



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光合成細菌の反応中心・アンテナ複合体
Author(s)	大友, 征宇; 小林, 正幸; 大岡, 宏造
Description	3章 単離・精製・活性測定 4. タンパク質複合体の単離 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, 289-294
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39158
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-043.pdf



4. タンパク質複合体の単離

d. 光合成細菌の反応中心・アンテナ複合体

大友 征宇¹⁾, 小林 正幸²⁾, 大岡 宏造³⁾

光合成細菌は原始的で多様なエネルギー獲得変換系を有していることから光合成における最も本質的な課題の1つであるエネルギー獲得と変換機構を物理化学的に研究する絶好なモデル系を提供している。本項では、光合成細菌のエネルギー獲得変換器官である光捕集アンテナ複合体と反応中心の単離精製について述べる。

Isolations of Reaction Center and Antenna Complexes from Photosynthetic Bacteria

Zheng-Yu Wang, Masayuki Kobayashi, Hirozo Oh-oka

Bacterial photosynthesis provides a simplified model system ideally for studying the light energy conversion and pigment-membrane protein interaction. In photosynthetic bacteria, the light energy is absorbed by light-harvesting complexes and then is transferred rapidly and efficiently to the reaction center where the primary charge separation takes place across the membrane and a cyclic electron transport chain is formed. In this chapter, we describe the isolation procedures of these pigment-membrane protein complexes.

光合成細菌の反応中心複合体は膜タンパク質の中で一番最初に高分解能の立体構造が決定されたもので、その単離精製法も比較的早くから確立されている。しかし、以下に示すように反応中心とアンテナ複合体の単離法は光合成細菌の種類によって大きく異なり、扱う菌体に対して個別に条件を検討する必要がある。膜タンパク質の単離全般において、特に可溶化の際光合成膜と界面活性剤との量比が重要なポイントである。

4.d.1 紅色光合成細菌由来の反応中心・アンテナ複合体

これらの複合体が古くから精力的に研究され、単離精製法はほぼ確立されている。材料として光合成膜（クロマトフォア）を使用するので、クロマトフォアの調製については本書3.2bまたは文献¹⁾を参照されたい。

4.d.1.1 紅色細菌の反応中心複合体の調製

これまで3種類の紅色細菌から反応中心の高分解能立体構造が報告されている。これらの複合体の可溶化には両性イオン界面活性剤 Lauryldimethylamine-N-oxide (LDAO) が使われる場合が多い。ここで好熱性細菌

Thermochromatium tepidum を例に取り、反応中心の単離法について述べる²⁾。クロマトフォアのペレットにまず少量の20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.05% (v/v) LDAO (Buffer A) 溶液を加えて毛筆で懸濁する。その後850 nmの吸光度 $A_{850}=50$ になるように濃度を調整する。このクロマトフォア懸濁液にLDAOを0.25% (v/v) になるように加え、40°Cで40分間程度振とうする。この溶液を150000×gで90分間超遠心分離し、上清溶液に可溶化した膜タンパク質が入っている。沈殿物をBuffer Aで懸濁して、再度上記の可溶化処理を25~35分程度行う。超遠心で得られた上清溶液をBuffer Aで一晩透析(MWCO=6000~8000)を行い、過剰のLDAOを取り除く。次に、DEAE陰イオン交換カラム(TOSOH, TSK Gel DEAE-TOYOPEARL 650S)による精製を行う。Buffer Aをカラム体積の5~10倍流すことによってカラムの平衡化を行う。透析後の試料溶液を平衡化したカラム剤に吸着させる。その後、次に示すNaCl濃度勾配法によって反応中心を溶出させる。0 mM: 90分, 0 → 150 mM (linear): 300分, 150 mM: 90分, 150 → 500 mM (linear): 30分, 500 mM: 90分。反応中心は約125 mMから徐々に溶出し始める。純度評価に280 nmと800 nmの吸光度の比 (A_{280}/A_{800}) を用いることが多いが、この段階で $A_{280}/A_{800} = 2 \sim 4$ になる。さらに純度を上げるためには、HPLCによる精製が必要である。DEAE精製後の試料溶液を数mM NaCl, $A_{800}=10$ にな

