



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光化学系Iコクロフィルaの分別抽出法
Author(s)	池上, 勇
Description	3章 単離・精製・活性測定 4. タンパク質複合体の単離 g
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, 309-313
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39161
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-046.pdf



4. タンパク質複合体の単離

g. 光化学系 I コアクロロフィル *a* の分別抽出法

池上 勇¹⁾

本稿では光化学系 I 反応中心複合体に結合している約 150 分子のクロロフィル *a* の有機溶媒による分別抽出法について述べている。水飽和度が 70%~80% のジエチルエーテルで処理することにより、*Chl a*/P700 比が約 10 の標品を得ることができる。

Selective Extraction of antenna *Chl a* in the core complex of *Photosystem I*

Isamu Ikegami

This section describes the ether-extraction of PSI-RC complexes with diethyl ether containing water at appropriate saturation level, which leads to the preparation of P700-enriched complexes with the *Chl a*/P700 ratio of about 10.

4.g.1 始めに

光化学系 I 反応中心複合体は 82-83 *kDa* の大きさをもつ *PsaA/PsaB* ヘテロダイマーコアポリペプチドとその周りを取り囲む 9-11 個の小サブユニットからなり、ここに好熱性シアノバクテリア (*Thermosynechococcus elongatus*) では 96 分子の *Chl a* (1 分子の *Chl a* epimer を含む), 22 分子の β -カロテン, 2 分子のフィロキノン, 3 分子の Fe-S cluster, および 4 分子の脂質を結合している (図 1)¹⁾。高等植物エンドウマメ (*Pisum sativum* var. *alaska*) では Lhca1~4 と呼ばれる 4 つの光化学系 I アンテナ色素タンパク質をさらに結合した複合体として得られるが, Lhca を除いた複合体の構造はシアノバクテリアとほとんど同じであり, ここに結合している約 100 分子の *Chl a* 分子の結合位置や配向性も好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* で明らかになった配置とよく一致している²⁾。エンドウマメで位置が同定された 2 分子のフィロキノン, 3 分子の Fe-S cluster, および 5 分子の β -カロテンの位置もシアノバクテリアと変わっていない。

これら複合体に結合しているクロロフィルなどの cofactors の大部分は複合体の主成分である *PsaA/PsaB* ポリペプチドに結合しているため (図 1), タンパク質的な分離精製法ではクロロフィルなど脂溶性の分子数を減少させることはできず, そのため, 反応中心部に存在する P700 などの特殊なクロロフィルの分光学的挙動を解析することは困難である。一方, 極性の高い有機溶

媒を用いることによって, クロロフィルなどの脂溶性成分を抽出することはできるが, 多くの場合は, 同時に反応中心部に存在するクロロフィル (P700 など) も抽出・破壊される上, 抽出後のタンパク質も変性させるので, 分光学的解析に適した標品を得ることは難しい。

本項で述べるジエチルエーテル抽出法³⁾は, 光化学系 I コアポリペプチドの外縁部は疎水的環境にあり, 一方,

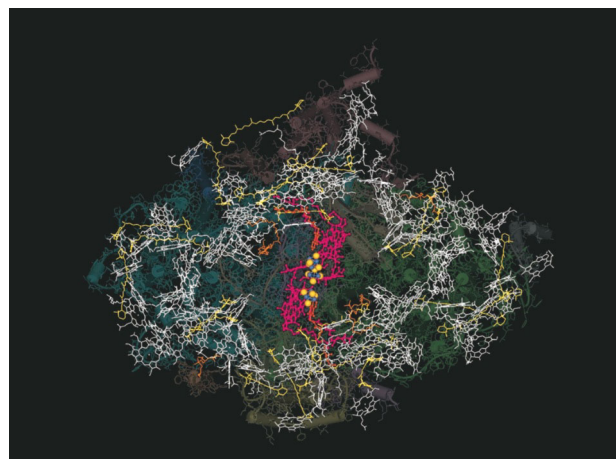


図 1: (II Fig1. jpg)

