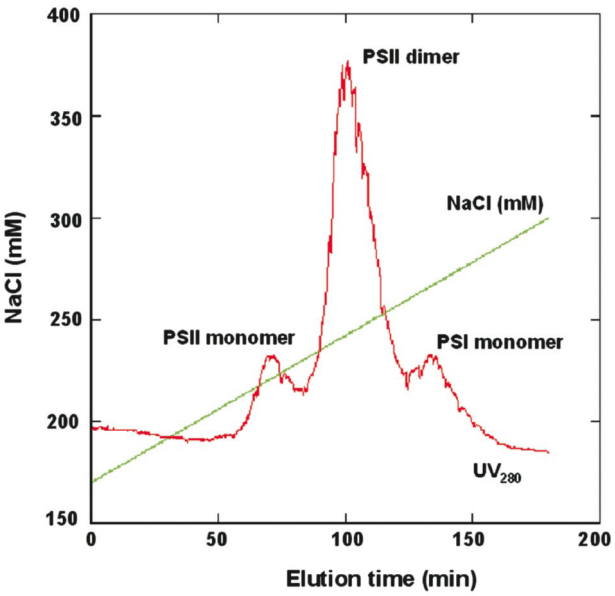

図 3：*T. vulcanus* 由来粗系II（LDAO-PSII）を DDM によって可溶化し，Q Sepharose High Performance カラムにかけた時の溶出パターン．

NaCl）で希釈し，13% PEG 1,450 を加えた後，4 °C，100,000 x*g*，30 min 遠心する．沈殿した系II単量体，二量体をそれぞれ Buffer B に懸濁し，液体窒素に保存する．保存時に 25% glycerol を加えると活性の低下を抑制することができる．

以上の手順で精製される系II二量体は 3 つの表在性タンパク質 PsbO, PsbU, PsbV を結合しており，酸素発生活性は 2,500–3,500 μmole O_2/mg chl/hr になり，chl を基とした収率はチラコイド膜の 3–5%である．収率が著しく低い，あるいは活性が低い場合は精製手順の改良が必要である．こうして精製された系II二量体は結晶化に成功し構造解析されている[18]．

4.b.7.2 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の系IIコア標品の調製[17]

常温性シアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 の系IIは表在性タンパク質の結合が弱く，特に PsbU, PsbV が解離しやすい．従来のように界面活性剤による可溶化，カラムクロマトグラフィーまたはショ糖密度勾配遠心による系IIコア標品の精製も報告されているが，3 つの表在性タンパク質を持った，高い酸素発生能を持つコアの精製は難しく，再現性が低い．そのため，遺伝子工学により系IIサブユニットのうちの 1 つに His-tag をつけ，Ni–カラムによるアフィニティークロマトグラフィーを利用した精製がよく用いられる．以下 CP47 の C 末端に 6 つの His をつけた系IIコアのアフィニティ精製について紹介する[17]．

[実験方法]

チラコイド膜

1．常温性シアノバクテリアの細胞は好熱性のものと同じように高温でリゾチーム処理して，破壊することができないので，ガラスビーズで機械的に破壊する．細胞を集め，Buffer A（40 mM Mes（pH 6.0），25% glycerol，10 mM $MgCl_2$，5 mM $CaCl_2$）に懸濁し，−80℃で凍結する（凍結 ── 解凍により細胞が壊れやすくなる）．
2．凍結した細胞を解凍し，冷やしておいたビーズビーダー（Bead-Beater, Bio-spec Co.）の容器に入れ，直径 100–170 μm のガラスビーズと 1：2 の割合で混ぜる．
3．氷で冷やしながら，10 sec ON，2 min OFF のサイクルを 24 回繰り返し，細胞を破壊する．
4．破壊液を 4 °C，100,000 x*g*，30 min 遠心し，沈殿したチラコイド膜を回収し，Buffer A に懸濁する．