1) 茨城大学理学部

2) 有明工業高等専門学校 物質工学科

3) 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

るようにフィルター (MWCO=30000) で脱塩濃縮する。得られた試料を $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過して、HPLC カラム (TOSOH, TSK Gel PW タイプ G3000PW 7.8 mm I. D. $\times$ 30 cm) に $100\ \mu\text{l}$ ロードする。カラム流速が $0.5\ \text{ml/min}$ の場合、反応中心が約 15 分で溶出する。HPLC 精製後の反応中心の純度は $A_{280}/A_{800}=1.7\sim 1.9$ となり、典型的な吸収スペクトルを図 1 に示す。

4.d.1.2 紅色細菌のコアアンテナ複合体 LH1 の調製

現在のところ、全ての紅色細菌から反応中心を含まない LH1 の単離ができるわけではなく、LH1 と反応中心との相互作用が強いため単独に LH1 の単離と精製ができない場合が多い。ここでは、比較的容易に LH1 を単離することができる *Rhodospirillum rubrum* の例を示す^{3,4)}。*Rhodospirillum rubrum* は従属栄養光合成細菌で、種々の培地により生育させることが可能である。大量の試料が必要な場合、リンゴ酸もしくはフマル酸を用いる方がよい。リンゴ酸を含んだ培地では生育速度が格段に速く、 $1.2\ \ell$ で約 $10\ \text{g}$ 程度の湿菌体を得られる。Yeast extract がなくても生育するが、得られる菌体量は $5\ \text{g}$ 程度である。LH1 を高い収率と純度で得るために以下の点に注意する。

- (1) 反応中心を除去するために、ある程度強めの界面活性剤の濃度で可溶化する。
- (2) 抽出の間の酸化を抑えるため、LH1 の単離は一日で行い、迅速かつ冷暗所で行う。
- (3) 対数増殖期を過ぎた菌体は使わない。

クロマトフォアを $50\ \text{mM}$ リン酸 (pH 7.0) (Buffer B) で懸濁し、 $880\ \text{nm}$ の吸光度が $A_{880}=40$ になるように調整する。アスコルビン酸ナトリウムを終濃度 $10\ \text{mM}$ で

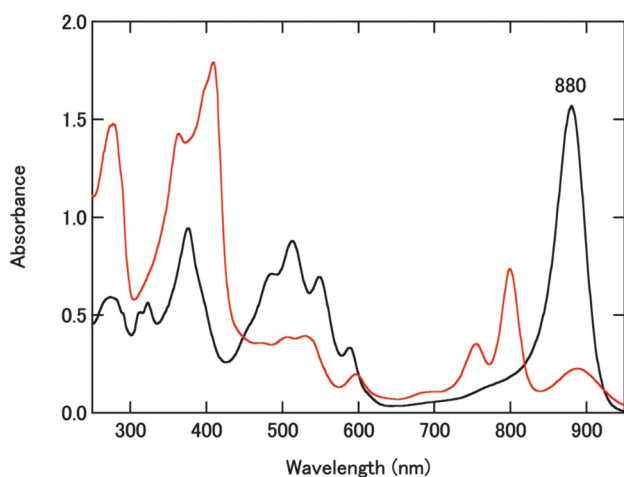


図 1: *Thermochromatium tepidum* 由来 RC (赤) と *Rhodospirillum rubrum* 由来 LH1 (黒) の吸収スペクトル

加える。LDAO を終濃度で 0.35% になるように加えて、室温 (約 23°C) で 60 分間攪拌する。Buffer B により希釈し、LDAO 濃度を 0.1% 程度にする。20% の Triton X-100 溶液を終濃度 0.1% になるように加えて、 $150000\times g$, 60 min, 4°C で超遠心を行う。沈殿物を Buffer B で懸濁し、 $A_{880}=25$ になるように調整する。終濃度が 0.35% となるように LDAO 溶液を加えて、 4°C で 60 分間攪拌する。 $150000\times g$, 60 min, 4°C で超遠心を行った後、上清溶液を透析チューブに入れて、 $50\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 8.0), $0.05\ (\text{v/v})$ LDAO で透析を 4°C で 12~24 時間で行う。透析後の試料を 4°C で陰イオン交換カラム (TOSOH, TSK Gel DEAE-TOYOPEARL 650S $25\times 250\ \text{mm}$) で精製を行う。 $50\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 8.0), $0.09\ (\text{v/v})\%$ LDAO (Buffer C) を用いて、流速 $1.5\ \text{ml/min}$ でカラム体積の約 2.5 倍量程度で平衡化する。LH1 を溶出するための NaCl 濃度条件は 120 分間で $60\ \text{mM}$ から $250\ \text{mM}$ まで直線勾配をかける。LH1 は $100\ \text{mM}$ ~ $130\ \text{mM}$ の間に溶出する。この段階で $A_{880}/A_{280}=2.5$ 以上、 $A_{880}/A_{800}=7.5$ 以上のフラクションが高純度の LH1 を含む。LH1 の典型的な吸収スペクトルを図 1 に示す。精製された LH1 溶液を蒸留水で 1~2 日間 4°C で透析することにより、LH1 の沈殿が得られる。