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の光化学系 I 反応中心複合体の結晶構造図¹⁾。光化学系 I 複合体は 12 個のポリペプチド, 95 分子のクロロフィル *a* (周辺部のアンテナクロロフィル *a* を白色, 中心部のコアクロロフィル *a* を赤色で示す), 1 分子のクロロフィル *a* エピマー, 22 分子の β -カロテン (黄色), 3 組の 4Fe-4S クラスター, 2 分子のフィロキノン (ビタミン K1) (赤橙色), 4 分子の脂質 (3 分子のホスファチジルグリセロール, 1 分子のモノガラクトシルジアシルグリセロール) (茶色) が有機的に組み合わさって構成されている。図はその複合体をチラコイド膜面に対して上 (ストロマ側) から見たときのクロロフィル配向構造を強調して示している。Protein Data Bank ID (1JB0) より作図。

1) 帝京大学薬学部

電荷分離を起こすポリペプチド中心部は親水的環境にあることを利用したクロロフィル分別抽出法である。極性の低い複合体外縁部に結合したクロロフィルから優先的に抽出除去していくことにより、極性の高い反応中心部に結合している P700 などのクロロフィルを色素的に精製できる。この方法で得られた標品を用いて、反応中心部のクロロフィルの詳細な分光学的解析が可能になった。また、この方法により、クロロフィルのほかに、極性の低い β -カロテン、フィロキノン、脂質を容易に抽出できるが、抽出後のポリペプチドの構造は変性せずに保たれるため、クロロフィルを始め、フィロキノンなど脂溶性成分の再構成実験も可能になった^{3,4)}。

4.g.2 調製法

4.g.2.1 ホウレンソウ光化学系 I 複合体の単離⁵⁾

エーテル抽出を行うために、適切な標品を選ぶ必要がある。ここでは、抽出に適したホウレンソウ光化学系 I 複合体調製法を示す (図 2)。

【光化学系 I 複合体調製に関する注意点】

- 1) 材料は高等植物であればホウレンソウ以外を用いてもよい。高等植物以外 (藻類, シアノバクテリア, 光化学系 I 型光合成細菌) では、エーテル処理に対する反応中心クロロフィルの抵抗性が低いため、分別抽出ができない場合がある。
- 2) 調製に用いる Buffer solution* の組成: 50 mM phosphate buffer (pH 8), 50 mM NaCl, 0.4 M sucrose.
- 3) 葉緑体可溶化時のジギトニン濃度は 3-5% (w/w) (液量は 100 mL~200 mL)。この条件ではジギトニンは完全には可溶化せず、粉末との平衡状態 (飽和濃度) を保ちながら攪拌する。可溶化溶液に $MgCl_2$ を加えるのは、葉緑体膜の stacking (ストロマラメラとグラナラメラの構造がはっきり区別できるようにすること) を起こし、光化学系 I と II の分離を容易にするためである。
- 4) 光化学系 I 複合体の調製にはジギトニン以外の表面活性剤 (Triton X-100, Dodecyl maltoside など) を使うことも可能であるが、その場合は、次のエーテル処理においてクロロフィルの分別抽出の効率が悪くなる。
- 5) 126,000 g, 20 min の遠心で光化学系 II 複合体が沈殿、除去される。この沈殿の上部を取って $Chl\ a/P700$ 比を測定する。この比が 5.5 以下の場合は回転数を上

