HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	集光装置 (LHC)
Author(s)	得津, 隆太郎; Swingley, Wesley; 皆川, 純
Description	3章 単離・精製・活性測定 4. タンパク質複合体の単離 c
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, 285-287
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39157
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-042.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

4．タンパク質複合体の単離
c．集光装置（LHC）

得津隆太郎[1)]，Wesley Swingley[1)]，皆川　純[1)]

緑色植物における光化学系Ⅰの集光装置はLHCI，光化学系Ⅱの集光装置はLHCIIと呼ばれる膜内在性のクロロフィル／カロテノイド結合タンパク質群である．これらはチラコイド膜上ではそれぞれの反応中心を取り巻くように存在し，太陽光を集め反応中心へ供給している．また，過剰な光を与えた際にその過剰なエネルギーを安全に熱として消去できる機構も兼ね備えている．LHCI，LHCIIそれぞれを精製する手法について述べる．

Light-harvesting proteins

Ryutaro Tokutsu, Wesley Swingley, Jun Minagawa

In green plants, light-harvesting complexes I (LHCI) and II (LHCII) proteins serve as light-harvesting apparatus for photosystem I and II, respectively.　These are chlorophyll-carotenoid binding integral membrane proteins in the thylakoid membranes.　We describe a protocol for isolation of LHCI and that for LHCII proteins by detergent-solubilization of the membranes followed by sucrose density gradient ultra centrifugation.

4.c.1　LHCIタンパク質

高等植物では，光化学系Ⅰコア複合体の片側（PsaG/F/J/Kサブユニット側）に4分子のLHCIタンパク質（以下LHCI）が結合し，PS1-LHCI超複合体を構成している[1)]（PS1-LHCI超複合体は，3.4 aを参照）．緑藻では4分子以上のLHCIが光化学系Ⅰに結合することが確認されているが，まだその構造情報は得られていない．LHCIは，LHCIIとは異なりコア粒子に強固に結合しているため，n-dodecyl-β-D-maltoside（β-DM）による可溶化ではコア粒子から分離されない．LHCIを光化学系Ⅰのコア粒子から分離するためには，イオン強度が上がるZwittergentによる可溶化が有効であると報告されている[2)]．以下のプロトコルは，現在知られているLHCI精製方法のうち，もっとも穏やかなものである．

LHCI精製プロトコル（Croce et al. 1998[2)]を改変）

ホウレンソウチラコイド膜からLHCIを精製する手順を紹介するが，他の材料からもほぼ同様の手順――1）β-DMによるチラコイド膜の可溶化，2）ショ糖密度勾配超遠心法によるPSI-LHCI超複合体の分画，3）Zwittergent存在下で凍結融解を繰り返すことによるLHCIの解離，4）ショ糖密度勾配超遠心法によるLHCIの精製――でLHCIを得ることができる．

［実験方法］

1．精製したチラコイド膜を25 mM MES/NaOH，pH6.5で2度洗浄したのち，終濃度0.8 mg Chl/mLになるよう希釈する
2．β-DM（終濃度0.8%）を1.のチラコイド膜に加え，4 ℃で10分間撹拌しながら可溶化を行う．
3．可溶化したチラコイド膜（0.3～0.5 mL）を0.1～1.3 Mショ糖密度勾配に重層し，超遠心（100,000 g，24時間）を行う．
4．クロロフィル結合タンパク質による緑色のバンドのうち，上から3番目のA 3バンド（PSI-LHCI超複合体画分）を分取する．
5．メンブランフィルター（分子量100,000以下排除）により4.を濃縮した後，界面活性剤を含まないバッファー（25 mM MES/HEPES，pH 6.5-7.5）にてクロロフィル濃度3 mg/mLになるよう希釈する．
6．1% β-DM/0.5% Zwittergent 3-16（終濃度）を加え，4 ℃で1-3時間撹拌する．
7．液体窒素を用いて急速凍結した後ゆっくりと融解させる．これを3度繰り返しPS1コア粒子からLHCIを解離させる．
8．200 mgクロロフィル相当の7.の懸濁液を0.1～1.3 Mショ糖密度勾配（13PAチューブ，日立）に上層し，超遠心（100,000 g，24時間）にて脱離したLHCIを分離する．

超遠心後，通常4本のバンドが得られるが，LHCIモノ

1）北海道大学低温科学研究所

マーは上から一番目，LHCI ダイマーは上から 2 番目のバンドに見られる（図 1）．界面活性剤の作用が強すぎる場合は，1 番目の LHCI モノマーバンドのさらに上に脱離した色素によるバンドが現れる場合がある．

4.c.2 LHCII タンパク質

LHCII タンパク質（以下 LHCII）は，PSII の周辺集光装置として集光および過剰エネルギー消去の機能を持つ．大きく分けて 2 種類の LHCII が知られており，コア粒子に隣接して単量体として存在するものをマイナーLHCII，その外側に位置し三量体を構成するものをメジャーLHCII と呼ぶ[4]．メジャーLHCII の三量体構造の結晶構造は解明されている[3]．メジャーLHCII は緑藻では 4 種類のポリペプチド（LHCII type I〜IV），高等植物では 3 種類のポリペプチド（Lhcb1〜3）で構成され，それぞれのポリペプチドはさらに数個の重複遺伝子によってコードされる[5]．緑藻にはマイナーLHCII として CP29，CP26 の 2 種類が，高等植物にはそれにさらに CP24 を加えた 3 種類が存在する[6]．チラコイド膜を β-DM やオクチルグルコシドなどで可溶化すると，通常全ての LHCII はコア粒子から脱離するが，高等植物ではマイナーLHCII が脱離しない場合もある．