4.d.1.3 紅色細菌のアンテナ・反応中心複合体 LH1-RC の調製⁵⁾

多くの菌体に適用できる一般的な簡便法としてショ糖密度勾配法が用いられる。クロマトフォアのペレットを $20\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 8.0) 溶液で懸濁し、 $A_{850}=50$ 程度になるように濃度を調整する。この懸濁液に OG (オクチルグルコシド) を終濃度 $1.0\% (\text{w/v})$ になるように加え、室温で 1 時間程度振とうする。この溶液を $150000\times g$ で 90 分間超遠心分離し、上清溶液を $20\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 8.0) と $0.8\% (\text{w/v})$ OG を含む $10\sim 40\% (\text{w/v})$ のショ糖密度勾配で $150000\times g$ 約 12 時間分離する。通常、密度の高いフラクションに LH1-RC が含まれる。この方法は少し不純物を含んだ少量の試料の場合に適しているが、大量 (mg オーダー) かつ高純度の試料を調製する場合、次に述べる精製法が必要になる。ここでは *Thermochromatium tepidum* の例を示す。クロマトフォアのペレットに $20\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 8.5) 溶液を加えて懸濁し、 $A_{850}=50$ になるように濃度を調整する。この懸濁液にアスコルビン酸ナトリウムを終濃度 $10\ \text{mM}$, LDAO を終濃度 0.35% となるように加え、室温で 60 分間穏やかに攪拌する。この溶液を $150000\times g$ で 90 分間超遠心分離し、上清溶液に可溶化した LH2 が回収される。沈殿物を $20\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 8.5) で再懸濁して、LH1 の

Qy ピーク (約 915 nm) が $A_{915}=25$ になるように濃度を調整する。アスコルビン酸ナトリウムを終濃度 10 mM, OG を終濃度 1.0% となるように加え, 室温で 60 分間穏やかに攪拌する。この溶液を $150000\times g$ で 90 分間超遠心分離し, 上清を回収する。次に, 陰イオン交換カラムによる精製を行う。カラムは TOSOH, TSK Gel DEAE-TOYOPEARL 650S (25×250 mm) を用いる。20 mM Tris-HCl(pH 8.5), 0.7% OG を用いて, 流速 1.5 ml/min でカラム体積の約 2.5 倍量程度で平衡化した後, 試料をロードする。LH1-RC を溶出するための NaCl 濃度勾配は 50 mM~150 mM まで 20 分毎に 25 mM ずつ濃度を上げていく。この精製法で高濃度 ($A_{915}>20$), 高純度 ($A_{915}/A_{280}>2.1$) の LH1-RC が得られる。典型的な吸収スペクトルを図 2 に示す。

4.d.1.4 紅色細菌の周辺アンテナ複合体 LH2 の調製

簡便法として界面活性剤 LDAO を用いると LH2 が選択的に抽出される。クロマトフォアのペレットに 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 溶液を加えて懸濁し, $A_{850}=50$ 程度になるように濃度を調整する。この懸濁液に LDAO を終濃度 0.35% (w/v) になるように加え, 室温で 1 時間程度振とうする。この溶液を $150000\times g$ で 90 分間超遠心分離し, 上清溶液に LH2 が抽出される。クロマトフォアに含まれる LH2 の割合が菌体によって異なるが, クロマトフォアの濃度と LDAO 濃度を微調整すれば比較的高純度の LH2 が得られる。他の界面活性剤を使う場合, ショ糖密度法やカラムによる精製が必要である。OG を使う場合の例を示す。クロマトフォアのペレットに 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 溶液を加えて懸濁し, $A_{850}=50$ 程度になるように濃度を調整する。この懸濁液に OG を終濃度 1.0% (w/v) になるように加え, 室温で 1 時間程