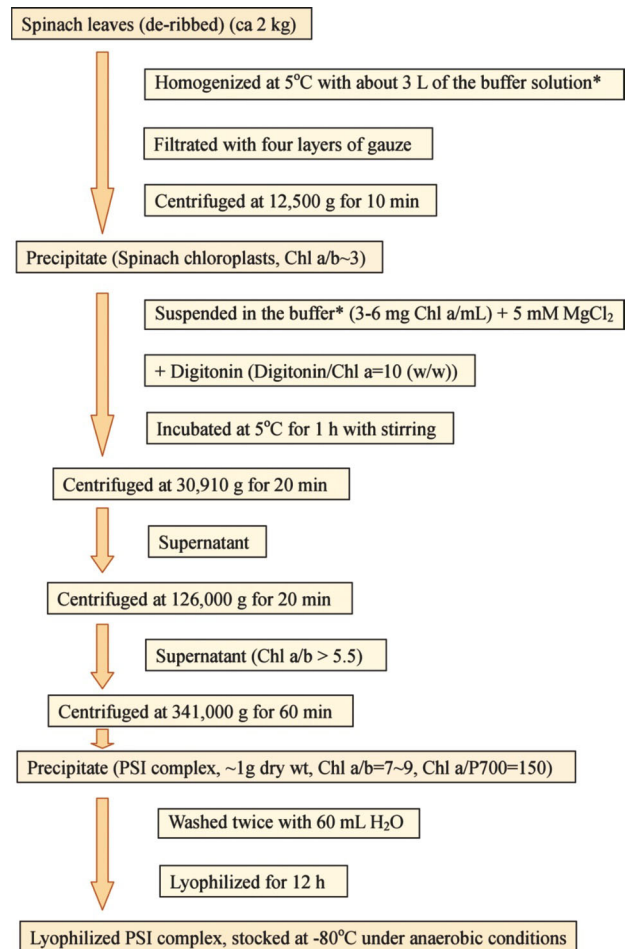


図 2: ホウレンソウ葉からジギトニン処理による光化学系 I 複合体の調製法

- げて再度、遠心し、5.5 以上のときの上清を用いる。
- 6) 得られた光化学系 I 複合体は光化学系 I 反応中心複合体に光化学系 I アンテナ色素複合体 (*Lhca*) が一部結合している。 $Chl\ a/P700$ 比は約 150 である。*Lhca* は次のエーテル処理後の可溶化操作で不溶性沈殿として除去できる。
- 7) 凍結乾燥する前に緩衝液成分やジギトニンをできるだけ除くために、蒸留水で 2 回洗う (沈殿をよくほぐして同じ遠心操作を繰り返す)。調製に用いた試薬類が残っていると、凍結乾燥後のサンプルがふわふわした粉末状にならず、次のエーテル処理ができない。
- 8) 凍結乾燥した光化学系 I 複合体は薬包紙に分包、さらに、アルミホイルで包んで遮光し、真空容器に入れて空気を除き、窒素ガスと置換して $-80^{\circ}C$ で保存する。数年間保存できる。