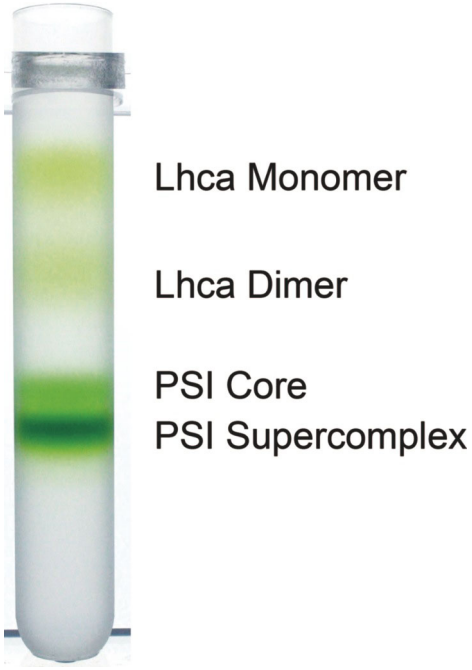


図 1：ホウレンソウより単離したチラコイド膜から光化学系 I 超複合体（PSI-SC）を調製し，Zwittergent 法で LHCI を解離させ，ショ糖密度勾配超遠心によって LHCI を分画した．

LHCII 精製プロトコル
（Minagawa et al. 2001[7] を改変）

本稿では，緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* から精製する手順を紹介するが，他の材料からもほぼ同様の手順――1）β-DM によるチラコイド膜の可溶化，2）ショ糖密度勾配超遠心法による LHCII 画分の分離 ―― で精製することができる．β-DM は 0.8%[8]〜1.0%[9] で用いる．得られた LHCII 画分は，シリンジまたはパスツールピペットを用いて回収する．ゲルろ過及びその他の生化学的解析に用いるためには，ショ糖密度勾配超遠心後，透析によるショ糖の除去が必要となる場合がある．

1．精製したチラコイド膜を 25 mM MES/NaOH，pH 6.5 で 2 度洗浄し，終濃度 0.4–0.8 mg Chl/mL となるように濃度調整した後，β-DM を Chl：detergent 比が 1：8 になるように加え，氷上で 10 分間緩やかに攪拌しながら可溶化する．
2．0.2–0.4 mg Chl 相当（500 μL）の可溶化チラコイド膜を，あらかじめ作製しておいたショ糖密度勾配（0.1–1.3 M sucrose gradient/25 mM Mes/NaOH，pH 6.5/0.03% β-DM/11.5 mL）に重層し，超遠心分離（4 °C，100,000 *g*，24 時間）を行う．
3．クロロフィル結合タンパク質によって形成された緑色のバンドのうち一番上の A 1 バンド（LHCII 画分）を分取する．条件によっては A 1 バンド内にさらに 2 つのサブバンドが確認できるが，その場合上のバンドが LHCII の単量体，下のバンドが LHCII の三量体に相当する（図 2）．

高等植物のグラナ領域（BBY particle）から LHCII を精製する場合，この領域には比較的多くの PSII-LHCII 超複合体が含まれているため，多くの 3 量体 LHCII を得ることが出来る[10]．3 量体 LHCII は，調製前に光処理または phospholipase 処理を行うことで単量体化することが知られている[10]．ショ糖密度勾配超遠心法では，単量体化した 3 量体 LHCII ともともと単量体 LHCII である CP26，CP29 及び CP24 を分離・精製することは困難だが，フラットベッド等電点電気泳動法を用いれば，色素を結合させたままこれらを分離することも可能である．

参考文献

1）A. Amunts, O. Drory, & N. Nelson, *Nature* **447** (2007) P.58.
2）R. Croce, G. Zucchelli, F. M. Garlaschi, & R. C. Jen-

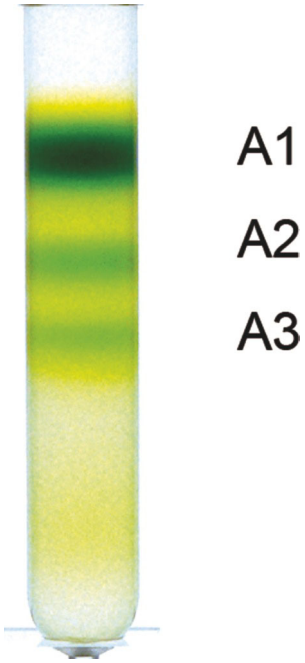


図2：クラミドモナスより単離したチラコイド膜を可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心によってLHCII(A 1)を分画した．

nings, *Biochemistry* **37** (1998) P.17355.
3）Z. Liu, H. Yan, K. Wang, T. Kuang, J. Zhang, L. Gui, X. An, & W. Chang, *Nature* **428** (2004) P.287.
4）J. P. Dekker, & E. J. Boekema, *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005) P.12.
5）J. Minagawa, & Y. Takahashi, *Photosynth. Res.* **82** (2004) P.241.
6）Teramoto, T.-A. Ono, & J. Minagawa, *Plant Cell Physiol.* **42** (2001) P.849.
7）J. Minagawa J, K. C. Han, N. Dohmae, K. Takio, Y. Inoue. *Plant Mol. Biol.* **46** (2001) P.277.
8）A. V. Ruban, S. Solovieva, P. J. Lee, C. Ilioaia, M. Wentworth, U. Ganeteg, F. Klimmek, W. S. Chow, J. M. Anderson, S. Jansson, & P. Horton, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) P.14981.
9）H. Takahashi, M. Iwai, Y. Takahashi, & J. Minagawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (2006) P.477.
10）A. V. Ruban, P. J. Lee, M. Wentworth, A. J. Young, & P. Horton, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) P.10458.