度振とうする。この溶液を $150000\times g$ で 90 分間超遠心分離し, 上清溶液を 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) と 0.8% (w/v) OG を含む 10~40% (w/v) のショ糖密度勾配で $150000\times g$ 約 12 時間分離する。通常, 密度の低いフラクションに LH2 が含まれる。カラムによる精製の場合, 前述の LH1-RC を溶出する過程で LH2 を回収することも可能である。LH2 の典型的な吸収スペクトルを図 2 に示す。

4.d.2 緑色光合成細菌由来の反応中心とアンテナ複合体

緑色細菌にはイオウ細菌と非イオウ細菌が存在する。緑色非イオウ細菌の反応中心の性質・構成サブユニットは基本的には上記紅色細菌の反応中心と同じでタイプ 2 (キノン型) 反応中心に分類される。またアンテナ複合体クロロゾームを構成する BChl *c* 会合体の構造はイオウ細菌と非イオウ細菌ではほぼ同じである。ここでは緑色イオウ細菌由来の反応中心 (タイプ 1 (Fe-S 型) 反応中心) とアンテナ複合体を調製する方法について述べる。

4.d.2.1 緑色イオウ細菌の反応中心の調製⁶⁾

緑色イオウ細菌由来の反応中心は非常に酸素に不安定であり, 厳密な嫌気条件下での調製が必要である。以下の操作方法の中で, 膜標品の可溶化, 硫安分画, カラムクロマト等はすべて嫌気グローブボックス (米国・Coy 社製) 内で行わねばならない。また使用する溶液・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。遠心中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か, 超遠心機用ローターを直接嫌気グローブボックス内に持ち込むなどの工夫が必要である。嫌気操作の詳細については本書別項を参照されたい。

【準備する溶液・緩衝液】

- ・緩衝液 A : 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM DTT, 20 mM glucose, glucose oxidase (2 U/ml), catalase (20 U/ml)
- ・緩衝液 B : 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM DTT, 2 mM sucrose monolaurate (SM-1200)
- ・可溶化溶液 1 : 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM DTT, 60 mM β -D-octylglucoside, 1 % Na-cholate, 20% 飽和硫安
- ・可溶化溶液 2 : 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM DTT, 2 mM sucrose monolaurate (SM-1200), 40%

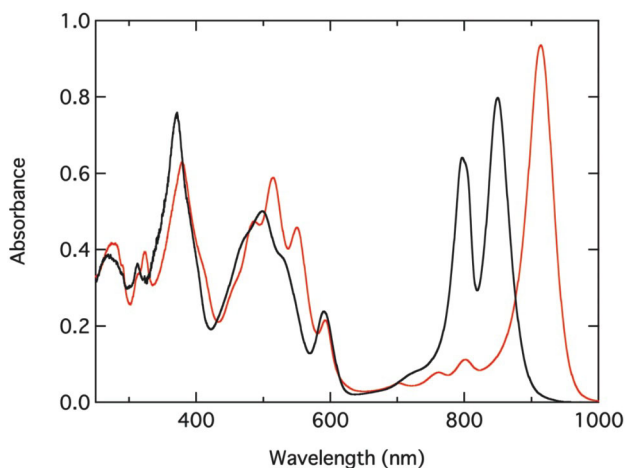


図 2 : *Thermochromatium tepidum* 由来 LH1-RC (赤) と LH2 (黒) の吸収スペクトル

飽和硫安

- 100% 飽和硫安緩衝液：50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM DTT, 100% 飽和硫安

上記の緩衝液には以下の各種プロテアーゼ阻害剤を含む。

- プロテアーゼ阻害剤：1 mM EDTA, 1 mM *p*-aminobenzamidine, 1 mM 6 amino-*n*-caproic acid, 0.2 mM PMSF, 2 μ M E-64, 1 μ M pepstatine

また 1 M DTT 溶液と 100 mM SM-1200 溶液は、作り置きしておくとう便利である。それぞれ粉末を秤量してバイアル瓶に入れ、嫌気グローブボックス内に持ち込んだ後、脱気・窒素ガス交換を行った水を加えて溶かす。