系IIコア標品

1．チラコイド膜を 1 mg chl/ml，0.8% DDM で可溶化し，暗所，氷中，穏やかに攪拌しながら 20 分間処理する．
2．処理液を 4 °C，35,000 x*g*，10 min 遠心し，上清を 0.03% DDM を含む Buffer A（40 mM Mes（pH 6.0），25% glycerol，10 mM $MgCl_2$，5 mM $CaCl_2$）で平衡化しておいた Ni カラムにロードする．
3．カラムを同 Buffer で十分洗浄した後（必要であれば 5–10 mM イミダゾールを含む buffer A で洗浄する），50 mM イミダゾール，0.03% DDM を含む Buffer A で系IIを溶出する．
4．溶出した PSII を Buffer A で 1 倍希釈し，15%になるよう PEG 1,450 を添加し，4 °C，100,000 x*g*，30 min 遠心して沈殿させる．
5．得られた系IIを Buffer A に懸濁し，液体窒素に保存する．

このように精製した系IIコアは酸素発生活性が 2,000–3,000 μmole O_2/mg chl/hr になり，3 つの表在性タンパク質以外に PsbQ-like タンパク質が結合している場合がある．このコアには単量体と二量体が混在しているので，必要であればショ糖密度勾配遠心などを用いて分離する．

参考文献

1）D. A. Berthold, G. T. Babcock, & C. F. Yocum, FEBS Lett. **134** (1981) P.231.
2）T. Suzuki, J. Minagawa, T. Tomo, K. Sonoike, H. Ohta, & I. Enami, Plant Cell Physiol. **44** (2003) P.76.
3）T. Suzuki, O. Tada, M. Makimura, A. Tohri, H. Ohta, Y. Yamamoto, & I. Enami, Plant Cell Physiol. **45** (2004) P.1168.
4）R. Nagao, A. Ishii, O. Tada, T. Suzuki, N. Dohmae, A. Okumura, M. Iwai, T. Takahashi, Y. Kashino, & I. Enami, Biochim. Biophys. Acta **1767** (2007) P.1353.
5）I. Enami, H. Murayama, H. Ohta, M. Kamo, K. Nakazato, & J.-R. Shen, Biochim. Biophys. Acta **1232** (1995) P.208.
6）J.-R. Shen, & Y. Inoue, Biochemistry **32** (1993) P.1825.
7）I. Enami, K. Kamino, J.-R. Shen, K. Satoh, & S. Katoh, Biochim. Biophys. Acta **977** (1989) P.33.
8）M. Ikeuchl, M. Yuasa, & Y. Inoue, FEBS Lett. **185** (1985) P.316.
9）R. K. Mishra, & D. F. Ghanotakis, Photosynth. Res. **42** (1994) P.37.

10) P. J. Smith, S. Peterson, V. M. Masters, T. Wydrzynski, S. Styring, E. Krausz, & R. J. Pace, Biochemistry **41** (2002) P.1981.
11) O. Nanba, & K. Satoh, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **84** (1987) P.109.
12) Y. Ikeda, M. Komura, M. Watanabe, C. Minami, H. Koike, S. Itoh, Y. Kashino, & K. Satoh, Biochim. Biophys. Acta **1777** (2008) P.351.
13) A. Okumura, R. Nagao, T. Suzuki, S. Yamagoe, M. Iwai, K. Nakazato, & I. Enami, Biochim. Biophys. Acta **1777** (2008) P.1545.
14) H. Adachi, Y. Umena, I. Enami, T. Henmi, N. Kamiya, & J-R. Shen, Biochim. Biophys. Acta **1787** (2009) P.121. in press.
15) I. Enami, H. Akitsu, & Y. Kyogoku, Plant Cell Physiol. **27** (1986) P.1351.
16) J.-R. Shen, & N. Kamiya, Biochemistry **39** (2000) P. 14739.
17) Y. Kashino, W. M. Lauber, J. A. Carroll, Q. Wang, J. Whitmarsh, K. Satoh, & H. B. Pakrasi, Biochemistry **41** (2002) P.8004.
18) N. Kamiya, & J.-R. Shen, Proc. Natl. Aca. Sci. USA **100** (2003) P.98.
19) I. Enami, A. Okumura, R. Nagao, T. Suzuki, M. Iwai, & J.-R. Shen, Photosyn. Res. **98** (2008) P.349.