4.g.2.2 エーテル抽出法^{3,5)}

エーテル抽出法を図 3 に示す。

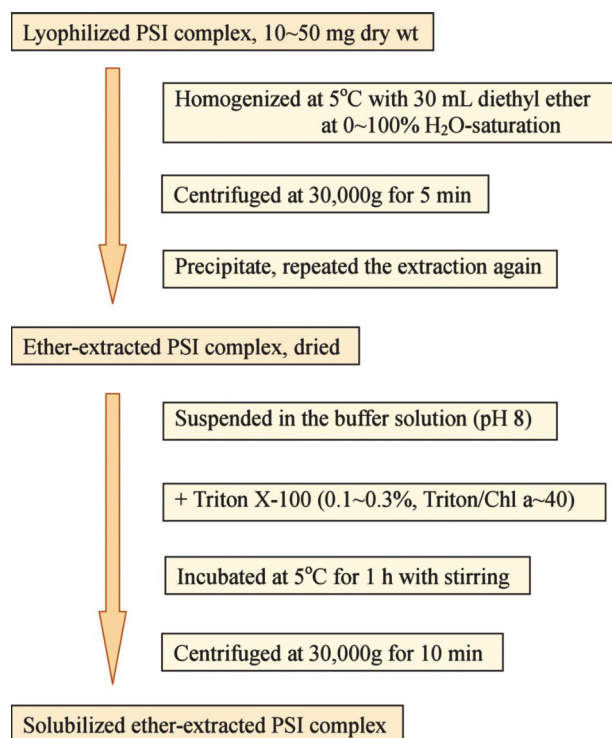


図3：光化学系 I 複合体のエーテル処理法

【エーテル処理に関する注意点】

- 1) 一回の処理で 10 mg~50 mg の凍結乾燥した光化学系 I 複合体を用いる。乾燥重量当り約 1/10 が *Chl a* 量となる。秤量の際、空気中の湿気を吸って重量が徐々に増加するので、標品を室温に戻した後、湿度の低い環境下（湿度 50% 以下が望ましい）で金属製遠心管に量り取る。
- 2) 遠心管をパラフィルムなどで密封し、低温室（5°C）に入れる。
- 3) 水飽和度の異なるエーテル約 80 mL（抽出 2 回分）を以下のように調製し、5°C に保っておく。
 (100% 水飽和 エーテル x mL + 0% (dry) エーテル y mL)
 ① 水飽和エーテルの調製：500 mL のジエチルエーテルに 10 mL 以上の水を加え、よく攪拌して一昼夜放置する。100% 水飽和エーテルは 5°C で約 1% (v/v) の水を含んでいる。5°C 保存。
 ② 乾燥エーテルの調製：500 mL のジエチルエーテルに 10 g 以上の無水硫酸ナトリウムを加え、よく攪拌して一昼夜放置する（これを dry-または 0% 水飽和エーテルと呼ぶ）。5°C 保存。
- 4) エーテル抽出操作は温度（5°C）と低温室内の湿度に注意する。湿度が高くと、操作中に水分がエーテル中に入り、エーテルの水飽和度が増し（時には水過飽和

になる）、期待された結果が得られないことがある。また、夏は外気温度が高いので、操作中、室温に晒すと、エーテルの温度やエーテル水飽和度が増えるので、遠心操作はできるだけ手早く外気に晒さないよう行うことが重要である。

- 5) 標品は一回あたり約 40 mL のジエチルエーテルで抽出処理する。遠心管にエーテルを少量加え、固まりが無いようブラシ（有機溶媒抵抗性のもの）でよくほぐしてから、残りのエーテルを加える。この操作をもう一回繰り返す。色素のほとんどは一回目の操作で抽出される。二回目の遠心による上清は薄い緑色である。上清（エーテル抽出液）は捨てる。
- 6) 抽出後の標品に残ったエーテルは完全に飛ばす（数分で自然乾燥する）。
- 7) エーテル臭が無くなったなら、1 mL のリン酸緩衝液（20-50 mM Phosphate buffer, 50 mM NaCl, pH 8）に懸濁させる。このとき、緩衝液の pH を酸性にすると、細かく分散しない（標品が凝集しやすい）。アルカリ性にするとより可溶化する。
- 8) 0.1~0.3% Triton X-100 により可溶化しないものが薄緑色~灰白色の沈殿として除かれる。ここに色素が完全に抽出された（Triton X-100 で可溶化されない）*Lhca*-アポタンパク質が含まれる。
- 9) 遠心の上清は -80°C で保存する。
- 10) ジエチルエーテル以外の有機溶媒ではアセトンが類似の性質を示すがジエチルエーテルほど有効ではない。アルコール類はクロロフィルを非特異的に抽出するので P700 の分別濃縮はできない。ジエチルエーテルに数%のアセトアルデヒドを加えることによって、クロロフィルの分別抽出の効率をやや高めることができるが、Triton X-100 による可溶化の効率が低下する。
- 11) アンテナ色素タンパク質および光化学系 II 複合体に結合しているクロロフィル類はこのエーテル処理によりほぼ完全に抽出される（すなわち、P680 の分別濃縮はできない）。そのため、凍結乾燥した葉緑体を用いてエーテル処理することにより、ほぼ同様な P700 が分別濃縮された標品を得ることができる。
- 12) 好熱性シアノバクテリア（*Thermosynechococcus elongatus*）でも同様な P700 の分別濃縮標品を得ることができる⁶⁾。しかし、光化学系 I タイプの光化学系を持つヘリオバクテリア（*Helio bacterium chlorum*）ではエーテル処理はそれほど有効ではない⁷⁾。また、クロロフィル *d* を持つアカリオクロリス（*Acaryochloris marina*）では、クロロフィルの分別抽出はできない

(Unpublished data).