【手順】

材料としては好熱性 *Chlorobium tepidum* を用いる。嫌気グローブボックス内での操作は常温で行うため、一般に熱安定性が期待できる好熱性細菌由来のタンパク質が望ましい。湿重量 30 g の菌体に対し 10 mM cysteine を加えた緩衝液 A, 100 ml で懸濁後、菌体をフレンチプレスで破碎する (glucose oxidase/catalase は処理中に混入してくる酸素をできるだけ除去するために加えている。また cysteine は抗酸化剤として加える)。10000×g, 15 min の遠心で未破碎細胞を除き、110000×g, 60 min の超遠心で膜画分を回収する。ここで回収する膜画分はクロロゾームを含む細胞膜画分であり、反応中心の可溶化においては膜画分を用いる方が操作的には簡便で、収量も高く大量調製に適している。フレンチプレスでの菌体破碎方法および精製細胞膜標品の調製については本書別項を参照されたい。

膜画分を緩衝液 A で懸濁し、5 mg BChl (BChl *a* と BChl *c* の合計)/ml の濃度に調整する。この懸濁液に等量の可溶化溶液 1 を加え、60 分間緩やかに攪拌する。110000×g, 60 min の超遠心で得られた緑色の上清に 1/2 容量の 100% 飽和硫安緩衝液を加え、20 分間緩やかに攪拌する。26000×g, 30 min の遠心後の上清に 1/3 容量の 100% 飽和硫安緩衝液を加え、再度、20 分間の緩やかな攪拌、26000×g, 30 min の遠心を行い、緑色の沈殿画分を回収する。つぎに可溶化溶液 2 を加え、60 分間緩やかに攪拌することにより、界面活性剤の置き換えとともに再可溶化を行う。110000×g, 60 min の超遠心後、反応中心に富む緑色の上清画分が得られる。

可溶化溶液 2 で平衡化しておいた TOYOPEARL HW-65 (TOSOH) のカラム (15 x 30 mm) に上清を吸着させ、1 カラム容量の同溶液でカラムを洗浄する (TOYOPEARL HW-65 はゲル濾過用樹脂であるが、高

い硫安濃度下では疎水クロマトとして使用できる)。30% 飽和硫安緩衝液 (緩衝液 B と可溶化溶液 2 を 1:3 の割合で混合して作る) で濃緑色画分が溶出してくるので、この画分を緩衝液 B で平衡化した Sephadex G25 カラム (11×260 mm) を用いて脱塩する。最後に緩衝液 B で平衡化した DEAE Bio-Gel A カラム (15×40 mm) に通し、素通りで溶出してくる鮮緑色の反応中心画分を回収する。典型的な吸収スペクトルを図 3 に示す。

上記の方法では湿重量 30 g の菌体から $A_{800} = 11-15$ 程度の反応中心標品を約 10 ml 得ることができる。反応中心可溶化の界面活性剤として Triton X-100 を使う方法も報告されているが⁹⁾、 β -D-octylglucoside/Na-cholate の混合界面活性剤による可溶化に比べ、その効率はきわめて低い (筆者らの経験では約 1/10 である)。

4.d.2.2 緑色細菌のアンテナ複合体クロロゾームの調製⁹⁾

ここで、良く研究に用いられてきた好熱性緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* 由来のクロロゾームの単離精製法について述べる⁹⁾。菌体を湿重量で約 15 g とり、10 mM リン酸 (pH 7.0)–2 M チオシアン酸ナトリウム NaSCN 溶液 (SCN 緩衝液) で懸濁し、体積を 200 mL にする。この操作を含め、以下の一連の操作はできるだけ氷水中でサンプルを低温に保ったまま行う。細胞を超音波 (70~100 W, 3 分間×4 回) で破碎する。超音波によって熱が発生するので、変性を防ぐためにこの操作は特に温度が上昇しないように気を付ける。超音波処理した菌体の懸濁液を 25000×g で 20 分間遠心分離し、破碎されなかった細胞や巨大な細胞膜はペレットとなって、遠心チューブのそこに溜まる。ペレットの重さは最初の菌体の湿重量の約 60% になる。遠心後の上清中にクロロゾームが含まれているので、さらに上清溶液を 4℃で

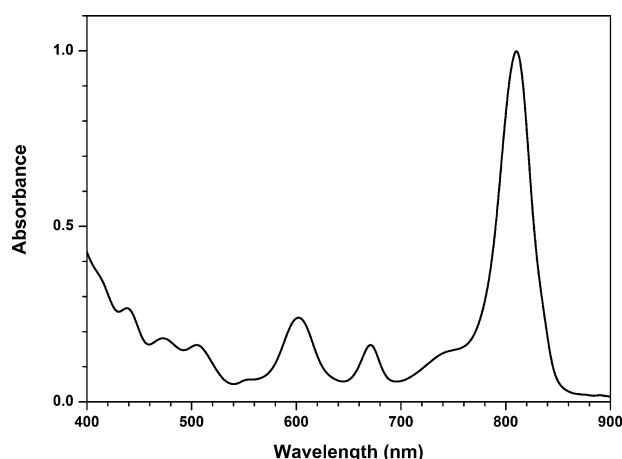


図 3: *Chlorobium tepidum* 由来 RC の吸収スペクトル

150000×g 約2時間超遠心分離する。ここでクロロゾームを含む光合成膜がペレットして得られる。次に、ペレットをSCN緩衝液で体積が15 mL以下になるように懸濁する。懸濁液をSCN緩衝液で調製した15~40% (w/v) のショ糖密度勾配で150000×g 約12時間超遠心分離する。ショ糖密度分離終了後、およそ35%と20%の部分に2つの緑色バンドが出現する。これらのバンドはそれぞれクロロゾームの大部分が外れた細胞膜と、クロロゾームが濃縮されたフラクションである。クロロゾームを上層から簡易ポンプを用いて分取する。この段階でクロロゾームの吸収スペクトルに、細胞膜中のバクテリオクロフィル *a* 由来の807 nmの成分がないことが確認できる。回収したクロロゾームからショ糖やSCN⁻イオンを取り除くため、透析チューブを用いて4℃、20 mM リン酸 (pH 7.0) 緩衝液で透析を2、3回緩衝液を交換しながら1昼夜行う。これらの操作によって純粋なクロロゾーム標品が得られる。その吸収スペクトルを図4に示す。さらに必要に応じて、クロロゾームを超遠心分離でペレットにし、これを凍結乾燥して、固体のクロロゾーム標品を得ることも可能である。菌体湿重量15 gから、乾燥クロロゾームが約200 mg以上得られる。

4.d.3 ヘリオバクテリア由来の反応中心の調製¹⁰⁾

ヘリオバクテリア由来の反応中心もタイプ1 (Fe-S型) 反応中心に分類され、酸素に対して非常に不安定である¹¹⁾。それゆえ可溶性・精製においては上記4.d.2.1で説明したような嫌気的手法が必要である。しかしアンテナ複合体を持たないために細胞膜標品の調製は簡便であ

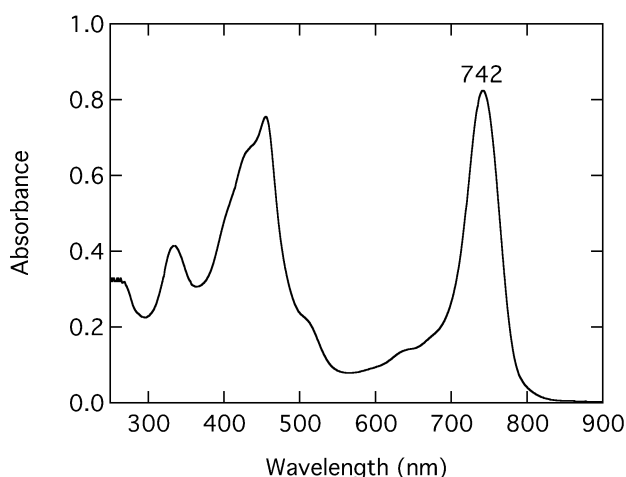


図4: *Chlorobium tepidum* 由来クロロゾームの吸収スペクトル

り、湿重量1-2 g程度の菌体から各種分光測定に必要な量を容易に調製することが可能である。

【準備する溶液・緩衝液】

- ・緩衝液A: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DTT, 1 mM EDTA
- ・緩衝液B: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM SM-1200
- ・緩衝液C: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM SM-1200, 40% 飽和硫安
- ・100% 飽和硫安緩衝液: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 100% 飽和硫安
- ・ショ糖溶液: 緩衝液Bに30%および35% (w/v) のショ糖を加えて作る。