4.g.3 エーテル抽出標品の性質

4.g.3.1 クロロフィルの抽出

図4はジエチルエーテルの水飽和度を変えたときの *Chl a*, *b* および P700 の抽出%を示している。dry (0%-water-saturated) ether では *Chl a* の約60%が抽出されるが、P700 は全く抽出されない。エーテルの水飽和度を高めるにしたがって *Chl a* はさらに抽出され、70%水飽和エーテルで約90%の *Chl a* が、また、100%水飽和エーテル (water-saturated ether) で95%以上の *Chl a* が抽出される。一方、P700 は70%水飽和エーテルまではほとんど抽出されず、それ以上の水飽和度で徐々に抽出される。その結果、P700 当りに存在する *Chl a* の分子数は抽出前の150 から10程度にまで低下する^{3,5)}。

4.g.3.2 クロロフィル以外の成分の抽出

表1は光化学系I複合体を構成している成分に対するエーテル処理の効果をまとめている。この処理によって、 β -カロテン、脂質 (ホスファティジルグリセロールとモノガラクトシルジアシルグリセロール) およびキノン電子受容体 (フィロキノン) は完全に抽出されるが、それ以外の電子伝達に関与するクロロフィル成分 (P700, A, A₀) および FeS クラスター (F_x, F_A/F_B) は抽出されない。ポリペプチド成分は抽出前と変わらず、脂溶性成分が除かれたタンパク質部分も非可逆的な変性は受けていない (脂溶性成分の再結合により機能が回復する)³⁾。

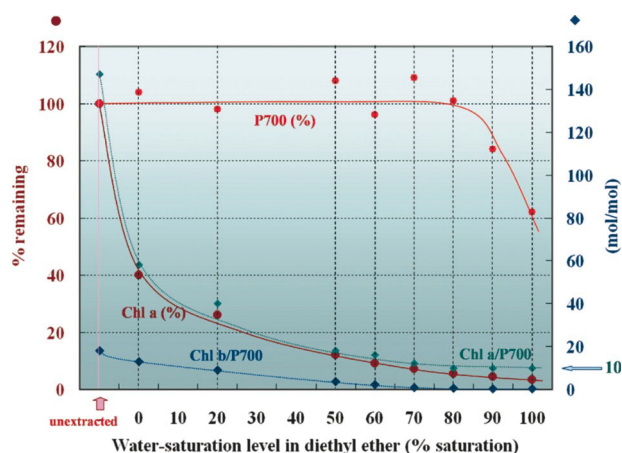


図4 : (II_Fig4.jpg)

ジエチルエーテルの水飽和度を変えたときの *Chl a*, *Chl b* および P700 の量変化. 赤丸, 左目盛りは, 処理前の量を100%としたときの各処理後の標品に残っている *Chl a* および P700 の%量. ひし形, 右目盛りは各標品の *Chl a*/P700, *Chl b*/P700 のモル比 (mol/mol)。

表1 : 光化学系 I 反応中心複合体の構成成分に対するエーテル処理効果

PS I Components	Effects of ether treatment
Constituents	
Chl <i>a</i> , <i>b</i>	Selectively extracted
Carotenoids	Fully extracted
Lipids	Almost fully extracted
Polypeptides	Not extracted
Electron carriers	
P700 (Chl <i>a</i> dimer)	Not extracted
A (Accessory Chl <i>a</i>)	Not extracted
A ₀ (Chl <i>a</i> monomer)	Not extracted
A ₁ (Quinone)	Fully extracted
F _x (FeS cluster)	Not extracted
F _A /F _B (FeS clusters)	Not extracted