【手順】

材料としては好熱性 *Helibacterium modesticaldum* を用いる。湿重量1-2 gの菌体に対し緩衝液A, 6 mlに懸濁後、菌体をフレンチプレス (20000 psi, 3回) で破碎する。12000×g, 10 minの遠心で未破碎細胞を除き、180000×g, 60 minの超遠心で細胞膜画分を回収する。緩衝液AでA₇₉₀=30となるように懸濁し、界面活性剤SM-1200を終濃度20 mMとなるように加え、60分間緩やかに攪拌する。180000×g, 60 minの超遠心で得られた褐色の上清を、ショ糖密度勾配遠心 (30%, 35% (w/v) の段階勾配) にかける。450000×g, 120 minの超遠心後、反応中心に富む濃褐色のバンドが30%と35%ショ糖溶液の界面に形成される。この反応中心画分を回収し、100% 飽和硫安緩衝液を加えて硫安濃度が40%飽和になるように調整する。その後、緩衝液Cで平衡化しておいたTOYOPEARL HW-65 (TOSOH) のカラム (15×40 mm) に吸着させ、1カラム容量の同溶液でカラムを洗浄する。30% 飽和硫安緩衝液 (緩衝液Bと100% 飽和硫安緩衝液を7:3の割合で混合して作る) で濃褐色の反応中心画分が溶出してくる。典型的な吸収スペクトルを図5に示す。

参考文献

- 1) Z.-Y. Wang, M. Kudoh, Y. Ohama, H. Nakatani, M. Kobayashi & T. Nozawa, Photosynth. Res. **51** (1997) P. 51.
- 2) M. Kobayashi & T. Nozawa, Bull. Chem. Soc. Jpn. **66** (1993) P.3834.
- 3) R. Picorel, G. Belanger & G. Gingras, Biochemistry **22**

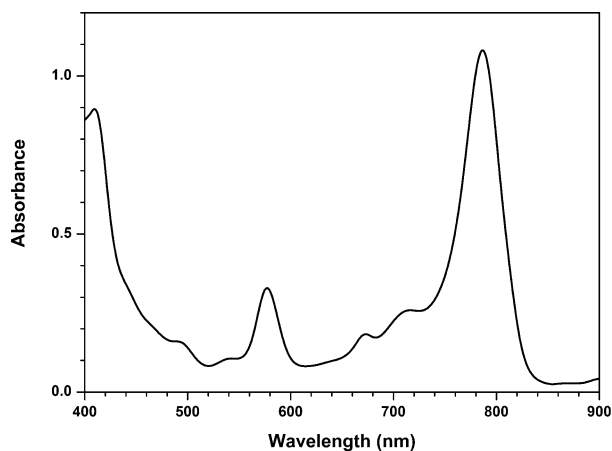


図5： *Heliobacterium modesticaldum* 由来 RC の吸収スペクトル

(1983) P.2491.

- 4) Z.-Y. Wang, M. Shimonaga, Y. Muraoka, M. Kobayashi & T. Nozawa, *Eur. J. Biochem.* **268** (2001) P.3375.
- 5) Z.-Y. Wang, M. Shimonaga, H. Suzuki, M. Kobayashi & T. Nozawa, *Photosynth. Res.* **78** (2003) P.133.
- 6) H. Oh-oka, S. Kamei, H. Matsubara, M. Iwaki & S. Itoh, *FEBS Letters* **365** (1995) P.30
- 7) N. Kusumoto, K. Inoue, H. Nasu & H. Sakurai, *Plant Cell Physiol.* **35** (1994) P.17
- 8) P. Gerola & J. M. Olson, *Biochim. Biophys. Acta* **848** (1986) P.69.
- 9) Z.-Y. Wang, G. Marx, M. Umetsu, M. Kobayashi, M. Mimuro & T. Nozawa, *Biochim. Biophys. Acta* **1232** (1995) P.187.
- 10) R. Miyamoto, M. Iwaki, H. Mino, J. Harada, S. Itoh & H. Oh-oka, *Biochemistry* **45** (2006) P.6306
- 11) H. Oh-oka, *Photochem. Photobiol.* **83** (2007) P.177