4.g.4 応用例

本法によって得られた標品を用いた研究応用例は総説^{3,4)}を参照されたい。この標品を用いることによって、① 光化学系 I 反応中心に位置する P700 や A₀ およびその周りに位置するコアアンテナクロロフィルの解析が可能になった⁸⁻¹¹⁾。② 抽出されたフィロキノン結合部位へのフィロキノンおよびその誘導体を用いた再構成実験により、フィロキノン結合部位の解析が可能になった¹²⁻¹⁷⁾。③ フェムト秒/ピコ秒分光による光化学系 I 反応中心近辺のエネルギー伝達・電子伝達の解析が可能になった¹⁸⁻²²⁾。④ クロロフィル誘導体を用いてアンテナ機能の再構成実験を行うことにより、PsaA/B ポリペプチドにおけるクロロフィル結合部位の解析が可能になった²³⁻²⁵⁾。

参考文献

- 1) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, & N. Krauß, *Nature* **411** (2001) P.909.
- 2) A. Amunts, O. Drory, & N. Nelson, *Nature* **447** (2007) P.58.
- 3) I. Ikegami, S. Itoh, & M. Iwaki, *Plant Cell Physiol.* **41** (2000) P.1085.
- 4) S. Itoh, M. Iwaki, & I. Ikegami, *Biochim. Biophys. Acta* **1507** (2001) P.115.
- 5) I. Ikegami, & S. Katoh, *Biochim. Biophys. Acta* **376** (1975) P.588.
- 6) I. Ikegami, & S. Katoh, *Plant Cell Physiol.* **30** (1989) P.175.
- 7) M. Kobayashi, T. Watanabe, I. Ikegami, E. J. van de Meent, & J. Ames, *FEBS Lett.* **284** (1991) P.129.
- 8) I. Ikegami, & S. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta* **851** (1986) P.75.

- 9) I. Ikegami, & S. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta* **934** (1988) P.39.
- 10) P. Mathis, I. Ikegami, & P. Setif, *Photosynthesis Res.*, **16** (1988) P.203.
- 11) M. Kobayashi, T. Watanabe, M. Nakazato, I. Ikegami, T. Hiyama, T. Matsunaga, & N. Murata, *Biochim. Biophys. Acta*, **936** (1988) P.81.
- 12) S. Itoh, M. Iwaki, & I. Ikegami, *Biochim. Biophys. Acta*, **893** (1987) P.508.
- 13) S. Itoh, & M. Iwaki, *FEBS Lett.* **243** (1989) P.47.
- 14) S. Itoh, & M. Iwaki, *FEBS Lett.* **250** (1989) P.441.
- 15) M. Iwaki, & S. Itoh, *FEBS Lett.* **256** (1989) P.11.
- 16) S. Itoh, & M. Iwaki, *Biochemistry* **30** (1991) P.5340.
- 17) M. Iwaki, & S. Itoh, *Plant Cell Physiol.* **35** (1994) P.983.
- 18) S. Kumazaki, H. Kandori, H. Petek, K. Yoshihara, & I. Ikegami, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) P.10335.
- 19) S. Kumazaki, M. Iwaki, I. Ikegami, H. Kandori, K. Yoshihara, & S. Itoh, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) P.11220.
- 20) S. Kumazaki, I. Ikegami, & K. Yoshihara, *J. Phys. Chem.* **101** (1997) P.597.
- 21) S. Kumazaki, I. Ikegami, H. Furusawa, S. Yasuda, & K. Yoshihara, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) P.1093.
- 22) S. Kumazaki, I. Ikegami, H. Furusawa, & K. Yoshihara, *J. Phys. Chem. B*, **107** (2003) P.3228.
- 23) I. Ikegami, & S. Katoh, *Biochim. Biophys. Acta* **1059** (1991) P.275.
- 24) I. Ikegami, S. Satoh, & M. Aoki, *Plant Cell Physiol.*, **48** (2007) P.1092.
- 25) S. Ohtake Y. Morikawa, & I. Ikegami, *Photosynthesis: Energy of Sun.* (eds. by J. F. Allen et al.), Springer. (2008) P.85.